



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE QUIMICO FARMACOBIOLOGÍA**

**MAESTRÍA INSTITUCIONAL EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA**

Biosorción de arsénico (V) en biomasa de *Trichoderma atroviride* cultivada sobre residuos de limón criollo (*Citrus aurantifolia* var. swingle)

**TESIS**

Que para obtener el título de:

**Maestra en Ciencias Biológicas**

presenta:

**Q.F.B. VANIA MARILYN MARÍN RANGEL**

DIRECTOR DE TESIS

Dr. HÉCTOR EDUARDO MARTÍNEZ FLORES

Dr. RAÚL CORTÉS MARTÍNEZ

**Agosto 2011**

# *Índice temático*

<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	2
<b>INTRODUCCIÓN</b>	3

## *Capítulo I*

1. Generalidades	5
1.1 Contaminación del agua y tipos de contaminantes	5
1.2 Contaminación de agua por metales	5
1.2.1 El arsénico como contaminante del agua	6
1.2.2 Efecto del arsénico sobre la salud	8
1.3 Contaminación del agua por arsénico en México	10
1.4 Métodos para la remoción de arsénico en agua	11
1.5 Biorremediación	13
1.6 Proceso de sorción	13
1.6.1 Biosorción	13
1.6.2 Procesos involucrados en la biosorción al emplear microorganismos	14
1.7 Modelos empíricos del proceso de sorción	17
1.7.1 Modelo cinético de primer orden (Lagergren)	17
1.7.2 Modelo cinético de pseudo-segundo orden	18
1.7.3 Modelo cinético de Elovich	18
1.8 Equilibrio de sorción	19
1.8.1 Modelo de Langmuir	20
1.8.2 Modelo de Freundlich	21
1.8.3 Modelo Langmuir-Freundlich	21
1.7 <i>Trichoderma atroviride</i>	22
1.7.1 Generalidades	22
1.7.2 Biomasa fúngica empleadas en la biosorción	23
1.8 Limón criollo ( <i>Citrus aurantifolia</i> var. swingle)	24

1.8.1 El limón como biosorbente	24
1.9. Biosorbentes mixtos	25
<b>2. JUSTIFICACION</b>	26
<b>3. HIPOTESIS</b>	27
<b>4. OBJETIVOS</b>	27
<b>4.1 General</b>	27
<b>4.2 Específicos</b>	27

## *Capítulo II*

<b>5. MATERIALES Y METODOS</b>	28
5.1 Materiales biológicos	28
5.2 Conservación y acondicionamiento de los residuos de limón	28
5.3 Caracterización química de los residuos de limón y biomasa mixta	29
5.4 Caracterización de <i>Trichoderma atroviride</i>	29
5.4.1 Medios de cultivo	29
5.4.2 Obtención de inóculos	29
5.4.3 Cinética de crecimiento de <i>Trichoderma atroviride</i> en medio líquido	30
5.4.4 Cinética de crecimiento sobre residuos de limón	30
5.4.4.1 Preparación de los residuos como sustrato	30
5.4.4.2. Obtención de la biomasa mixta	31
5.5 Experimentos de contacto	31
5.5.1 Cinéticas de adsorción	31
5.5.2 Isotermas de adsorción	31
5.6 Espectroscopia infrarrojo	32
5.6.1 Preparación de los residuos de limón	32
5.6.2 Preparación de la biomasa	32
5.6.3 Biomasa mixta	32
5.6.4 Preparación de las pastillas para el análisis de Espectroscopia infrarrojo por transformadas de Fourier (FT-IR)	33
5.7 Microscopía electrónica de barrido (MEB)	33

## Capítulo III

<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	34
6.1 Caracterización	34
6.1.1 Caracterización de los residuos de limón	34
6.1.2 Caracterización de <i>Trichoderma atroviride</i>	42
6.1.3 Caracterización biomasa mixta	50
6.2 Experimentos de contacto	55
6.2.1 Cinéticas de remoción de As con Residuos de limón	55
6.2.2 Cinéticas de sorción en biomasa muerta de <i>Trichoderma atroviride</i>	58
6.2.3 Cinéticas de sorción en biomasa mixta	62
6.3 Isotermas de adsorción	66
6.3.1 Isotermas de sorción en residuos de limón	66
6.3.2 Isotherma de sorción para biomasa muerta de <i>Trichoderma atroviride</i>	67
6.3.3 Isotermas de sorción para biomasa mixta	68
6.4 pH	71
6.4.1 Efecto del pH en la sorción de As sobre RL-Fe <sub>3</sub>	72
6.4.2 Efecto del pH en la sorción de As usando cm biosorbente biomasa muerta de <i>T. atroviride</i>	73
6.4.3 Efecto del pH en la sorción de As usando cm biosorbente biomasas mixtas	74

## Capítulo IV

<b>7. CONCLUSIONES</b>	76
<b>8. REFERENCIAS</b>	77

## Índice de figuras

Figura 1. Diagrama Eh-pH de especies acuosas de arsénico en el sistema As–O <sub>2</sub> –H <sub>2</sub> O a 25 °C y 1 bar de presión total.	7
Figura 2. Especies químicas del arsénico a diferentes pH.	8
Figura 3. Biotransformación de arsénico inorgánico propuesto por Heinrich.	9
Figura 4. Procesos involucrados en la biosorción con microorganismos	15
Figura 5. Mecanismos de adsorción propuestos por Weber y Smith.	17
Figura 6. Modelos de isotermas de sorción más comunes.	20
Figura 7. Residuos de limón deshidratados a 60°C	34
Figura 8. FTIR de RL antes y después de los tratamientos con FeCl <sub>3</sub> .	38
Figura 9. Mecanismo de adsorción de As en biomasas acondicionadas con Fe.	39
Figura 10. Micrografía residuo de limón (RL) a 500X	40
Figura 11. Cinética y fases de crecimiento de <i>T. atroviride</i> en medio líquido. tratados a diferentes concentraciones de Fe	41
Figura 12. Crecimiento observado de <i>T. atroviride</i> sobre residuos de limón	43
Figura 13. Cinética de crecimiento de <i>Trichoderma atroviride</i> sobre RL con y sin tratamiento de hierro.	45
Figura 14. FTIR Biomasa muerta de <i>T. atroviride</i> antes y después del contacto con As.	47
Figura 15. Micrografías de la micelio vegetativo de <i>T. atroviride</i> antes del contacto con As y después del contacto con As	49
Figura 16. FTIR biomasa mixta autoclave antes y después del contacto con As	52
Figura 17. FTIR biomasa mixta estufa antes y después del contacto con As	53
Figura 18. Micrografías de biomasa mixta por el método de calor húmedo (BMA) y por el método de calor seco (BME)	54
Figura 19. Porcentajes de As en solución y remoción para residuos de limón.	55
Figura 20. Modelos cinéticos aplicados al proceso de biosorción en RL-Fe.	57
Figura 21. Cinética de adsorción de arsénico usando como biosorbente <i>T. atroviride</i> .	59

Figura 22. Modelos cinéticos aplicados al proceso de biosorción en biomasa de <i>Trichoderma atroviride</i> .	61
Figura 23. Cinética de remoción de As usando BME	63
Figura 24. Cinética de remoción de As usando BMA	63
Figura 25. Modelos cinéticos aplicados al proceso de adsorción en BMA.	64
Figura 26. Modelos cinéticos aplicados al proceso de adsorción en BME.	65
Figura 27. Isoterma de adsorción para RL-Fe <sub>3</sub> .	66
Figura 28. Modelos isotérmicos aplicados al proceso de biosorción en biomasa de <i>Trichoderma atroviride</i>	68
Figura 29. Modelos isotérmicos aplicados al proceso de biosorción en BMA.	69
Figura 30. Modelos isotérmicos aplicados al proceso de biosorción en BME.	69
Figura 31. Efecto de la biosorción a diferentes pH en residuos de limón.	73
Figura 32. Efecto de la biosorción a diferentes pH en biomasa muerta de <i>Trichoderma atroviride</i>	74
Figura 33. Efecto de la biosorción a diferentes pH en biomasa mixta tratada por calor húmedo	75
Figura 34. Efecto de la biosorción a diferentes pH en biomasa mixta tratada por calor seco.	75

## *Índice de cuadros*

Cuadro 1. Clasificación taxonómica <i>T. atroviride</i>	22
---	----

## *Índice de tablas*

Tabla I. Caracterización de residuos de limón.	35
Tabla II. Longitud de onda de FTIR para residuos de limón y grupos funcionales correspondientes.	36
Tabla III. FTIR para biomasa de <i>T. atroviride</i> y grupos funcionales correspondientes.	46
Tabla IV. Caracterización química de biomazas mixtas.	50
Tabla V. Longitud de onda de FTIR en biomasa mixta y grupos funcionales correspondientes.	51
Tabla VI. Valores de $q_t$ para RL- Fe3.	56
Tabla VII. Valores de los parámetros cinéticos para residuos de limón	58
Tabla VIII. Valores de $q_t$ para biomasa muerta de <i>Trichoderma atroviride</i> .	59
Tabla IX. Valores de los parámetros cinético en la biosorción de As con <i>T. atroviride</i> .	60
Tabla X. Valores de $q_t$ para ambos tipos de biomasa mixta.	62
Tabla XI. Valores de los parámetros cinéticos de los modelos empíricos para. biomasa mixta	67 65
Tabla XII. Parámetros isotérmicos observados en la retención de arsénico usando como biosorbente <i>Trichoderma atroviride</i>	67
Tabla XIII. Parámetros isotérmicos para la biomasa mixta.	70
Tabla XIV. Capacidad de adsorción de arsénico ( $\mu\text{g/g}$ ) de algunos materiales.	71

## RESUMEN

Los altos niveles de arsénico de origen natural, encontrados en algunos pozos de agua potable de los municipios de Araró y Cuitzeo en el estado de Michoacán, son un problema que causa preocupación ya que pone en riesgo la salud humana de las comunidades existentes en dicha zona. Por lo tanto, es necesario desarrollar métodos de remediación que permitan disminuir la concentración de arsénico del agua que se extrae de los mantos acuíferos contaminados con dicho elemento; para esto es importante que la investigación esté orientada a buscar alternativas para la remoción de arsénico empleando materiales que sean de fácil adquisición, bajo costo, un ejemplo de esto son los residuos agroindustriales y las diferentes biomasaas fúngicas. El objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad de adsorción de arsénico en soluciones acuosas de tres tipos de biomasaas diferentes: residuos de limón, biomasaas muerta del hongo *Trichoderma atroviride* y una biomasa mixta compuesta por el crecimiento de dicho hongo sobre los residuos de limón. Las biomasaas se acondicionaron, y se caracterizaron por medio de análisis químicos para determinar el tipo de componentes mayoritarios que cada una de estas presentaba, posteriormente se realizaron análisis de FT-IR así como de MEB para conocer la morfología de cada uno de las biomasaas utilizadas. Se realizaron experimentos de contacto tipo lote y los sobrenadantes se analizaron por AA-GI y se ajustaron a los respectivos modelos empíricos. Los resultados obtenidos demuestran que en todas las biomasaas se presenta una sorción del tipo química, la biomasa que presenta la mayor capacidad de sorción fueron los residuos de limón siendo aproximadamente 2 veces mayor que las otras biomasaas probadas. Concluyendo que para este tipo de biomasa mixta la remoción no es tan eficiente como lo es si se usan las biomasaas por separado.

## ABSTRACT

The high levels of arsenic from natural origins, found in some drinking water wells in the municipalities of Araró and Cuitzeo, at Michoacan, is a problem that is causing concern because of the risk to the human health of the communities in the area. Therefore, it is necessary to develop remediation methods to reduce the amount of arsenic in water that is extracted from the aquifers contaminated with the element. Consequently, it is important to focus the research on the exploration of alternatives to remove arsenic using available low cost materials; examples of these materials are the agro-industrial waste and the different fungal biomasses. The objective of this investigation was to evaluate the adsorption capacity of arsenic in aqueous solutions of three different types of biomass: lemon waste, dead biomass of fungus *Trichoderma atroviride* and a mixed biomass composed by the fungus grown on the lemon wastes. These biomasses were conditioned and characterized by chemical analysis to determine their major components; later, FT-IR and SEM analyses were performed to determine the morphology of each biomass. Batch-type arsenic adsorption experiments were accomplished and the supernatants were analyzed by AA-IG. The results were adjusted to the respective empirical models. The results show in all biomasses a chemical sorption process. The biomass with the highest sorption capacity was lemon waste and it was approximately two times higher than other biomasses tested. It can be concluded from this results that, for this type of mixed biomass, removal is not as efficient as it is when biomasses were used separately.

## INTRODUCCIÓN

El problema de la contaminación del agua por metales pesados, como el arsénico, está ampliamente distribuido en todo el mundo debido a las diversas actividades humanas, dando como consecuencia alteraciones en la salud humana.

El arsénico es un elemento que se encuentra comúnmente en la atmósfera, suelos, rocas, aguas naturales y organismos. Sus diferentes formas y comportamiento versátil, explican la preocupación existente a nivel mundial acerca de este elemento potencialmente tóxico, por lo que la EPA (Environmental Protection Agency) ha reducido los límites permisibles en agua potable hasta 10  $\mu\text{g/L}$  (EPA, 2008). Se han encontrado concentraciones de arsénico en diferentes zonas de México, incluyendo el Estado de Michoacán, donde los niveles de este elemento en aguas superficiales y subterráneas oscilan entre 0.047 y 3.81  $\text{mg/L}$  (Alfaro *et al.*, 2007; Páez, 2008).

La biosorción es un proceso en el cual materiales de origen natural son utilizados para retener metales pesados y metaloides por vías metabólicas o por procesos fisicoquímicos (Sathishkumar *et al.*, 2008). Es una alternativa prometedora para tratar efluentes contaminados, por su bajo costo y alta capacidad de retención de estos elementos. Un biosorbente se puede definir como aquel que es abundante en la naturaleza, o bien un subproducto o material de desecho de alguna industria o actividad humana. Para la remoción de metales y metaloides, algunas veces se prefiere el uso de células muertas de biomasa o no viables, ya que se pueden obtener grandes cantidades de ellas fácilmente y son económicas como subproductos de la industria biotecnológica. La biosorción en este tipo de biomasa muerta es, por lo general, más rápida. Otra ventaja de utilizar biomasa muerta es la fácil recuperación del metal o metaloide adsorbido, lo cual permite la regeneración de ésta.

En la literatura se han reportado diferentes materiales biológicos en la remoción de metales pesados. Sin embargo, existe poca información sobre la retención de arsénico en residuos de limón y biomasa del hongo *Trichoderma sp.*; por ello el objetivo de este trabajo fue realizar estudios que establecieran parámetros básicos sobre el comportamiento de estos materiales biológicos en los procesos de retención de arsénico.

El presente trabajo se divide en cuatro capítulos en el primero se mencionan las generalidades sobre el tema de la contaminación del agua por metales pesados y arsénico, los

problemas de salud ocasionados por el arsénico, biorremediación y el proceso de biosorción, se menciona el uso de diferentes biosorbentes en el tratamiento de aguas residuales. Se presentan además diferentes modelos empíricos matemáticos para describir el proceso de remoción del As del agua. El segundo capítulo describe la etapa experimental así como los métodos analíticos e instrumentos utilizados para llevar a cabo cada una de las determinaciones utilizadas en la caracterización de los biosorbentes, además también se describen las condiciones de operación utilizadas en los experimentos de contacto tipo lote con soluciones de arsenato de sodio así como el método analítico utilizado para valorar la remoción de arsénico mediante los biosorbentes probados. En el tercer capítulo se presenta la discusión de resultados, también se proponen posibles formas en las que la biosorción se lleva a cabo bajo estas condiciones y con estos materiales. Por último en el cuarto capítulo se muestran las conclusiones a las que se llegó con el resultado de dicha investigación, así como las referencias citadas a lo largo del trabajo.

## Capítulo I

### 1. GENERALIDADES

#### 1.1 La contaminación del agua y tipos de contaminantes

Los recursos de agua en el mundo han sido contaminados debido a las diversas actividades humanas. La contaminación ambiental por metales tóxicos ocurre globalmente debido a la actividad industrial, procesos agrícolas y la generación de basura (Kumari *et al.*, 2005).

Por su naturaleza los contaminantes del agua se pueden agrupar en tres grandes grupos: biológicos, químicos y físicos (Jiménez, 2002); i) Contaminantes biológicos: suelen ser microorganismos que provocan enfermedades en el hombre u otras especies. Las más comunes en el hombre son la tifoidea, disentería, salmonelosis, cólera y helmintiasis. Los agentes que las causan entran al agua a través de las heces de humanos o de animales; ii) Contaminantes químicos: provienen de los drenados de minas, desechos solubilizados de la agricultura, derrames de petróleo, plaguicidas, aguas residuales municipales, desechos industriales y compuestos radiactivos. Producen efectos diversos y pueden ser de origen natural o sintético. Algunos son desechados directamente, otros se forman por la reacción de diversos compuestos en el agua y por último una pequeña fracción se forma durante el procesamiento del agua, como pueden ser los compuestos organoclorados. Dentro de éste grupo está el arsénico, el cual suele encontrarse más en las fuentes de agua subterránea que en las fuentes superficiales de agua potable. iii) Contaminantes físicos: son alteraciones de las propiedades físicas del agua, tales como temperatura, color, etc. Su origen y efecto son diversos.

#### 1.2 Contaminación del agua por metales

Elemento traza o vestigial es un término que se refiere a aquellos elementos que existen a niveles de microgramos por litro, en un sistema dado. Algunos de estos están reconocidos por ser nutrientes requeridos por plantas y animales siendo esenciales a niveles bajos pero tóxicos en niveles más altos (Manahan, 2007).

Este grupo de elementos puede provenir de fuentes diversas como pueden ser las actividades agrícolas, industriales (metalúrgicas, papeleras, azucareras), e incluso urbanas y sanitarias (fungicidas, herbicidas e insecticidas). El peligro que estos elementos potencialmente

tóxicos representan es su combinación con compuestos orgánicos presentes en los sedimentos y su ingreso a las cadenas alimentarias, donde puede ocurrir el proceso de bioacumulación (Ponce y Botello, 1992).

Algunos de los metales pesados son tóxicos para los humanos. Estos elementos son, en general, los metales de transición, muchos de ellos tienen una marcada afinidad por el azufre evitando la función de las enzimas; el ácido carboxílico y los grupos amino también se enlazan químicamente con los metales pesados (Manahan, 2007).

Otros, como los metaloides, elementos frontera entre los metales y los no metales, son también contaminantes importantes del agua; el arsénico, el selenio y el antimonio son de interés particular.

### 1.2.1 El arsénico como contaminante del agua

El arsénico (del latín *arsenicum*, y éste del griego αρσενικό) es un elemento natural que forma un  $5 \times 10^{-5}\%$  de la corteza terrestre. Se encuentra ampliamente distribuido en ella con una concentración media de 1.5 y 2 (mg/kg), se ubica en el vigésimo lugar en abundancia en relación con otros elementos. El arsénico es el metaloide mas importante como contaminante del agua (Frankenberg, 2001).

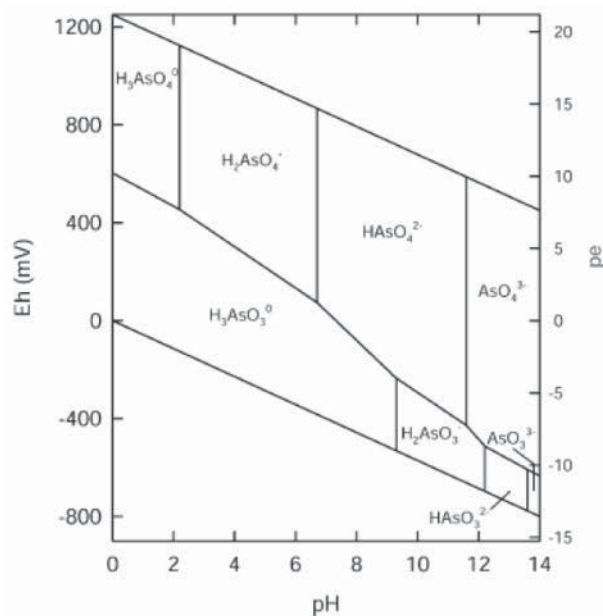
La demanda de agua subterránea de los sistemas municipales y privados y en los pozos de agua potable puede causar disminución de los niveles de agua y la liberación de este metal de las formaciones rocosas (EPA, 2008). La combustión de combustibles fósiles como el carbón introduce grandes cantidades de arsénico en el medio ambiente, gran parte del cual alcanza las aguas naturales (Manahan, 2007).

El arsénico aparece junto a los minerales de fosfato y entra en el ambiente con algunos compuestos de fósforo. Algunos de los minerales primarios que contienen arsénico son: arsenopirita ( $\text{FeAsS}$ ), realgar ( $\text{As}_4\text{S}$ ) y oropimente ( $\text{As}_2\text{S}_3$ ). El arsénico y sus componentes se presentan en forma cristalina, en polvo, amorfa o vítrea. Presenta varias formas alotrópicas: gris metálico, amarillo y negro. Algunos plaguicidas que se usaban anteriormente, particularmente antes de la segunda guerra mundial contenían compuestos de arsénico muy tóxicos (Jiménez, 2002). Por su origen, el arsénico en general, en el agua subterránea se encuentra asociado a otras especies químicas como el flúor, vanadio, y selenio, entre otros (Carro, 2009).

Las formas solubles del As son los iones arsenito ( $\text{AsO}_2^{2-}$ ) y arsenato ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ). De los estados de oxidación del arsénico el más tóxico es el trivalente o forma de arsenito; sin embargo, éste solo se encuentra en aguas subterráneas, mientras que la pentavalente o arsenato en aguas superficiales (Kumari *et al.*, 2005). La oxidación de arsenito en arsenato es lenta y viceversa.

El estado de oxidación del arsénico, y por tanto su movilidad, están controlados fundamentalmente por las condiciones redox (potencial redox, Eh) y el pH. Este metaloide es un elemento que tiene la singularidad de formar oxianiones, debido a su movilidad en los valores de pH típicos de las aguas subterráneas (pH 6.5 a 8.5).

Como aproximación y sin tener en cuenta otros factores como su contenido en materia orgánica, en condiciones oxidantes el estado As(V) predomina sobre As(III), encontrándose fundamentalmente como  $\text{H}_2\text{AsO}_4^-$  a valores de pH bajos (inferiores a 6.9), mientras que a valores de pH más altos, la especie dominante es  $\text{HAsO}_4^{2-}$  (en condiciones de extrema acidez, la especie dominante es  $\text{H}_3\text{AsO}_4$ ). En condiciones de extrema basicidad, la especie principal es  $\text{AsO}_4^{3-}$ . En condiciones reductoras a pH inferior a 9.2, predomina la especie neutra. En las Figuras 1 y 2 se presentan las especies de arsénico en función del pH y Eh (Smedley– Kinniburgh, 2002).



**Figura 1. Diagrama Eh-pH de especies acuosas de arsénico en el sistema As–O<sub>2</sub>–H<sub>2</sub>O a 25 °C y 1 bar de presión total (Smedley– Kinniburgh, 2002).**

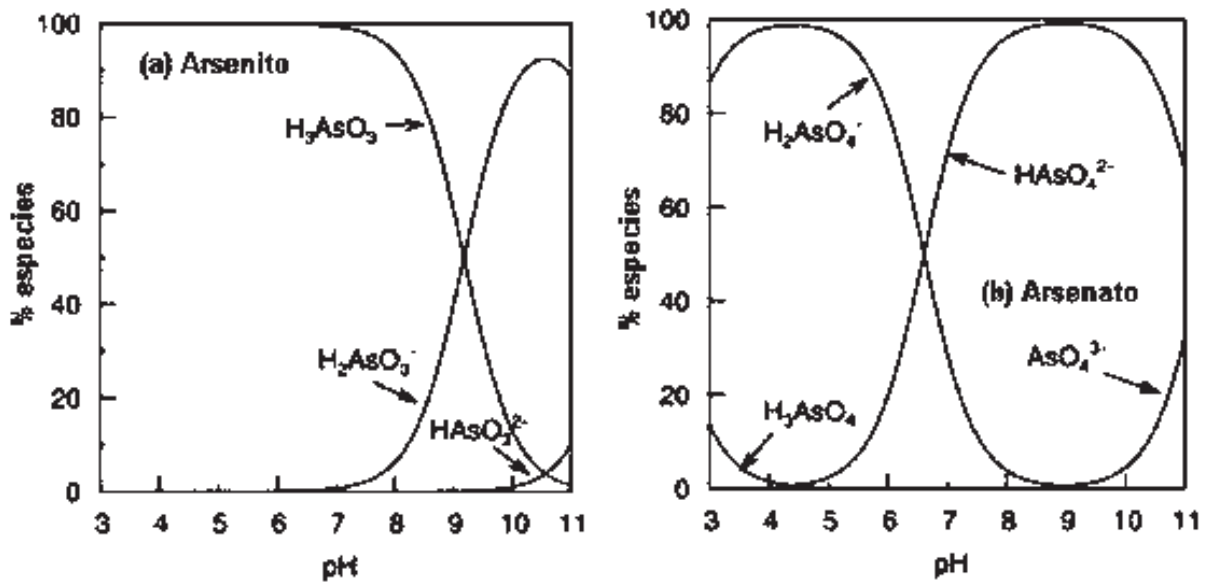


Figura 2. Especies químicas del arsénico a diferentes pH (Smedley y Kinniburgh, 2002).

### 1.2.2 Efecto del arsénico sobre la salud

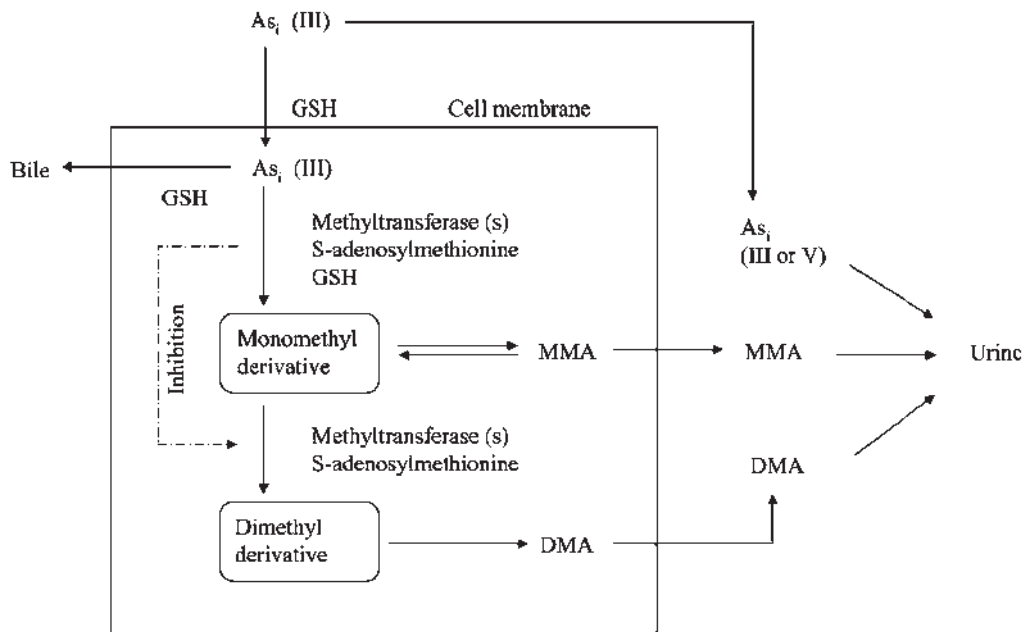
Este metaloide, en cantidades pequeñas ocasiona daños a la salud causando problemas gastrointestinales, dermatológicos, enfermedades cardio-renales, y es considerado altamente carcinogénico (Kumari *et al.*, 2005). El principal aporte de arsénico a la dieta son los alimentos de origen marino, pues los crustáceos y peces comestibles tienen concentraciones más altas de As que otras especies (0.1 a 90  $\mu\text{g/g}$ ). A pesar de esto, el As presente en este tipo de alimento es arsénico orgánico, que es considerado menos tóxico; por su parte, el que se ingiere en el agua de bebida es de origen inorgánico, mientras que el ingreso de As al organismo a través del aire y suelo es mucho menor, pero puede ser importante en poblaciones vecinas a las fuentes de emisión (Albert, 1997), pudiendo ser consideradas dentro de éstas las industriales y la minería (Sharpe, 2003).

La mayoría de los compuestos arsenicales se absorben por tracto gastrointestinal (TGI) cuando se trata de soluciones acuosas, la principal forma química presente en el aire es el As (III), las partículas inhaladas se depositan en las vías respiratorias, y posteriormente transportadas al TGI donde son absorbidas (Albert, 1997).

Los compuestos arsenicales suelen acumularse principalmente en hígado, riñón, pulmón y bazo, aunque el As (III) se une preferentemente a los grupos sulfhidrilo de las proteínas como la queratina, por lo que se deposita en pelo y uñas (Albert, 1997).

En el metabolismo del arsénico (Figura 3) intervienen dos pasos de metilación que dependen del folato: primero, el arsénico inorgánico (InAs) es convertido en ácido monometilarsónico (MMA) por medio de un agente reductor como el glutatión reducido (GSH), el cual a su vez es convertido en ácido dimetilarsínico (DMA), que es menos tóxico. Este proceso facilita la eliminación del arsénico por vía urinaria (Freeman, 2009).

El metabolismo de arsenicales orgánicos es limitado ya que solo un 13 % del MMA se convierte en DMA; sin embargo, una vez que los arsenicales han sido metilados no pueden ser desalquilados.



**Figura 3. Biotransformación de arsénico inorgánico propuesto por Heinrich.**

Ciertos factores nutricionales influyen en el metabolismo del arsénico en los adultos, y se considera que los niveles nutricionales bajos, reflejados en parte por la falta de varias de las vitaminas del complejo B y de antioxidantes, confieren una mayor susceptibilidad a la toxicidad

por arsénico. Se han reportado que los déficits de folato, de vitamina B y del aminoácido cisteína pueden influir de manera adversa en el metabolismo de arsénico en niños (Freeman, 2009).

Los síntomas y signos de la exposición crónica parecen diferir entre los individuos, los grupos de población y las áreas geográficas. Por lo tanto, no hay definición universal de la enfermedad causada con arsénico, lo que complica evaluación de la carga de morbilidad. Del mismo modo, no existe un método para diferenciar los tipos de cáncer internos causados por arsénico de casos de cáncer inducidos por otros factores.

Después de la exposición a largo plazo, los primeros cambios se observan generalmente en la piel: cambios en la pigmentación y después hiperqueratosis. El cáncer es un fenómeno tardío, y por lo general toma más de 10 años en desarrollarse.

La relación entre el arsénico y la exposición en otros efectos de salud sigue siendo poco claro; por ejemplo, algunos estudios han reportado efectos negativos en sistemas como el cardiovascular, pulmonar, neurológico y reproductivo. De acuerdo con un estudio de Sharpe (2003), la exposición a largo plazo para arsénico en el agua potable está directamente relacionado con el desarrollo de arterosclerosis en las arterias que conducen al el cerebro.

Una de las enfermedades más graves ocasionada por arsénico produce una serie de manifestaciones dermatológicas y viscerales que se denomina hidroarsenicismo crónico regional endémico (HACRE). Entre sus efectos destacan lesiones en la piel, vejiga, riñón, hígado, y pulmón (Bocanegra *et al.*, 2002).

### **1.3 Contaminación del agua por arsénico en México**

En México existen regiones en las que se encuentran concentraciones altas de arsénico en aguas subterráneas para consumo humano, como son la Comarca Lagunera, Hidalgo y Guanajuato (Rodríguez *et al.*, 2004).

En la Comarca Lagunera, particularmente en el estado de Coahuila, se tienen reportes en los últimos años de una prevalencia significativamente elevada en lesiones de la piel y hasta cáncer en la población que ha estado expuesta a arsénico. También se ha observado que en todos los casos, la incidencia de los padecimientos aumentó de acuerdo con la edad de los individuos, sugiriendo que el tiempo de exposición puede ser determinante (Valdés y Cabrera, 1999).

En Villa de la Paz y Matehuala (San Luis Potosí) se realizó una evaluación de la contaminación por arsénico y metales pesados en suelo, sedimento y agua, encontrando

concentraciones de arsénico en agua entre 4.8 y 7  $\mu\text{g/L}$  (Monroy *et al.*, 2002). En Zimapán, Hidalgo, se han detectado concentraciones de As entre 0.2 y 0.3 mg/L en agua potable, durante un periodo de 10 años (Rodríguez *et al.*, 2004). Por su parte Quintana *et al.* (2007), encontraron de 0.047 a 0.372 mg/L de As en el río Conchos en Chihuahua.

En Michoacán se detectó la presencia de arsénico en los municipios de Cuitzeo, Zinapécuaro y Cd. Hidalgo (Alfaro *et al.*, 2007, Villalobos *et al.*, 2010). En una investigación realizada por Páez (2008) se reportaron niveles de As que van desde 0.001 hasta 3.812 mg/L en pozos de agua subterránea y manantiales ubicados alrededor del lago de Cuitzeo, siendo la localidad de Araró, en Zinapécuaro, el que presentó el mayor nivel de As. Esto implica un alto riesgo para la salud de la comunidad, ya que el agua de dicho lugar, es usada con fines recreativos en varios balnearios de la zona.

Tomado en cuenta que el límite máximo permisible en agua para consumo humano según la NOM es 0.025 mg/L (DOF, 1994), mientras que la EPA permite solo hasta 0.010 mg/L, la situación de varios de los pozos y sitios analizados en los trabajos mencionados con anterioridad indica el grave problema de contaminación en estos estados del país.

#### 1.4 Métodos para remoción de arsénico en agua

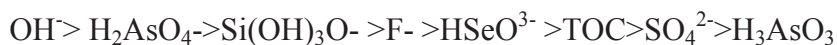
Los tratamientos que han sido desarrollados describen diversos mecanismos mediante los cuales puede removerse el arsénico, los más comunes implican la combinación de sus iones con metales como el hierro, aluminio, principalmente, o itrio y lantano. Estos metales pueden adsorber el arsénico ya que precipitan en forma de hidróxidos (Jiménez, 2007). Debido a que el As (V) es más fácil de remover que el As (III), el tratamiento se inicia con la oxidación del As (III) a As (V). Los oxidantes más utilizados son: cloro, hipoclorito de calcio y permanganato de potasio.

Existen diferentes métodos para la remoción de arsénico en agua siendo los más usados los siguientes (Estrada, 2009):

- I. **Coagulación/filtración:** Es un proceso en el cual las cargas eléctricas de las sustancias coloidales disueltas o suspendidas son neutralizadas con la adición de sustancias insolubles en el agua, lo que permite la formación de partículas mayores o aglomerados que pueden ser eliminadas por sedimentación o filtración. El tipo y la dosis del coagulante y el pH influyen en la eficiencia del proceso. El rendimiento del sulfato de aluminio es ligeramente menor que el del sulfato férrico. A un pH de 7.6 o menor, ambos coagulantes

tienen la misma eficiencia de remoción, sin embargo el sulfato férrico remueve mejor a un pH menor de 7.6. A dosis mayores de 20 mg/L de cloruro férrico ó 40 mg/L de sulfato de aluminio se alcanza una remoción de As (V) de más del 90 %. A bajas dosis de coagulantes la remoción de As (V) es menor.

- II. **Alúmina activada:** Es un tipo de intercambio iónico, donde los iones presentes en el agua son adsorbidos por la superficie oxidada de la alúmina activada. Es altamente selectiva para remover el As (V) y efectiva para tratar agua con alto contenido de sólidos disueltos totales. En la superficie de adsorción de la alúmina activada pueden interferir el selenio, fluoruro, cloruro y sulfato. Este método tiene alta remoción de arsénico a pH 8.2. La alúmina activada absorbe preferentemente  $\text{H}_2\text{AsO}_4^-$  (As (V) más que  $\text{H}_3\text{AsO}_3$  (As(III)) además de otros iones competitivos, como se muestra en la siguiente relación:



**Ósmosis inversa (OI):** este es un proceso de separación por membrana que es capaz de rechazar contaminantes tan pequeños como 0.0001mm. La osmosis inversa es el nivel más fino de filtración posible, puede describirse como un proceso de difusión controlada en que la transferencia de masa de iones a través de la membrana está controlada por difusión. Consecuentemente, este proceso puede llevar a la remoción de sales, durezas, patógenos, turbidez, compuestos orgánicos sintéticos, pesticidas, y la mayoría de los contaminantes del agua potable conocidos hoy en día. El rechazo de sales disueltas de una membrana de OI se encuentra entre el 95 y 99.9 %. El proceso de ósmosis inversa elimina las sustancias disueltas presentes en el agua, forzando la circulación del agua por una membrana semipermeable bajo una presión superior a la osmótica. Tiene una eficiencia de más de 95 % de remoción de arsénico disuelto. Este método es efectivo para remover arsénico de aguas subterráneas. El rendimiento del proceso con ósmosis inversa es afectado principalmente por la turbiedad de hierro, manganeso y sílice.

Los métodos arriba descritos suelen ser eficientes para algunos metales, sin embargo son costosos y algunos de ellos producen lodos tóxicos que después son difíciles de manejar (Sandoval, 2000); por otra parte, los métodos más recientes, conocidos como biorremediación, son un conjunto de métodos que utiliza organismos (plantas, parásitos, incluso microorganismos como hongos y bacterias); dentro de estos métodos está el conocido como biosorción (Maroto *et al.*, 2009).

Una tecnología apropiada para la remoción de metales, en particular en el contexto de los países menos desarrollados, debería abordar los siguientes criterios: (1) la tecnología debe ser de diseño sencillo y fácil de producir, (2) debe ser de bajo costo, (3) se debe utilizar materiales locales y fácilmente accesibles, (4) debe estar enfocado a una zona rural, criterios que cumple la biosorción (Al Rmalli *et al.*, 2005).

## 1.5 Biorremediación

Las medidas biocorrectivas o los sistemas de biorremediación consisten principalmente en el uso de los microorganismos (levaduras, hongos o bacterias) existentes en el medio para descomponer o degradar sustancias peligrosas en sustancias de carácter menos tóxico o bien inocuas para el medio ambiente y la salud humana (Maroto *et al.*, 2009). En el caso de hongos y bacterias se puede usar tanto biomasa viva como muerta.

Mientras que la biosorción es un mecanismo de de inmovilización metales y metaloides en la biomasa; la biovolatilización aumenta la movilidad de metales y metaloides en el medio ambiente. La biovolatilización es una conversión enzimática de los compuestos inorgánicos u orgánicos de metales y metaloides en sus derivados volátiles por medio de una reacción bioquímica intracelular, conocida como biometilación (Styblo *et al.*, 2002, Mukhopadhyay y Rosen, 2002). La biovolatilización y la biosorción son procesos naturales responsables del éxito de la biorremediación de ambientes contaminados con estos elementos. También se han establecido como mecanismos eficaces para la eliminación de metales en condiciones de laboratorio (Čerňanský *et al.*, 2007).

## 1.6 Procesos de sorción

### 1.6.1 Biosorción

La biosorción se refiere a la adsorción pasiva de un metal por diferentes formas de biomasa las cuales pueden ser vivas o muertas (Mogollón *et al.*, 1998).

Volesky (2003) define biosorción como una interacción físicoquímica que puede ocurrir entre metales o metaloides y los grupos amino, carboxilo, sulfato y fosfato de los compuestos celulares (polisacáridos, proteínas y lípidos).

Este método que ayuda a recuperar metales pesados, rápidamente se convirtió en toda una área científica en 1990. En los primeros informes se describe cómo abundantes materiales biológicos que pueden ser utilizados para extraer, a un costo bajo, incluso pequeñas cantidades de metales pesados tóxicos frente a efluentes industriales (Vieyra y Volesky, 2000). Por estas razones este método es una alternativa para eliminar ciertos contaminantes del agua.

El uso de biosorbentes para la eliminación de contaminantes tóxicos o para la recuperación de valiosas fuentes de agua provenientes de aguas residuales, es uno de los desarrollos más recientes en el medio ambiente o la tecnología de bio-recursos. Las principales ventajas de esta tecnología comparadas con los métodos convencionales incluyen no sólo su bajo costo, sino también su alta eficiencia, la minimización de la producción de lodos químicos o biológicos, la capacidad de regenerar biosorbentes, y la posibilidad de recuperación metálica después de la adsorción (Park *et al.*, 2010).

### **1.6.2 Procesos involucrados en la biosorción al emplear microorganismos**

Los procesos por los cuales los organismos interactúan con los metales tóxicos son diversos. Sin embargo, existen en la práctica tres categorías generales de procesos biotecnológicos para el tratamiento de aguas residuales que contienen metales tóxicos: la biosorción, la precipitación extracelular y la captación a través de biopolímeros purificados y de otras moléculas especializadas, derivadas de células microbianas. Estos procesos no son excluyentes y pueden involucrar fenómenos fisicoquímicos y biológicos como se observa en la Figura 4 (Cañizares, 2000).

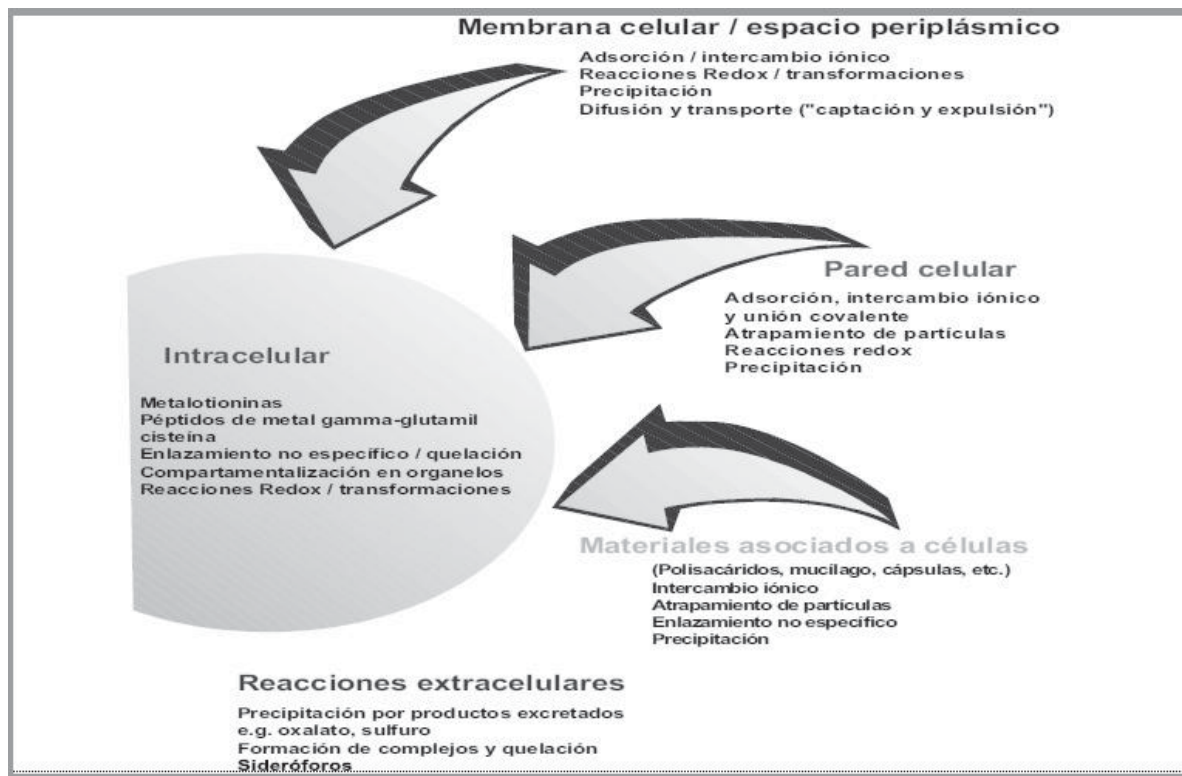


Figura 4. Procesos involucrados en la biosorción con microorganismos (Cañizares, 2000).

### Etapas de la biosorción

La biosorción es un conjunto de técnicas de fácil aplicación y eficientes al lograr sus objetivos en las que es necesario que el biosorbente se encuentre en las mejores condiciones para optimizar la eficiencia de acuerdo a las necesidades particulares del medio en que ha de aplicarse, para ello debe de tomarse en cuenta lo siguiente: el acondicionamiento y la granulación (Flores *et al.*, 2001).

### Mecanismos involucrados en la biosorción

En la literatura se describe cómo se enlaza el metal al adsorbente; se postulan dos mecanismos principales:

- Quimisorción: incluye el intercambio iónico, coordinación, quelatación; e involucra altas energías de enlace entre el adsorbente y la especie metálica.

- Fisisorción: mediante interacciones débiles de tipo dipolar, o por atrapamiento en tamices moleculares.

La complejidad de los biomateriales puede generar mecanismos simultáneos de quimisorción/fisisorción, estos se verifican en las cinéticas y equilibrio de biosorción (Flores *et al.*, 2001).

El proceso de biosorción se puede evaluar y describir por ecuaciones matemáticas, mediante diferentes modelos; dichos modelos desarrollados indican las condiciones óptimas y además predicen condiciones en el rango de las pruebas realizadas, describiendo dos aspectos principales de la biosorción:

- La cinética o dinámica de la biosorción corresponde al estudio de la cantidad que se adsorbe en el tiempo.
- Dependiendo del tipo de adsorbente puede ser el desarrollo más o menos complicado (Aguilar *et al.*, 2009).

La transferencia de un compuesto desde una fase líquida hacia un sitio de adsorción se efectúa en cuatro etapas (Figura 5): la transferencia del compuesto desde el líquido hacia la película cerca al adsorbente sólido (etapa rápida), la transferencia del compuesto a través de la película de líquido cercana de la superficie externa del adsorbente (transferencia de masa externa), la difusión del compuesto al interior de la partícula del adsorbente (difusión intraparticular), y la adsorción propiamente dicha, que es una etapa rápida. La cinética de adsorción está determinada por la etapa más lenta, es decir, la transferencia de masa externa ( $K_f$ ) y la difusión intragranular superficial ( $D_s$ ) y/o porosa ( $D_p$ ). Sin embargo, para la mayor parte de los autores, el efecto de la difusión superficial es mayor al ser comparada con la difusión porosa (Dudamel *et al.*, 2010).

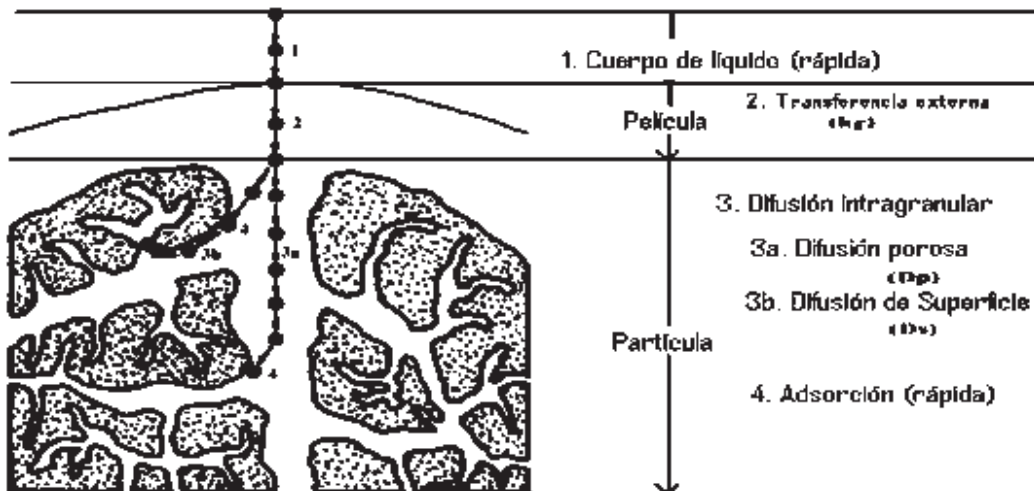


Figura 5. Mecanismos de adsorción propuestos por Weber y Smith.

## 1.7 Modelos empíricos del proceso de sorción.

### 1.7.1 Modelo cinético de primer orden (Lagergren)

Estudios numerosos han reportado que la cinética Lagergren es válida para evaluar la adsorción de metales. La ecuación de velocidad Lagergren fue la primer ecuación de velocidad para el sistema de adsorción de líquido / sólido basado en la capacidad del sólido; y es una de las ecuaciones más utilizadas, representando la tasa de adsorción para la adsorción de un soluto en una solución líquida (Özer *et al.*, 2004). Siendo el modelo matemático el siguiente:

$$q_t = q_e (1 - e^{-(K_L \cdot t)})$$

Donde:

$q_e$  = Es la concentración de As(V) removido en el equilibrio por cantidad de adsorbente ( $\mu\text{g/g}$ )

$q_t$  = Es la concentración de As(V) removido en tiempo  $t$  por cantidad de adsorbente ( $\mu\text{g/g}$ )

$K_L$  = Es la constante de velocidad en el equilibrio de la adsorción de pseudo primer orden (h<sup>-1</sup>)

$t$  = Tiempo (h)

### 1.7.2 Modelo cinético de pseudo-segundo orden

Este modelo fue desarrollado por Ho y McKay (2000), el cual supone que el adsorbato se adsorbe en dos sitios activos de la biomasa. A partir de esta fecha, muchas más investigaciones han reportado un mejor ajuste de los datos experimentales obtenidos a este modelo, con coeficientes de correlación superiores a los de los otros modelos ensayados (Pinzón y Vera, 2009). En este caso, la ecuación de velocidad de la cinética de adsorción se expresa como:

$$q_t = \frac{t}{\left(\frac{1}{kq_e^2}\right) + t/q_e}$$

Teniendo la forma lineal:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{kq_e^2} + \frac{1}{q_e}$$

Donde:

$q_e$  = Es la concentración de As(V) removido en el equilibrio por la cantidad de adsorbente ( $\mu\text{g/g}$ )

$q_t$  = Es la concentración de As(V) removido en el tiempo t por cantidad de adsorbente ( $\mu\text{g/g}$ )

$t$  = tiempo (h)

$k$  = Es la constante de velocidad en el equilibrio de la sorción de pseudo-segundo orden ( $\text{g/mg.h}$ )

### 1.7.3 Modelo cinético de Elovich

Este modelo, de aplicación general en procesos de quimisorción, supone que los sitios activos del bioadsorbente son heterogéneos y por ello exhiben diferentes energías de activación, basándose en un mecanismo de reacción de segundo orden para un proceso de reacción heterogénea.

Este modelo ha mostrado resultados satisfactorios en la identificación del mecanismo controlante en procesos de adsorción de un soluto en fase líquida a partir de un sólido adsorbente (Pinzón y Vera, 2009) La expresión matemática que rige el comportamiento de este modelo es la siguiente:

$$q_t = 1/\beta \ln(1 + \alpha \beta t)$$

Donde:

$q_t$  = Es la concentración de As(V) adsorbido al tiempo t ( $\mu\text{g/g}$ )

$\alpha$  = Es la velocidad de sorción inicial ( $\mu\text{g/g h}$ )

$\beta$  = Constante de desorción ( $\mu\text{g/mg}$ )

$t$  = Tiempo (h)

### 1.8 Equilibrio de sorción

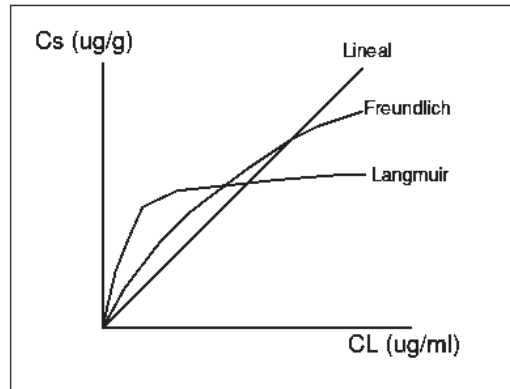
La capacidad de sorción está definida en base a las isotermas de adsorción en disolución. La isoterma de adsorción es la relación de dependencia, a una temperatura constante de la cantidad de adsorbato retenido por el peso unitario del adsorbente, con respecto a la concentración del adsorbato en equilibrio. La gráfica de la isoterma (Figura 6) representa el metal adsorbido ( $C_s$ ) en función de la concentración de la disolución ( $C_m$ ) cuya expresión general es:

$$C_s = K_d * C_m$$

Donde:

$K_d$  = constante de adsorción, coeficiente de distribución o coeficiente de partición.

Cuando la isoterma no es lineal, hay otras aproximaciones para describir la distribución entre el sólido y la disolución. Las más utilizadas son las de Freundlich, Langmuir y la combinación de ambas (Langmuir-Freundlich)



**Figura 6. Modelos de isotermas de sorción más comunes.**

### Modelos que describen la isoterma de sorción

Existen gran variedad de modelos matemáticos empíricos que se han desarrollado para describir las isotermas de adsorción (Slejko, 1985). Los modelos no lineales más sencillos se desarrollaron para sistemas en los cuales la adsorción conduce a la deposición de una monocapa de moléculas de adsorbato, en la superficie del adsorbente. A continuación se describen los que se utilizaron en esta investigación.

#### 1.8.1 Modelo de Langmuir

En este modelo se asume que la energía de sorción de cada molécula es la misma e independiente de la superficie que se cubre. La sorción se produce solamente en determinados lugares y no tiene una interacción entre las moléculas retenidas (Slejko, 1985).

Las consideraciones básicas del modelo de Langmuir son:

- 1) Las moléculas son adsorbidas en sitios definidos en la superficie del adsorbente.
- 2) Cada sitio puede acomodar solamente a una molécula (monocapa).
- 3) El área de cada sitio es una cantidad fija determinada solamente por la geometría de la superficie.
- 4) La energía de adsorción es la misma en todos los sitios.

La ecuación que describe este modelo es la siguiente:

$$q_e = \frac{q_0 a_L C_e}{1 + a_L C_e} = \frac{K_L C_e}{1 + a_L C_e}$$

Donde:

$q_e$  = concentración de soluto adsorbido por unidad en peso de adsorbente.

$C_e$  = concentración de soluto en el equilibrio.

$q_0$  = concentración de soluto adsorbido por unidad en peso de adsorbente requerido para la capacidad de monocapa.

$a_L$  = constante relacionada con el calor de adsorción,  $Q$ , [ $b \propto \exp(-\Delta H/RT)$ ].

$K_L$  = constante de Langmuir, (L/g)

### 1.8.2 Modelo de Freundlich

La ecuación de Freundlich es una expresión empírica que implica la heterogeneidad de la superficie y la distribución exponencial de los sitios de adsorción y sus energías (Faust y Aly 1999). La ecuación se expresa como:

$$q_e = K_F C_e^{1/n_F}$$

Donde:

$q_e$  = concentración de soluto adsorbido por peso de adsorbente.

$C_e$  = concentración de soluto en el equilibrio.

$K_F, 1/n_F$  = constantes características del sistema.

### 1.8.3 Modelo Langmuir-Freundlich

La ecuación de Langmuir describe una adsorción fuerte sobre superficies homogéneas, por lo que se considera el exponente  $n$  que da la heterogeneidad, y como resultado da la ecuación de Langmuir-Freundlich:

$$q_e = \frac{K_{LF} C_e^{n_{LF}}}{1 + (a_{LF} C_e)^{n_{LF}}}$$

Donde,

$q_e$  = concentración de soluto por unidad de peso de biomasa.

$C_e$  = concentración de soluto en la solución.

$K_{LF}$ ,  $a_{LF}$ ,  $n_{LF}$  = constantes empíricas.

## 1.7 *Trichoderma atroviride*

### 1.7.1 Generalidades

Los hongos del genero *Trichoderma* son un grupo de microorganismos que habitan naturalmente en un número importante de suelos agrícolas, con abundante materia orgánica en descomposición y altas densidades de raíces. Su desarrollo se ve favorecido por la presencia de otros hongos que atacan a los cultivos. *Trichoderma* se encuentra ampliamente distribuido por todo el mundo en diferentes zonas de vida, además también suelen hallarse asociados a la superficie de la corteza de la madera descompuesta y suelos naturales, tanto de origen forestal, como de otros substratos orgánicos cuyo componente principal sean la lignina o la celulosa (Agamez *et al.*, 2008). *Trichoderma atroviride* se ha clasificado taxonómicamente como se muestra en el Cuadro 1.

**Cuadro 1. Clasificación taxonómica *T. atroviride***

Dominio	Eukaryota
Reino	Fungi
Subreino	Dikarya
División	Ascomycota
Subdivisión	Pezizomycotina
Clase	Sordariomycetes
Subclase	Hypocreomycetidae
Orden	Hypocreales
Familia	Hypocreaceae
Subfamilia	mitosporic Hypocreaceae
Género	Trichoderma

Fuente: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY628432.1>

Las especies del género *Trichoderma* forman parte de un grupo complejo de hongos filamentosos que se reproducen clonalmente mediante un ciclo de vida asexual en el que se alternan micelio y esporas o conidios. El micelio se caracteriza por poseer hifas más o menos ramificadas, tabicadas y con más de un núcleo por célula. Los conidios poseen un solo núcleo haploide, son ovoides de color verde y se forman sobre estructuras muy ramificadas o conidióforos que a su vez se sitúan sobre células denominadas fialidas (Domsh *et al.*, 1993).

Algunas cepas del género *Trichoderma* secretan quitinasas y glucanasas, permitiendo la degradación de los polímeros de otros hongos (Ej. *Agaricus bisporus*), provocando pérdidas económicas importantes (Dashtban *et al.*, 2009). Aunado a esto, las cepas de *Trichoderma* son conocidas especialmente como agentes de biocontrol. Además de la extraordinaria capacidad celulolítica del género *Trichoderma*, se han identificado otros tipos de enzimas extracelulares como son: celulasas (CMCasa, CBH, BGL,  $\beta$  1-3 glucanasas) y hemicelulasas (xilanasas) (Adams, 2004).

### 1.7.2 Biomosas fúngicas empleadas en la biosorción

El reino fungi además de su asombrosa capacidad de crecimiento y de alcanzar un micelio denso, así como de poseer un amplio rango de diversos tipos morfológicos, son potencialmente capaces de producir varios tipos de enzimas y con ello la capacidad de acumular diferentes tipos de metales, es por ello que las biomosas fúngicas han sido utilizadas no solo en los procesos de biosorción sino también en procesos de bioacumulación (Anjana *et al.*, 2010).

En la literatura se han identificado varios tipos de biomosas que son capaces de retener metales; en el caso de los hongos: *Phanerochaete chrysosporium* es capaz de retener cadmio y plomo (Li *et al.*, 2004), *Aspergillus niger* puede retener cromo, cobre, níquel y zinc (Kovačević *et al.*, 2000), así como también *Penicillium*, *Trichoderma* sp., *Byscoclamyss* sp. y *Mucor* sp. níquel (Mogollón *et al.*, 1998), *Aspergillus fumigatus* arsénico (Sathishkumar *et al.*, 2008; siendo la capacidad máxima de este hongo al retener este metaloide de 0.538 mg/g.

También se ha identificado que la biomasa de *Trichoderma* sp., es eficiente para retener níquel (Mogollón *et al.*, 1998); este hongo está ampliamente distribuido en la naturaleza y se usa

como control biológico para enfermedades en cultivos, la versatilidad metabólica del mismo le permite transformar diferente materia orgánica e inorgánica (solubilización de metales) en nutrientes para su desarrollo.

### **1.8 Limón criollo (*Citrus aurantifolia* var. *swingle*)**

Pertenece a la familia de las Rutaceae; es un árbol vigoroso, de porte erguido, con brotes color púrpura que después cambian a verde; sus hojas están alternas, relativamente pequeñas en comparación con otros cítricos (5 a 7 cm de longitud) y con pecíolos estrechamente alados, aromáticos. Posee flores en grupos de 2 a 7 en la axila de las hojas, muy aromáticas, blancas. El fruto es pequeño, con alrededor de una a dos pulgadas de diámetro y es redondo. Su pulpa es verde-amarillenta, jugosa, con semillas y más ácida que las limas. La fruta tiene una corteza suave y con una piel verde cuando está inmadura y más amarilla en su madurez, con una papila apical. (Anónimo, 2010)

El limón mexicano fresco prácticamente en su totalidad se consume en el país, con exportaciones marginales menores al 4% de la producción. El aceite esencial destilado es el principal subproducto de exportación, la cual se hace a través de grandes comercializadoras internacionales que a su vez lo venden a las grandes refresqueras (Puente, 2002).

Michoacán es el segundo estado productor de limón criollo en el país, contribuyendo entre 350 y 405 mil toneladas por año (Anónimo, 2009); los municipios involucrados en la producción de este fruto son principalmente Aguililla, Apatzingán, Tepalcatepec, Buena Vista y Parácuaro.

#### **1.8.1 El limón como biosorbente**

El uso básico de la cáscara de limón es para la producción de aceites esenciales y pectinas. Experimentos recientes han mostrado que la cáscara de limón remueve metales como plomo y cadmio (Millan *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que la pectina presente en algunos biosorbentes, cómo las cáscaras de cítricos, juegan un papel importante en la biosorción de metales como el plomo, cadmio, cobre, níquel, zinc y estroncio, entre otros (Aguilar *et al.*, 2009).

### 1.9. Biosorbentes mixtos

Las ventajas de uso de biosorbentes hacen necesario la búsqueda de microorganismos que se encuentren en crecimiento constante o que sean de fácil acceso, así como la utilización de consorcios microbianos o sistemas mixtos compuestos por microorganismos y/o macromoléculas que hipotéticamente incrementarían los rendimientos y la selectividad de captación de metales y metaloides (Cuizano y Navarro, 2008).

El uso de biomazas mixtas para el proceso de remoción de metales y metaloides ha sido empleado para biomazas que corresponden al mismo reino, es decir cultivos mixtos de bacterias, y hongos, incluso plantas. Se cuenta con poca información en la literatura del uso de biomazas mixtas en las que se involucren organismos de diferentes reinos en el mismo proceso. Se ha reportado también materiales de origen inorgánico como mezclas de zeolitas. Singh *et al.* (2009) usaron cenizas con caolín como biosorbente mixto para la remoción de As (III) en soluciones acuosas; el uso de té de hongos (fungus tea) también fue reportado por Mamisahebei *et al.* (2007) como biosorbente mixto.

Javed *et al.* (2007) utilizaron un cultivo mixto de *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, y *Humicola insolens* en la retención de mercurio, demostrando que el consorcio de estas especies reducen de 2.02 ug/L de concentración hasta 0.001 ug/l después de un periodo de incubación de 7 días.

Con base a lo anterior y considerando la capacidad de *Trichoderma atroviride* para crecer sobre los residuos de limón, se analizará la capacidad de retención de arsénico con este nuevo tipo de biomasa en comparación con las biomazas por separado.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La contaminación ocasionada por arsénico a nivel mundial ha causado gran interés debido a los problemas en la salud humana que trae como consecuencia el consumo de aguas contaminadas por este metaloide. El problema se ha extendido a varios países entre los que se pueden destacar, India, Brasil, México y Australia, entre muchos otros.

La exposición crónica a través de la ingestión de agua contaminada con arsénico ocasiona lesiones cutáneas características como son pigmentación, hiperqueratosis palmoplantar e hiperqueratosis papular. Algunos estudios indican que el arsénico inorgánico se asocia con cáncer de piel y de órganos internos cuando es ingerido, además de enfermedades neurológicas y cardiovasculares. Debido a los problemas de salud antes mencionados se ha modificado la Norma Oficial Mexicana NOM 127-SSA1-1994 en cuanto a la concentración máxima permisible de arsénico en el agua de bebida. Esta modificación programó una disminución anual de 0.005 mg/L, partiendo de un valor de 0.05 mg/L en el año 2000 hasta 0.025 mg/L en el 2005.

En el territorio nacional se han identificado concentraciones de arsénico que rebasan el límite permisible vigente en fuentes de abastecimiento de agua en los estados de Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Durango, Guanajuato, Hidalgo y Morelos (Carrillo, 1996; Martínez, 1998; Segovia, 2008).

El problema de contaminación por arsénico observada en agua para consumo humano en varias comunidades del Estado de Michoacán hace necesario el uso de medidas biorremediadoras de bajo costo como lo es la biosorción con el uso de materiales disponibles como el hongo *Trichoderma atroviride*, que es comúnmente encontrado en suelos y limón criollo (*Citrus aurantifolia* var. *swingle*) siendo este fruto ampliamente cosechado en el estado. Ambos materiales son potencialmente capaces de retener este metaloide.

### 3. HIPÓTESIS

La biomasa mixta formada por el hongo *Trichoderma atroviride* cultivado en residuos de limón presenta una alta capacidad de retención de arsénico (V) comparada con la capacidad de los componentes individuales.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 General

Evaluar la biosorción de arsénico (V) en biomasa muerta del hongo *Trichoderma atroviride*, cultivada sobre residuos de limón.

#### 4.2 Específicos

- Establecer los métodos óptimos de preparación de los materiales biosorbentes y caracterizarlos.
- Establecer las condiciones de cultivo para el crecimiento del hongo *Trichoderma atroviride* sobre los residuos de limón.
- Determinar la cinética y las relaciones de equilibrio de biosorción de arsénico (V) de los residuos de limón y la biomasa del hongo muerta por dos métodos (estufa y autoclave) en un cultivo de los residuos mencionados.
- Proponer el mecanismo por el cual se retiene el As (V) en los materiales mencionados.

## CAPITULO II

### 5. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 5.1 Materiales biológicos

**Los biosorbentes probados para la remoción de arsénico fueron tres:**

*Trichoderma atroviride*. Se utilizó biomasa muerta de la cepa silvestre IMI 206040 del hongo ascomiceto *Trichoderma atroviride*.

**Limón criollo** (*Citrus aurantifolia* var. *swingle*). Los residuos de limón (RL) fueron recolectados de la industria Citrolim S.A. de C.V., ubicada en la localidad Las Canoas, Apatzingán en el estado de Michoacán de Ocampo, estos residuos consisten en el bagazo y la cáscara del limón los cuales serán usados de manera conjunta para los estudios de biosorción y crecimiento del hongo.

**Biomasa mixta** compuesta por: *Trichoderma atroviride* cultivado sobre los residuos de limón, esta biomasa se dividió en dos lotes, en uno el tratamiento de esterilización fue por calor seco y en otro fue por el método de calor húmedo; ambos tratamientos fueron probados para la remoción de As.

#### 5.2 Conservación y acondicionamiento de los residuos de limón

Los RL fueron expuestos a la intemperie y después sometidos a un secado en estufa a 60°C durante 18 h. Posteriormente los residuos fueron molidos y tamizados con mallas de 1 mm.

A continuación los residuos de limón fueron expuestos a una solución de FeCl<sub>3</sub> para aumentar su capacidad de retención (Jimenez, 2007; López 2009). Se pesaron 5 g de residuos de cada tipo y se pusieron en 60 mL de una solución de FeCl<sub>3</sub> al 0.3%, posteriormente se pusieron en agitación por 24 h. Los residuos se filtraron, y se lavaron cinco veces con agua destilada, se secaron por 12 h a 60°C, y se empacaron en bolsas de celofán para su conservación.

### 5.3 Caracterización química de los residuos de limón y biomasa mixta

Las siguientes determinaciones se hicieron necesarias para definir las características de los residuos de limón para la formulación del medio de cultivo. Para los experimentos de retención de arsénico se sabe que la presencia en los residuos de limón de algunos de los biopolímeros como son la pectina, celulosa, hemicelulosa, lignina, etc. favorece la retención de metales.

El contenido de humedad, cenizas y proteína de los residuos de limón y biomasa mixta fue determinado por los métodos de la American Association of Cereal Chemists (AACC, 2000).

La determinación de pectina se realizó mediante el método gravimétrico de Carré y Haynes (Kira *et al.*, 2002).

Para la determinación de fibra dietética se utilizó el método enzimático de Prosky *et al.* (1998), se realizó en dos partes: digestión y filtración. Por su parte, el contenido de celulosa hemicelulosa y lignina se realizó por el método de Van Soest (1963).

Los carbohidratos totales se determinaron por el método Clegg-Anthrone (1956). Este método determina la cantidad de carbohidratos totales, basándose en su contenido de almidones hidrolizables y azúcares solubles.

### 5.4 Caracterización de *Trichoderma atroviride*

#### 5.4.1 Medios de cultivo

El hongo se hizo crecer en medio PDA (Papa dextrosa agar DIFCO™) y Vogel a temperatura de 28°C para obtención de micelio y esporas para los análisis posteriores.

#### 5.4.2 Obtención de inóculos

Para todos los experimentos realizados se utilizaron inóculos de micelio provenientes de colonias en crecimiento activo. Tales inóculos se obtuvieron de cultivos miceliares en medio PDA incubados a 28°C. Para ello, los inóculos se tomaron del borde de la colonia con un sacabocados de 7 mm de diámetro.

### 5.4.3 Cinética de crecimiento de *Trichoderma atroviride* en medio líquido

Por el método de cultivo sumergido. Se colocaron 25 mL de caldo papa dextrosa, en matraces Erlenmeyer de 125 mL, se esterilizaron a 121°C (15 lb/in<sup>2</sup>) por 15 min y posteriormente se inocularon. Los matraces se mantuvieron en agitación a 150 rpm y a una temperatura de 28±1°C; el avance del crecimiento se registró tomando mediciones periódicas del peso seco del micelio formado a intervalos de 12 h. El micelio fue filtrado y puesto a temperatura constante de 50°C por 24 h o hasta peso constante. Los valores en mg/d se obtuvieron por diferencia entre el peso del papel con muestra y el peso del papel sin la muestra. Las curvas de crecimiento se realizaron por triplicado y el resultado de las mediciones se promedió, obteniéndose valores de desviación estándar para cada punto de la curva de crecimiento.

### 5.4.4 Cinética de crecimiento sobre residuos de limón

#### 5.4.4.1 Preparación de los residuos como sustrato

Los RL con y sin tratamiento con FeCl<sub>3</sub> fueron empleados para el crecimiento de *T. atroviride*. Dichos residuos fueron hidratados al 80% 12 h antes de su inoculación, el porcentaje de hidratación de los sustratos de obtuvo por la siguiente fórmula:

$$x + y = 100 \quad y = 100 - x$$

Donde:

x= humedad de la muestra

y= humedad deseada

Una vez hidratados los residuos fueron esterilizados a 121°C (15 lb/in<sup>2</sup>) por 15 min, se dejaron atemperar y se colocaron en caja Petri estériles de 60 x 15 mm y se inocularon como se indica en el apartado 5.4.2. Los residuos inoculados se mantuvieron en incubación a 28±1°C hasta que el micelio invadió totalmente la caja. El crecimiento se registró tomando mediciones periódicas del diámetro de la colonia a intervalos de 12 h. Las curvas de crecimiento se realizaron por triplicado y el resultado de las mediciones se promedió, obteniéndose valores de desviación estándar para cada punto de la curva de crecimiento.

#### 5.4.4.2. Obtención de la biomasa mixta

Habiendo establecido las condiciones de cultivo de *Trichoderma* sobre los residuos de limón (biosorbente mixto), se determinó que la etapa de crecimiento sobre la que se utilizaría el biosorbente sería en la fase logarítmica, es decir a 72 h de crecimiento. De los cultivos en estas condiciones se formaron dos lotes, uno de ellos fue esterilizado por calor húmedo y posteriormente se secó a 50°C por 12 h, el otro lote fue esterilizado por calor seco a 140°C por 6 h. Se obtuvieron así, dos tipos de biomasa mixta, biomasa mixta estufa (BME) y biomasa mixta autoclave (BMA). Para ambas biomásas se probó la capacidad de retención de As por separado.

### 5.5 Experimentos de contacto

#### 5.5.1 Cinéticas de adsorción

Las cinéticas de adsorción se realizaron como se describe a continuación. Se pesó 0.1 g de biomasa (según fuese el caso) y se colocó en un tubo falcón, al cual se le agregaron 10 mL de la solución de arsenato de sodio 0.2 mg/L. Los tubos a los diferentes tiempos se mantuvieron en agitación a 150 rpm y 25°C según el tiempo en una jornada total de 8 h con diferentes intervalos.

Una vez transcurrido el tiempo de cada tubo, la solución fue filtrada recuperando así solo el sobrenadante para su posterior lectura en el espectrofotómetro de absorción atómica (EAA) marca PerkinElmer® modelo AAnalyst 200, por el método de generación de hidruros. Cada una de las pruebas de biosorción se realizó por triplicado para determinar su reproducibilidad.

#### 5.5.2 Isotermas de adsorción

Para determinar la capacidad máxima de adsorción de cada uno de los biosorbentes probados, a partir del tiempo obtenido en la cinética de adsorción, se variaron las concentraciones las cuales fueron: 30 - 7000 µg/L, para ello se pesaron 0.1 g del biosorbente y se colocó en tubos Falcón, a continuación se le adicionó en cada tubo 10 mL de las soluciones de arsenato, y se mantuvieron en agitación a 175 rpm a 25°C en una incubadora orbital Environ Shaker 3527 marca Lab line®, para posteriormente analizar el contenido del arsénico removido con respecto al que estaba en solución con el EAA-GH.

Después los datos se ajustaron a los modelos empíricos que describen las isotermas de adsorción como los de Langmuir, Freundlich, etc. (Cortés *et al.*, 2007)

## 5.6 Espectroscopía infrarrojo

Se evaluaron los tres tipos de biomasa antes y después del contacto con el metaloide en sus dos tamaños de partícula, antes y después de tratamiento y la biomasa muerta; así como también antes y después de los contactos con la solución de arsenato de sodio. Este análisis se hizo con el fin de localizar los grupos funcionales más representativos presentes en los materiales mencionados y su posible interacción con el metaloide a tratar (Quaiser, 2009). Para ello se siguió la siguiente metodología.

### 5.6.1 Preparación de los residuos de limón

Se pesaron 4 g de los residuos sin tratar y con pre-tatamiento con  $\text{FeCl}_3$  y fueron expuestos a 50 mL de una solución de 2 mg/L de arsenato de sodio a 200 rpm y  $24\pm 2^\circ\text{C}$  por 24 h. A continuación los residuos se filtraron, y se lavaron una vez con agua destilada para eliminar el arsenato residual, se secaron a  $60^\circ\text{C}$  por 18 h.

### 5.6.2 Preparación de la biomasa

La biomasa utilizada fue crecida en cultivo sumergido y colectada en una fase de crecimiento logarítmica; la biomasa se esterilizó, se filtró, y se lavó una vez con agua destilada para eliminar los restos de medio de cultivo y una parte se secó a  $60^\circ\text{C}$  por 18 h. Mientras que otra parte del micelio vegetativo se colocó en un matraz Erlenmeyer que contenía 50 mL de solución de 2 mg/L de arsenato de sodio, y se mantuvo en agitación a 200 rpm a  $24\pm 2^\circ\text{C}$  por 24 h. Posteriormente la biomasa se filtró, y se lavó una vez con agua destilada para eliminar el arsenato residual, se secó a  $60^\circ\text{C}$  por 12 h. Una vez realizado esto la biomasa fue molida reducida a polvo para proceder con el análisis.

### 5.6.3 Biomasa mixta

Se colocaron 5 g de cada una de las biomasas mixtas por separado, provenientes de ambos tratamientos (estufa y autoclave) suspendiéndolas en 50 ml de una solución de 2 mg/L de arsenato de sodio, se mantuvo en agitación a 200 rpm a  $24\pm 2^\circ\text{C}$  por 24 h para la biomasa de autoclave y 4 h para la biomasa mixta de estufa. Posteriormente ambas biomasas fueron lavadas una vez con agua destilada para eliminar el arsenato residual, y se secaron a  $60^\circ\text{C}$  por 12 h.

Finalmente, como control se utilizaron biomásas mixtas que no fueron sometidas al contacto con arsenato. Las biomásas fueron reducidas a polvo para la posterior elaboración de pastillas.

#### **5.6.4 Preparación de las pastillas para el análisis de Espectroscopia infrarrojo por transformadas de Fourier (FT-IR)**

Para la lectura en el espectrofotómetro, se pesaron pastillas de 0.3 g de KBr seco, y 0.02 g de cada una de las biomásas, después se comprimieron con una fuerza de 4 ton. por un min. Las muestras fueron analizadas en un espectrofotómetro FTIR marca Bruker® Modelo Tensor 27. El rango de longitud de onda empleado fue el comprendido entre 200 y 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **5.7 Microscopía electrónica de barrido (MEB)**

Este análisis nos proporcionó tanto información para la parte de caracterización como para obtener microfotografías de los materiales a tratar, determinando su morfología superficial (Quaiser, 2009). Además, posterior a los experimentos de contacto, el análisis de superficie permitió observar que la retención de arsénico se llevó a cabo en la parte superficial de los materiales, es decir en la pared celular (Siham, 2007).

Debido a las características del equipo, se utilizaron biomasa seca del hongo y los residuos de limón así como de la biomasa en sus dos formas se analizaron por MEB usando el equipo JMS-6400, Marca: JEOL®, con un detector para microanálisis marca Bruker® Modelo X FLASH 4010 MEB, dicho análisis se llevó a cabo en el Instituto de Investigaciones Metalúrgicas de la U.M.S.N.H. con su respectivo análisis de componentes superficiales.

## Capítulo III

### 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 6.1 Caracterización

##### 6.1.1 Caracterización de los residuos de limón

Los RL obtenidos de la empresa CITROLIM (RL), habían sido sometidos previamente a una extracción de pectina y aceites esenciales. La materia prima usada para los experimentos fue un limón en estado de madurez avanzada, notándose en el color de la cáscara un tono amarillo (Figura 7).



Figura 7. Residuos de limón deshidratados a 60°C

#### Análisis químico

Debido a que los biosorbentes son considerados materiales promisorios dentro de procesos de descontaminación, se hace necesario evaluar sus propiedades para su uso efectivo (Xuan *et al.*, 2006). Para ello es importante determinar su composición química.

En los resultados del análisis químico de los RL, se observa la proporción de los contenidos de fibra y su composición, así como también el contenido de carbohidratos totales y pectina.

Cabe destacar que los RL fueron obtenidos cuando los frutos estaban en una estado de madurez avanzada lo cual disminuye su contenido de pectina y por lo mismo el contenido de carbohidratos totales se ve aumentado (Crini, 2008), tal como se observa en la Tabla I. El contenido de los componentes analizado depende mucho del estado de madurez y condiciones en los que la muestra se encuentre, así como el tamaño de partícula utilizado; Sangnark y Noomhorm (2003) reportaron que la disminución en el contenido de la fibra dietética está asociada con el tamaño de partícula, así como con otras características como la capacidad de absorción de agua y aceite.

A partir de los componentes contenidos en los RL se pueden inferir la presencia de algunos de los probables sitios involucrados en la biosorción, ya que las moléculas que conforman la pectina (p.e. ácido galacturónico), lignina (monómeros de hidroxí amino-alcoholes) y celulosa están asociados a la adsorción de cationes y aniones (García, 2009; Villaescusa y Bollinger, 2004).

**Tabla I. Caracterización de residuos de limón.**

<b>Componente</b>	<b>%</b>
<b>Humedad</b>	<b>10 ± 0.1</b>
<b>Proteínas totales</b>	<b>8.73 ± 0.2</b>
<b>Componentes de fibra</b>	
<b>Celulosa</b>	<b>7.5 ± 0.3</b>
<b>Hemicelulosa</b>	<b>10.4 ± 0.2</b>
<b>Lignina</b>	<b>17.1 ± 0.1</b>
<b>Pectina</b>	<b>7.5 ± 0.2</b>
<b>Carbohidratos totales</b>	<b>8.75 ± 0.2</b>

### Espectroscopía de infrarrojo de residuos de limón

Los resultados de la espectroscopía de infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR), se observan en la Figura 8 para los residuos de limón sin modificar (RL), antes y después del contacto con solución de arsenato. Se observa que existió variación en las bandas de absorción de los espectros de FTIR correspondientes al material, lo cual revela que los grupos funcionales de los diferentes componentes químicos de los RL están interviniendo en el proceso de adsorción, tal como también lo han reportado Pinzón y Cardona (2008).

En los RL fue observada la presencia de grupos funcionales característicos entre los que destacaron los grupo amino (-NH), hidroxilo (-OH), carbonilo (-C=O), carboxil aniones (-COO) y sulfoxido (S=O), mostrados en la Tabla II. Por el contenido de la biomasa de los RL, se asume la presencia de varios grupos funcionales polares, provenientes de materiales como lignina y celulosa, los cuales han sido asociados directamente a la biosorción de metales y metaloides (Matheickal *et al.*, 1999; Pino *et al.*, 2006; Villaescusa y Bollinger, 2004). Estos polímeros también pueden contener otros grupos funcionales polares como alcoholes, aldehídos y cetonas, y todos ellos tiene la habilidad de unir metales por sustitución de iones hidrógeno o por donación de un par de electrones de estos grupos para formar complejos con los metales en solución (Ofomaja y Ho, 2007).

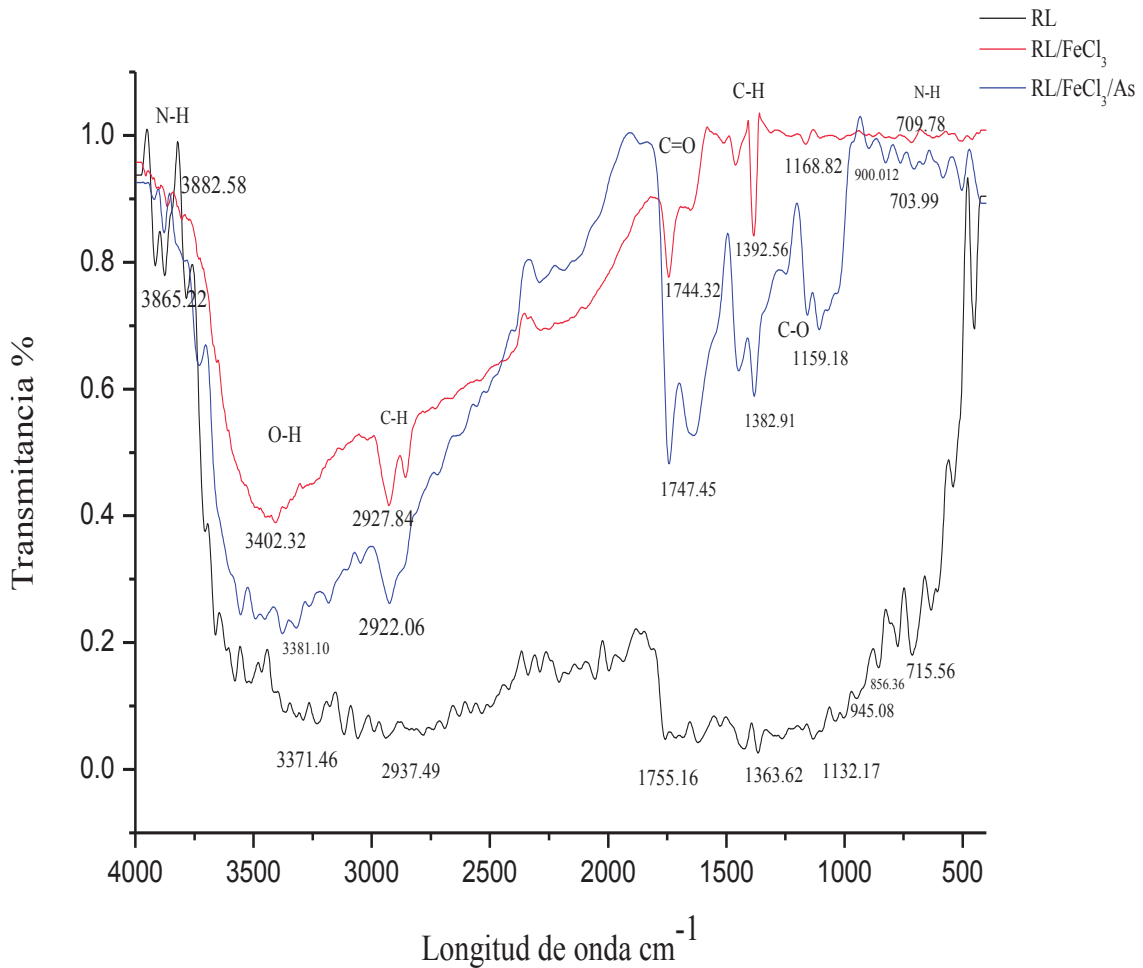
**Tabla II. Longitudes de onda en FTIR para residuos de limón y grupos funcionales correspondientes.**

Longitud de onda $\text{cm}^{-1}$	Grupo funcional
3855.95, 3770.88, 3400.01	-NH, -OH
2990.58, 2880.02	CH, -OH
1701.59, 1864.54	C=O
1491.11, 1405.75	CH (de alcanos)
1202.35	S=O
1131.8	C-N (de alquil amidas)
652.7	-NH (aminas alifáticas)

Se observó la coincidencia de los picos en las muestras de RL con y sin As; sin embargo, la intensidad no fue la misma, lo cual indica la interacción del metaloide con los grupos funcionales correspondientes a cada banda. Particularmente en los grupos sulfóxido donde se nota la desaparición del pico de dicha señal ( $1201.10\text{ cm}^{-1}$ ). Se ha documentado que la unión de arsénico se ve favorecida por la presencia de grupos  $\text{-SH}$  y  $\text{S=O}$  (Hirano *et al.*, 2005).

Posteriormente, se realizó un análisis de FTIR para RL sometidos al tratamiento con  $\text{FeCl}_3$  (RL-Fe). La Figura 8 muestra la diferencia de la intensidad de señal, antes y después de los contactos con As. Nótese que la presencia de los grupos funcionales determinados con anterioridad se mantiene, y sobre los mismos grupos se ve la diferencia de intensidad ante los contactos con  $\text{FeCl}_3$  y As.

Se observó que en el análisis de FTIR de los RL-Fe aumentó el porcentaje de transmitancia, el desplazamiento de las señales correspondientes a los grupos funcionales característicos se vió alterado, indicando con esto la interacción del Fe con el grupo funcional en cuestión. Un comportamiento similar se describe al tratar biomásas de algunos microorganismos con Fe (Sathiskumar *et al.* 2008). Posteriormente, la adición de arsenato a las muestras de RL-Fe disminuyó la transmitancia, pero sin llegar al de la muestra sin tratar (RL). Lo anterior indica la unión de As (como arsenato) con el Fe presente en el material tratado tal como lo propusieron Kamala *et al.* (2005).



**Figura 8. FTIR de RL antes y después de los tratamientos con FeCl<sub>3</sub>.**

Es posible que la presencia de aniones a bajas concentraciones desestabilice la capa aniónica formada alrededor de los iones de hierro (III), lo que simplifica el intercambio entre éstos y los aniones de arsenito y arsenato (Ghimire *et al.* 2002). Iliná *et al.* (2009) propusieron un mecanismo de adsorción para biomazas tratadas con Fe<sup>3+</sup>, mostrando que en gran parte de este tipo de adsorción se trata de un intercambio iónico, en el cual se ven involucrados en su mayoría grupos carbonilo, principalmente proveniente de carbohidratos, como se observa en la Figura 9.

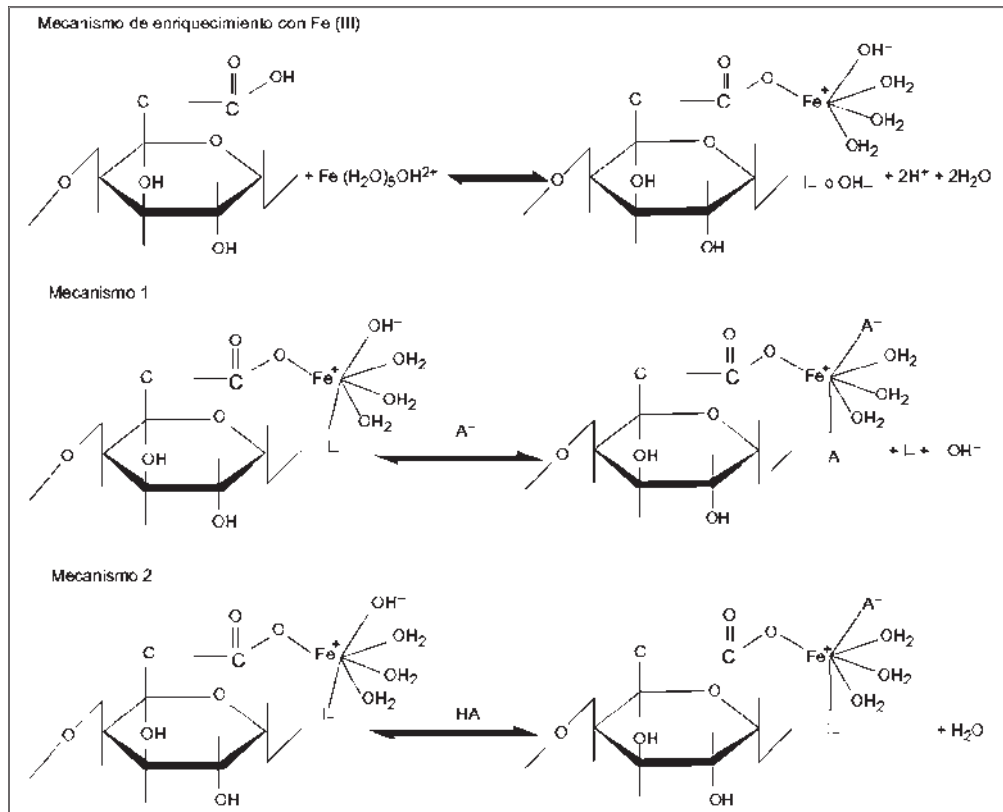


Figura 9. Mecanismo de adsorción de As en biomasa acondicionada con Fe.

### Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) de los residuos de limón

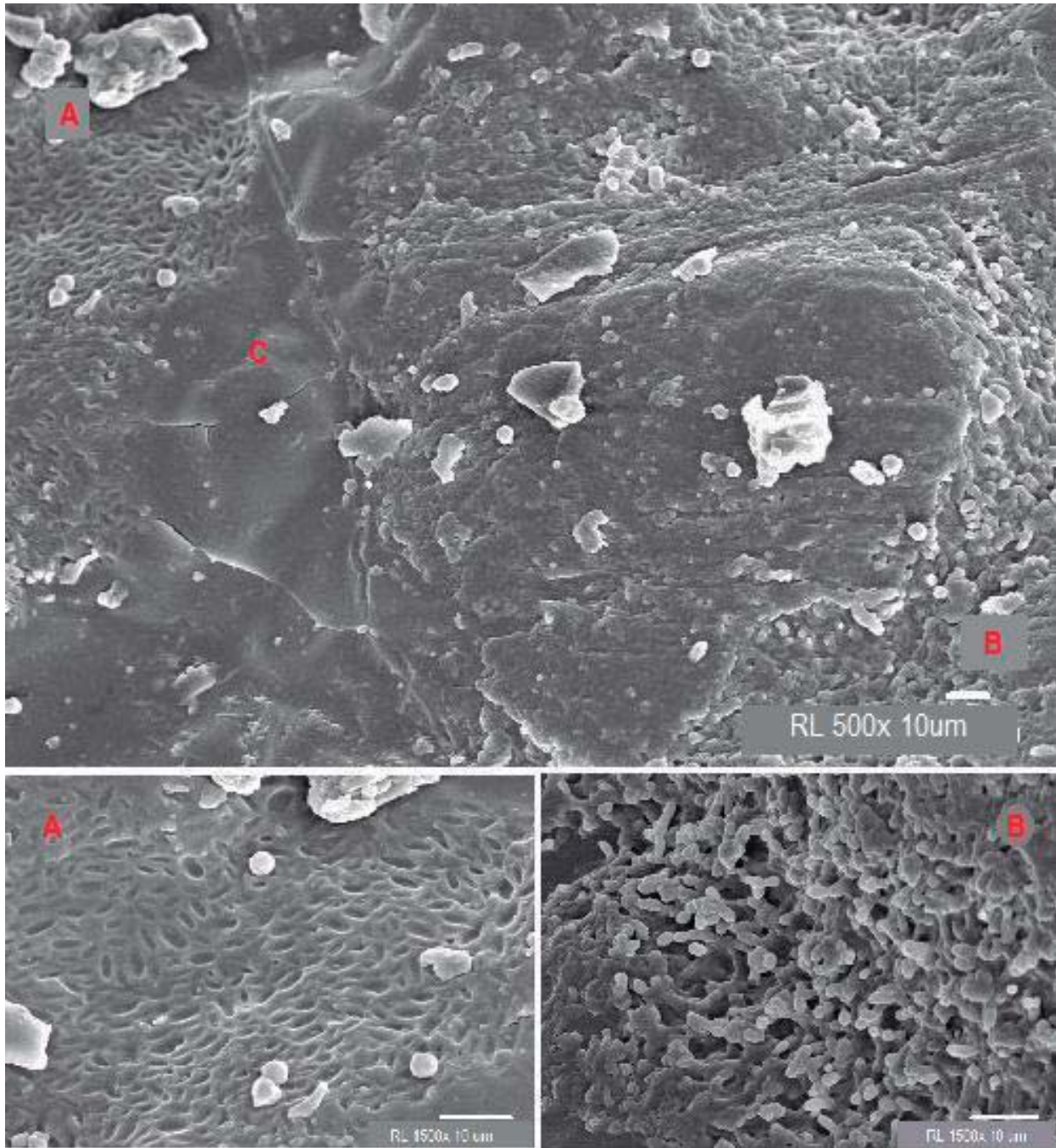
Con el análisis microscópico se pretende observar la morfología de superficie para determinar posibles sitios de unión en poros y microporos.

Se encontró que los RL tienen una superficie heterogénea que consta de zonas lisas, así como zonas rugosas, que llegan a formar poros de tamaño incluso de micras; estos sitios son importantes ya que estos poros ayudan a que se dé una difusión dentro de los mismos aumentando el área superficial y, por lo tanto, la capacidad de adsorción del mismo.

En las Figura 10, se observan los RL a diferentes acercamientos y zonas de la misma muestra, mostrando la diversidad de la superficie, notando en la figura 10-A y 10-B zonas rugosas y con poros; mientras que la zona 10-C se distinguen zonas lisas.

De acuerdo con Alzaydien (2009) en una microfotografía obtenida por MEB se observó que los poros en las cáscaras de naranja son altamente heterogéneos, de la misma manera como

pueden observarse en estas micrografías, de modo que ésta es una característica compartida entre este tipo de cáscaras de cítricos. El tamaño de los poros observado en los RL fue de aproximadamente 2 a 3  $\mu\text{m}$ .



**Figura 10. Micrografía residuo de limón (RL) a 500X A y B se observan las zonas rugosas; C: zonas lisas**

### 6.1.2 Caracterización de *Trichoderma atroviride*

Se realizaron las cinéticas de crecimiento sobre medio nutritivo para determinar el estado de crecimiento en el cual se llevaron a cabo los experimentos de retención.

Los resultados mostrados en la Figura 11 muestran el comportamiento habitual del crecimiento de *T. atroviride*, percibido por la distinción de las diferentes zonas en función del tiempo.

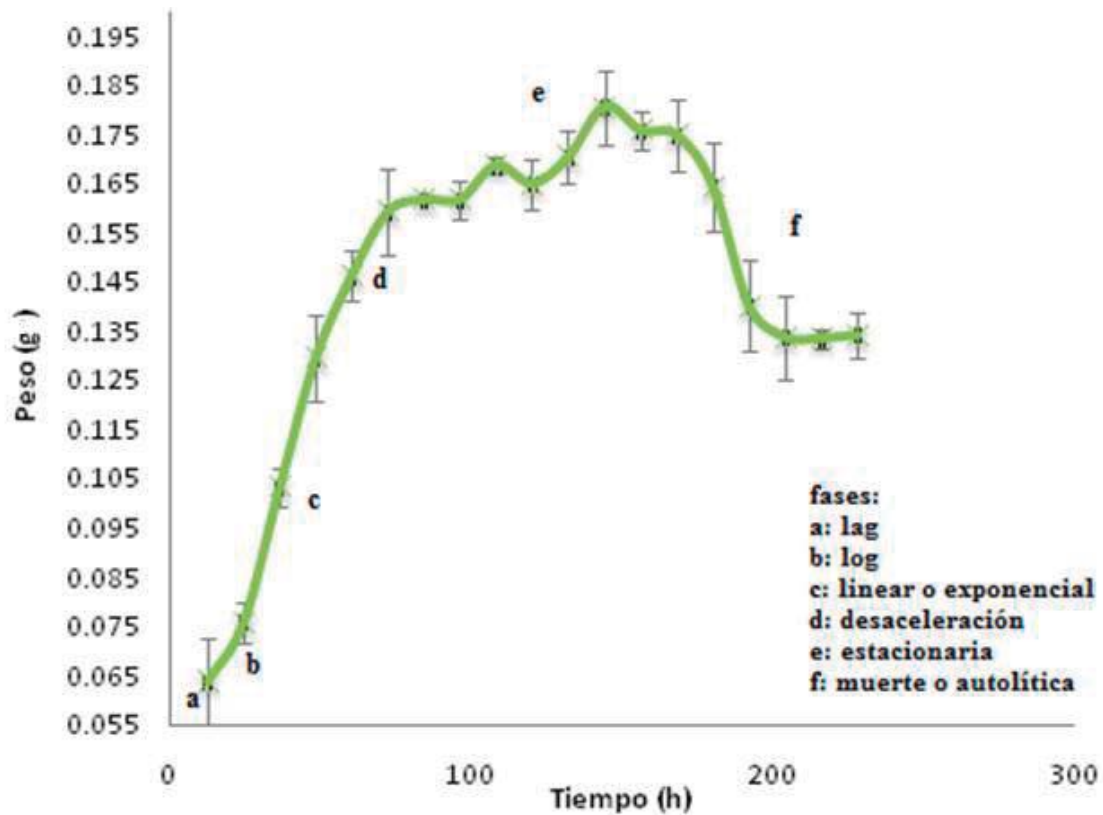


Figura 11. Cinética y fases de crecimiento de *T. atroviride* en medio líquido.

El estado de crecimiento seleccionado para los experimentos posteriores fue en la fase logarítmica, es decir entre las 40 y 60 h de crecimiento. en esta etapa de crecimiento se tiene únicamente el micelio vegetativo en el cultivo, sin la presencia de estructuras de propagación como las conidias.

Se ha reportado en otras investigaciones (Su *et al.*, 2010, Morales *et al.*, 2008) que para experimentos de biosorción de diversos metales como cromo, hierro y cadmio, la biomasa de *Trichoderma* puede ser colectada entre las 24 y 72 h de crecimiento.

### **Cinéticas de crecimiento de *T. atroviride* sobre residuos de limón**

El uso de los RL como sustrato para crecimiento del hongo provee una forma diferente para su aprovechamiento. Rodríguez y Piñeros (2007) realizaron una investigación para la producción de complejos enzimáticos celulolíticos mediante el cultivo en fase sólida de *Trichoderma* sp. sobre un sustrato constituido por racimos vacíos de palma de aceite.

El crecimiento del hongo en los RL se presentó desde las primeras horas se dio de manera continua y casi hasta el final en fase logarítmica prácticamente en todo el tiempo en el que fueron tomadas las muestras (Figura 13). Esto puede deberse al contenido de carbohidratos totales en la muestra, lo cual no somete al hongo a un estado de estrés, proporcionando nutrientes durante todo el ensayo y se ve reflejado también en la duración de la fase logarítmica (100 h). La fase estacionaria se da a partir de las 140 h y las esporas empiezan con una coloración amarilla, esto es indicativo de un estado de desaceleración en el crecimiento del hongo.

De igual manera se realizaron cinéticas de crecimiento sobre los RL tratados con diferentes concentraciones de Fe específicamente 1% 3% y 6% (RL-Fe1, RL-Fe3 y RL-Fe6), para establecer las condiciones adecuadas para un máximo crecimiento del hongo sin formación de esporas en un periodo corto, y usar esta biomasa para experimentos posteriores.

Se puede notar que las biomásas RL-Fe1, RL-Fe3 presentaron un comportamiento similar en la cinética de crecimiento del hongo. Se puede observar que la presencia de Fe en los residuos mejoró el crecimiento del hongo, ya que en los residuos sin tratamiento (RL) el crecimiento máximo alcanzado fue de solamente 3 cm de diámetro, mientras que en los RL-Fe se alcanzaron diámetros de hasta 5 cm en un menor tiempo, lo cual indicó una mayor obtención de biomasa con las características deseadas en un periodo más corto.

En la Figura 12 -A se puede observar el crecimiento de *T. atroviride* a las 48 h sobre los RL tratados a las diferentes concentraciones de hierro (RL-Fe1, RL-Fe3 y RL-Fe6). Se observó

un crecimiento normal y progresivo en RL-Fe1 y RL-Fe3, mientras que para RL-Fe6 el crecimiento fue lento (Figura 13) y el diámetro micelial fue menor.

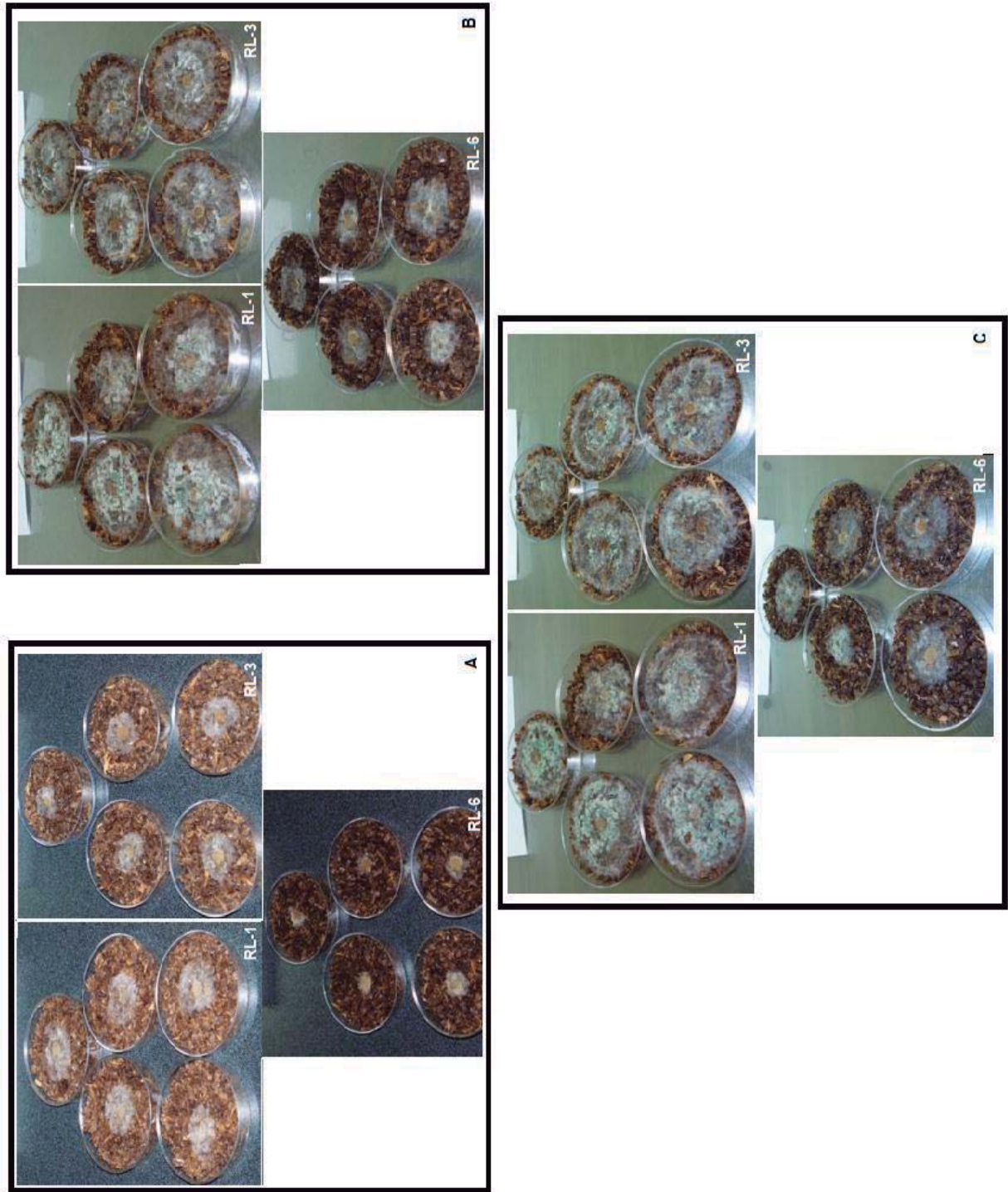


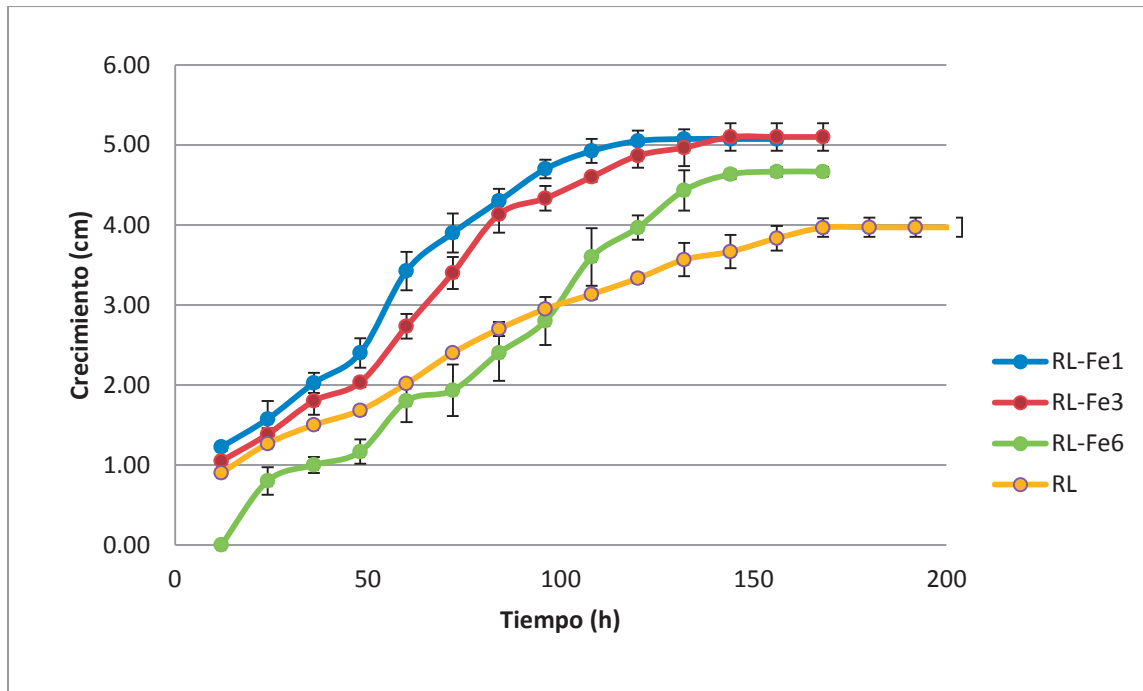
Figura 12. Crecimiento observado de *T. atroviride* sobre residuos de limón tratados a diferentes concentraciones de Fe A)48h B)84h C)98h.

En la Figura 12-B se observa el crecimiento a las 84 h, puede notarse que para los RL-Fe1, la presencia de esporas empieza a ser evidente, y el crecimiento está cubriendo casi completamente la caja Petri; mientras que para RL-Fe6 el crecimiento exponencial comenzó a este tiempo (Figura 13). En el caso de los RL tratados a una concentración de RL-Fe3 el crecimiento sigue en fase exponencial y sin aparición de esporas (pigmentación).

En la Figura 12-C se observa la fase estacionaria del *T. atroviride* cultivado sobre RL-Fe1 en donde destaca la presencia de esporas. Mientras que para la concentración de 0.3% se observa aún en la fase de crecimiento logarítmica de la misma manera que en la concentración de 0.6%.

Se realizaron las pruebas estadísticas para los datos obtenidos en las cinéticas y se observó que la concentración no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) en relación con el crecimiento.

Por lo tanto, para seleccionar la biomasa modificada se tomó en cuenta aquella concentración de hierro en la que la duración de la fase logarítmica (miceliar) fuera mayor, sin presencia de esporas, y que dicha concentración no fuera tan baja para tratar de aumentar la capacidad de retención de arsénico, ya que se ha reportado que en biomosas modificados con Fe a mayor concentración se aumenta la capacidad de adsorción de As (López, 2009; Jiménez, 2007). Con base en lo anterior, se decidió usar la concentración de 0.3% de  $\text{FeCl}_3$  con aparición de esporas a las 108h (Figura 13), ya que en los RL-Fe1 la aparición de pigmento comenzó a partir de las 72 h, y aunque en la concentración de 0.6% comenzó la aparición de esporas a las 120 h, el crecimiento fue lento a lo largo de toda la cinética.



**Figura 13. Cinética de crecimiento de *Trichoderma atroviride* sobre RL con y sin tratamiento de hierro.**

Orzua-Gonzalez *et al.* (2001) reportaron velocidades de crecimiento para *Aspergillus niger* sobre diferentes residuos agroindustriales, señalando a la cáscara de limón, naranja y manzana como los mejores soportes para el crecimiento de dicho hongo, indicando un diámetro de crecimiento de 38.1 mm de diámetro a las 96h sobre cáscaras de limón, siendo este un valor menor al obtenido en las condiciones seleccionadas en el presente estudio.

### Espectroscopía Infrarrojo de biomasa de *Trichoderma atroviride*

La Tabla III. muestra las bandas de transmitancia de grupos funcionales característicos que se atribuyen a la composición de la pared celular de *Trichoderma*. Estos grupos funcionales han sido asociados con la adsorción de diversos tipos de metales como Cr y Ni (Bishnoi *et al.*, 2007).

La pared celular de hongos está constituida por una red compleja de polisacáridos (aproximadamente el 90 %) dentro de los cuales está la quitina,  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6 glucanos, mananos y proteínas. En el caso de *Trichoderma* existe una gran variedad de enzimas extracelulares (Lalgé, 2007; Adams, 2004). Todos estos compuestos pueden contener en cierto grado algún grupo de los mencionados en la Tabla III.

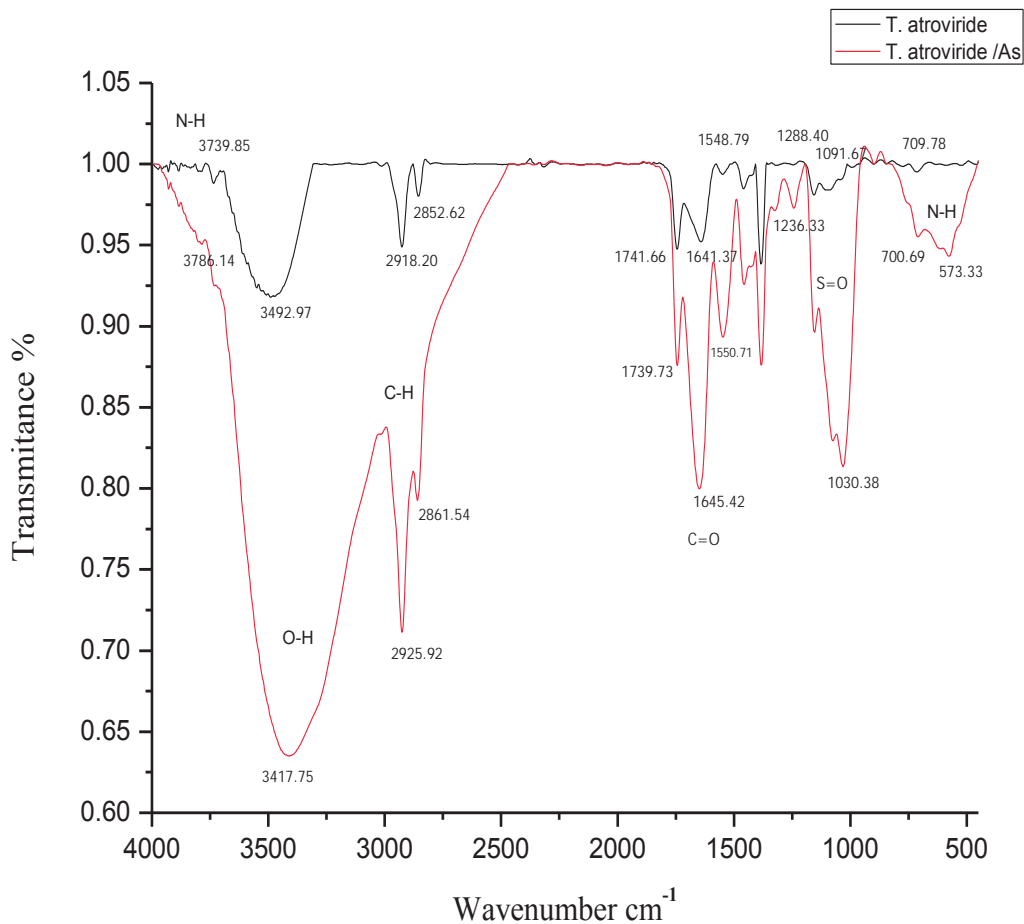
**Tabla III. Longitudes de onda en FTIR para biomasa de *T. atroviride* y grupos funcionales correspondientes.**

Longitud de onda $\text{cm}^{-1}$	Grupo funcional
3739.85., 3492.97	-NH, -OH
2918.20, 2852.62	CH,
1741.66	C=N
1641.37	C=O
1548.79	N-H (amina primaria y secundaria)
1060.19	S=O
1285.71	C-N (de alquil amidas)
709.78	-NH (aminas alifáticas)

El contacto de la biomasa con el As ocasionó un cambio de intensidad de las bandas en los grupos funcionales presentes en la misma, así como el desplazamiento de las señales después del contacto, por lo cual se advierte una interacción de los grupos con el metaloide, con especial distinción en los grupos -NH y S=O. Sin embargo, la señal después del contacto con As se ve totalmente deformada (Figura 14). Se ha reportado que el desplazamiento de las señales puede ser ligero (hasta menos de  $6 \text{ cm}^{-1}$ ) para atribuirse como interacción con el metal o metaloide en cuestión (Rao *et al.*, 2010).

Las señales asociadas a los diferentes grupos funcionales fueron las siguientes: las bandas encontradas a  $3739.85 \text{ cm}^{-1}$  y  $3492.97 \text{ cm}^{-1}$  están relacionadas con grupos N-H de proteínas y

grupos O-H de carbohidratos, respectivamente (Zhou *et al.*, 2005). Las bandas de media sorción encontradas a  $2918.20\text{ cm}^{-1}$  se asignan a vibraciones de estiramiento C-H y C-CH<sub>3</sub>, ambas pueden ser atribuidas a grupos funcionales de fosfolípidos de membrana (Yee *et al.*, 2004). Los picos encontrados en  $1641.07\text{ cm}^{-1}$  y cerca de  $1548.07\text{ cm}^{-1}$  representan bandas de aminas primarias y secundarias, y pueden atribuirse a grupos funcionales de polímeros de N-acetil glucosamina y a los enlaces peptídicos de las proteínas (Liu *et al.*, 2007).



**Figura 14. FTIR Biomasa muerta de *T. atroviride* antes y después del contacto con As.**

Se ha reportado que los grupos involucrados en la biosorción de Cr (VI) en *T. viride* son -NH y -OH, concordando con estos resultados. Sin embargo, en este caso, para la biosorción de As (V) sobre biomasa de *T. atroviride* se observa también que los grupos S=O y P-O interactúan directamente en la remoción.

### **Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) de biomasa de *T. atroviride***

La Figura 15 muestra micrografías del micelio vegetativo del hongo *T. atroviride*, en las cuales se puede observar el micelio, así como las hifas. Se tomaron imágenes antes y después del contacto con el As.

La biomasa presentó una superficie homogénea, aunque en algunas partes hubo proyecciones y/o hendiduras que confieren rugosidad al biosorbente. Se puede observar también que el tamaño de cada hifa fue de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ . Una característica importante de las hifas antes del contacto con el As es que mostraron una superficie definida y uniforme en la pared celular y esta característica se noto al observarla en conjunto como micelio (Figura 15 A, B, C). En la Figura 15-D, E y F se aprecia el micelio vegetativo después del contacto con As. La pared muestra signos de desgaste en la superficie, así como también el rompimiento de las hifas, probablemente ocasionados por la presencia del metaloide, así como por las condiciones en las que se lleva a cabo el proceso de remoción, particularmente debido a la agitación (Figura 16-F). Otros autores han reportado que para especies como *Aspergillus* ocurre algo similar al exponerlo a metales como Cr (Khambhaty *et al.*, 2009), así como *Penicillium* y *Fusarium* al exponerlo a As (Su *et al.*, 2010), comprobando el desgaste de pared por medio de MEB.

Con estas observaciones, aunadas a los espectros FTIR, se puede establecer que la pared celular, y los grupos funcionales de sus compuestos, tienen un papel importante en la retención de As (V), confirmando la naturaleza superficial del proceso de biosorción.

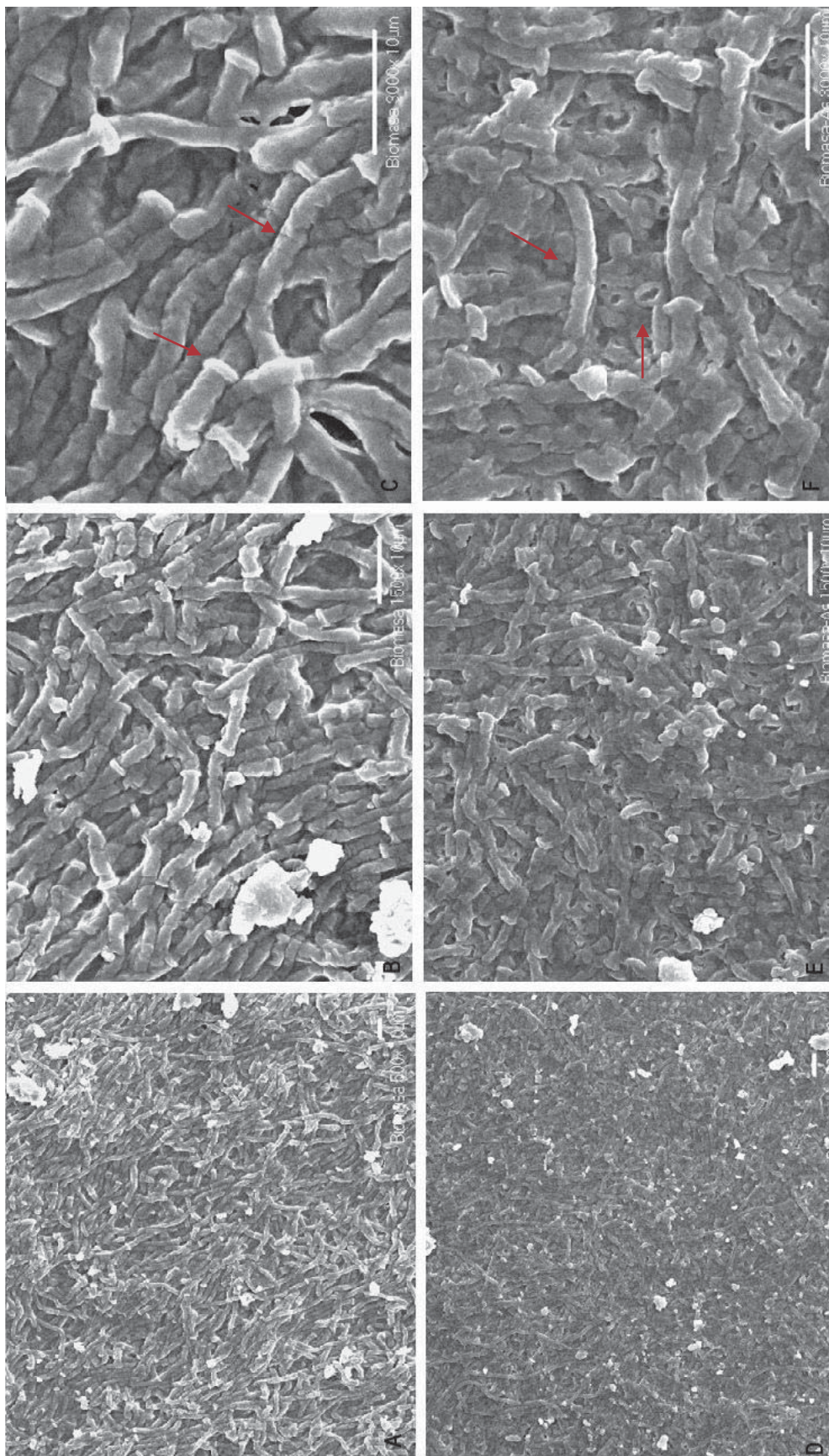


Figura 15. Micrografías de micelio vegetativo de *T. atroviride* antes del contacto con As: A)500x B)1500x C)3000x y después del contacto con As: D)500x E) 1500x F) 3000x.

### 6.1.3 Caracterización biomasa mixta

#### Caracterización química

Los resultados del análisis químico de la biomasa mixta en ambos casos fue muy similar para todos los parámetros analizados con respecto a los RL, excepto para el contenido de carbohidratos el cual para ambos casos (BMA y BME) fue mayor incluso que en los RL, indicando con esto la degradación de algunos polímeros, probablemente ocasionados por el crecimiento del hongo, así como también el incremento en el contenido de proteínas. En la Tabla IV se muestran los resultados de esta caracterización, nótese que el análisis de comparación de medias no da diferencias estadísticamente significativas en los demás parámetros, por lo cual podemos decir que el tratamiento (calor) no tiene un efecto significativo en la composición química de los biosorbentes.

**Tabla IV. Caracterización química de biomazas mixtas.**

Componente	% Autoclave	% Estufa
Humedad	2.5±0.3 <sub>a</sub>	2.1±0.2 <sub>a</sub>
Proteínas totales	5.05±0.3 <sub>b</sub>	4.76±0.25 <sub>c</sub>
Componentes de fibra		
Celulosa	5.8±0.1 <sub>d</sub>	5.5±0.2 <sub>d</sub>
Hemicelulosa	7.9±0.2 <sub>e</sub>	7.8±0.3 <sub>e</sub>
Lignina	13.2±0.4 <sub>f</sub>	13.1±0.3 <sub>f</sub>
Pectina	8.58±0.2 <sub>g</sub>	8.46±0.3 <sub>g</sub>
Carbohidratos totales	21.19±0.5 <sub>h</sub>	20.70±0.5 <sub>i</sub>

\*Letras diferentes = valores estadísticamente significativos.

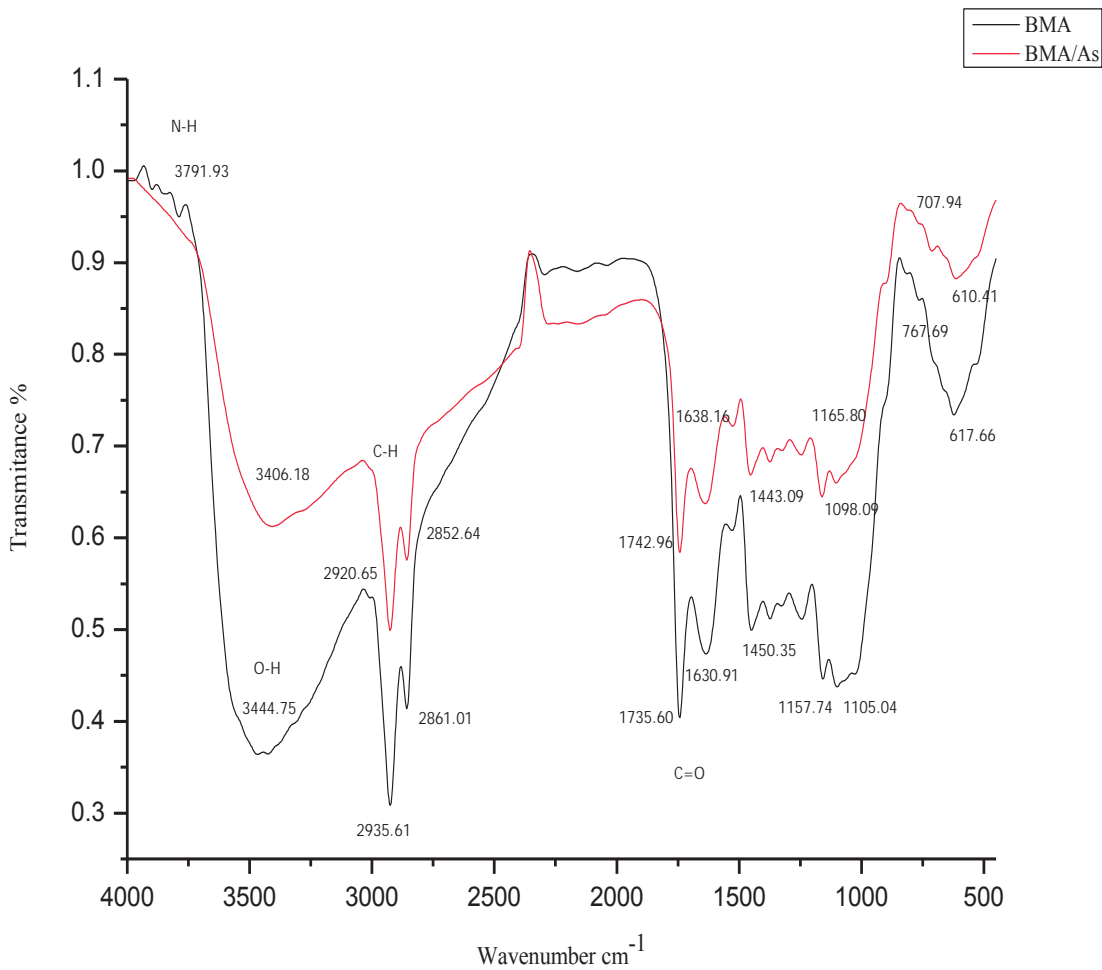
### Espectroscopía de infrarrojo para biomasa mixta

En las Figuras 16 y 17 se muestran los FTIR de las biomazas mixtas BME y BMA. Las señales identificadas en ambos tipos de biomazas fueron similares a las observadas en las biomazas de limón y *T. atroviride*. Las señales más características observadas en cada una de las biomazas son las indicadas en la Tabla V.

**Tabla V. Longitudes de onda en FTIR para biomasa mixta y grupos funcionales correspondientes.**

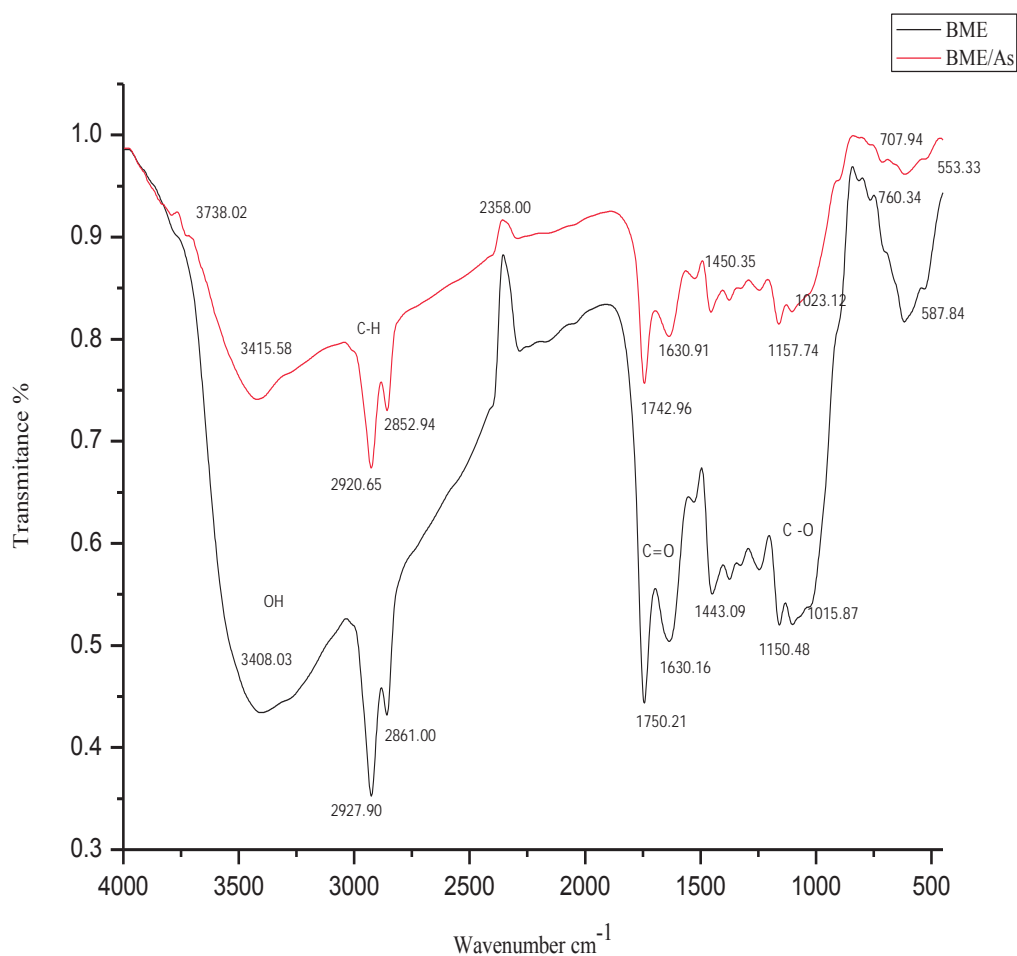
Biomasa mixta autoclave	Biomasa mixta estufa	Grupo funcional
Longitud de onda $\text{cm}^{-1}$		
3791.93, 3406.18	3758.02, 3415.08	-NH, -OH
2920.65, 2852.64	2920.65, 2852.94	CH,
1742.96, 1638.16	1742.96, 1630.91	C=O
1443.09	1450.35	C-H stretching
1165.80	1157.94	C=O
	1023.12	P-O Y C-OH enlace
767.69, 707.94	760.34, 701.94	
610.41	553.33	

Los FTIR fueron realizados antes y después del contacto con arsénico y con los dos tipos de biomazas mixtas; se puede observar en la Figura 16 que la señal identificada a  $3791.93 \text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a grupos amina (N-H), después del contacto con As desaparece, y la encontrada a  $3406.18 \text{ cm}^{-1}$  (correspondiente a grupos hidroxilo) se encuentra desplazada  $44 \text{ cm}^{-1}$  después del contacto con arsénico. Como este último ejemplo se encuentra la mayoría de las señales identificadas, con desplazamientos que van desde los  $7 \text{ cm}^{-1}$  hasta los  $13 \text{ cm}^{-1}$ , indicando con ello la interacción del metaloide con la biomasa empleada.



**Figura 16. FTIR BMA antes y después del contacto con As.**

En la Figura 17 se observan los resultados para la BME donde es evidente la diferencia del porcentaje de transmitancia antes y después del contacto, así como también el desplazamiento de las señales características de los grupos funcionales identificados. Se puede observar la ausencia de algunos grupos previamente identificados en BMA, como el grupo P-O. Por otro lado es importante decir que los desplazamientos de señal en este caso van desde los  $7\text{cm}^{-1}$  hasta  $53\text{cm}^{-1}$  indicando la interacción del As con la biomasa.



**Figura 17. FTIR BME antes y después del contacto con As.**

Como se mencionó anteriormente, en las biomazas del limón y *T. atroviride*, el grupo carbonilo está involucrado en la adsorción de As, ya que está presente en compuestos como los ácidos orgánicos (Jena *et al.*, 2002). El ácido hidroxícítrico es de estructura similar al ácido cítrico y se sabe que el As es capaz de reducir el contenido de ácido cítrico en frutos como limón y naranja, aunque este mecanismo aún no está bien establecido. Sin embargo, se ha postulado que el grupo carbonilo de estos ácidos se une al As por medio de un acoplamiento de quelación (Kamala *et al.*, 2005).

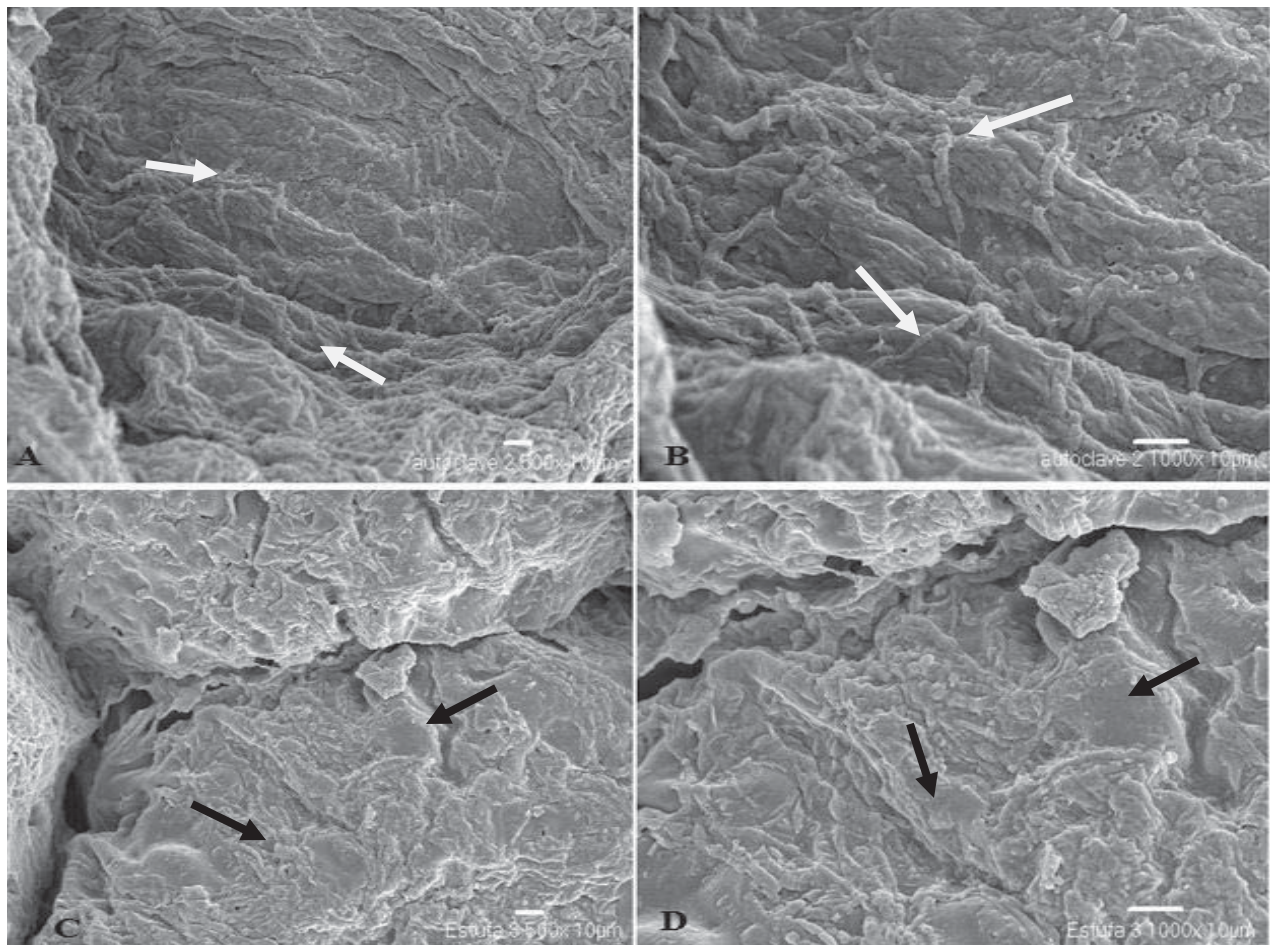
Babakhouya *et al.* (2010) realizaron FTIR para un biosorbente mixto compuesto por hueso de aceituna y semilla de dátil, y observaron que los porcentajes de transmitancia varían al

cambiar las proporciones de cada uno de los biosorbentes, así como también reportaron ligeros desplazamientos en las señales.

### Microscopía Electronica de Barrido (MEB) para biomasa mixta

En las micrografías tomadas a la biomasa mixta sometida a los dos tipos de esterilización (BMA y BME), se observó que para la BMA se distingue sobre su superficie parte del micelio de *T. atroviride*, (Figura 18-A y 18-B); así como también se distinguen zonas rugosas atribuidas a los RL y las hendiduras formadas por el crecimiento del hongo sobre dichos residuos.

Por otro lado en la BME se percibe un daño del material (Figura 18-C y 18-D) y por consecuencia no se alcanza a ver el efecto del crecimiento del hongo debido a la alta temperatura a la que fue sometida la biomasa, evidencia del daño es ver zonas lisas.



**Figura 18. Micrografías de biomasa mixta por el método de calor húmedo (BMA): A) 500x B)1000x y por el método de calor seco (BME): C) 500x y D) 1000x.**

## 6.2 Experimentos de contacto

### 6.2.1 Cinéticas de remoción de As con Residuos de limón

Se realizaron los experimentos de contacto con los RL que fueron sometidos al tratamiento con  $\text{FeCl}_3$  al 0.3% (RL-Fe3); se eligió este porcentaje de acondicionamiento ya que fue en el cual el hongo presento mejores características de crecimiento; se observó que en las primeras horas de contacto (3h) el porcentaje de remoción de As fue aproximadamente del 12% alcanzando el equilibrio a las 24h con un porcentaje de remoción del 58.28% (Figura 19).

En los RL-Fe3 el proceso de retención del metaloide fue lento en comparación con lo reportado por otros autores como Jiménez (2007) quien utilizó perejil para la remoción de arsénico alcanzando el equilibrio de sorción a los 180 min. Mohan *et al.* (2007) y López (2009) reportaron el uso de madera de pino para la remoción de As destacando que dicha sorción puede considerarse instantánea.

Otros resultados fueron observados en la remoción de As en soluciones acuosas al usar carbón activado tratado con óxidos de hierro, donde el equilibrio de adsorción se observa a partir de las 18 h (Chen *et al.* 2007).

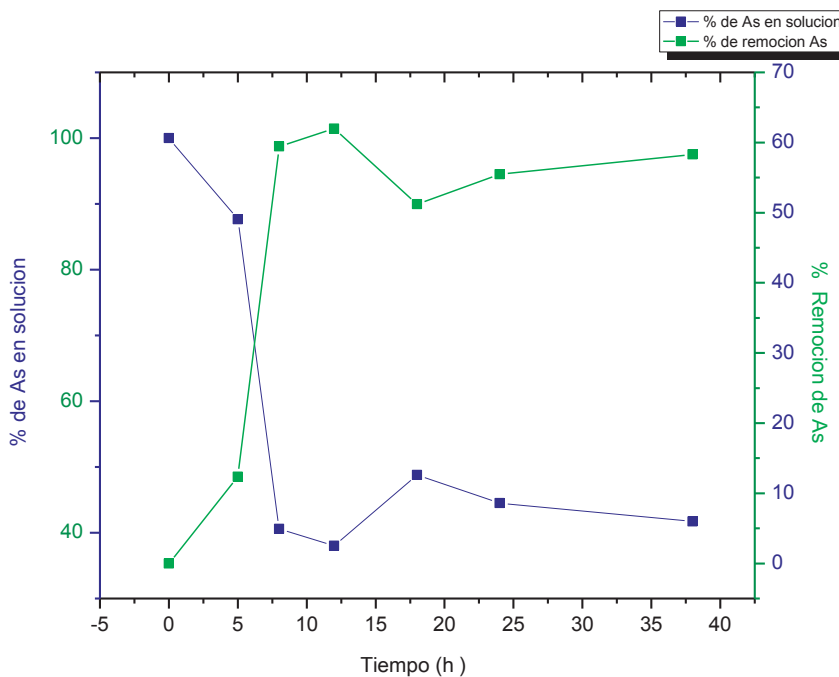


Figura 19. Porcentajes de As en solución y remoción para residuos de limón.

En la Tabla VI. se pueden ver los valores de la concentración de As removido por unidad de masa de biosorbente,  $q_t$  ( $\mu\text{g As/g RL-Fe}$ ), así como la desviación estándar de cada uno de los datos, observándose una buena reproducibilidad del experimento.

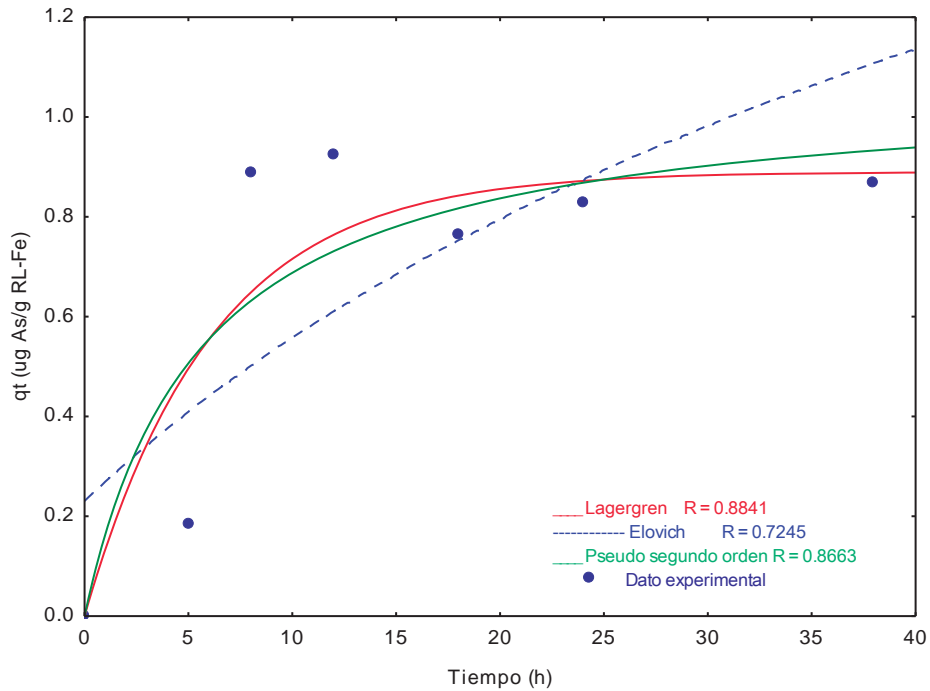
**Tabla VI. Valores de  $q_t$  para RL- Fe3.**

Tiempo (h)	$q_t$ ( $\mu\text{g As/g RL-Fe3}$ )
5	0.18 $\pm$ 0.04
8	0.89 $\pm$ 0.04
12	0.92 $\pm$ 0.05
18	0.76 $\pm$ 0.24
24	0.83 $\pm$ 0.05
38	0.87 $\pm$ 0.20

Los datos obtenidos en las cinéticas de RL-Fe3 fueron ajustados a los modelos empíricos de Lagergren (pseudo-primer orden), Elovich y pseudo-segundo orden mediante un análisis de regresión no lineal (Figura 20).

Los resultados de correlación revelan que los modelos que mejor describen a los datos experimentales para RL-Fe3 fueron los modelos empíricos de Lagergren y pseudo segundo orden con un coeficiente de correlación  $R=0.8841$  y  $R=0.8667$ , respectivamente. Por los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, el modelo que mejor explica el tipo de sorción que se llevo a cabo fue el de pseudo segundo orden, este modelo se basa en que el paso limitante de la velocidad se debe a una sorción química o quimisorción, la cual, involucra fuerzas de valencia a través de intercambio iónico o que comparten electrones el adsorbente con el adsorbato, como fuerzas covalentes (Ho y McKay, 2000).

Matemáticamente los dos modelos (Lagergreen y pseudo segundo orden) pueden describir bien la cinética debido a que el coeficiente que es parecido, pero el modelo de pseudo segundo orden por las bases sobre las que fue propuesto, coincide más con los mecanismos de sorción que se llevan a cabo en este sistema en particular, por eso se puede elegir a este modelo para describir la cinética en este sistema.



**Figura 20. Modelos cinéticos aplicados al proceso de biosorción en RL-Fe.**

En la Tabla VII. se muestran los valores de las constantes para cada uno de los modelos probados, así como su coeficiente de correlación. El modelo de pseudo segundo orden es representado por las variables  $q_e$  y  $K_2$ ; el valor de  $q_e$ , representa la cantidad de As (V) removido por el biosorbente. Estos coeficientes indican además que la velocidad inicial de sorción de arsenato es significativamente alta. Iliná *et al.* (2009), reportaron para este mismo modelo cinético en derivados del maracuyá.

**Tabla VII. Valores de los parámetros cinéticos para residuos de limón.**

MODELO	Parámetro cinético	R
Lagergren	$K_L=0.162978 h^{-1}$ $q_e=0.890010\mu g/g$	$R = 0.8841$
Pseudo-segundo Orden	$K_2= 0.168524g/g.h$ $q_e= 1.069316\mu g/g$	$R = 0.8663$
Elovich	$\alpha= 0.051627g/g.h$ $\beta=1.140595g/mg$	$R = 0.7245$

Jiménez en 2009, encontró que para adsorción de As en perejil pretratado con hierro los valores de las constantes para el modelo de pseudo segundo orden fueron para  $q_e$  de 3.81 y para  $K_2$  de 0.60; resultados similares obtuvieron Pokhrel y Viraraghavan (2007) con *Aspergillus niger* modificado con oxido de hierro para la remoción de As(III) y As(V); también Maity *et al.* (2005) encontraron que el modelo de pseudo-segundo orden fue el mejor para describir el proceso cinético de la adsorción de arsenito y arsenato por un nódulo polimetálico de origen marino. Otros datos referentes a este modelo fueron obtenidos por Deng y Ting (2007) deduciendo que el modelo de pseudo segundo orden fue el que mejor describe los datos cinéticos para la remoción de As(III) y As(V) por *Penicilium chrysogenum*, obteniendo valores de  $K_2$  igual a 0.203 y 0.028 g/mmol min, respectivamente, observando que para el caso de RL-Fe3 la sorción es más lenta.

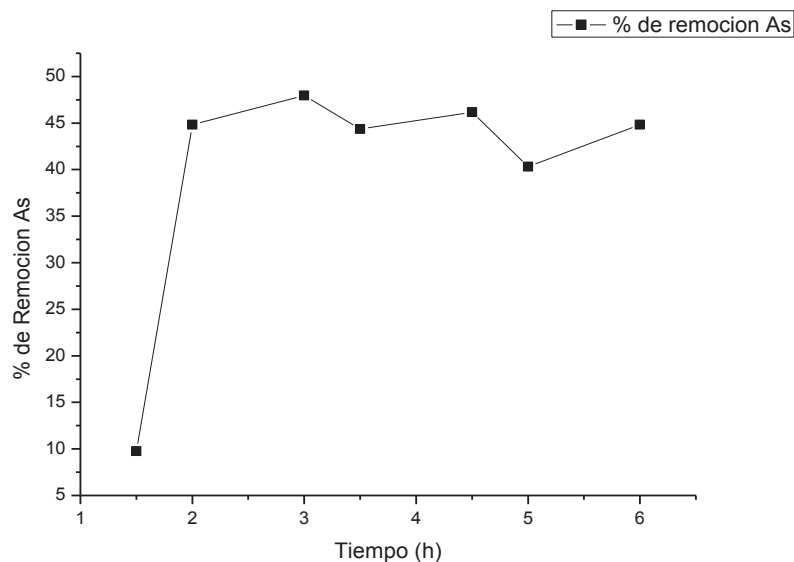
### 6.2.2 Cinéticas de sorción en biomasa muerta de *Trichoderma atroviride*

La adsorción de contaminantes como los metales, metaloides y colorantes se puede llevar a cabo por microorganismos vivos, pero también pueden ser removidos por material biológico muerto. Los estudios de aplicación de viabilidad a gran escala han demostrado que los procesos de biosorción utilizando la biomasa muerta son de hecho, más aplicables a los procesos de bioacumulación que los que utilizan microorganismos vivos, ya que estos últimos requieren una fuente de nutrientes constante y un complicado sistema de biorreactor (Park *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos de la cinética de adsorción usando biomasa muerta del hongo *Trichoderma atroviride* se observan en la Figura 21. El porcentaje de remoción alcanzado a las 3 h en el equilibrio fue del 44.8%. Por lo cual, se considera que en este tiempo se alcanzó el equilibrio. En la Tabla VIII. se muestran los valores de  $q_t$  con sus respectivos valores de desviación estándar a los diferentes tiempos indicando la reproducibilidad del experimento.

**Tabla VIII. Valores de  $q_t$  para biomasa muerta de *Trichoderma atroviride*.**

Tiempo (h)	$q_t$ ( $\mu\text{g As/g T.atroviride}$ )
<b>1.5</b>	$0.169 \pm 0.07$
<b>2</b>	$0.75 \pm 0.01$
<b>3</b>	$0.802 \pm 0.02$
<b>3.5</b>	$0.742 \pm 0.04$
<b>4</b>	$0.772 \pm 0.02$
<b>5</b>	$0.652 \pm 0.04$
<b>6</b>	$0.75 \pm 0.01$



**Figura 21. Cinética de adsorción de arsénico usando como biosorbente *T. atroviride*.**

Los datos obtenidos en las cinéticas fueron ajustados para ambos tipos de residuos a los modelos empíricos de Lagergreen (primer orden), Elovich y pseudo-segundo orden mediante un análisis de regresión no lineal (Slejko, 1985; Faust y Ali, 1999). Los resultados de correlación revelan que el modelo que mejor describió la cinética de biosorción de As para la biomasa de *Trichoderma atroviride* fue el modelo empírico de pseudo segundo orden con un coeficiente de correlación de  $R= 0.8668$  (Figura 22). Indicando con esto que se trata de una quimisorción. En la Tabla IX. se muestran los valores de los parámetros cinéticos obtenidos a través del ajuste a los diferentes modelos. Podemos destacar que la constante K indica la velocidad de sorción inicial y muestra que la sorción fue rápida al inicio ( $0.4836 \text{ h}^{-1}$ ).

Matemáticamente al igual que para los RL, los dos modelos (Lagergren y pseudo segundo orden) pueden describir bien la cinética debido al coeficiente de correlación que es muy parecido, sin embargo, por los resultados obtenidos en FTIR y por las características del modelo, el modelo que mejor explica los resultados de cinética es el de pseudo segundo orden, debido a la interacción de los grupos funcionales presentes en la biomasa con el As.

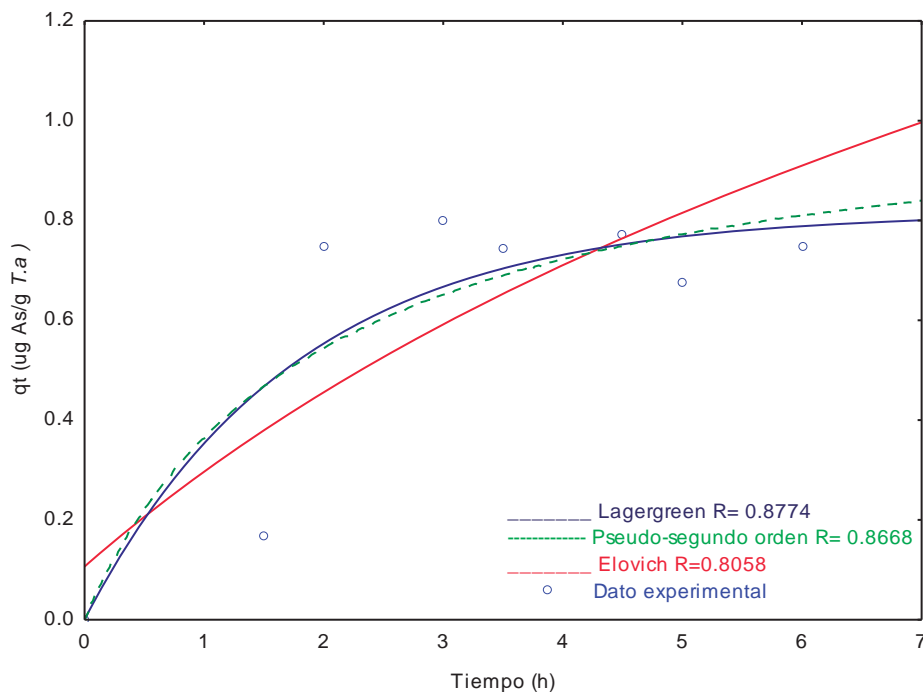
**Tabla IX. Valores de los parámetros cinético en la biosorción de As con *T. atroviride*.**

MODELO	Parámetro cinético	R
Lagergren	$K_L=0.567340 \text{ h}^{-1}$ $q_e=0.815923 \text{ ug/g}$	$R = 0.8774$
Pseudo-segundo Orden	$K_2= 0.483667 \text{ g/mg. h}$ $q_e= 1.070813 \text{ ug/g}$	$R = 0.8668$
Elovich	$\alpha= 0.23649 \text{ ug/g.h}$ $\beta=1.057947 \text{ ug/mg}$	$R = 0.8058$

Comparando estos resultados con los RL-Fe3 se observa que la velocidad inicial de adsorción de As es mayor para el caso de *T. atroviride*, por lo cual la sorción se llevó en un menor tiempo, pudiendo ser considerada como instantánea.

En la literatura, la mayoría de las biomazas de microorganismos se comportan de acuerdo al modelo de pseudo segundo orden (Khambhaty *et al.* 2009; Aguilar *et al.* 2009; López, 2009) ya que éste es considerado como uno de los mejores modelos para explicar sistemas de biosorción (Aguilar *et al.* 2009).

Se ha reportado con referencia al arsénico (Sathishkumar *et al.*, 2008), ajustando al modelo de pseudo segundo orden, que usando biomasa esterilizada por autoclave de *Aspergillus fumigatus* encontraron valores de  $K_2$  y  $q_e$  de 0.105 y 0.21 respectivamente, indicando con ello que la velocidad de remoción es alta, indicando con ello que los resultados obtenidos para la biomasa de *T. atroviride* es de igual manera una sorción rápida.



**Figura 22. Modelos cinéticos aplicados al proceso de biosorción en biomasa de *Trichoderma atroviride*.**

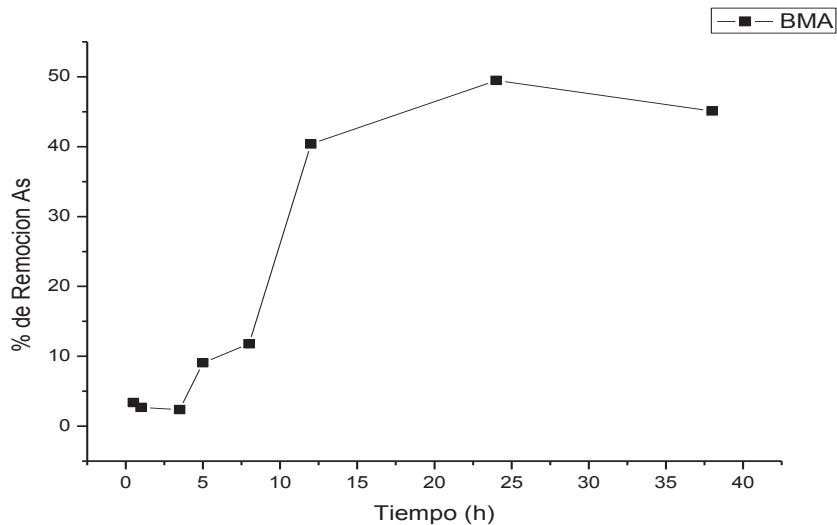
### 6.2.3 Cinéticas de sorción en biomasa mixta

En la Tabla X. se muestran los valores de  $q_t$  obtenidos para cada una de las biomاسas. El comportamiento para la biomasa mixta de autoclave (BMA) indicó que la mayor parte de la sorción se llevó a cabo a partir de las 5 h hasta alcanzar el equilibrio a las 24 h, teniendo un porcentaje de remoción del 48.5% (Figura 23).

**Tabla X. Valores de  $q_t$  para ambos tipos de biomasa mixta.**

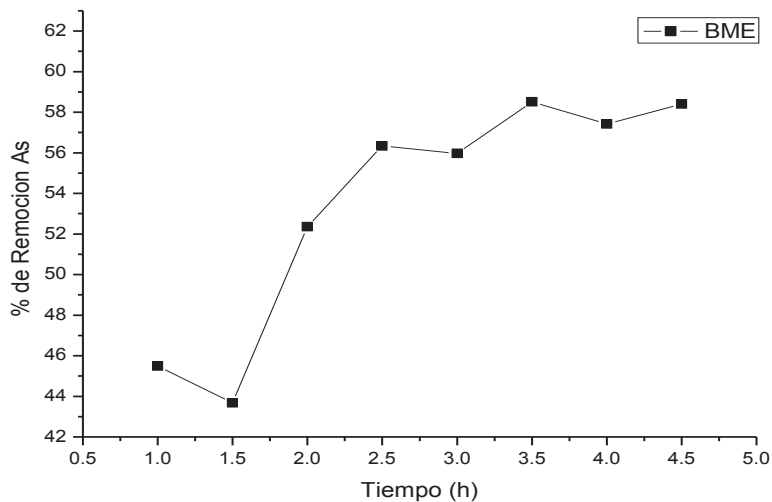
Tiempo (h)	$q_t$ ( $\mu\text{g As/g BMA}$ )	Tiempo (h)	$q_t$ ( $\mu\text{g As/g BME}$ )
<b>0.5</b>	0.047±0.04	<b>1</b>	1.111±0.04
<b>1</b>	0.037±0.01	<b>1.5</b>	1.096±0.02
<b>3.5</b>	0.033±0.04	<b>2</b>	1.448±0.04
<b>5</b>	0.127±0.02	<b>2.5</b>	1.497±0.03
<b>8</b>	0.165±0.03	<b>3</b>	1.478±0.03
<b>12</b>	0.566±0.04	<b>3.5</b>	1.497±0.04
<b>24</b>	0.694±0.03	<b>4</b>	1.472±0.02
<b>38</b>	0.632±0.02	<b>4.5</b>	1.509±0.03

En la figura 23 se puede observar que en las primeras horas de contacto, el porcentaje de remoción es bajo, y a partir de las 8 horas la remoción aumenta de manera considerable.



**Figura 23. Cinética de remoción de As usando BMA.**

En la Figura 24 se puede observar la cinética de remoción de arsénico usando como biosorbente la biomasa mixta sometida al tratamiento de estufa; gran parte de la sorción fue instantánea ya que desde los primeros minutos existió sorción, y conforme transcurrió el tiempo ésta se volvió más lenta, llegando al equilibrio a las 2.5 h con un porcentaje de remoción del 56%.

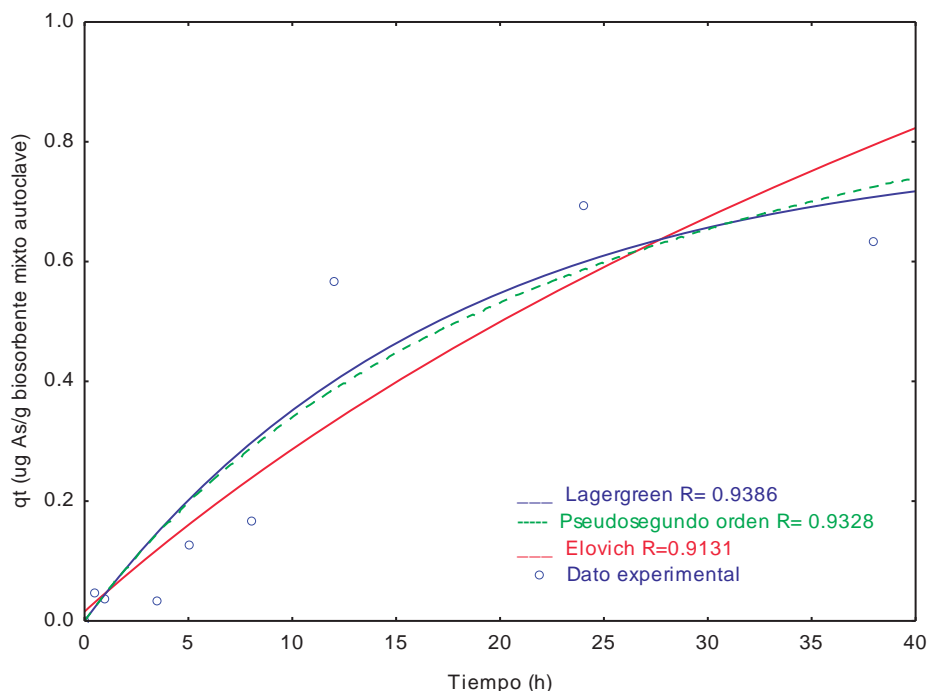


**Figura 24. Cinética de remoción de As usando BME.**

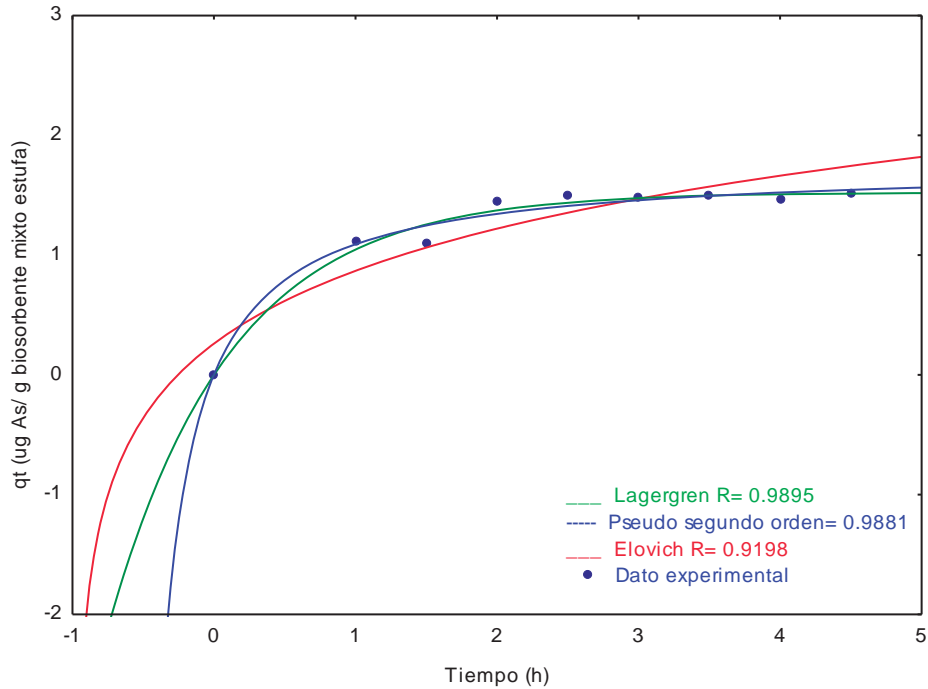
El ajuste a los tres modelos empíricos demostró que el proceso correspondió a una adsorción de pseudo segundo orden (Figuras 25 y 26) para ambos casos con valores en la  $K_2=0.0320\text{g/mg.h}$  para la biomasa mixta de autoclave y  $K_2=0.9347\text{g/mg.h}$  para la biomasa mixta de estufa; indicando con esto que la velocidad inicial de sorción fue rápida.

Singh *et al.* (2009) reportaron un comportamiento diferente para un biosorbente mixto compuesto por alúmina y sílica, deduciendo que se trató de una sorción superficial, debido a la naturaleza de ese biosorbente.

En la Tabla XI se muestran los valores de las constantes para cada uno de los modelos probados, así como su coeficiente de correlación. El modelo de pseudo segundo orden representado por las variables  $q_e$  y  $K_2$ , que representan a la cantidad de soluto adsorbido ( $\mu\text{g/g}$ ) en el equilibrio y la constante de velocidad, respectivamente, es el que mejor describe la velocidad de sorción de As(V) para cada unos de las biomazas probadas, indicando con ello que se trata de una quimisorción. Estos coeficientes indican además que la velocidad inicial de sorción de arsenato fue significativamente alta.



**Figura 25. Modelos cinéticos aplicados al proceso de adsorción en BMA.**



**Figura 26. Modelos cinéticos aplicados al proceso de adsorción en BME.**

**Tabla XI. Valores de los parámetros cinéticos de los modelos empíricos para biomasa mixta.**

	Biomasa mixta autoclave		Biomasa mixta estufa	
MODELO	Parámetro cinético	R	Parámetro cinético	R
Lagergren	$K_L=0.0584 h^{-1}$ $q_e=0.7939 ug/g$	0.9386	$K_L=1.1619 h^{-1}$ $q_e=1.5226ug/g$	0.9895
Pseudo-segundo Orden	$K_2=0.0320g/mg.h$ $q_e=1.2149ug/g$	0.9328	$K_2=0.9347g/mg.h$ $q_e=1.7547ug/g$	0.9881
Elovich	$\alpha=1.007ug/g.h$ $\beta=0.0316 ug/mg$	0.9131	$\alpha=1.1976ug/g.h$ $\beta=1.1639 ug/mg$	0.9198

Por los valores obtenidos para los cuatro tipo de biosorbentes, y por los valores obtenidos en el ajuste a los modelos cinéticos, los biosorbentes que tuvieron una mayor velocidad inicial de

adsorción fueron la biomasa muerta de *Trichoderma atroviride* y la BME, lo cual indicó que estos biosorbentes realizaron una sorción más rápida, comparada con los RL-Fe3 y BMA.

### 6.3 Isotermas de adsorción

#### 6.3.1 Isotermas de sorción en residuos de limón

La modelación de equilibrio de adsorción o de la capacidad de adsorción consiste en representar el estado de equilibrio que determinan las concentraciones de adsorbato en la solución ( $C_e$ ) y sobre el material adsorbente ( $q_e$ ). Los modelos permiten conocer la cantidad máxima susceptible de ser fijada sobre el adsorbente para una concentración de disolución dada; es decir, la modelación consiste en buscar una relación de los valores  $q_e$  y  $C_e$  (Weber y Smith, 1987).

Los datos obtenidos para RL-Fe3 se presentan en la Figura 27, los cuales nos demuestran que, bajo estas condiciones experimentales, la isoterma tiene una forma lineal. El valor del coeficiente lineal de sorción (coeficiente de partición) corresponde al valor de la pendiente de la línea ajustada:  $K_d = 1.8171$  L/g; por lo tanto a mayor valor en el coeficiente mayor será la capacidad máxima de retención del material biosorbente. Un comportamiento similar fue reportado por Brunson y Sabatini (2009) al evaluar la remoción de arsenatos con carbón de huesos animales, obteniendo un valor de  $K_d = 0.035$  L/g.

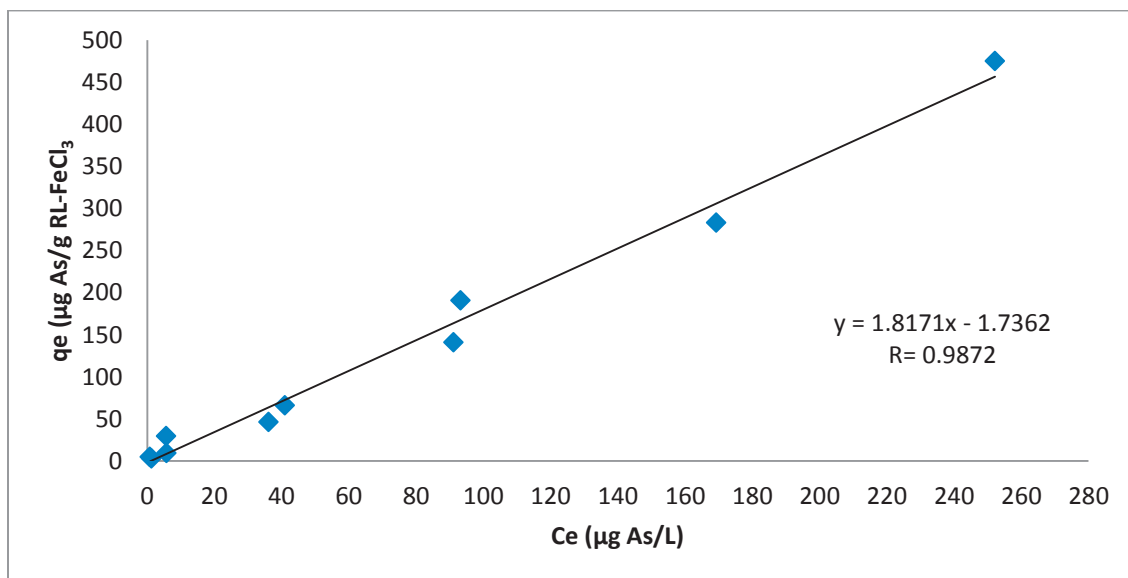


Figura 27. Isoterma de adsorción para RL-Fe3.

Estos datos sugieren que el biosorbente usado aun tiene capacidad de seguir reteniendo arsénico en soluciones acuosas de concentración mayor.

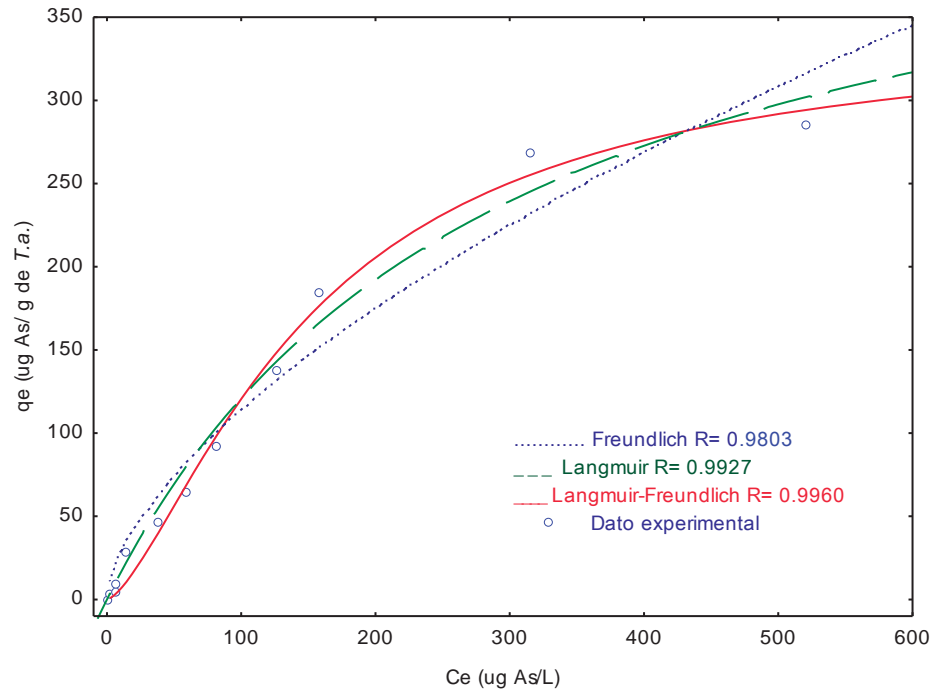
El último punto de la isoterma que equivale a 474.8  $\mu\text{g As/g RL-Fe}$  indicando que la capacidad de adsorción de este biosorbente, en el intervalo de concentraciones probado, fue significativa.

### 6.3.2 Isoterma de sorción para biomasa muerta de *Trichoderma atroviride*

Usando el tiempo al equilibrio obtenido en las cinéticas de adsorción se observó que *Trichoderma atroviride* demostró una capacidad máxima de adsorción de 285.20  $\mu\text{g As/g}$  biomasa; estos datos fueron ajustados a los modelos isotérmicos empíricos (Tabla XII) de Langmuir, Freundlich y Langmuir-Freundlich (Slejko, 1985); siendo el modelo al que más se ajustaron el de Langmuir-Freundlich con un coeficiente de correlación de  $R= 0.9960$  indicando con esto una biosorción heterogénea, debido a los diferentes sitios de adsorción, ya que los grupos funcionales que influyen, poseen diferente energía (Figura 28).

**Tabla XII. Parámetros isotérmicos observados en la retención de arsénico usando como biosorbente *Trichoderma atroviride*.**

MODELO	Parámetros isotérmicos	R
Freundlich	$K_F = 6.6174$ $n = 1.6172$	0.9803
Langmuir	$q_0 (\mu\text{g/g}) = 468.93$ $b (L/\mu\text{g}) = 0.003$	0.9927
Langmuir-Freundlich	$K_{LF} = 0.2169$ $a_{LF} = 0.006$ $n_{LF} = 1.4664$	0.9960



**Figura 28. Modelos isotérmicos aplicados al proceso de biosorción en biomasa de *Trichoderma atroviride*.**

### 6.3.3 Isotermas de sorción para biomasa mixta

La capacidad máxima de adsorción de As demostrada por la BMA fue de  $267.6 \mu\text{g As/g BMA}$ , y el ajuste de datos experimentales a los modelos empíricos demostró que la sorción fue de tipo heterogénea con una correlación de 0.9884 para el modelo de Langmuir- Freundlich (Figura 29). Mientras que para BME la capacidad máxima de adsorción de As fue de  $127.6 \mu\text{g As/g BME}$ ; el ajuste al modelo empírico fue el mismo que para BMA, con un coeficiente de correlación de 0.9916 (Figura 30).

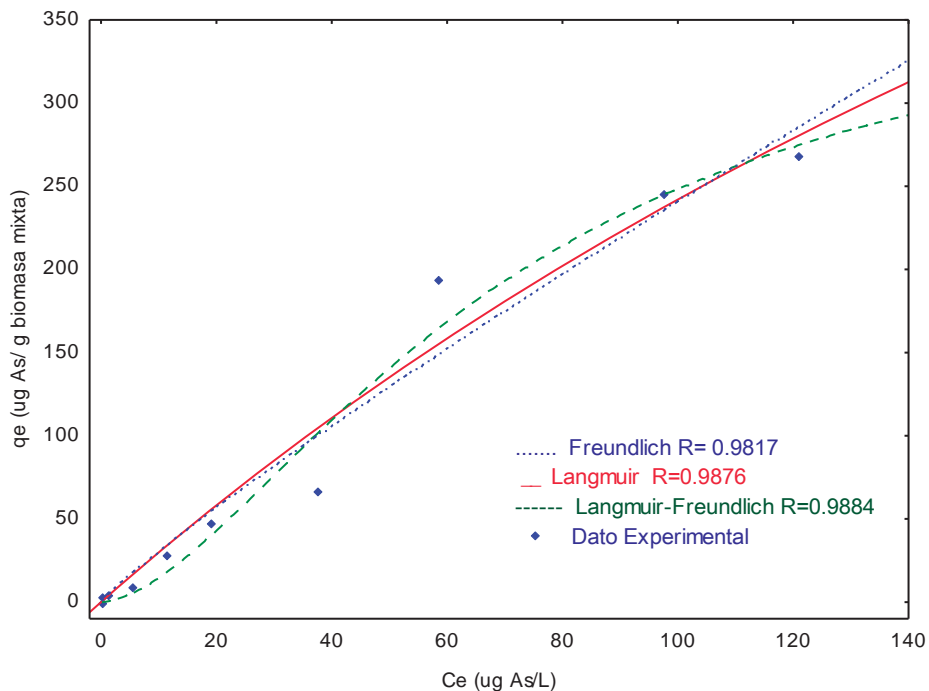


Figura 29. Modelos isotérmicos aplicados al proceso de biosorción en BMA.

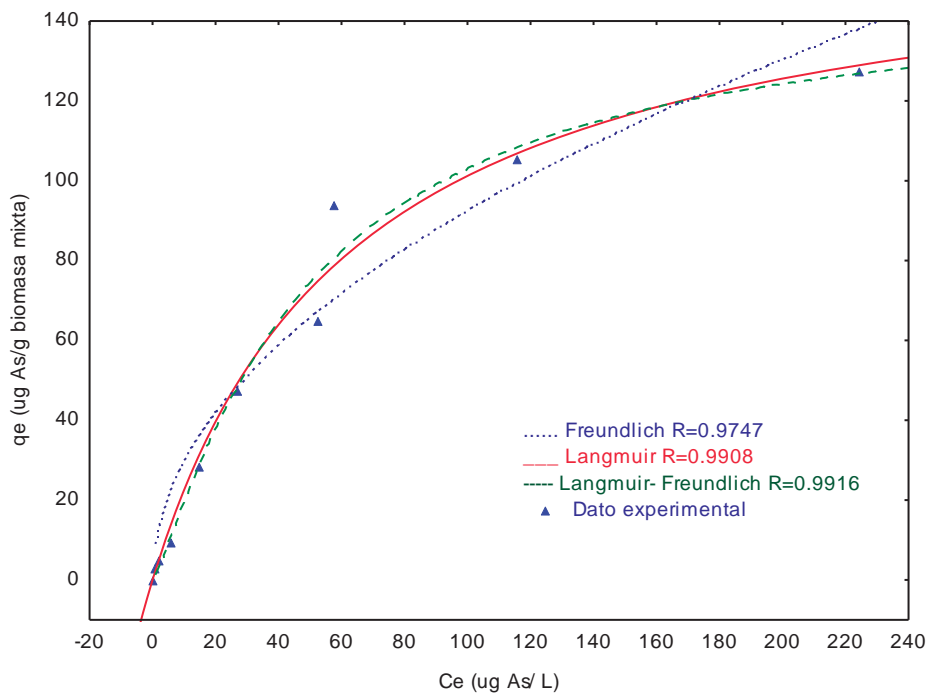


Figura 30. Modelos isotérmicos aplicados al proceso de biosorción en BME.

De acuerdo con el parámetro  $n$  (indicador de heterogeneidad) la BMA fue más heterogénea que la BME. Asimismo, el parámetro  $a_{LF}$  ( $\mu\text{g/g}$ ) la BMA tuvo mayor capacidad de remoción que la BME (Tabla XIII).

**Tabla XIII. Parámetros isotérmicos para la biomasa mixta.**

Biomasa mixta autoclave			Biomasa mixta Estufa	
MODELO	Parámetros isotérmicos	R	Parámetros isotérmicos	R
Freundlich	$K_F = 3.8944$ $n = 1.1162$	0.9817	$K_F = 9.4922$ $n = 2.0217$	0.9747
Langmuir	$q_0 (\mu\text{g/g}) = 153.69$  $b (L/\mu\text{g}) = 0.0026$	0.9876	$q_0(\mu\text{g}) = 165.45$  $b (L/\mu\text{g}) = 0.015$	0.9908
Langmuir-Freundlich	$K_{LF} = 0.3332$ $a_{LF} = 0.1435$ $n = 1.6615$	0.9884	$K_{LF} = 1.4579$ $a_{LF} = 0.0201$ $n = 1.1804$	0.9916

La capacidad de remoción demostrada por la biomasa mixta en ambos casos fue menor que la encontrada para los biosorbentes por separado siendo de mayor a menor como se indica:

$$RL\text{-Fe} > T. \textit{atroviride} > BMA > BME$$

Siendo los RL-Fe 3.7 veces más adsorbente que BME y 1.7 veces más que BMA.

Singh *et al.*, (2009) reportaron adsorción de As (III) en usando como biosorbente una mezcla de caolín y cenizas obteniendo una capacidad de remoción de dicho metaloide de 200  $\mu\text{g}$  de As/ g biosorbente.

Finalmente en la Tabla XIV. se presentan las capacidades de adsorción de algunos biosorbentes que han sido utilizados para la remoción de As en soluciones acuosas.

**Tabla XIV. Capacidad de adsorción de arsénico (µg/g) de algunos materiales.**

<b>Material</b>	<b>Capacidad de adsorción (µg As/g biosorbentes)</b>	<b>Referencia</b>
<b>Clinoptilolita- heulandita</b>	<b>75.4</b>	<b>Macedo y Olguin (2007)</b>
<b>Zeolita/San Luis</b>	<b>50</b>	<b>Elizalde <i>et al.</i> (2001)</b>
<b><i>Aspergillus-FeCl<sub>3</sub></i></b>	<b>538</b>	<b>Sathishkumar <i>et al.</i> (2008)</b>
<b>Resinas modificadas</b>	<b>60 mg As/g</b>	<b>Rau <i>et al.</i> (2000)</b>
<b>Carbón de huesos animales</b>	<b>50</b>	<b>Brunson y Sabatini (2009)</b>
<b>Residuos de Limón – Fe</b>	<b>474.8</b>	<b>En este trabajo</b>
<b><i>Trichoderma atroviride</i></b>	<b>285.1</b>	<b>En este trabajo</b>
<b>Biomasa mixta (<i>T. atroviride</i> cultivada sobre residuos de limón)</b>	<b>127.6 ~ 276.6</b>	<b>En este trabajo</b>

#### **6.4 pH**

El pH es un factor importante en la biosorción de metales pesados como el Cu, Pb, Zn, Cd y Ni, ya que cuando el valor de pH disminuye la biosorción incrementa para estos metales. Chen y Yang (2005) mencionan que el efecto del pH sobre la biosorción del metal se puede explicar por la competencia de los iones H<sup>+</sup> con los iones de metales pesados, generando una combinación de mecanismos, como intercambio iónico y formación de complejos metálicos en superficie.

El pH afecta sustancialmente a la disponibilidad de iones metálicos en la solución (especiación) por las interacciones en la superficie de los biosorbentes. Se sabe que a valores bajos de pH, H<sub>3</sub>AsO<sub>4</sub> y H<sub>2</sub>AsO<sub>4</sub><sup>-</sup>, son las especies de As (V) predominantes en disolución acuosa. En un estudio realizado en la biosorción de arsenatos con rapa de uva se observó que estas especies aniónicas interactúan con más fuerza con los respectivos ligandos cargados

positivamente, presentes en la superficie de la rapa; por lo que a pH bajos se reducían las especies negativas de As y se facilitaba así la sorción por la rapa con estructura de lignina (Villaescusa y Bollinger, 2008).

El Cr (VI) en disolución acuosa al igual que el As (V), está presente como anión ( $\text{HCrO}_4^-$  y  $\text{CrO}_4^{2-}$ ). Estudios demuestran que la lignina ha dado resultados satisfactorios como adsorbente de aniones y cationes metálicos, probablemente debido a la presencia en la lignina de grupos funcionales cargados tanto negativa como positivamente (grupos fenólico, carboxil y metil) (Lalvani *et al.* 2000).

#### 6.4.1 Efecto del pH en la sorción de As sobre RL-Fe3

En la Figura 31 se muestran los resultados obtenidos a diferentes valores de pH para los RLC-Fe3 y se observó que la mayor parte de la retención de arsénico (*qt*) se logró en el rango de pH 4-6; mostrando un incremento en pH 9 probablemente debido a alguna precipitación del metaloide por la unión con algún otro catión; a pH de 7 y 8 la biosorción no se llevó a cabo.

Jiménez en 2007 observó que en *Petroselinum crispum* modificado con hierro usado para la remoción de As (V) la reacción de sorción se llevó a cabo por interacciones ácido-base como pasa en las zeolitas o por la interacción con los grupos funcionales que se encuentran presentes en el biosorbente.

De Marco *et al.* (2003), utilizaron un sorbente polimérico inorgánico y sugirieron que el óxido de hierro hidratado cristalino y amorfo tuvo una fuerte afinidad para adsorber a los oxácidos y oxianiones de As(III) y As(V), por medio de intercambio de ligandos en la esfera de coordinación de átomos de hierro. Las especies de As(III) y As(V) son selectivamente enlazadas a la superficie del óxido, por medio de la formación de complejos a  $\text{pH} < 8$ .

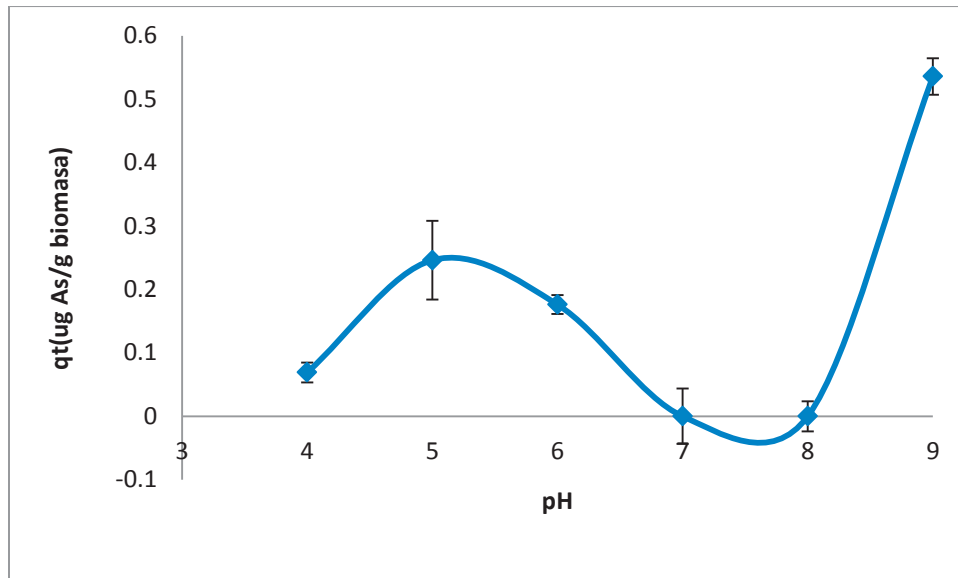
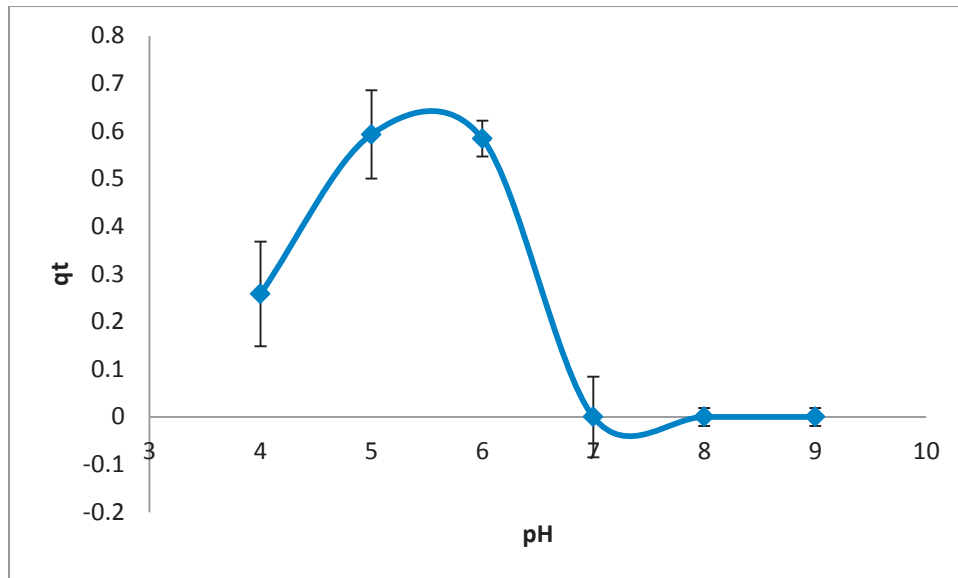


Figura 31. Efecto de la biosorción a diferentes pH en RL-Fe3.

#### 6.4.2 Efecto del pH en la sorción de As usando cm biosorbente biomasa muerta de *T. atroviride*

Park *et al.* (2010) estudiaron en la biosorción de Cr (VI) en *Aspergillus niger* y propusieron dos mecanismos: el primero consistía en una reducción de Cr (VI) a Cr (III) por el contacto con la biomasa; y el segundo mecanismo se dividió en 3 partes: la unión de Cr(VI) a los grupos cargados positivamente como son las aminas de quitina y quitosano, presentes en la pared celular del hongo; ii) la reducción de Cr(VI) a Cr(III) por grupos funcionales adyacentes, teniendo un valor de potencial de reducción más bajo que el de Cr(VI); y iii) la liberación de Cr(III) reducido en solución acuosa, por repulsión electrónica entre los grupos cargados positivamente y el ion catiónico de Cr(III), este comportamiento también es posible explicarlo para el caso del As; en la Figura 32 se observa el comportamiento de la biomasa muerta del hongo *Trichoderma atroviride* en la que la mayor parte de la biosorción se llevó a cabo a pH bajos entre 4-6 donde la especie de disociación predominante es  $H_2AsO_4^-$ , y prácticamente nula a pH de 7-9, indicando con esto que la biosorción se debe a uniones con grupos básicos.



**Figura 32. Efecto de la biosorción a diferentes pH en biomasa muerta de *Trichoderma atroviride*.**

#### 6.4.3 Efecto del pH en la sorción de As usando cm biosorbente biomazas mixtas

Para la biomasa mixta tratada por calor húmedo (Figura 33) se observó que la mayor parte de la sorción ocurrió a pH 4, y de nuevo a pH 6, y para la biomasa mixta tratada por calor seco (Figura 34) la biosorción se llevó a cabo a pH 4, y 7. El valor de  $q_t$  para el caso de la biomasa mixta tratada por calor húmedo puede deberse a la precipitación de la sal a causa del NaOH usado para ajustar el pH de la solución.

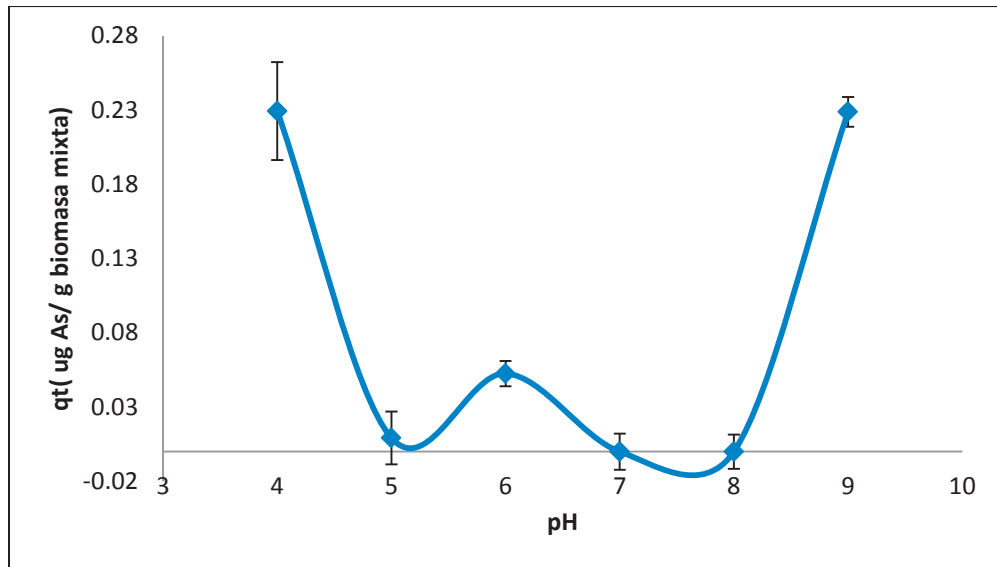


Figura 33. Efecto de la biosorción a diferentes pH en biomasa mixta tratada por calor húmedo.

En ambos casos la especie de arsénico predominante observada fue la monovalente ( $H_2AsO_4^-$ ), pudiendo asumirse que el proceso de biosorción está ocurriendo sobre grupos funcionales básicos, de manera que permitan la unión del arsénico. No hay que olvidar que los residuos de limón de la biomasa mixta también fueron tratados con Fe. En la remoción de As del agua utilizando cloruro férrico o sulfato férrico (como floculantes), la adsorción por los complejos de hierro se realiza mediante intercambio de ligando de la especie de oxianión por  $OH_2$  y  $OH^-$  (Hans *et al.* 2002).

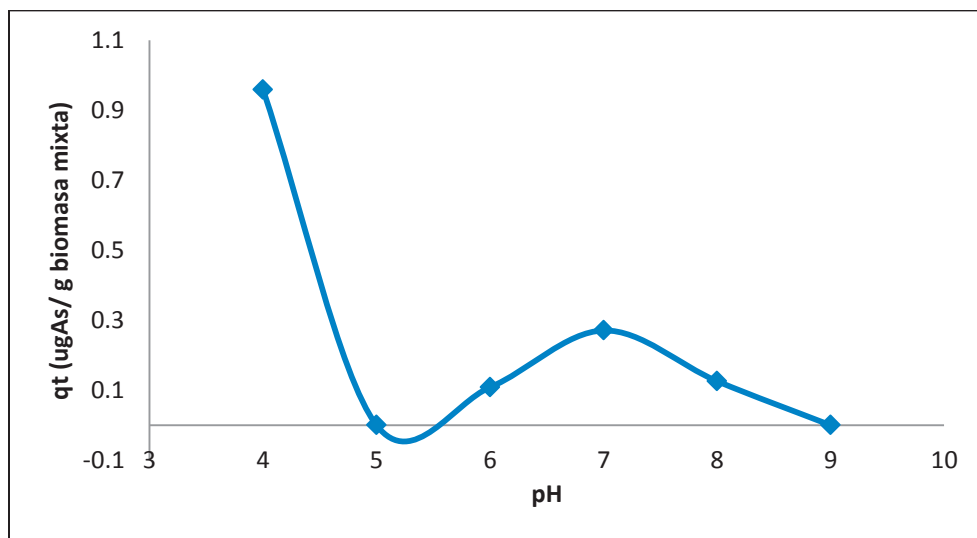


Figura 34. Efecto de la biosorción a diferentes pH en biomasa mixta tratada por calor seco.

## Capítulo IV

### 7. CONCLUSIONES

El acondicionamiento de los residuos de limón con cloruro férrico favorece la remoción de arsénico en soluciones acuosas. Además, a determinadas concentraciones de hierro ayuda al crecimiento del hongo sobre los mismos.

Las biomásas muertas contienen diversos compuestos como celulosa, hemicelulosa y lignina, los cuales a su vez poseen grupos funcionales que están directamente involucrados en la retención de hierro y arsénico (V).

La cinética de sorción para los residuos de limón y biomasa mixta esterilizada por autoclave es un proceso relativamente lento, en comparación con la biomasa mixta esterilizada por estufa y el hongo *T. atroviride*. El modelo de pseudo segundo orden es el que mejor describe la cinética de sorción para todos los tipos de biomasa, indicando con ello que se lleva a cabo para estos sistemas un mecanismo de sorción de tipo químico.

Las biomásas mixtas probadas poseen una capacidad de remoción de As significativamente alta en soluciones acuosas, sin embargo; el uso de los biosorbentes por separado, posee una capacidad más alta en la remoción de dicho metaloide. En particular, el limón acondicionado con cloruro férrico demostró ser el mejor biosorbente por su alta capacidad de remoción del arsénico. El modelo empírico al cual se ajustaron todos los biosorbentes utilizados fue el de Langmuir-Freundlich, lo cual indica que se trata de una sorción heterogénea.

## 8. REFERENCIAS

- **AACC**. American Association of Cereal Chemists. Approved Methods. 10<sup>th</sup> edition. Ed. by the American Association of Cereal Chemists. Minneapolis, MN, USA. (2000).
- **Adams**, D.J. 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*, 150: 2029-2035.
- **Agamez**, R.E.Y., Zapata, N.R.I., Oviedo, Z.L.E. Barrera, V.J.L. 2008. Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. *Revista colombiana de Biotecnología*, 10:23-34.
- **Aguilar**, A. S., Cortés, M. R., Martínez, F.H.E., Alfaro, C.V.R., Bartolomé, C.M.C. 2009. Uso de residuos de naranja (*Citrus sinensis*) y tamarindo (*Tamarindus indica*) como biosorbentes en la remoción de plomo, cadmio y zinc de agua contaminadas. *Memorias del 5º Congreso Estatal de Ciencia y Tecnología*, Morelia, Michoacán, México.
- **Al Rmalli**, S.W., Harrington, Ch.F., Ayub M., Haris P.I. 2005. A biomaterial based approach for arsenic removal from water. . *Journal of Environmental Monitoring*, 7:279-282.
- **Albert**, L. 1997. *Introducción a la Toxicología Ambiental*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, División de Salud y Ambiente, OPS/OMS. México. 471 pp.
- **Alfaro**, R., M.A. Herrera, Cortés, R., N. Segovia, V. Martínez y B. Villalobos. 2007. Evaluación del contenido de arsénico en el lago de Cuitzeo, México. VI Congreso Internacional y XII Congreso Nacional de Ciencias Ambientales. Chihuahua, México.
- **Alzaydien**, A. S. 2009. Orange peels as low cost adsorbent for the removal of Pb (II) from wastewater: Equilibrium and Kinetic Studies. *World Applied Sciences Journal*, 6:309-322.
- **Anjana**, K.V., Vipul, D., Upadhyay, R.V. 2010. An Investigation on Tolerance and Accumulation of a Facultative Marine Fungus *Aspergillus flavus* to Pentavalent Arsenic. *Journal Ocean University of China*, 9: 65-67.
- **Anónimo** consultado en febrero del 2010:
- [http://www.hipernatural.com/es/pltlimon\\_criollo.html](http://www.hipernatural.com/es/pltlimon_criollo.html)
- **Anónimo** consultado en Junio del 2009:
- <http://www.limonmexicano.gob.mx/index.php?portal=limon>.

- **Babakhouya**, N., Aksas, H., Boughrara, S., Louhab, K. 2010. Adsorption of Cd (II) ions from aqueous solutions using mixed biosorbents prepared from olive stone and date pit. *Journal of applied Sciences*, 10: 2316-2321.
- **Bishnoi**, N.R., Kumar, R., Bishnoi, K. 2007 Biosorption of Cr (VI) with *Trichoderma viride* immobilized fungal biomass and cell free Ca- alginate beads. *Indian Journal of Experimental Biology*, 4: 657-664.
- **Bocanegra**, O.C., Bocanegra, E.M., Álvarez, A.A. 2002. Arsénico en aguas subterráneas: su impacto en la salud. XXXII IAH & VI ALHSUD Congress “Groundwater and human development”. *Memorias de Congreso*. Mar del Plata , Argentina.
- **Brunson**, L.R., Sabatini, D.A. 2009. An Evaluation of Fish Bone Char as an Appropriate Arsenic and Fluoride Removal Technology for Emerging Regions. *Environmental Engineering Science*, 26(12):1777- 1784.
- **Cañizares**, V.R.O. 2000. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42:131-143.
- **Carrillo**, A. 1996. Environmental geochemistry of the San Antonio-El Triunfo mining area, Baja California Peninsula, México. Ph. D. Thesis. Department of Geology and Geophysics, University of Wyoming, USA. Unpublished, 193 pag.
- **Carro**, P.M.E., Montoro, M.A. 2009. Adsorción de Arsénico en Geomateriales. III Conferencia Sudamericana de Ingenieros Geotécnicos Jóvenes. Córdoba, Argentina.
- **Čerňanský**, S., Urík M., Ševc, J., Khun, M. 2007. Biosorption and biovolatilization of arsenic by heat-resistant fungi. *Environmental Science and Pollution Research*, 14: 31-35.
- **Chen**, J.P.; Yang, L. 2005. Chemical modification of *Sargassum sp.* for prevention of organic leaching and enhancement of uptake during metal biosorption. *Environmental Science and Engineering*, 44:9931-9942.
- **Chen**, W., Parette, R., Zou, J., Cannon F.S., Dempsey, B.A. 2007. Arsenic removal by iron-modified activated carbon. *Water Research*, 41:1851–1858.
- **Clegg**, K.M. 1956. Analysis for starch and sugar content of roots. A modified anthrone-sulfuric acid method. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 7:40.
- **Cortés**, M.R., Solache-Ríos, M., Martínez-Miranda, V., Alfaro-Cuevas, R. 2007. Sorption behavior of 4-chlorophenol from aqueous solutions by a surfactant-modified Mexican zeolitic rock in batch and fixed bed systems. *Water, Air and Soil Pollution*, 187:85-94.

- **Crini**, G. 2008. Recent developments in polysaccharide- based material used as adsorbent in wastewater treatment. *Progress in polymer science*, 30: 38:70
- **Cuizano**, N.A., Navarro, A.E. 2008. Biosorción de metales pesados con algas marinas: posible solución a la contaminación a bajas concentraciones. *Análisis químico*, 104:120-125.
- **Dashtban**, M., Schraft,H., Qin, W. 2009. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. *International journal of biological sciences*, 5: 578-595.
- **De Marco**, M.J., SenGupta, A.K., Greenleaf, J.E. 2003. Arsenic removal using a polymeric/inorganic hybrid sorbent. *Water Research*, 37: 164-176.
- **Deng**, S., Ting, Y.P. 2007. Removal of As(V) and As(III) from water with a PEI modified fungal biomass. *Water Science and Technology*, 55:177–185.
- **DOF** (1994). Diario Oficial de la Federación. NOM-127-SSAI-1994. Salud ambiental, agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamiento al que debe someterse el agua para su potabilización. México.
- **Domsh**, K.H., Gams, W., Anderson, T.H. 1993. *Compendium of Soil Fungi*. Vol 1. Academic Press, London, 859 p.
- **Dudamel**, D., Wilmer J., Wolbert, D., Cazeaudumec, Y.R. 2010. Modelado de la cinética de adsorción de plaguicidas en fase acuosa sobre carbón activado considerando efectos de la temperatura. *Interciencia*, 35:255-262.
- **Elizalde**, G.M.P., Mattusch, J., Einicke, W.D., Wennrich, R. 2001. Sorption on natural solids for arsenic removal. *Chemical Engineering Journal*, 81:187-195.
- **EPA**. 2008. <http://www.epa.gov/safewater/arsenic/basicinformation.html>. consultado en agosto 2008.
- **Estrada**, O.P.A. 2009. Evaluación de las alternativas para la remoción de arsénico en el agua potable. *Aquaforum*, 13:10-13.
- **Faust**, S.D., Aly, O.M. 1999. *Chemistry of Water Treatment*. 2ª ed., Lewis Publishers. USA.
- **Flores**, V.J., Ly, M., Tapia, H.N., Maldonado, G.H. 2001. Biorremediación de metales tóxicos en efluentes mineros aplicando biosorción, *Revista del Instituto de Investigación*, 4(7).
- **Freeman**, K. 2009. Nutrient Protection against Arsenic Toxicity. *Environmental Health Perspectives*, 117: A211.

- **García**, R.R.B. 2009. Biosorption of chromium (III) by agro-wasted materials: characterization, sorption-desorption studies, mechanism and adsorption kinetic experiments. Tesis de doctorado. Instituto Potosino De Investigación Científica Y Tecnológica. San Luis Potosí. S.L.P. 195 pp.
- **Ghimire**, K.N., Inoue, K., Makino, K. 2002. Adsorptive removal of arsenic using orange juice residue. *Separation Science and Technology*, 37:2785–2799.
- **Han**, B., Runnells, T., Zimbron, J., Wickramasinghe, R. 2002. Arsenic removal from drinking water by flocculation and microfiltration. *Desalination*, 145:293-298.
- **Hansen**, H.K., Ribeiro, A., Mateus, E. 2006. Biosorption of arsenic (V) with *Lessonia nigrescens*. *Minerals Engineering*, 19 (5):486-490.
- **Heinrich**, R.R., Schaller, K.H., Horn J., Angerer, J. 2003. Arsenic species excretion after dimercaptopropanesulfonic acid (DMPS) treatment of an acute arsenic trioxide poisoning. *Archives of Toxicology*, 77(2):63-68.
- **Hirano**, S. Kobayashi, Y., Hayakawa, T., Cui X., Yamamoto, M., Kanno, S., Shraim, A. 2005. Accumulation and toxicity of monophenyl arsenicals in rat endothelial cells. *Archives of Toxicology*, 79:54–61.
- **Ho**, Y.S., McKay, G. (2000). The kinetic of sorption of divalent metal ions onto sphagnum moss peat. *Water Research*, 34(3):735-742.
- **Iliná**, A., Martínez, H.J.L., Segura, C.E.P., Villareal, S.J.A. Gregorio, J.K.M. 2009. Biosorción de arsénico en materiales derivados de maracuyá. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 25(4):201-216.
- **Javed**, M.M., Haq I., Shahbaz, F. 2007. Biosorption of Mercury from Industrial Effluent by Fungal Consortia. *Biorremediation Journal*, 11(3):149-153.
- **Jena**, B.S., Jayaprakasha, G.K., Singh, R.P., Sakariah, K.K., 2002. Chemistry and biochemistry of (–)-hydroxycitric acid from *Garcinia*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 50, 10–22.
- **Jiménez**, C.B.E. 2002 *Contaminación Ambiental en México*. Editorial LIMUSA. México. 33-42 pp.
- **Jiménez**, C.M.J. 2007. Clinoptilolita y *Petroselinum crispum* (perejil) como adsorbentes de As (V) como arsenatos. Tesis de maestría. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, Mex. 11-106 pp.

- **Kamala**, C.T., Chu, K.H., Chary, N.S., Pandey, P.K., Ramesh, S.L., Sastry, A.R.K., Chandra Sekha, K. 2005. Removal of arsenic (III) from aqueous solutions using fresh and immobilized plant biomass. *Water Research*, 30: 2815-2826.
- **Khambhaty**, Y., Mody, K., Basha, S., Jha, B. 2009. Biosorption of Cr(VI) onto marine *Aspergillus niger*: experimental studies and pseudo-second order kinetics. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25:1413–1421.
- **Kira**, R., Sawyer, R., Egan H. 2002. Composición y análisis de alimentos de Pearson. Compañía editorial continental.
- **Kovačević**, Z.F., Sipos, L., Brišky, F. 2000. Biosorption of Chromium, cooper, nickel and zinc ions on fungal pellets of *Aspergillus niger* 405 from aqueous solutions. *Food Technology and Biotechnology*, 38(3):211-216.
- **Kumari**, P., Sharma, P., Srisvastava, S. 2005. Arsenic Removal from aqueous system using plant biomass: a biorremedial approach. *Environmental Biotechnology*, 32:521-526.
- **Lalvani**, S.B., Hübner, A., Wiltowski, T. S.2000. Chromium adsorption by lignin. *Energy sources*. 22:45-56.
- **Latgé**, J-P. 2007. The cell wall: carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology*. 66:279-290.
- **Li**, Q., Wu, S., Liu, G., Liao, X., Deng, X., Sun, D., Hu, Y., Huang, Y. 2004. Simultaneous biosorption of cadmium (II) and lead (II) ions by pretreated biomass of *Phanerochaete Chrysosporium*. *Separation and Purification Technology*, 34:135-142.
- **Liu**, T., Li, H., Li Z., Xiao X., Chen, L., Deng L. 2007. Removal of hexavalent chromium by fungal biomass of *Mucor racemosus*: influencing factors and removal mechanism. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 23:1685–1693.
- **López**, L.M.A. 2009. Aprovechamiento de los residuos del procesamiento de la madera (aserrín de pino) para tratamiento de aguas contaminadas con arsénico. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. U.M.S.N.H. Morelia, Mich., México. 80 pp.
- **Macedo**, M.M.G., Olguin, M.T. 2007. Arsenic sorption by modified clinoptilolite–heulandite rich tuffs. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 59:139-142.
- **Maity**, S., Chakravarty, S., Bhattacharjee, S., Roy, B.C. 2005. A study on arsenic adsorption on polymetallic sea nodule in aqueous medium. *Water Research*, 39:2579-2590.

- **Mamisahebei** ,S., Jahed Khaniki Gh. R., Torabian, A., Nasser, S., Naddafi K. 2007. Removal of arsenic from an aqueous solution by pretreated waste tea fungal biomass. *Iranian Journal of Environmental Health, Science and Engineering.*, 4: 85-92.
- **Manahan**, S.E. 2007. *Introducción a la química elemental*. Ed Reverté. Mexico. 1era. edición. 145-184.
- **Maroto**, A.M.E., Rogel, Q.J.M. Consultado en Junio del 2009:
- [http://aguas.igme.es/igme/publica/con\\_recu\\_acuiferos/028.pdf](http://aguas.igme.es/igme/publica/con_recu_acuiferos/028.pdf).
- **Martínez**, F.M. 1998. Contenido de arsénico en el agua subterránea de la zona minera de San Antonio, Baja California Sur. Relación con los yacimientos minerales y obras mineras. Tesis Profesional. Departamento de Geología Marina, U.A.B.C.S. La Paz, B.C.S. México Inédita, 63 pp.
- **Matheickal**, J.T., Yu, Q., Woodburn, G.M. 1999. Biosorption of cadmium(II) from aqueous solutions by pre-treated biomass of marine alga *Durvillaea potatorum*. *Water Research*, 33: 335–342.
- **Millán**, C.E., Balderas, H.P., Roa, M.G., Barrera, D.C., Colín, C.A. 2008. Sorción de Cd(II) y Pb(II) usando un biosorbente de bajo costo. *Memorias del VII Congreso internacional y XIII congreso nacional de ciencias ambientales*. Ciudad Obregón, Sonora. México.
- **Mogollón**, L., Rodríguez, R., Larrota, W., Ramírez, N., Torres, R. 1998. Biosorption of Nickel using filamentous fungi. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 70-72: 593-601.
- **Mohan**, D., Pittman Jr., C.U., Bricka, M., Smith F., Yancey B., Mohammad J., Steele, P.H., Alexandre-Franco, M.F., Serrano, V.G., Gong, H. 2007. Sorption of arsenic, cadmium, and lead by chars produced from fast pyrolysis of wood and bark during bio-oil production. *Journal of Colloid and Interface Science*, 30:57-73.
- **Monroy**, M., Díaz, B.F., Razo, I., Carrizalez, L. 2002. Evaluación de la contaminación por arsénico y metales pesados (Pb, Cu, Zn) y análisis de riesgo en la salud en Villa de la Paz-Matehuala, S.L.P. Tesis de Maestría, Facultad de Ingeniería. UASLP.
- **Morales**, B.L., Cristiani, U.E. 2008. Hexavalent Chromium Removal by a *Trichoderma inhamatum* fungal strain isolated from tannery effluent. *Water Air Soil Pollution*, 187:327–336.
- **Mukhopadhyay**, R., Rosen, B.P. 2002. Arsenate Reductases in Prokaryotes and Eukaryotes. *Environmental Health Perspective*, 110:745–748.

- **Ofomaja**, A.E., Ho, Y.S. 2007. Effect of pH on cadmium biosorption by coconut copra meal. *Journal of Hazardous Materials*, B139:356–362.
- **Orzua**, G.M.C., Aguilar, G.C., Rodriguez, H. R., 2001. Velocidad de Crecimiento de *Aspergillus niger* sobre diversos residuos agroindustriales. IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería XIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica II Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica. Veracruz, Veracruz.
- **Ózer**, A., Ózer, D., Ekiz, H.I. 2004. The equilibrium and kinetic modeling of the biosorption of copper (II) ions on *Cladophora crispate*. *Adsorption*, 10:317-326.
- **Páez**, A. 2008. Evaluación de la concentración de arsénico y calidad del agua subterránea en función de su manejo en la cuenca de Cuitzeo, Michoacán. *Tesis de Licenciatura*. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México. 66 pp.
- **Park**, D., Yun ,Y-S., Park J.M. 2010. The Past, Present, and Future Trends of Biosorption. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15:86-102.
- **Pino**, G.H., Souza de Mesquita, L.M., Torem, M.L., Saavedra, P.G.A. 2006. Biosorption of cadmium by green coconut shell powder. *Minerals Engineering*, 19:380-387.
- **Pinzón**, B.M.L., Cardona, T.A.M. 2008. Caracterización de la cáscara de naranja para su uso como material bioadsorbente. *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 6:1-23
- **Pinzón**, B.M.L., Vera, V.L.E. 2009. Modelamiento de la cinética de bioadsorción de Cr (III) usando cáscara de naranja. *Dyna*, 76(160):95-106.
- **Pokhrel**, D., Viraraghavan, T. 2007. Arsenic removal from an aqueous solution by modified *A. niger* biomass: Batch kinetic and isotherm studies. *Journal of Hazardous Materials*, 150: 818-825.
- **Ponce**, V.G., Botello, A.V. 1992. Aspectos geoquímicos de la contaminación por metales pesados en la Laguna de Términos, Campeche. *Hidrobiológica*, 1:1-10.
- **Prosky**, L., Asp, N.G., Schweizer, T.F., Devries, J.W., Furda, I. 1998. Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 71:1017-1023.
- **Puente**, G.A. La Cadena Productiva del Limón Mexicano (*Citrus aurantifolia swingle*) Análisis de su Competitividad en el Estado de Colima. 2002. consultado en Febrero del 2010 en: <http://www.aserca.gob.mx/sicsa/estudios/analisis-limon.pdf>.

- **Quaiser**, S., Saleemi, A.R., Umar., M. 2009. Biosorption of lead (II) and chromium (VI) on groundnut hull: equilibrium, kinetics and thermodynamics study. *Electronic Journal of Biotechnology*, 12:1-6.
- **Quintana**, M.E.C., Sosa, C.M., Puga, T.S., Quintana, M.G., Soto, C.R., Lebgue, K.T. 2007. Cuantificación de la contaminación por arsénico, cromo y hierro en la Cuenca del Rio Conchos: VI Congreso Internacional y XII Congreso Nacional de Ciencias Ambientales, Memorias de Congreso. Chihuahua, México.
- **Rao**, S.K., Andand, S., Venkateswarlu, P. 2010. Cadmium removal from aqueous solutions using biosorbent *Syzygium cumini* leaf powder: Kinetic and equilibrium studies. *Korean Journal Chemistry Engineering*, 27:1547-1554.
- **Rau**, I., Gonzalo, A., Valiente M. 2000. Arsenical removal from aqueous solution from iron (III) from loaded chelating resin. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 246:597-600.
- **Rodriguez**, I., Piñeros, Y. 2007. Producción de complejos enzimáticos celulolíticos mediante el cultivo en fase solida de *Trichoderma sp.* Sobre racimos de vacios de palma de aceite como sustrato. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 14:35-42.
- **Rodriguez**, R., Ramos, J.A., Armienta, A. 2004. Groundwater arsenic variations: the role of local geology and rainfall. *Applied Geochemistry*, 19:245-250.
- **Sandoval**, L. 2000. Estabilización y disposición de residuos que contienen arsénico. Anuario 2000 Revista IMTA Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. 53 pp.
- **Sangnark**, A., Noomhorm, A. 2003. Effect of particle sizes on functional properties of dietary fibre prepared from sugarcane bagasse. *Food Chemistry*, 80:221–229.
- **Sathishkumar**, M., Binupriya, A.R., Swaminathan, K., Choi, J.G., Yun, S.E. 2008. Arsenite sorption in liquid-phase by *Aspergillus fumigatus*: Adsorption rates and isotherm studies. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24:1813–1822.
- **Segovia**, N., Armienta, M.A. 2008. Arsenic and fluoride in the groundwater. *Environmental Geochemistry Health*, 30:345-353.
- **Sharpe**, M. 2003. Deadly waters run deep: the global arsenic crisis. *Journal of Environmental Monitoring*, 5:81-85.
- **Siham**, A.A. 2007. Removal of lead and cooper by some filamentous fungi isolated from Riyadh region. *World Journal of Agricultural Sciences*, 3:458-467.

- **Singh** A.P., Srivastava, K.K., Shekhar, H. 2009. Arsenic (III) removal from aqueous solutions by mixed adsorbent. *Indian Journal Chemical Technology*, 16:136-141.
- **Slejko**, F.L. 1985. *Adsorption Technology: A step-step approach to process evaluation and application*. Marcel Dekker inc. New York and Basel.
- **Smedley**, P.L., Kinniburgh, D.G. 2002. A review of the source, behavior and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*, 17(5):517-568.
- **Stýblo**, M., Drobná, Z., Jasper, I., Lin, S., Thomas, D.J. 2002. The Role of Biomethylation in Toxicity and Carcinogenicity of Arsenic: A Research Update. *Environmental Health Perspective*, 110:767–771.
- **Su**, S., Zeng, X. Bay, L., Jiang, X., Li, L. 2010. Bioaccumulation and Biovolatilization of Pentavalent Arsenic by *Penicillium janthinellum*, *Fusarium oxysporum* and *Trichoderma asperellum* Under Laboratory Conditions. *Current Microbiology*.
- **Valdés**, P.F., Cabrera, V.M. 1999. La contaminación por metales pesados en Torreón, Coahuila, México. *En Defensa del Ambiente, A.C.* Primera Edición. 46pp.
- **Van Soest**, P.J. 1963. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 46:829.
- **Vieyra**, H.S.F.R., Volesky, B. 2000. Biosorption: a solution to pollution? *International Microbiology*, 3:17-24.
- **Villaescusa**, I., Bollinger, J.C. 2008. Arsenic in drinking water: sources, occurrence and health effects (a review). *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 7:307–323.
- **Villaescusa**, I., Fiol, N., Martínez, M., Miralles, N., Poch, J., Serarols, J., 2004. Removal of copper and nickel ions from aqueous solutions by grape stalks wastes. *Water Research*, 38: 992-1002.
- **Villalobos** C.B., Alfaro C.R., Cortés M.R., Martínez M.V., Márquez B.L. (2010). Distribution and partitioning of iron, zinc, and arsenic in surface sediments in the Grande River mouth to Cuitzeo Lake, Mexico. *Environ. Monit. Assess.* 166(1-4):331-46.
- **Volesky**, B. 2003. Sorption and biosorption. BV Sorbex, Inc., Montreal
- **Weber**, J., Smith, E. 1987. Simulation and design models for adsorption process. *Environmental Science Technology*, 21:1040-1050.
- [www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY628432.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY628432.1). Casas, F.S., Rios M.,M., Bibbins, M., Ponce,

- N.,P. and Herrera,E,A. 2004. BLR-1 and BLR-2, key regulatory elements of photoconidiation and mycelial growth in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology* 150: 3561-3569.
- **Xuan**, Z., Tang, Y., Li, X., Liu, Y., Luo, F. 2006. Study on the equilibrium, kinetics and isotherm of biosorption of lead ions onto pretreated chemically modified orange peel. *Biochemical Engineering Journal*, 31:160-164.
  - **Yee**, N., Benning, L.G., Phoenix, V.R., Ferris, F.G. 2004. Characterization of metal-cyanobacteria sorption reactions: a combined macroscopic and infrared spectroscopic investigation. *Environmental Science and Technology*, 38:775–782.
  - **Zhou**, D., Zhang, L., Guo, S. 2005. Mechanisms of lead biosorption on cellulose/chitin beads. *Water Resource*, 39:3755–3762.