



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**Generación de bioscorodita en cultivos de hongos y As/Fe:
Bioensayos de toxicidad**

Tesis que presenta

JESÚS ADRIANA RAMÍREZ CASTILLO

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Directora de la Tesis:

DRA. REFUGIO RODRÍGUEZ VÁZQUEZ

Ciudad de México

JUNIO 2023



Agradecimientos

A la Dra. Refugio Rodríguez Vázquez por su dirección y gran apoyo para el desarrollo y culminación de esta investigación.

A la Dra. María Eugenia Hidalgo Lara, al Dr. Ricardo Aguilar López, al Dr. Mariano Cebrián García y al Dr. Roberto Zúñiga Silva, por sus valiosas aportaciones a este trabajo.

A la Dra. Viridiana Olin Sandoval, por su apoyo al incorporarse al comité en la culminación del proyecto.

A mis compañeros de laboratorio; Johanna Torres Pedraza, Andrea Luis Montiel, Anbu Landa Faz y Netza de los Santos R., por su apoyo técnico y valiosa compañía.

Al Proyecto SENER-CONACYT No. 263043, Implementación de energía termosolar, fotovoltaica y fotocatalítica para la remoción de metales pesados: diseño de planta piloto autosustentable.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) y al Centro Nacional de Prevención de Desastres (CENAPRED), por las facilidades otorgadas para la realización de esta investigación.



Dedicatorias

A mi esposo Javier Cristobal, a mis hijos Javier Emir y Natalia Sofía, por ser mi inspiración y motivación siempre.

A mis padres Eustolia y Aduino[†], a mis hermanas Mary y Aleida y a mis sobrinos Héctor Emilio y Alejandro, por estar siempre presentes a la distancia.



Contenido

RESUMEN.....	11
ABSTRACT.....	12
I. MARCO TEÓRICO.....	13
1.1 ARSÉNICO EN EL MEDIO AMBIENTE.....	13
1.2.1 EN AGUAS NATURALES	14
1.2.2 EN AGUA DE CONSUMO HUMANO	15
1.2 TOXICIDAD.....	17
1.3 TECNOLOGÍAS DE TRATAMIENTO.....	19
1.3.1 MICORREMEDIACIÓN	20
1.3.2 ENZIMAS FÚNGICAS	22
1.3.3 REACCIÓN FENTON	24
1.4 DISPOSICIÓN DE ARSÉNICO.....	26
II. ANTECEDENTES.....	28
III. JUSTIFICACIÓN.....	31
IV. HIPÓTESIS.....	32
V. OBJETIVOS.....	33
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	33
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
VI. METODOLOGÍA.....	34
6.1. ETAPA I. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD IN VITRO DEL ARSÉNICO SOBRE EL CRECIMIENTO DE HONGOS ASCOMICETOS Y BASIDIOMICETOS.....	34
6.2 ETAPA II. ESTABLECIMIENTO DE PARÁMETROS DE CULTIVO PARA FAVORECER CONDICIONES OXIDANTES EN EL MEDIO.....	35
6.3. ETAPA III. FORMACIÓN DEL CRISTAL BIOSCORODITA.....	36
6.4 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	37
MICROCULTIVO DE HONGOS	37
POTENCIAL DE HIDRÓGENO (PH)	37
POTENCIAL DE OXIDACIÓN-REDUCCIÓN (REDOX)	37
BIOMASA EN PESO SECO	38
AZÚCARES	38
PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H ₂ O ₂)	38
ENZIMA MANGANESO PEROXIDASA	39
ENZIMA LACASA	40



ENZIMA GLUCOSA OXIDASA	41
ARSÉNICO (As)	41
<u>VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</u>	<u>42</u>
7.1 ETAPA I. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD IN VITRO DEL ARSÉNICO SOBRE EL CRECIMIENTO DE HONGOS ASCOMICETOS Y BASIDIOMICETOS.....	42
7.1.1 REACTIVACIÓN DE CEPAS Y OBSERVACIÓN DE MICROCULTIVOS	42
7.1.2 ENSAYO DOSIS-RESPUESTA	44
7.1.2.1 <i>TRICHODERMA ATROVIRIDE</i>	47
7.1.2.2 <i>PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM</i>	48
7.1.2.3 <i>ASPERGILLUS NIGER</i>	49
7.1.2.4 <i>POSTIA PLACENTA</i>	51
7.2 ETAPA II. ESTABLECIMIENTO DE PARÁMETROS DE CULTIVO PARA FAVORECER CONDICIONES OXIDANTES EN EL MEDIO	53
7.2.1 BASIDIOMICETOS	53
7.2.1.1 <i>POSTIA PLACENTA</i>	54
7.2.1.2 <i>PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM</i>	55
7.2.2 ASCOMICETOS	57
7.2.2.1 <i>ASPERGILLUS NIGER</i>	58
7.2.2.2 <i>TRICHODERMA ATROVIRIDE</i>	59
7.2.3 PRODUCCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO POR HONGOS	65
7.2.4 APLICACIÓN DEL DISEÑO FACTORIAL FRACCCIONADO 2^{3-1}	68
7.3. ETAPA III. FORMACIÓN DEL MINERAL BIOSCORODITA	75
7.3.1 EVALUACIÓN DE PARÁMETROS PARA LA FORMACIÓN DE ESCORODITA	75
7.3.2 PRODUCCIÓN DE BIOSCORODITA USANDO MEDIO DE CULTIVO DE HONGOS BASIDIOMICETOS Y ASCOMICETOS	77
7.3.2.1. BASIDIOMICETOS	77
7.3.2.2. ASCOMICETOS	79
7.3.3 USO DE MEDIO DE CULTIVO DE <i>TRICHODERMA ATROVIRIDE</i> PARA LA FORMACIÓN DE BIOSCORODITA	81
7.3.4 CARACTERIZACIÓN DEL LA ESCORODITA ATMOSFÉRICA OBTENIDA QUÍMICAMENTE	84
7.3.5 CARACTERIZACIÓN DEL LA BIOSCORODITA OBTENIDA USANDO EL MEDIO DE CULTIVO DE HONGOS	87
<u>IX. CONCLUSIONES</u>	<u>93</u>
<u>IX. RECOMENDACIONES</u>	<u>94</u>
<u>XI. REFERENCIAS.....</u>	<u>95</u>
<u>ANEXO A. ANÁLISIS PROBIT PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MEDIA EFECTIVA (CME₅₀).....</u>	<u>105</u>
<u>ANEXO B. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL DISEÑO FACTORIAL FRACCIONADOS 2^{3-1} .</u>	<u>112</u>
<u>ANEXO C. ARTÍCULO PUBLICADO</u>	<u>119</u>



ANEXO D. CAPÍTULO DE LIBRO120

ANEXO E. ARTÍCULO POR SER ENVIADO121



Índice de tablas

Tabla 1. Estimación de la contaminación global por arsénico en agua subterránea (Tomada de Nordstrom, 2002).	15
Tabla 2. Rango de concentraciones de arsénico reportadas en agua subterránea en México (Adaptada de Arreguín-Cortés et al., 2010).....	17
Tabla 3. Enzimas características de los hongos basidiomicetos	23
Tabla 4. Arreglo codificado del diseño factorial fraccionado 2^{3-1}	36
Tabla 5. Concentración media efectiva (CME_{50}) a 3 días de crecimiento.	52
Tabla 6. Composición del medio Sivakumar modificado (Sivakumar et al., 2010).....	53
Tabla 7. Composición del medio Wunder modificado (Wunder et al., 1994)	57
Tabla 8. Valores máximos de potencial redox durante el cultivo líquido de hongos	60
Tabla 9. Diseño factorial fraccionado 2^{3-1} con las variables reales	71
Tabla 10. Medición de parámetros en cultivo líquido de <i>T. atroviride</i>	81
Tabla 11. Condiciones probadas en el laboratorio para la formación de escorodita	83



Índice de figuras

	Pág.
Figura 1. Diagrama Eh-pH de especies acuosas de arsénico en el sistema As-O ₂ -H ₂ O a 25°C y 1 bar de presión (Smedley y Kinniburgh, 2002).....	14
Figura 2. Mecanismos involucrados en la remoción de arsénico, adaptado de Tsai <i>et al.</i> , 2009.....	21
Figura 3. Estrategia experimental implementada para el desarrollo de la investigación.....	34
Figura 4. Determinación de H ₂ O ₂ por la técnica reportada por Klassen <i>et al.</i> , 1994.....	39
Figura 5. Curva de calibración para H ₂ O ₂	39
Figura 6. Observación macroscópica y microscópica (40X) de <i>P. placenta</i>	43
Figura 7. Observación macroscópica y microscópica (40X) de <i>P. chrysosporium</i>	43
Figura 8. Observación macroscópica y microscópica (40X) de <i>A. niger</i>	43
Figura 9. Observación macroscópica y microscópica (40X) de <i>T. atroviride</i>	44
Figura 10. Tasa de crecimiento del diámetro (TCD) de <i>Postia placenta</i> a los 14 días de tratamiento.....	46
Figura 11. Tasa de crecimiento del diámetro (TCD) de <i>T. atroviride</i> a los 3 días de tratamiento.....	47
Figura 12. Determinación de pH en tratamientos con <i>T. atroviride</i>	48
Figura 13. Tasa de crecimiento del diámetro (TCD) de <i>P. chrysosporium</i> los 3 días de tratamiento.....	49
Figura 14. Determinación de pH en tratamientos con <i>P. chrysosporium</i>	50
Figura 15. Tasa de crecimiento del diámetro (TCD) de <i>A. niger</i> a los 3 días de tratamiento.....	50
Figura 16. Determinación de pH en tratamientos con <i>A. niger</i>	51
Figura 17. Tasa de crecimiento del diámetro (TCD) de <i>P. placenta</i> a los 3 días de tratamiento.....	52
Figura 18. Producción de biomasa y consumo de azúcares de <i>P. placenta</i> en medio Sivakumar a 28°C y 125 rpm.....	54
Figura 19. Monitoreo de pH y potencial redox de <i>P. placenta</i> en medio Sivakumar a 28°C y 125 rpm.....	55
Figura 20. Producción de biomasa y consumo de azúcares de <i>P. chrysosporium</i> en medio Sivakumar a 28°C y 125 rpm.....	56
Figura 21. Monitoreo de pH y potencial redox de <i>P. chrysosporium</i> en medio Sivakumar a 28°C y 125 rpm.....	56
Figura 22. Producción de biomasa y consumo de azúcares de <i>A. niger</i> en medio Wunder a 28°C y 125 rpm.....	58
Figura 23. Monitoreo de pH y potencial redox de <i>A. niger</i> en medio Wunder a 28°C y 125 ppm.....	58
Figura 24. Producción de biomasa y consumo de azúcares de <i>T. atroviride</i> en medio Wunder a 28°C y 125 rpm.....	59
Figura 25. Monitoreo de pH y potencial redox de <i>T. atroviride</i> en medio Wunder a 28°C y 125 rpm.....	59
Figura 26. <i>P. placenta</i> a los 12 días de cultivo líquido en medio Sivakumar a 28°C y 125 rpm.....	62
Figura 27. <i>Phanerochaete chrysosporium</i> a los 8 días de cultivo líquido en medio Sivakumar a 39°C y 125 rpm.....	63



Figura 28. <i>A. niger</i> a los 4 días de cultivo líquido en medio Wunder a 28°C y 125 rpm.....	64
Figura 29. <i>T. atroviride</i> a los 4 días de cultivo líquido en medio Wunder a 28°C y 125 rpm.....	65
Figura 30. Producción de H ₂ O ₂ por el hongo <i>P. placenta</i> a 28°C y 125 rpm Producción de biomasa y consumo de azúcares de <i>T. atroviride</i> en medio Wunder a 28°C y 125 rpm.....	66
Figura 31. Monitoreo de pH y potencial redox de <i>T. atroviride</i> en medio Wunder a 28°C y 125 rpm.....	66
Figura 32. Producción de H ₂ O ₂ por el hongo <i>T. atroviride</i> a 28°C y 125 rpm.....	67
Figura 33. Producción de H ₂ O ₂ por el hongo <i>A. niger</i> a 28°C y 125 rpm.....	67
Figura 34. Producción de biomasa y consumo de azúcares de <i>T. atroviride</i> en medio Wunder a 28°C y 125 rpm.....	69
Figura 35. Monitoreo de pH y potencial redox de <i>T. atroviride</i> en medio Wunder a 28°C y 125 rpm.....	69
Figura 36. Producción de H ₂ O ₂ de <i>T. atroviride</i> en medio Wunder a 28°C y 125 rpm.....	70
Figura 37. Producción de biomasa de <i>T. atroviride</i> en medio Wunder modificado (Tabla 7) a 28°C y 125 rpm.....	72
Figura 38. Monitoreo de pH en cultivo de <i>T. atroviride</i> en medio Wunder modificado (Tabla 7) a 28°C y 125 rpm.....	72
Figura 39. Determinación del potencial redox en cultivo de <i>T. atroviride</i> en medio Wunder modificado (Tabla 7) a 28°C y 125 rpm.....	73
Figura 40. Producción de H ₂ O ₂ en cultivo de <i>T. atroviride</i> en medio Wunder modificado (Tabla 7) a 28°C y 125 rpm.....	73
Figura 41. Sistema de calentamiento y agitación para la obtención de escorodita atmosférica.....	76
Figura 42. Unidad experimental utilizada para la obtención de escorodita hidrotermal en autoclave.....	76
Figura 43. Proceso de obtención de escorodita atmosférica utilizando sulfato férrico como fuente de Fe ^{III}	77
Figura 44. Proceso de obtención de bioscorodita utilizando las diferentes cepas....	78
Figura 45. Proceso de obtención de bioscorodita utilizando el hongo <i>P. chrysosporium</i>	79
Figura 46. Solución final obtenida utilizando el medio de cultivo de <i>A. niger</i>	80
Figura 47. Muestras de los sólidos obtenidos con las diferentes cepas.....	80
Figura 48. Proceso de obtención de bioscorodita utilizando <i>T. atroviride</i>	82
Figura 49. Difractograma de rayos X de escorodita atmosférica precipitada químicamente a 92 °C filtrada en papel poro grueso.....	84
Figura 50. Difractograma de rayos X de escorodita atmosférica precipitada químicamente a 92 °C filtrada en papel con diámetro de 45 µm.....	84
Figura 51. Difractograma de rayos X de sulfato de calcio utilizado como semilla para la formación de escorodita atmosférica precipitada químicamente a 92 °C.....	85
Figura 52. Patrón de rayos X de escorodita hidrotermal obtenida por Caetano <i>et al.</i> , 2009.....	85
Figura 53. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de escorodita atmosférica precipitada químicamente a 92 °C filtrada en papel poro grueso.....	86
Figura 54. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de escorodita atmosférica precipitada a 92°C filtrada en papel con diámetro de 45 µm.....	86
Figura 55. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de sulfato de calcio (CaSO ₄ ·2H ₂ O).....	86



Figura 56. Difractogramas de rayos X del sólido obtenido de la reacción 5, utilizando el medio de cultivo filtrado de <i>T. atroviride</i>	87
Figura 57. Imagen SEM del sólido obtenido de la reacción 5 utilizando medio de cultivo de <i>T. atroviride</i>	88
Figura 58. Microscopía electrónica de barrido de la reacción con medio de <i>A. niger</i>	88
Figura 59. Microscopía electrónica de barrido de la reacción con medio de <i>T. atroviride</i>	89
Figura 60. Microscopía electrónica de barrido de la reacción con medio de <i>P. chrysosporium</i>	89
Figura 61. Microscopía electrónica de barrido de la reacción con medio de <i>P. placenta</i>	89
Figura 62. Difractograma de rayos X del sólido obtenido con <i>A. niger</i>	90
Figura 63. Difractograma de rayos X del sólido obtenido con <i>T. atroviride</i>	90
Figura 64. Difractograma de rayos X del sólido obtenido con <i>P. placenta</i>	91
Figura 65. Difractograma de rayos X del sólido obtenido con <i>P. chrysosporium</i>	91



Resumen

El Arsénico (As) es un metaloide clasificado como carcinógeno humano, que se encuentra ampliamente distribuido en el medio ambiente debido a procesos naturales o actividades antropogénicas. Está clasificado como carcinógeno humano y constituye una amenaza para la salud pública en varias regiones de México.

Actualmente la aplicación de tecnologías sustentables, tales como las biotecnológicas ha incrementado, es por ello que en esta investigación se consideró el uso de hongos como tecnología de tratamiento representando una alternativa económica y amigable con el ambiente. En este trabajo se propuso el uso de hongos para favorecer condiciones ácidas y oxidantes en el medio de cultivo, con la finalidad de oxidar el As^{III} a As^V , el cual es menos tóxico y posteriormente, favorecer la formación del mineral, bioscorodita ($FeAsO_4 \cdot 2H_2O$), reconocido como un compuesto estable para la disposición de arsénico.

Se realizó el cultivo y las pruebas de toxicidad *in vitro* de cuatro cepas fúngicas; dos ascomicetos; *Trichoderma atroviride* y *Aspergillus niger*, y dos basidiomicetos; *Postia placenta* y *Phanerochaete chrysosporium*, en presencia de sales de As^{III} y As^V . Encontrando que el As^V inhibe en mayor medida la tasa de crecimiento del diámetro (TCD) de los hongos en comparación con As^{III} , este último reconocido como más tóxico para humanos que el As^V . *T. atroviride* fue el hongo que presentó las características adecuadas, para la formación de bioscorodita; alta tasa de crecimiento en presencia de sales de As, así como el menor tiempo de cultivo para producir 0.39 mg/L de H_2O_2 y alcanzar condiciones ácidas (pH=2.2) y oxidantes (207 mV).

El potencial redox en el medio de cultivo de *T. atroviride* se incrementó a 324.80 mV mediante el mejoramiento de las condiciones de cultivo, seleccionadas a partir de la aplicación de un diseño experimental factorial fraccionado 2^{3-1} .

El medio de cultivo de *T. atroviride* fue utilizado para la reacción de formación de bioscorodita, adicionado con sales de Fe (III)/As(III) y semilla de escorodita, la temperatura a 92°C y el tiempo de reacción fue de 21 h, obteniendo un sólido con las características de bioscorodita reportadas en la literatura. Tanto la semilla de escorodita como la bioscorodita fueron caracterizadas por difracción de rayos X (DRX) y microscopía electrónica de barrido (SEM). Adicionalmente, el As total en solución se midió por espectrofotometría de absorción atómica, mostrando un reducción del 73 % respecto a la concentración inicial de arsénico (0.30 g/100 mL). Por lo anterior, se concluye que la bioscorodita producida bajo condiciones adecuadas de cultivo, podría ser una opción sustentable para la remoción y disposición de arsénico.



Abstract

Arsenic (As) is a metalloid widely distributed in the environment due to natural processes or anthropogenic activities. It is classified as a human carcinogen and constitutes a threat to public health in several regions of Mexico.

Currently, the application of sustainable technologies, such as biotechnological, has increased, which is why this research considers the use of fungi as a technology for the treatment, representing an economical and environment friendly alternative. In this work, the use of fungi was proposed to favor acid and oxidizing conditions in the culture medium, in order to oxidize As^{III} to As^{V} , which is less toxic. Subsequently, the crystallization conditions were established to favor the formation of the mineral, bioscorodite ($\text{FeAsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), recognized as a stable compound for the disposal of arsenic.

Culture and *in vitro* toxicity tests of four fungal strains were performed; two ascomycetes; *Trichoderma atroviride* and *Aspergillus niger*, and two basidiomycetes; *Postia placenta* and *Phanerochaete chrysosporium*, in the presence of As^{III} and As^{V} salts. Finding that As^{V} inhibits to a greater extent the diameter growth rate (DGR) of fungi compared to As^{III} , the latter recognized as more toxic to humans than As^{V} .

Trichoderma atroviride was the fungus that presented the adequate characteristics for the formation of bioscorodite; high growth rate in the presence of arsenic salts, as well as the shortest culture time to reach acid (pH=2.2) and oxidizing (207 mV) conditions, producing 0.39 mg/L of H_2O_2 in less time in modified Wunder medium.

The redox potential in the *T. atroviride* culture medium increased to 324.80 mV by improving the culture conditions, selected from the application of a 2^{3-1} fractional factorial experimental design.

The *T. atroviride* culture medium was used for the bioscorodite formation reaction, added with Fe(III)/As(III) salts and scorodite seed, the temperature was increased to 92°C and the reaction time was 21 h, obtaining a solid with the bioscorodite characteristics reported in the literature. Both the scorodite and bioscorodite seeds were characterized by X-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscopy (SEM). Additionally, the total As in solution was measured by atomic absorption spectrophotometry, showing a reduction of 73% with respect to the initial concentration of arsenic (0.30 g/100 mL) after the production of scorodite. From the above, it is concluded that bioscorodite produced under adequate growing conditions, it could be a sustainable option for the removal of arsenic from water.



I. Marco Teórico

1.1 Arsénico en el medio ambiente

El Arsénico (As) es un metaloide que se encuentra ampliamente distribuido en el ambiente, debido a procesos naturales (emisiones volcánicas, vetas de minerales, zonas geotérmicas, entre otras) o actividades antropogénicas (minería, fundidoras, uso de combustibles fósiles, de plaguicidas orgánicos, herbicidas y como aditivo de alimento para ganado y aves de corral) (Kowalski, 2014; Rangel *et al.*, 2015, Singh *et al.*, 2023).

La característica que hace de este metal una problemática es su fácil movilización bajo condiciones naturales. Se puede encontrar en diferentes estados de oxidación: como arseniato As^V , arsenito As^{III} , elemental As^0 y arseniuro As^{-III} hallándose más frecuentemente en su forma inorgánica como arsenito o arseniato (Tsai *et al.*, 2009). En ambientes naturales, el arsénico se encuentra en formas inorgánicas (As^{III} y As^V) y orgánicas (ácido monometilarsinato (MMA), ácido dimetilarsínico (DMA) y óxido de trimetilarsina (TMA). Estos pueden cambiar de uno a otro vía oxidación/reducción y metilación/desmetilación, debido a la actividad microbiana (Su *et al.*, 2011).

La cantidad de arsénico en el ambiente puede ser influenciada por biovolatilización a bajas temperaturas, donde los microorganismos aerobios y anaerobios, tales como bacterias y hongos microscópicos son particularmente responsables de la generación de compuestos volátiles de arsénico. Estos compuestos (especialmente arsina, mono-, di-, tri-metilarsina y óxidos de arsénico) pueden ser encontrados en gases liberados de ambientes naturales y antropogénicos, constituyendo este proceso una parte importante del ciclo biogeoquímico de los metales y metaloides (Cernaský *et al.*, 2009).



1.2.1 En aguas naturales

En aguas naturales, el arsénico se encuentra en general como especie disuelta, formando oxianiones. Los estados de oxidación que predominan son As^{III} y As^{V} , y con menos frecuencia, As^0 y $\text{As}^{-\text{III}}$. Generalmente, el As^{V} es la especie mayoritaria en agua, encontrándose bajo condiciones oxidantes, mientras que el As^{III} se encuentra bajo condiciones reductoras (Bowell *et al.*, 2014; Rangel *et al.*, 2015).

El estado de oxidación del arsénico y, por lo tanto, su movilidad, están controlados fundamentalmente por las condiciones redox (potencial redox, Eh) (Park *et al.*, 2022) y el pH, como se muestra en la Figura 1. Con respecto a las formas químicas, el As^{V} puede encontrarse como ácido arsénico (H_3AsO_4) y sus correspondientes productos de disociación (H_2AsO_4^- , HAsO_4^{2-} y AsO_4^{3-} , mientras que el As^{III} se presenta como ácido arsenioso (H_3AsO_3) y sus correspondientes derivados dependiendo del pH (H_4AsO_3^+ , H_2AsO_3^- , HAsO_3^{2-} y AsO_3^{3-} (Smedley y Kinniburgh, 2002; Litter *et al.*, 2009).

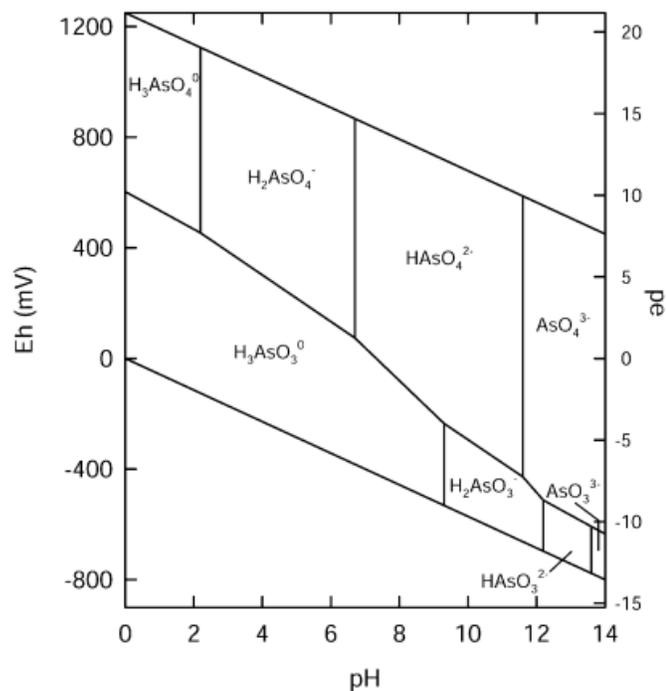


Figura 1. Diagrama Eh-pH de especies acuosas de arsénico en el sistema As-O₂-H₂O a 25°C y 1 bar de presión (Smedley y Kinniburgh, 2002).



1.2.2 En agua de consumo humano

La presencia de arsénico en agua subterránea ha sido reportada ampliamente en diversas partes del mundo (Tabla 1). La magnitud del problema de intoxicación por arsénico ocasionó que la Organización Mundial de la Salud (OMS) redujera el valor límite de arsénico en agua de consumo humano de 50 a 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (WHO, 2011), mientras que en nuestro país la normatividad marcaba una concentración de 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$, valor 2.5 veces mayor (DOF, 2000); sin embargo, el 2 de mayo de 2022 se publicó la actualización de la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-2021, Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de la calidad del agua, donde se establece un nuevo límite máximo permisible (10 $\mu\text{g.L}$), dando diferentes plazos para su cumplimiento a partir de la publicación de la norma, dependiendo del número de habitantes de la localidad (DOF, 2022).

Tabla 1. Estimación de la contaminación global por arsénico en agua subterránea (Tomada de Nordstrom, 2002).

No.	País/ Región	Población potencialmente expuesta	Concentración ($\mu\text{g/L}$)	Condiciones ambientales
1	Bangladesh	30,000,000	<1-2,500	Natural; Sedimentos aluviales/deltáicos con alta concentración de fosfato, orgánicos
2	Bengala occidental	6,000,000	<10-3,200	Similar a Bangladesh
3	Vietnam	>1,000,000	1-3,050	Natural; sedimentos aluviales
4	Tailandia	15,000	1-5,000	Antropogénico; minería y aluvión de dragado
5	Taiwán	100,000- 200,000	10-1,820	Natural; zonas costeras
6	Mongolia interior	100,000 a 600,000	<1-2,400	Natural; aluvial y sedimentos de lagos; alta alcalinidad



No.	País/ Región	Población potencialmente expuesta	Concentración (µg/L)	Condiciones ambientales
7	Xinjiang, Shanxi	>500	40-750	Natural; sedimentos aluviales
8	Argentina	2,000,000	<1-9,900	Natural; Rocas volcánicas, aguas termales ; alta alcalinidad Natural y antropogénico;
9	Chile	400,000	100-1,000	sedimentos vulcanogénicos, lagos de cuenca cerrada, aguas termales, minería
10	Bolivia	50,000		Natural; similar a Chile y partes de Argentina
11	Brasil		0.4-350	Minería de oro
12	México	400,000	8-620	Natural y antropogénico; sedimentos volcánicos, minería
13	Alemania		<10-150	Natural; arena mineralizada
14	Hungría, Rumania	400,000	<2-176	Natural; sedimentos aluviales; orgánicos
15	España	>50,000	<1-100	Natural; sedimentos aluviales
16	Grecia	150,000	-	Natural y antropogénico; aguas termales y minería
17	Reino Unido	-	<1-80	Minería; suroeste de Inglaterra
18	Ghana	<100,000	<1-175	Natural y antropogénico; minería de oro
19	EUA y Canadá	-	<1->100,000	Natural y antropogénico; minería, plaguicidas, reservas de As ₂ O ₃ , aguas termales, aluvial, cuencas cerradas de lagos, varias rocas

En varias regiones de México se han detectado concentraciones de arsénico por arriba de los límites permisibles para agua potable (Tabla 2). Esta contaminación ha sido asociada a tres principales ambientes, áreas de actividad geotérmica, acuíferos



aluviales y áreas de actividad minera (Alarcón-Herrera *et al.*, 2013; Vega, 2001). Sin embargo, son pocas las zonas donde se han determinado los procesos específicos involucrados en la liberación de este metaloide en las aguas subterráneas (Armenta y Segovia, 2008).

Tabla 2. Rango de concentraciones de arsénico reportadas en agua subterránea en México (Adaptada de Arreguín-Cortés *et al.*, 2010)

No.	Región /ESTADO	Rango de concentración reportada ($\mu\text{g. L}^{-1}$)
1	Comarca Lagunera, Coahuila y Durango	3 - 865
2	Chihuahua	5 - 650
3	Sonora	2 - 305
4	Valle del Guadiana, Durango	5 - 240
5	Baja California Sur	10 - 410
6	Valle de Zimapán, Hidalgo	14 - 1000
7	San Luis Potosí	0.2 - 21
8	Guanajuato	2.0 - 10

1.2 Toxicidad

Los compuestos volátiles de arsénico son más móviles, biodisponibles y frecuentemente más tóxicos en comparación con especies inorgánicas de arsénico tri- y pentavalente. Por ejemplo, las arsinas volátiles y las metilarinas son más tóxicas que el arsénico inorgánico trivalente; sin embargo, los óxidos de arsénico metilados volátiles son menos tóxicos que arsénico inorgánico (III) (Cernaský *et al.*, 2009). Estos últimos son producto de reacciones de metilación mediadas biológicamente en microorganismos como hongos, levaduras y bacterias que convierten el arsenito y arsenato en compuestos metilados de toxicidad moderada como el monometilarsonato [MMA(V)] o ácido monometilarsónico [MMAA,



$\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2$], el dimetilarseniato [DMA(V)] o ácido dimetilarsínico [DAMA, $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})$], el óxido de trimetilarsina (TMAO) y el ion tetrametilarsonio (TMA^+), los cuales son precursores de formas orgánicas más complejas y prácticamente no tóxicas, tal como los arsenolípidos, como la arsenobetaina (AB) y la arsenocolina (AC), y los arsenoazúcares (AsAZ) (Litter *et al.*, 2009). Cabe destacar que en los últimos años se ha encontrado que el arsénico trivalente, incluso sus compuestos metilados, tienen propiedades tóxicas más potentes que el arsénico pentavalente (Hughes, 2002).

La exposición al arsénico se presenta por inhalación, absorción a través de la piel y, principalmente, por ingestión, por ejemplo, de agua contaminada, manifestándose en diferentes efectos en la salud, dependiendo de la dosis y el tiempo de exposición. La intoxicación aguda por arsénico se asocia inicialmente a náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea severa y salivación, así como encefalopatía y neuropatía periférica. La dosis letal de arsénico varía de 100 a 300 mg, aunque también se ha estimado una dosis arsénico inorgánico en humanos de 0.6 mg/Kg/día (Ratnaike, 2003). La exposición crónica al arsénico resulta en la afectación de varios órganos. El metaloide se deposita en tejidos ricos en queratina: uñas, cabello y piel, presentándose cambios dermatológicos, como; hiperpigmentación y queratosis palmar y solar. Además existe un incremento en el riesgo de enfermedades cardiovasculares, respiratorias, diabetes mellitus y neutropenia (Ratnaike, 2003), así como cáncer (piel, pulmón, hígado, riñón y vejiga principalmente) y efectos cardiovasculares y neurológicos (Basu *et al.*, 2014).

Se han hecho algunas propuestas sobre el posible mecanismo de acción del arsénico sobre las células. El As^{V} puede remplazar el fosfato en varias reacciones bioquímicas, debido a que tienen una estructura y propiedades similares. Las sustituciones por fosfato y la subsecuente inhibición de la fosforilación oxidativa es la mayor causa de toxicidad del estado pentavalente As^{V} . Por otro lado, la afinidad del arsénico trivalente As^{III} por los grupos tioles o sulfhidrilos de las proteínas lo hace altamente tóxico, ya que las uniones de As^{III} -S promueven la inhibición de varias



enzimas (Hughes, 2002; Sharma y Sohn, 2009). Además, el As^{III} también actúa como disruptor endócrino por unión a receptores de hormonas e interfiere con la señalización normal de la célula (Tsai *et al.*, 2009).

1.3 Tecnologías de tratamiento

Entre las tecnologías que permiten eliminar metales del agua destacan la oxidación, la coagulación-precipitación, la adsorción, el intercambio de iones y diversas técnicas de membranas. Sin embargo, estos métodos se convierten en ineficientes o caros especialmente cuando la concentración de los metales es bajo, en el orden de 1 a 100 mg L⁻¹ (Say *et al.*, 2001).

Las tecnologías que se han aplicado en los últimos años para la remoción de arsénico de agua potable son las siguientes: 1) Coagulación, floculación, precipitación y filtración); 2) Adsorción e intercambio iónico; 3) Procesos basados en membranas y 4) Tratamientos biológicos, sin embargo, la adsorción es la que ha recibido mayor atención (Basu *et al.*, 2014, Abejón y Garea, 2015; Jadhav *et al.*, 2015). En particular, en América Latina los principales métodos de tratamiento usados son precipitación química/filtración y ósmosis inversa (Alarcón-Herrera *et al.*, 2013).

El arsénico puede oxidarse mediante procesos químicos o biológicos. La oxidación química es lenta, se utiliza cloro, hipoclorito de calcio y permanganato de potasio, pero pueden derivar en costos elevados, generar contaminación secundaria y ser ineficientes a bajas concentraciones de arsénico, por lo que se prefiere el proceso biológico (Rangel *et al.*, 2015).

Dentro de los procesos biológicos destaca el uso de algunos microorganismos que pueden utilizar el arsénico en su metabolismo, ya sea en su forma reducida de arsenito, o en su forma oxidada de arseniato mediante reacciones de óxido-



reducción, transformación enzimática, metilación, quelación, exclusión e inmovilización.

1.3.1 Micorremediación

La micorremediación es un método biológico de tratamiento basado en el uso de hongos para la remoción de contaminantes del ambiente mediante procesos de biodegradación, biosorción y bioconversión. La biosorción consiste en la acumulación por interacciones predominantemente independientes del metabolismo, tales como los procesos de adsorción o de intercambio iónico (Tobin *et al.*, 1994). Aunque en los hongos, el mecanismo no está completamente explicado, la sorción a polisacáridos, proteínas y otras moléculas presentes en la pared celular probablemente juega el papel más importante (Baldrian, 2003).

Varias especies de hongos tales como *Rhizopus arrhizus*, *Penicillium spinulum* y *Aspergillus niger* han sido ampliamente estudiados en la remoción de metales, y los mecanismos al parecer dependen de cada especie (Say, 2001). Algunos de los parámetros que pueden influir son el pH, ion metálico, concentración de la biomasa, pre-tratamiento físico o químico de la biomasa, presencia de varios ligandos en la solución y, de manera limitada, a la temperatura (Kapoor y Viraraghavan, 1995).

La biovolatilización de arsénico por hongos puede también ser considerada una técnica de biorremediación, ya que una vez que el arsénico metilado volátil está en el aire, este puede ser fácil y rápidamente oxidado y desmetilado y finalmente dispersado por los flujos de aire (Cernaský *et al.*, 2009).

Los hongos capaces de acumular y volatilizar arsénico dependen de la sorción a biomasa, importación/exportación, complejación con péptidos ricos en cisteína, oxidación/reducción y procesos de biometilación (Su *et al.*, 2011, Mohd *et al.*, 2019).



En el caso de eucariontes, estudios realizados con *Saccharomyces cerevisiae* sugieren la entrada de arsénico a la célula a través de tres diferentes transportadores. El As^{V} , debido a su similitud con el fosfato puede internalizarse a través de un transportador de fosfato. Por otro lado, el As^{III} lo hace a través de dos transportadores: uno de acuagliceroporinas y otro de hexosas. Una vez en el interior de la célula, ocurren una serie de etapas de desintoxicación para reducir los efectos de citotoxicidad aguda, que incluye la reducción de arsenato a arsenito mediante una arsenato reductasa Arr2p y la salida del arsenito de la célula mediante un transportador Arr3p. El arsenito en la célula puede unirse a varias proteínas quelantes o péptidos con grupos tiol, tales como glutatión (GSH), fitoquelatinas (PCs) y metalotioneinas (MTs) para formar complejos inactivos. Los primeros dos forman complejos con el arsenito que son transportados a las vacuolas (Tsai *et al.*, 2009) (Figura 2).

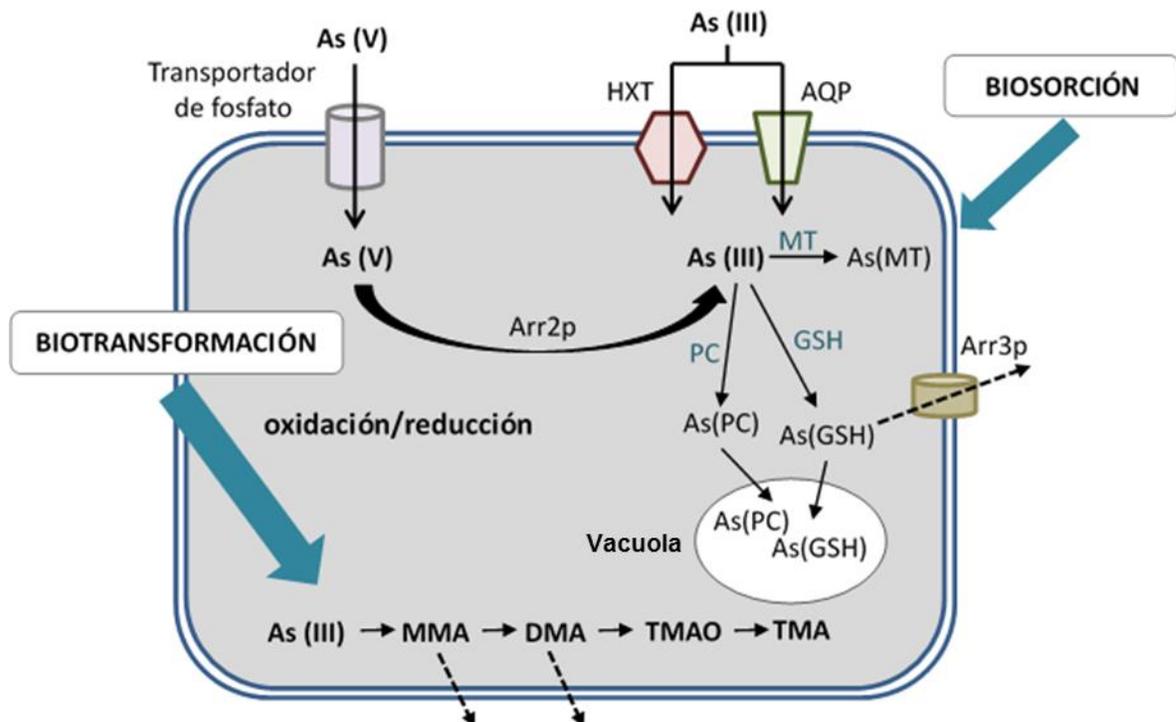


Figura 2. Mecanismos involucrados en la remoción de arsénico, adaptado de Tsai *et al.*, 2009. La producción de compuestos metilados de arsénico en hongos ha sido descrito por varios autores (Cernaský *et al.*, 2009, Su *et al.*, 2011, Mohd *et al.*, 2019).



1.3.2 Enzimas fúngicas

Entre los hongos se tienen dos divisiones relevantes desde el punto de vista ambiental; los basidiomicetos y ascomicetos. Cada una con enzimas características que ayudan a explicar su uso potencial en procesos de biorremediación.

En la división de los basidiomicetos se encuentran los hongos causantes de la podredumbre blanca (*Trametes versicolor*, *P. chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*) y podredumbre café (*P. placenta*) de la madera, es decir que causan el decaimiento de la madera por descomposición de los polímeros que la conforman, tales como la celulosa, hemicelulosa y lignina. Esto ha sido aprovechado en procesos de biorremediación de contaminantes con estructuras químicas parecida tales como hidrocarburos, plaguicidas, bifenilos policlorados (PCB's), entre otros. Además pueden acumular, remover metales o metilar los metales (Singh, 2006, Batista *et al.*, 2016).

La capacidad de biodegradación de compuestos orgánicos de estos hongos se asocia a un sistema enzimático en el que intervienen enzimas ligninolíticas extracelulares, como la lignina y manganeso peroxidasa (LiP y MnP), que tienen una potente capacidad oxidante (Quintero *et al.*, 2006). Ambas son capaces de oxidar a la lignina, y derivados de la misma, además de una variedad de compuestos. Estas enzimas comparten la estructura del grupo hemo presente en sus sitio activo. La LiP es relativamente inespecífica en sus sustratos reductores, puesto que oxida compuestos aromáticos de alto potencial redox tales como; el alcohol veratrílico, metoxibencenos, entre otros. Mientras que la MnP es específica en sus sustratos reductores y solamente el Mn^{2+} puede completar eficientemente su ciclo catalítico. El Mn^{3+} generado por la MnP es una especie altamente oxidante (1.54 V) con el inconveniente de ser altamente inestable en medio acuoso.



Otra enzima implicada es la lacasa, que es una fenol oxidasa extracelular producida principalmente por hongos ligninolíticos. Las fenol oxidasas son enzimas que catalizan la oxidación de un amplio espectro de compuestos fenólicos y aminas aromáticas utilizando el oxígeno molecular como aceptor de electrones, reduciéndolo a agua. Este grupo de enzimas posee cuatro átomos de cobre en su estado de oxidación $^{2+}$ que les confiere una coloración azul (Dávila-Vázquez y Vázquez-Duhalt, 2006).

En la siguiente *Tabla* se muestran algunas características de las enzimas mencionadas.

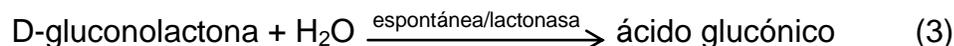
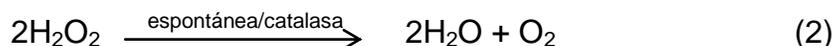
Tabla 3. Enzimas características de los hongos basidiomicetos

ENZIMA	CO FACTORES	REACCIONES
Lignina peroxidasa (LiP)	H_2O_2	Oxidación de núcleos aromáticos no fenólicos hasta radicales catiónicos
Manganeso peroxidasa (MnP)	H_2O_2 , Mn^{+2}	Oxidación de Mn^{+2} a Mn^{+3} el cual oxida fenoles a radicales fenólicos
Lacasas (Lac)	O_2 , Cu^{+2}	Reduce Cu^{+2} a Cu^{+1} , reduce O_2 a H_2O_2 . Oxidación de fenoles a radicales fenoxilo

Por otro lado, los ascomicetos (entre ellos; los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*), también tienen la capacidad de degradar compuestos orgánicos y remover metales; sin embargo, no poseen el sistema enzimático característico de los basidiomicetos. Debido a esto, en el grupo de trabajo se busca explicar el posible mecanismo que utilizan estos hongos para llevar a cabo estos procesos mediante la producción de ácidos orgánicos y especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La producción de H_2O_2 de estos hongos está asociada a varias enzimas oxidoreductasas, entre las que destaca; la glioxal oxidasa y la glucosa oxidasa.



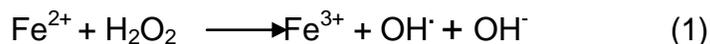
La glucosa oxidasa es una enzima que cataliza la oxidación de D-glucosa ($C_6H_{12}O_6$) a D-gluconolactona ($C_6H_{10}O_6$) y H_2O_2 . El H_2O_2 y la D-gluconolactona se descomponen espontánea y enzimáticamente. La actividad enzimática de la glucosa oxidasa se reduce cuando el H_2O_2 se acumula e inactiva a la enzima. Por otro lado, el producto de degradación de la D-gluconolactona; el ácido glucónico ($C_6H_{12}O_7$) se acumula, reduciendo el pH de la solución. El rango de temperatura en el que trabaja la glucosa oxidasa de *A. niger* es de 20 a 50°C y el pH de 4 a 7 (Wong *et al.*, 2008).



Por otro lado, la secreción extracelular de ácidos orgánicos propicia condiciones ácidas en el medio, lo que favorece reacciones tipo Fenton.

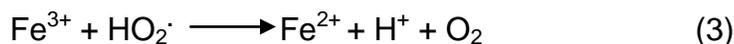
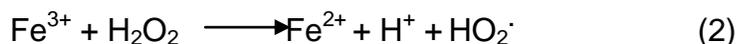
1.3.3 Reacción Fenton

El término reactivo Fenton se refiere a la mezcla acuosa de Fe (II) y H_2O_2 . Investigaciones subsecuentes a la de Fenton en 1876 indican como proceso predominante ea la siguiente reacción:





Donde Fe^{2+} y Fe^{3+} representan las especies hidratadas, $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ y $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, respectivamente. La reacción (1) es frecuentemente referida como la Reacción Fenton, aunque ocurren muchas otras reacciones en los sistemas Fenton (2-6). La principal utilidad de esta reacción en la degradación de contaminantes es la formación de radicales hidroxilo, el cual es un oxidante fuerte y no selectivo, capaz de degradar una amplia variedad de contaminantes. Aunque la formación del radical hidroxilo es una etapa clave en la reacción Fenton, el proceso global es afectado fuertemente por las condiciones bajo las que ocurre la reacción (Tarr, 2003).



Las reacciones (2) y (3) indican procesos que regeneran Fe^{2+} en el ciclo catalítico. Mientras que el H_2O_2 esté disponible en el sistema, las especies de hierro continúan al ciclo entre Fe^{2+} y Fe^{3+} , a menos que se produzcan reacciones adicionales como, la formación de óxidos e hidróxidos de hierro insolubles.

Por otro lado, la presencia de ligandos orgánicos e inorgánicos de hierro en sistemas naturales puede tener gran influencia en la reacción Fenton. Otras especies pueden afectar la eficiencia de la formación del radical hidroxilo al competir por H_2O_2 . Por ejemplo, el manganeso que reacciona con el H_2O_2 para formar otros productos que no incluyen al radical hidroxilo (Tarr, 2003).



En sistemas biológicos, el radical $\cdot\text{OH}$ generalmente es producido por reacción Fenton. Por lo tanto, para usar $\cdot\text{OH}$ como oxidante, los hongos necesitan reducir Fe^{3+} y producir H_2O_2 extracelular. Por lo anteriormente mencionado; los hongos producen H_2O_2 extracelularmente por la actividad enzimática y bajan el pH por la producción de ácidos orgánicos, que en presencia de sales de hierro favorecen reacciones de tipo Fenton en el medio, propiciando condiciones oxidantes mediante la formación de radicales libres de tipo hidroxilo, los cuales tiene alto poder oxidante, favoreciendo el cambio de especiación del As, de As^{III} a As^{V} , la cual es la propuesta de este trabajo.

1.4 Disposición de arsénico

El arsénico llega al medio ambiente por procesos naturales o actividades antropogénicas. Un ejemplo es la minería y actividades metalúrgicas, que generan grandes volúmenes de residuos de arsénico, por ello la importancia de disponerlo de forma segura. Una manera de disponerlo es la precipitación como arsenato de calcio, ferrihidrita o arseniato férrico (escorodita). La escorodita ($\text{FeAsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) tiene varias ventajas sobre otros compuestos para la disposición de arsénico, tales como la baja demanda de hierro, mayor densidad, estabilidad termodinámica (Riveros *et al.*, 2001), alta capacidad de fijación de arsénico, buen estado de cristalización y bajo contenido de agua en escorias (Li *et al.*, 2022). La escorodita puede ser hidrotermal o atmosférica, la primera se obtiene en autoclave a altas temperaturas, requiriendo mayor gasto energético, mientras la segunda se obtiene a presión atmosférica.

Singhania *et al.*, 2005 estudiaron el efecto de la temperatura y siembra sobre la precipitación de escorodita atmosférica, encontrando que la tasa de formación de escorodita incrementa dramáticamente por pequeños incrementos en la temperatura de 85 °C a 100 °C. Además los efectos de la alta temperatura se reflejan en una mayor estabilidad termodinámica y una mayor tasa de formación de núcleos



secundarios y crecimiento del cristal, lo que coincide con Taboada *et al.*, 2008, quienes agregan que este parámetro también influye en la coloración de los sólidos.

Otro parámetro importante es la siembra, observándose que entre mayor es la concentración inicial de semilla, es más rápida la precipitación. Además la precipitación de escorodita cristalina puede ser afectada de igual manera por semillas heterogéneas como la hematita (Fe_2O_3) o yeso ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) agregado externamente o formado *in situ* (Singhania *et al.*, 2005). En cuanto a la concentración de semilla a utilizar, Okibe *et al.*, 2017 encontraron que al adicionar 0.015, 0.03, 0.075 y 0.15% se inmoviliza arsénico al 96, 97, 97 y 98% respectivamente.



II. Antecedentes

Los estudios sobre la remoción de arsénico usando sistemas biológicos, específicamente hongos, son escasos. La mayoría de los tratamientos son físicoquímicos. Dentro de los tratamientos biológicos, la adsorción usando biomasa microbiana ofrece varias ventajas; bajos costos de operación, es efectiva en el tratamiento de bajas concentraciones de metales y genera mínimas cantidades de efluente (Murugesan *et al.*, 2006).

La acumulación y volatilización de arsénico por microorganismos ha sido reconocida como un método potencial de remediación, debido a su naturaleza amigable con el ambiente y costo-efectividad. La bio-volatilización de este elemento es influenciada por factores bióticos y abióticos que pueden ser manipulados para propósitos de biorremediación (Wang *et al.*, 2014). Algunos hongos capaces de acumular y/o volatilizar arsénico son; *Fusarium oxysporum*, *Sinorhizobium metiloti*, *Aspergillus candidus*, *Trichoderma sp.*, *Neocosmospora sp.*, *Rhizopus sp.*, entre otros (Su *et al.*, 2011).

Los hongos *Neosartorya fischeri*, *Aspergillus clavatus* y *A. niger* fueron probados bajo condiciones de laboratorio, volatilizando aproximadamente el 23% del arsénico del medio de cultivo que originalmente fue enriquecido con 4 y 17 mgL⁻¹ de As^{III}, mientras que la volatilización de As^V enriquecido con las mismas concentraciones, fue de entre 24%-16%, respectivamente (Cernanský *et al.*, 2009).

En otra investigación realizada por Srivastava *et al.*, 2011 probaron 15 cepas, encontrando porcentajes de volatilización entre 3.71 a 29.86% donde las cepas más efectivas para la remoción de arsénico fueron *Trichoderma sp.*, *Neocosmospora sp.* y *Rhizopus sp.* Recientemente se reportó que los hongos *Aspergillus sp.* LMC 330.01 y LMC 330.03, *Penicillium sp.* LMC 331.02 y *Westerdykella sp.* LMC 334.01 son capaces de oxidar As, así como de metilar el metaloide; *Aspergillus sp.* LMC 330.04, *Rhizopus sp.* LMC 333.01 y *Westerdykella sp.* LMC 334.01 (Bastita *et al.*, 2016).



Por otro lado, en estudios recientes también han trabajado la producción de escorodita de origen biológico o bioscorodita, como método de disposición de arsénico. En este proceso, la oxidación biológica controla el nivel de saturación induciendo la formación de bioscorodita. La composición química, el color y la caracterización estructural de la bioscorodita es muy similar al mineral escorodita encontrado en la naturaleza (González-Contreras *et al.*, 2012). González-Contreras *et al.*, 2009 produjeron el cristal a 80°C y a una concentración de As V de 1 g/L utilizando la bacteria oxidante de hierro *Acidianus sulfidivorans* con una relación molar de Fe/As igual a 1 y sin la adición de semilla. Estudiaron el efecto de una mayor concentración de hierro y la adición de semilla (yeso), encontrando que al aumentar la concentración de hierro se alarga el tiempo de cristalización, debido a la alta concentración de Fe (III) producido por la oxidación biológica. Por otro lado, el uso de semillas no mejoró las cinéticas de cristalización, pero si mejoró la remoción de arsénico, esto último quizá como resultado de la formación de escorodita menos estable. En 2010, este mismo grupo de trabajo demostró que la arquea termoacidófila oxidante de hierro es capaz de precipitar escorodita en ausencia de algún mineral primario o cristales semilla cuando crece en 0.7 g/L de hierro (Fe II) a 80°C y pH=1 en presencia de 1.9 g/L de arsenato (H_3AsO_4). La cristalización simultánea de hierro (Fe III) y arsénico inducida biológicamente previene la acumulación de hierro (Fe III) y como resultado, el crecimiento del cristal es favorecido sobre la nucleación primaria resultando en la formación de escorodita biológica altamente cristalina, muy similar a la escorodita mineral.

González-Contreras *et al.*, 2012 estudiaron la formación de escorodita en un reactor de tanque agitado continuo a pH=1.2 y 72 °C. El reactor fue alimentado con 2.8 g/L de arsenato y 2.4 g/L de hierro y fue operado con un tiempo de retención hidráulica de 40 horas, sin la adición de semilla o recirculación del cristal. La oxidación y cristalización fueron estables por periodos superiores a los 200 días. La eficiencia de remoción de arsénico fue de 99% con una tasa molar de alimentación de Fe/As entre 1 y 2, obteniendo efluentes con 29 ± 18 mg/L de As.



Por otro lado, Okibe *et al.*, 2017 utilizaron como modelo de estudio otra arquea; *Acidanus brierleyi* con un mayor tiempo de residencia; 24 días. Para la obtención de bioscorodita en dicho trabajo utilizaron 18 mM de Fe (II) como $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 13 mM de As(III) como NaAsO_2 + 0.02% de extracto de levadura en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 200 mL de medio a un pH=1.5 ajustado con H_2SO_4 .



III. Justificación

Las aguas subterráneas de varias regiones de México se encuentran contaminadas con arsénico (As), metaloide extremadamente tóxico, cancerígeno y móvil en el ambiente, que afecta la salud de las comunidades más vulnerables. El arsénico constituye una amenaza para la salud pública cuando su concentración se encuentra por arriba de los límites permisibles en el agua y esta es utilizada para consumo humano. Esto representa un problema para varios países, entre ellos México, donde se ha registrado y documentado la presencia de arsénico en los acuíferos de varios estados de la República: Coahuila, Chihuahua, Durango, Hidalgo, San Luis Potosí, Sonora y Jalisco.

La exposición prolongada a este elemento en el agua de consumo tiene diversos efectos a la salud, algunos relacionados con lesiones cutáneas, enfermedades cardiovasculares, problemas respiratorios, alteraciones neurológicas, cáncer de piel, entre otros (ATSDR, 2007). Una manera adecuada de prevenir la exposición a este contaminante es instalar sistemas de tratamiento de aguas eficaces, económicos y amigables con el medio ambiente.

Como una alternativa de tratamiento sustentable se propone un sistema fúngico que permita la disminución del As, mediante la formación del mineral bisocorodita.



IV. Hipótesis

La aplicación de un sistema fúngico a agua contaminada con As (III) permitirá su oxidación a As (V), que podrá ser removido a través de la formación del mineral bioscorodita y por lo tanto, se reducirá la toxicidad del medio.



V. Objetivos

5.1 Objetivo General

Evaluar un sistema fúngico en la oxidación de arsénico As (III) a As (V) para la formación del mineral bioscorodita.

5.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la toxicidad de sales de arsénico en hongos ascomicetos y basidiomicetos en medio sólido.
2. Determinar las principales variables (fuente de carbono, mediador redox (Fe) y fuente de fósforo) que influyen en la producción de H_2O_2 (condiciones oxidantes) en el medio de cultivo de hongos.
3. Determinar las condiciones de pH, temperatura y tiempo que favorecen la cristalización del mineral bioscorodita.



VI. Metodología

La estrategia para el desarrollo del presente estudio fue dividida en tres etapas como se muestra en la Figura 3.

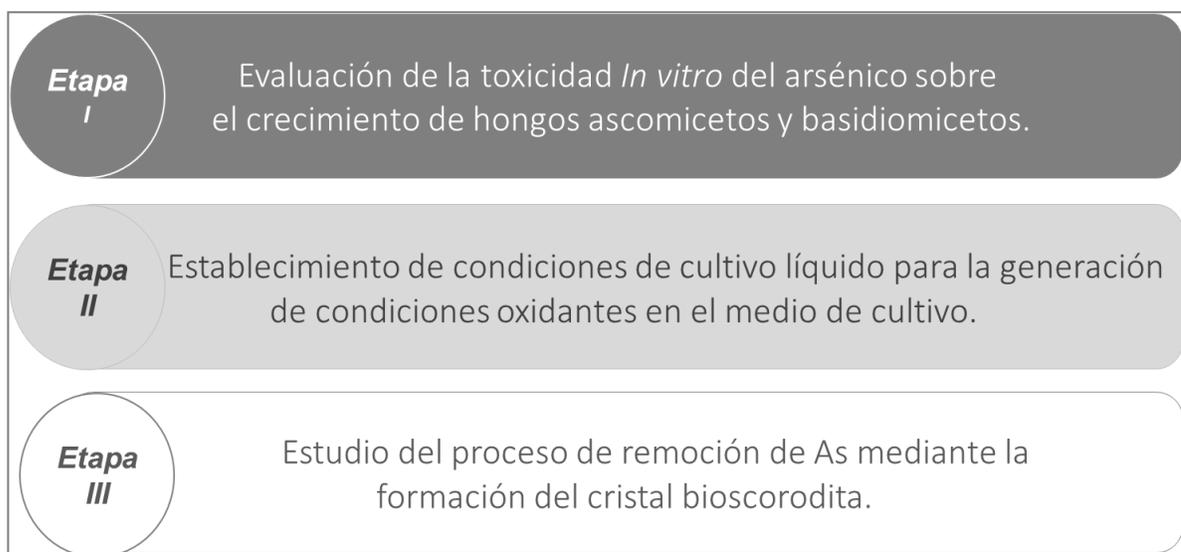


Figura 3. Estrategia experimental implementada para el desarrollo de la investigación.

6.1. ETAPA I. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD *in vitro* DEL ARSÉNICO SOBRE EL CRECIMIENTO DE HONGOS ASCOMICETOS Y BASIDIOMICETOS

Esta primera etapa tuvo por objetivo evaluar la toxicidad *in vitro* de las sales de arsénico (arsenito y arseniato) sobre el crecimiento vegetativo de cepas de hongos ascomicetos y basidiomicetos, para que de acuerdo a los resultados obtenidos se seleccionaran las cepas que se utilizarían en el tratamiento. Esta etapa constó de las siguientes actividades:

Actividad 1.1. Reactivación y mantenimiento de cepas fúngicas en agar papa dextrosa (PDA) y caracterización por la técnica de microcultivo.



Actividad 1.2. Evaluación de la toxicidad de dos sales de arsénico: Arsenito (NaAsO_2) y arseniato (Na_3AsO_4) sobre el crecimiento de hongos, evaluando la tasa de crecimiento radial y la concentración mínima inhibitoria.

6.2 ETAPA II. ESTABLECIMIENTO DE PARÁMETROS DE CULTIVO PARA FAVORECER CONDICIONES OXIDANTES EN EL MEDIO

En esta segunda etapa se investigó el efecto de la variación de parámetros que permitieran inducir condiciones oxidantes en medio líquido, propiciadas por la generación de radicales libres en el agua, debido a diferentes reacciones, entre ellas la Fenton, que consiste en la reacción de sales de hierro (adicionadas al medio de cultivo) con H_2O_2 ; producido por las células. Entre las variables de respuesta se midieron el pH y potencial redox, por considerarse decisivos en el cambio de especiación del arsénico; de As (III) a As (V), el cual es menos tóxico.

Actividad 2.1. Estudios exploratorios para la determinación de los niveles de las variables independientes del diseño experimental en la generación de condiciones oxidantes en medio líquido.

Actividad 2.2. Estandarización de las técnicas analíticas de las variables de respuesta del diseño experimental planteado; consumo de azúcares, producción de biomasa, generación de H_2O_2 , radicales libres, actividad enzimática, pH y potencial redox.

Actividad 2.3. Aplicación y análisis de resultados del diseño experimental mediante la realización de los tratamientos planteados. Los parámetros evaluados fueron: Fuente de carbono, fuente de hierro y fuente de fósforo. Se aplicó un diseño factorial fraccionado 2^{3-1} (Tabla 4).

Los diseños factoriales son los diseños más eficientes para experimentos donde interviene el estudio de los efectos de dos o más factores. En cada ensayo o réplica



completa del experimento, se investigan todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores. Por ejemplo si el nivel A tiene a niveles y el factor B tiene b niveles, cada réplica contiene todas las ab combinaciones de los tratamientos.

El efecto en un factor se define como el cambio en la respuesta producido por el cambio en el nivel del factor. Con frecuencia se le llama efecto principal, porque se refiere a los factores de interés primario en el experimento.

En esta etapa se aplicó un diseño factorial fraccionado con la finalidad de obtener información de los factores principales y las interacciones de orden inferior. Este tipo de diseños son utilizados cuando es posible que muchos factores considerados en un principio tengan un efecto reducido o nulo sobre la respuesta, además permite reducir el número de corridas, reduciendo el consumo de recursos (Montgomery, 2007).

Tabla 4. Arreglo codificado del diseño factorial fraccionado 2^{3-1}

Tratamiento	FACTORES		
	A	B	C
1	-1	-1	+1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	+1

A= Fuente de carbono, B=Fuente de hierro, C= Fuente de fósforo

6.3. ETAPA III. FORMACIÓN DEL CRISTAL BIOSCORODITA

En la etapa final del proyecto se investigó cómo favorecer la formación del cristal bioscorodita como medida de disposición de arsénico y se verificó la disminución de la concentración del metaloide en el agua después de la formación del mineral.



Actividad 3.1. Evaluación de las condiciones de pH, Temperatura y tiempo que favorecen la cristalización del mineral bioscorodita.

Actividad 3.2. Evaluación de la concentración de arsénico en el agua antes y después del tratamiento mediante espectrofotometría de absorción atómica.

6.4 MÉTODOS ANALITICOS

Microcultivo de hongos

La técnica de microcultivo permite observar e identificar estructuras microscópicas de hongos filamentosos, forma parte de las pruebas para identificar el género y la especie. La tinción de azul de lactofenol es una tinción simple y está basada en la afinidad del colorante por los componentes de la estructura fúngica.

Potencial de hidrógeno (pH)

El pH es una medida de acidez o alcalinidad de una disolución y está determinado por la concentración de iones hidrógeno $[H]^+$ presentes en una solución. El método de medición se fundamenta en la existencia de una diferencia de potencial entre las dos caras de una membrana de vidrio, expuestas a disoluciones acuosas que difieren en su valor de pH. El pH de las muestras se midió directamente con una sonda multiparamétrica HANNA HI9828.

Potencial de oxidación-reducción (redox)

El potencial redox es una forma de medir la energía química de oxidación-reducción mediante un electrodo, convirtiéndola en energía eléctrica. El potencial redox es positivo cuando se produce una oxidación y negativo para una reducción. Este



parámetro se midió directamente en el medio de cultivo utilizando una sonda multiparamétrica HANNA HI9828.

Biomasa en peso seco

Los cultivos se filtraron al vacío en un matraz Kitasato con embudo Büchner y papel filtro poro medio. Los papeles filtro con biomasa se dejaron secar en la estufa a 105°C durante 1 hora. Después de ese tiempo se pasaron a un desecador durante 10 minutos y se pesaron para determinar la biomasa en peso seco.

Azúcares

La glucosa residual se determinó como azúcares reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) que se basa en una reacción de oxidación-reducción en la que el DNS en condiciones alcalinas forma el 3,5 dinitrosalicilato de sodio el cual reacciona con la glucosa reduciéndose y la glucosa se oxida a ácido glucónico (Miller, 1959). En tubos de ensaye de 10 mL se agregaron 250 µL de medio filtrado y 250 µL de ácido (DNS), se colocaron los tubos en baño María por 5 min. Los tubos se enfriaron en hielo y después se adicionaron 2.5 mL de agua destilada. El blanco se preparó con 250 µL de agua destilada en lugar de muestra. La absorbancia se midió a 540 nm en un espectrofotómetro UV-VIS UV-1800 de la marca Shimadzu.

Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

La concentración de H₂O₂ en el medio de cultivo fue determinada usando el método yoduro/yodato reportado por Klassen *et al.*, 1994. La absorbancia de la solución fue medida a 351 nm. Para el blanco se utilizó medio de cultivo estéril; Sivakumar para basidiomicetos y Wunder para ascomicetos. El contenido de H₂O₂ fue calculado considerando una curva de calibración realizada con H₂O₂ al 29-32% a concentraciones conocidas (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 mg/L) de acuerdo a la siguiente ecuación; $y = 0.3469x + 0.0037$, $R^2 = 0.9914$ (Figuras 4 y 5).

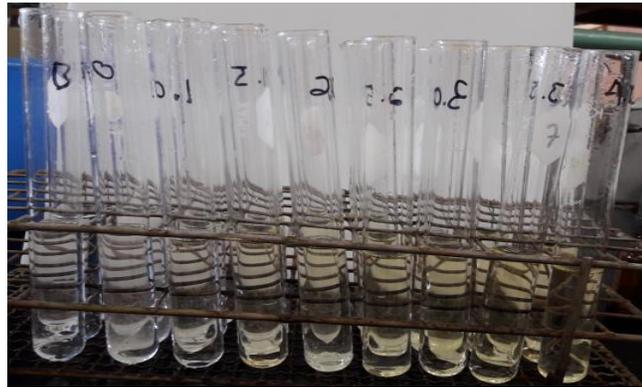


Figura 4. Determinación de H_2O_2 por la técnica reportada por Klassen *et al.*, 1994.

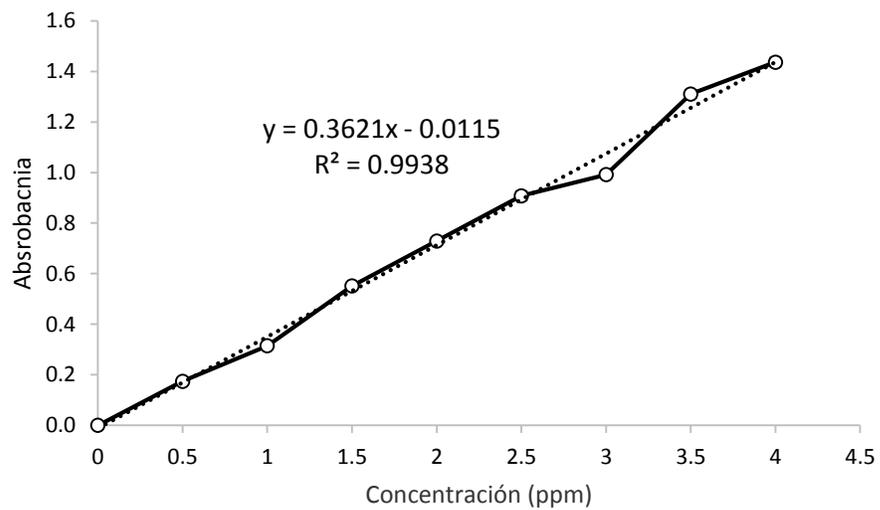


Figura 5. Curva de calibración para H_2O_2 .

Enzima Manganese peroxidasa

La determinación se basa en monitorear el incremento en la absorbancia debido a la oxidación del rojo de fenol.



Para la determinación cuantitativa de manganeso peroxidasa en medio líquido se añadieron en tubos de ensayo de 5 mL los siguientes reactivos:

50 μ L de solución amortiguadora de lactato-succinato 20 mM, pH=4.5

50 μ L de lactato de sodio 25 mM

50 μ L de sulfato de manganeso 2 mM

50 μ L de albúmina de huevo 0.1 %

50 μ L de rojo de fenol 0.2 %

700 μ L de extracto enzimático

La reacción se inició con la adición de 50 μ L de peróxido de hidrógeno 2 mM en un volumen total de 1 mL y se detuvo después de 5 minutos con la adición de 50 μ L de NaOH 2N. La lectura de absorbancia se realizó en un espectrofotómetro UV-Visible a 610 nm contra un blanco sin manganeso en la mezcla de reacción (Glenn y Gold, 1983).

Enzima Lacasa

El ensayo se basa en la oxidación del ABTS, la cual produce un radical catión de color verde (Bourbonnais *et al.*, 1988).

La determinación de la actividad de la enzima lacasa en medio líquido se realizó adicionando a tubos de ensayo de 5 mL los siguientes reactivos:

800 μ L de extracto enzimático

100 μ L de solución amortiguadora de acetato de sodio 100 mM pH=4.5

100 μ L de 2,2azino-3-etil benzatalino-6-sulfonato (ABTS) 5 mM

Como blanco se utilizó agua desionizada en lugar de ABTS. El contenido del tubo de ensayo se pasó a una celda de cuarzo, ahí se añadió el ABTS, se mezcla la solución e inmediatamente se realiza la lectura de absorbancia. El cambio de absorbancia se lee durante 5 minutos a 420 nm en el espectrofotómetro UV-visible.



Enzima Glucosa oxidasa

La determinación de la actividad de la enzima glucosa oxidasa en medio líquido se realizó adicionando a tubos de ensaye los siguientes reactivos:

50 μ L de glucosa 1mg/mL (0.0055 M)

950 μ L de extracto de hongo o medio de cultivo, para muestra o blanco

1 mL de solución amortiguadora ABTS-Fosfatos 0.2 M, pH=5.5, con una concentración de ABTS al 0.41 mM

1 mL de POD 5U/mL

La mezcla se incubó durante 10 min a 37°C y se lee la absorbancia a 410 nm (Acosta-Rubí, S.M., 2011, Acosta-Rubí *et al.*, 2017).

Arsénico (As)

La concentración de As en solución fue determinada por flama de aire-acetileno con un espectrofotometro de absorción atómica AA-6300 de la marca Shimadzu. La absorbancia fue medida a 193.7 nm. El contenido de As fue calculado considerando una curva de calibración realizada con una solución estándar de 1000 mg/L de As de la marca J.T. Baker a concentraciones conocidas (10, 20, 30, 50 y 70 mg/L) de acuerdo a la siguiente ecuación; $y = 0.0005x + 0.0046$, $R = 0.9896$.



VII. Resultados y Discusión

7.1 ETAPA I. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD *In vitro* DEL ARSÉNICO SOBRE EL CRECIMIENTO DE HONGOS ASCOMICETOS Y BASIDIOMICETOS

La primera actividad de esta etapa fue la evaluación de la toxicidad de sales de arsénico a diferentes hongos ascomicetos y basidiomicetos. Se probaron cuatro cepas; dos basidiomicetos: *P. placenta* y *P. chrysosporium* y dos ascomicetos: *A. niger* y *T. atroviride*. La finalidad de evaluar dos tipos de hongos es estudiar el posible mecanismo implicado en la remoción del arsénico. Se ha reportado ampliamente el mecanismo de los hongos basidiomicetos en la degradación de compuestos orgánicos basado en la actividad de las enzimas ligninolíticas y para la remoción de metales; mecanismos de adsorción. Sin embargo, para los ascomicetos que también remueven ambos tipos de compuestos, los mecanismos no se encuentran bien definidos.

7.1.1 Reactivación de cepas y observación de microcultivos

Previo a realizar los ensayos dosis-respuesta de los diferentes hongos, se realizó la reactivación y mantenimiento de cepas fúngicas en agar papa dextrosa (PDA). Sólo una de las cepas; *P. placenta* fue solicitada a la colección microbiana del CINVESTAV, las demás cepas fueron reactivadas del cepario del laboratorio de Xenobióticos. Posteriormente, se realizó un microcultivo de los hongos. Esta técnica permite observar e identificar estructuras microscópicas de los hongos filamentosos, forma parte de las pruebas para identificar el género y la especie. La tinción de azul de lactofenol es una tinción simple y está basada en la afinidad del colorante por los componentes de la estructura fúngica. El fenol destruye la flora acompañante, el ácido láctico conserva las estructuras fúngicas y el azul de algodón tiene la capacidad de adherirse a las hifas y conidios de los hongos microscópicos. A



continuación se muestran los microcultivos de los hongos de estudio; basidiomicetos (Fig. 6 y 7) y ascomicetos (Fig. 8 y 9).

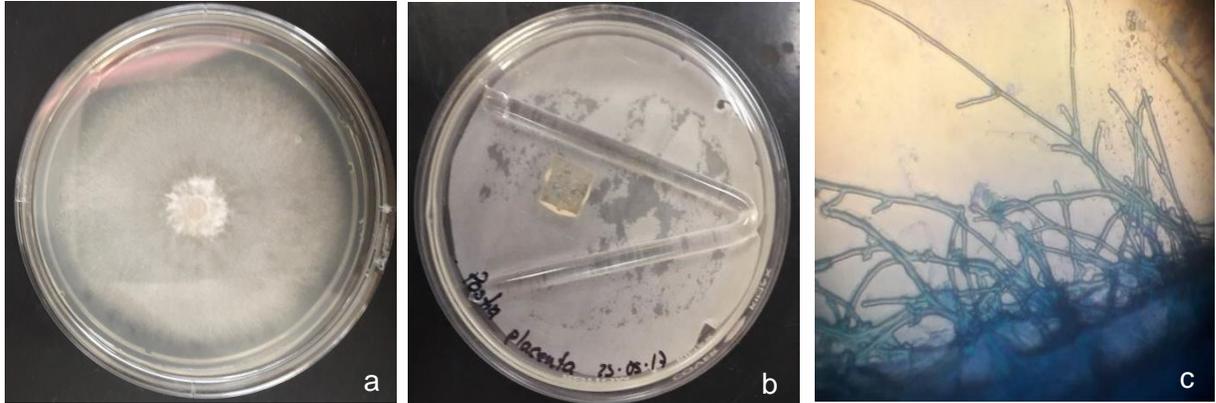


Figura 6. Observación macroscópica y microscópica (40X) de *P. placenta*. Cultivo *P. placenta* en PDA (a), técnica de microcultivo (b) y observación de hifas en el microscopio (c).

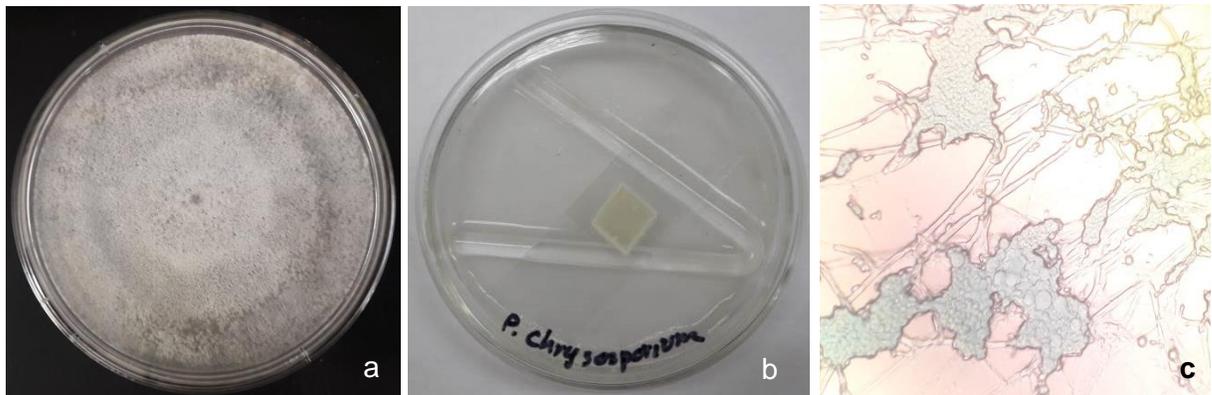


Figura 7. Observación macroscópica y microscópica (40X) de *P. chrysosporium*. Cultivo del hongo en PDA (a), técnica de microcultivo (b) y observación de hifas en el microscopio (c).

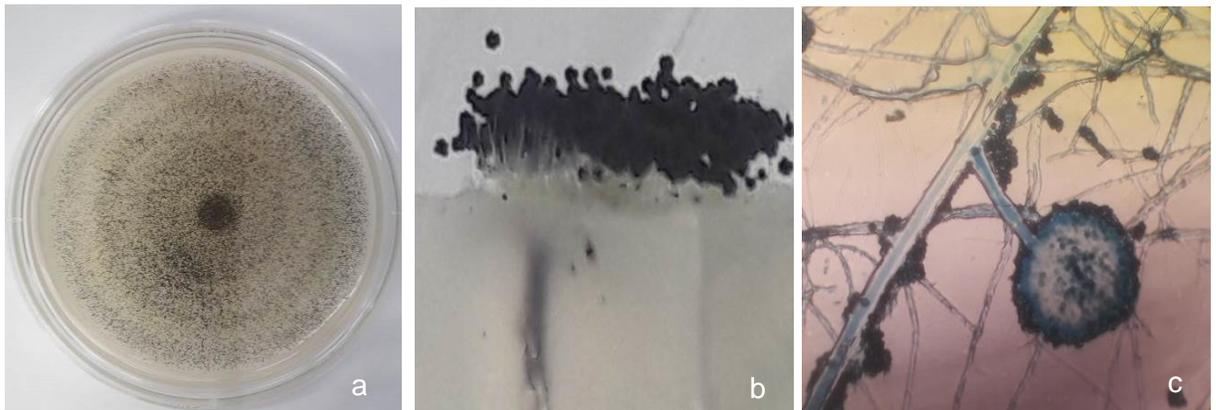


Figura 8. Observación macroscópica y microscópica (40X) de *A. niger*. Cultivo de *A. niger* en PDA (a), técnica de microcultivo (b) y observación de hifas en el microscopio (c).

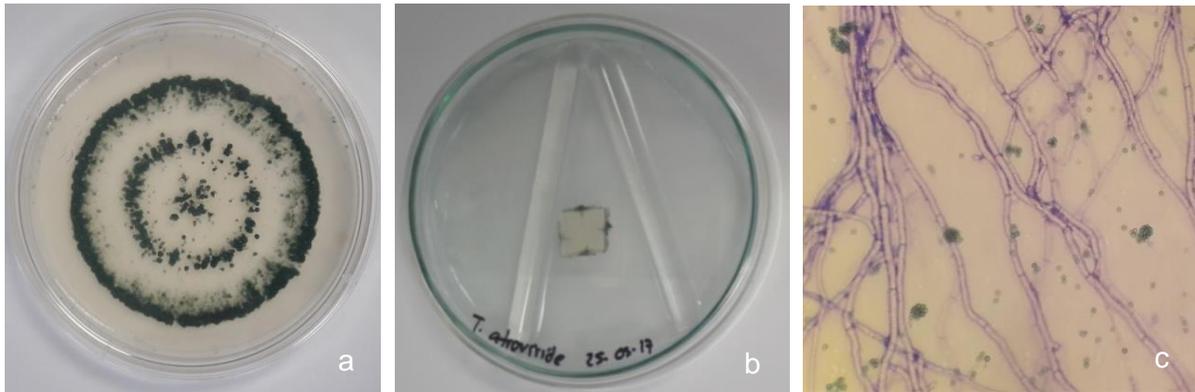


Figura 9. Observación macroscópica y microscópica (40X) de *T. atroviride*. Cultivo del hongo en PDA (a), técnica de microcultivo (b) y observación de hifas en el microscopio (c).

7.1.2 Ensayo concentración-respuesta

En la mayoría de las pruebas o ensayos de toxicidad se estudian las relaciones concentración-efecto y concentración-respuesta, donde se involucra un agente o estímulo (por ejemplo, un metal o una muestra ambiental), el cual se aplica a un organismo, sobre el que se evalúa una cierta respuesta preseleccionada. La respuesta del organismo se valora mediante la cuantificación final de alguna característica, el cambio de esta característica o por la ocurrencia o no de un determinado fenómeno (muerte, inhibición del crecimiento, entre otros) (Díaz-Báez *et al.*, 2004).

Para evaluar el efecto de las sales de arsénico en el crecimiento de los hongos fue medida la extensión del micelio en medio sólido PDA (cm) contra un control (medio sin metal).

Las cajas Petri (d=9 cm) con 18 mL de agar papa dextrosa previamente esterilizado por 15 min a 121 °C, fueron enriquecidas con 2 mL de solución de arsenato de sodio heptahidratado ($\text{HAsNa}_2\text{O}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) como fuente de As^{V} y arsenito de sodio (AsNaO_2) como fuente de As^{III} para alcanzar concentraciones finales de 12.5, 25, 50 y 100 mg/L de arsénico. Las cajas fueron agitadas suavemente. Una vez enfriado el medio,



las cajas se inocularon con 2.5 μL de una suspensión de esporas (1×10^6 esporas/mL) de cada cepa en el centro de la caja. A diferencia de *A. niger*, *T. atroviride* y *P. chrysosporium*, *P. placenta* fue la única cepa inoculada con un disco de agar ($d=0.6$ cm), debido a que el tiempo de crecimiento es muy lento al sembrarlo por suspensión de esporas. Las cajas fueron mantenidas a 28 °C para *A. niger*, *T. atroviride*, solamente *P. chrysosporium* se mantuvo a 39°C que es su temperatura óptima de crecimiento.

Los diámetros de las colonias se midieron diariamente hasta que el control lleno la superficie de la caja y se calcularon los siguientes parámetros:

Tasa de crecimiento del diámetro (TCD);

$\text{TCD} = \Sigma(D_1 - D_0) / (T_1 - T_0)$, donde D_0 y D_1 son los diámetros medidos al T_0 y T_1 , respectivamente.

Inhibición del crecimiento del micelio (ICM);

$\text{ICM} = ((C - T) / C) * 100$, donde C y T son los diámetros del micelio dentro de las cajas control y con tratamiento.

La concentración media efectiva (CME_{50}) definida como la cantidad de arsénico que inhibe la tasa de crecimiento micelial en 50% fue calculada por análisis Probit usando el software SAS 9.1.

Previo a realizar los ensayos concentración-respuesta en los cuatro hongos, se realizó un ensayo preliminar utilizando el hongo *P. placenta*, las concentraciones adicionadas de As^{III} y As^{V} fueron; 0.1, 1.0, 10 y 100 mg/L. Para realizar los tratamientos, se preparó medio papa dextrosa (PDA), se agregó el medio a las cajas Petri a 40 °C, después se adicionó la solución de arsénico de tal forma que la



concentración final en la caja fuese las mencionadas anteriormente (de 0.1 a 100 mg/L).

En la Figura 10 se muestran los resultados de la tasa de crecimiento del diámetro (TCD) de *P. placenta*, encontrando que ésta es mayor para As^{III} comparada con As^V , sobre todo en las concentraciones más altas; 50 y 100 mg/L, a pesar de que As^{III} se considera 10 veces más tóxico que As^V en seres humanos. Además el hongo a una concentración de 1 mg/L de arsénico aumenta su diámetro respecto al control sin arsénico.

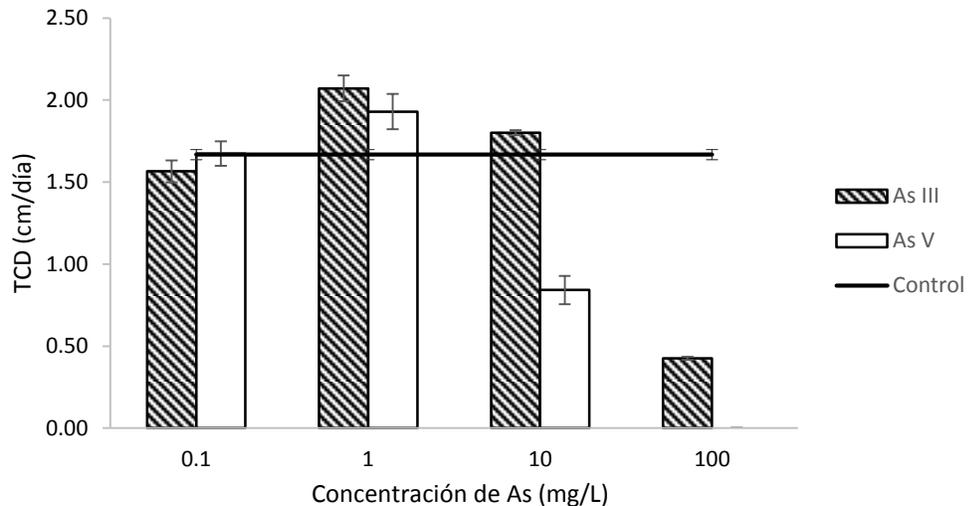


Figura 10. Tasa de crecimiento del diámetro (TCD) de *Postia placenta* a los 14 días de tratamiento. TCD (\pm desviación estándar, $n=4$), disco de agar=6 cm, $T=28^{\circ}C$.

Resultado de este ensayo preliminar también se obtuvieron los valores de Inhibición del crecimiento del micelio (ICM), encontrando los valores de la concentración media efectiva (CME_{50}) para As^{III} y As^V por debajo de 100 mg/L. Para As^{III} la CME_{50} fue de 19.58 mg/L y para As^V de 30.01 mg/L.

Por lo anterior, los ensayos concentración-respuesta de los cuatro hongos se realizaron con las siguientes concentraciones: 12.5, 25, 50 y 100 mg/L, considerando también que la mayoría de las referencias de remoción de arsénico utilizan 50 mg/L o menor concentración.



7.1.2.1 *Trichoderma atroviride*

En la Figura 11 se observa, que conforme aumenta la concentración de arsénico disminuye la tasa de crecimiento del diámetro en *T. atroviride*, además en todos los casos, se observa que el As^V tiene un efecto inhibitor de la TCD mayor a la de As^{III}, confirmando lo observado en *P. placenta*.

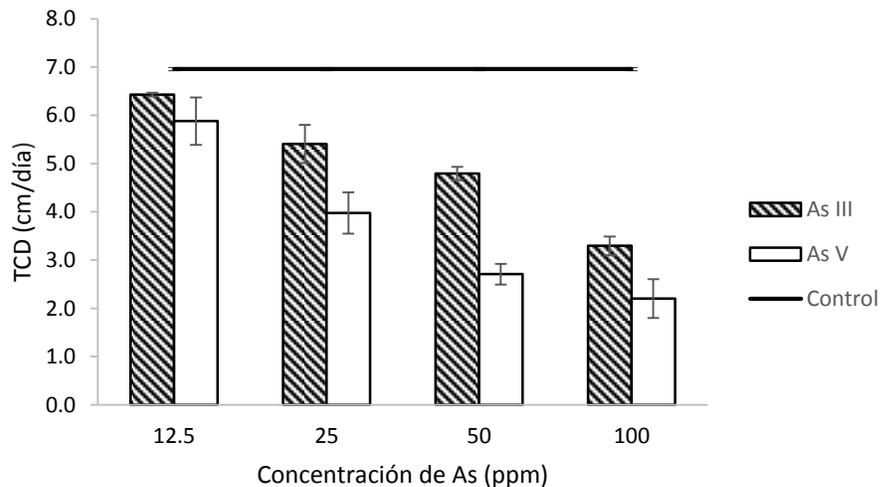


Figura 11. Tasa de crecimiento del diámetro (TCD) de *T. atroviride* a los 3 días de tratamiento. TCD (\pm desviación estándar, n=4), 1×10^6 esporas/mL, T=28°C.

De los datos resultantes de Inhibición del crecimiento del micelio (ICM), mediante el análisis Probit realizado en SAS 9.01 se obtuvieron los valores de concentración media efectiva (CME₅₀) para As^{III} y As^V; 41.52 y 26.01 mg/L, respectivamente (Anexo A).

Una vez terminado el tratamiento, se determinó el pH en las cajas con la finalidad de relacionar la producción de ácidos orgánicos como respuesta al estrés causado por el As en los hongos. Para ello, se colocó 1 g de medio con hongo en un tubo Falcón de polipropileno, se adicionaron 10 mL de agua destilada, se agitó y se midió el pH. En la Figura 12 no se observan diferencias en el pH entre las cajas con As^{III} y As^V, sólo que éste aumenta con la concentración de arsénico a 50 y 100 mg/L.

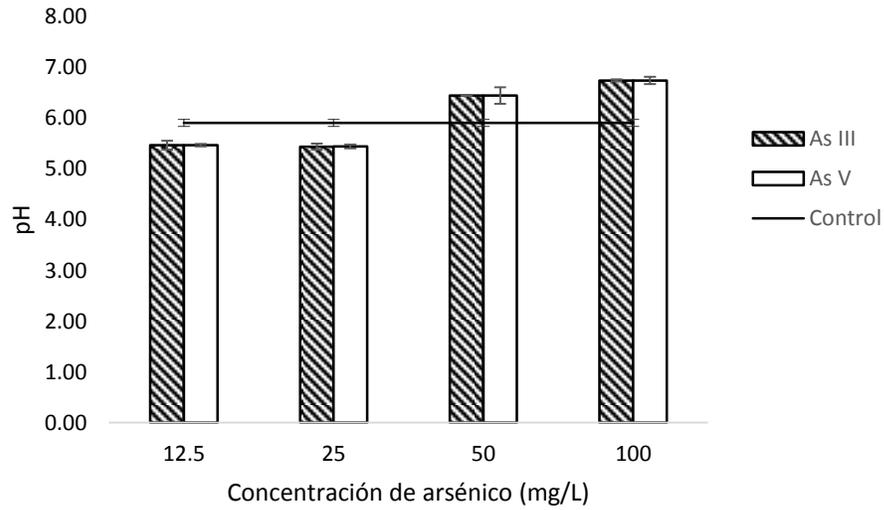


Figura 12. Determinación de pH en tratamientos con *T. atroviride*. Promedio (\pm desviación estándar, $n=4$), 1×10^6 esporas/mL, $T=28^\circ\text{C}$.

7.1.2.2 *Phanerochaete chrysosporium*

La tasa de crecimiento del diámetro (TCD) en *P. chrysosporium* tiene un comportamiento parecido a *T. atroviride*, pero con valores más altos (Figura 13). Las TCD de los tratamientos están más cercanas a las TCD de los controles respecto a *T. atroviride*. El As^{III} tiene un menor efecto inhibitor que As^{V} , no observando diferencia a una concentración de 12.5 mg/L.

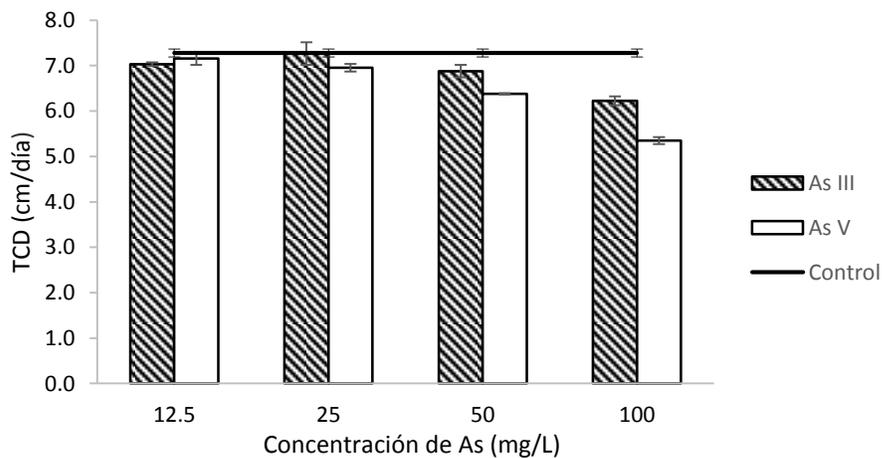


Figura 13. Tasa de crecimiento del diámetro (TCD) de *P. chrysosporium* los 3 días de tratamiento. TCD (\pm desviación estándar, $n=4$), 1×10^6 esporas/mL, $T=39^\circ\text{C}$.



De los datos de Inhibición del crecimiento del micelio (ICM), mediante análisis Probit se obtuvo el valor de la concentración media efectiva (CME_{50}) para As^V ; 64.45 mg/L y una CME_{50} para As^{III} de 100.56 mg/L. Cabe destacar el análisis de ICM se hizo a los dos días de tratamiento, puesto que debido al rápido crecimiento del hongo, al tercer día no se observa diferencia entre los tratamientos.

En cuanto al pH en las cajas después del tratamiento, se observan valores similares o por arriba de los controles sin arsénico y un ligero aumento del pH en las cajas con As^V respecto a As^{III} (Figura 14).

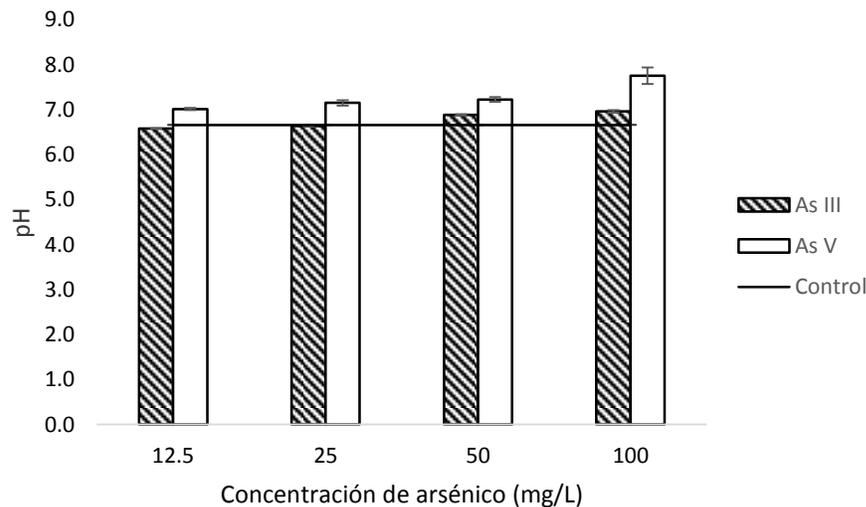


Figura 14. Determinación de pH en tratamientos con *P. chrysosporium*. Promedio (\pm desviación estándar, $n=4$), 1×10^6 esporas/mL, $T=39^\circ C$.

7.1.2.3 *Aspergillus niger*

En *A. niger* la TCD a los 3 días en general baja a la mitad respecto a *T. atroviride* y *P. chrysosporium*. Además, no se observan diferencias entre los tratamientos con As^{III} y en estos, los valores de TCD son mayores respecto a As^V (Figura 15). *A. niger* no creció a 100 mg/L de As^V .

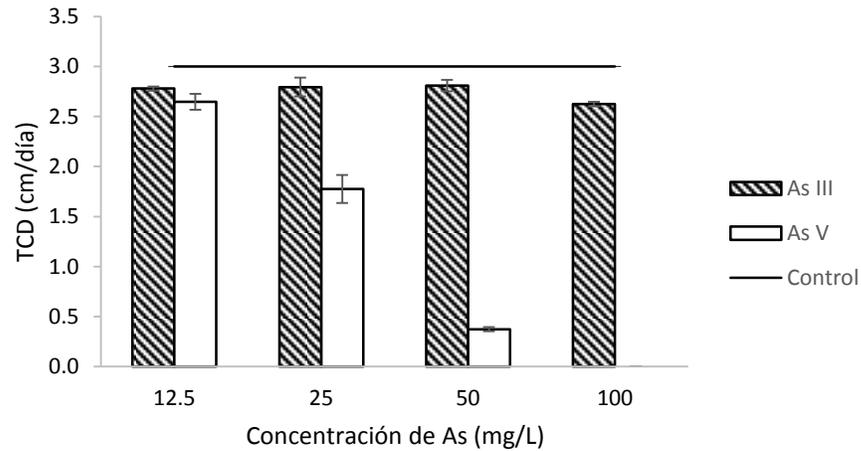


Figura 15. Tasa de crecimiento del diámetro (TCD) de *A. niger* a los 3 días de tratamiento. TCD (\pm desviación estándar, $n=4$), 1×10^6 esporas/mL, $T=28^\circ\text{C}$.

La CEM_{50} para As^{III} no se pudo calcular con el análisis Probit debido a que la diferencia es mínima entre los tratamientos. En el caso de As^{V} la CME_{50} fue de 19.50 mg/L.

De los datos obtenidos de pH, *A. niger* es el hongo con los valores más bajos para el control y los tratamientos con As^{III} y As^{V} . Esto también se observó en los resultados de pH del cultivo líquido de las cuatro cepas, lo cual se puede deber a la capacidad de producción de ácidos orgánicos de *A. niger* (Lira-Perez & Rodríguez-Vázquez, 2022). Las cajas con As^{V} presentan valores ligeramente más bajos de pH que las enriquecidas con As^{III} (Figura 16).

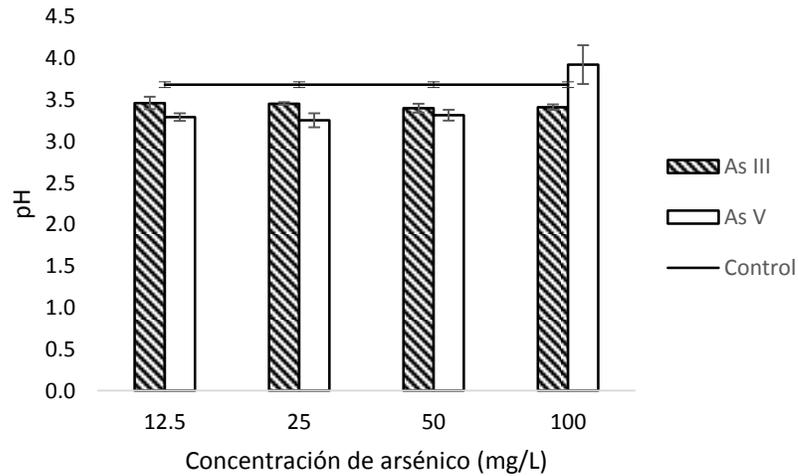


Figura 16. Determinación de pH en tratamientos con *A. niger*. Promedio (\pm desviación estándar, $n=4$), 1×10^6 esporas/mL, $T=28^\circ\text{C}$.

7.1.2.4 *Postia placenta*

Postia placenta presentó los valores más bajos de TCD a los tres días de tratamiento respecto a las demás cepas. Este hongo no creció a una concentración de 100 mg/L de As^{III} ni de As^{V} . A concentraciones de 25 y 50 mg/L la TDC es mayor para As^{III} respecto a As^{V} al igual que en las demás cepas (Figura. 17).

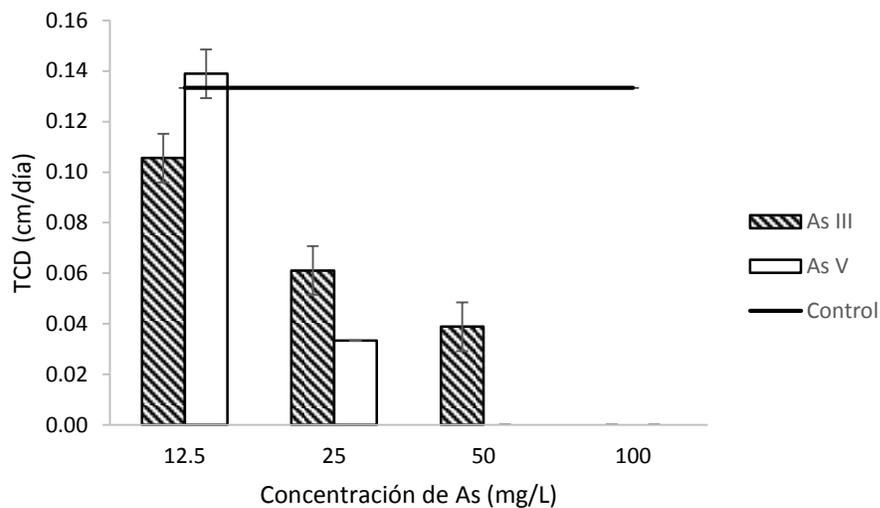


Figura 17. Tasa de crecimiento del diámetro (TCD) de *P. placenta* a los 3 días de tratamiento. TCD (\pm desviación estándar, $n=4$), disco de agar=6 cm, $T=28^\circ\text{C}$.



La CME₅₀ para As^{III} fue de 59.16 mg/L y para As^V de 30.50 mg/L. Por lo tanto, el As^V es más tóxico para *Postia placenta* que As^{III}, al igual que en los demás hongos estudiados.

Los valores de la concentración media efectiva (CME₅₀) para As III y As V para las cuatro cepas evaluadas se encuentran por debajo de 100 ppm, a excepción de *P. Chrysosporium* (Tabla 5).

Tabla 5. Concentración media efectiva (CME₅₀) a 3 días de crecimiento.

Hongo	As ^{III} (mg/L)	As ^V (mg/L)
<i>A. Niger</i>	N.D	19.50
<i>T. atroviride</i>	42.52	20.01
<i>P. placenta</i>	59.16	30.50
<i>P. chrysosporium</i>	100.56	64.45



7.2 ETAPA II. ESTABLECIMIENTO DE PARÁMETROS DE CULTIVO PARA FAVORECER CONDICIONES OXIDANTES EN EL MEDIO

Con la finalidad de seleccionar una cepa para la aplicación del diseño experimental fraccionado 2^{3-1} planteado en la segunda etapa del proyecto, se evaluó el comportamiento de las cuatro cepas en medio líquido.

Se evaluaron cuatro parámetros; producción de biomasa, consumo de azúcares, pH y potencial redox, estos últimos dos parámetros son importantes para el cambio de especiación del As^{III} a As^V.

7.2.1 Basidiomicetos

Para los experimentos en medio líquido con los dos hongos basidiomicetos; *P. placenta* y *P. chrysosporium*, se utilizó el medio de cultivo Sivakumar (Tabla 6), ya que este fue probado junto con otros medios de cultivo por Chan-Cupul *et al.*, 2016, encontrando mayor actividad de las enzimas ligninolíticas.

Tabla 6. Composición del medio Sivakumar modificado (Sivakumar *et al.*, 2010)

NO.	COMPONENTE	CONCENTRACIÓN (g/L)
1	Dextrosa	20.0
2	Extracto de levadura	2.5
3	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.05
4	MgSO ₄	0.5
5	KH ₂ PO ₄	1.0
6	CaCl ₂	0.01
7	MnSO ₄ .H ₂ O	0.001
8	FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01
9	ZnSO ₄	0.001
10	CuSO ₄	0.002



7.2.1.1 *Postia placenta*

Para la producción del inóculo de *P. placenta*, se sembró el hongo en agar extracto de malta, estuvo en incubación durante 10 días a 28°C. Se colocaron seis discos de agar con el hongo en 170 mL de medio Sivakumar, a los 7 días que se tuvo una densidad de biomasa adecuada, ésta se filtró y se añadieron 0.06 g de biomasa en 40 mL de medio Sivakumar modificado en matraces Erlenmeyer de 125 mL (1.5 g/L biomasa peso seco). Los matraces fueron mantenidos en una incubadora a 28 °C y 125 rpm de agitación. Las mediciones se realizaron por triplicado, cada dos días, durante 14 días.

P. placenta presentó la mayor producción de biomasa a los 8 días de incubación, que coincide con el consumo total de azúcares (Figura 18). Esto también se refleja en la producción de ácidos orgánicos en el medio, ya que es cuando se tiene el valor más bajo de pH (1.84). Los valores más altos de potencial redox se obtienen hasta los 12 días de tratamiento con valores de 381.3 mV (Figura 19), lo cual es interesante desde el punto de vista de especiación del arsénico, donde el cambio de estado de oxidación de As^{III} a As^V se ve favorecido bajo estas condiciones; valores bajos de pH y condiciones oxidantes.

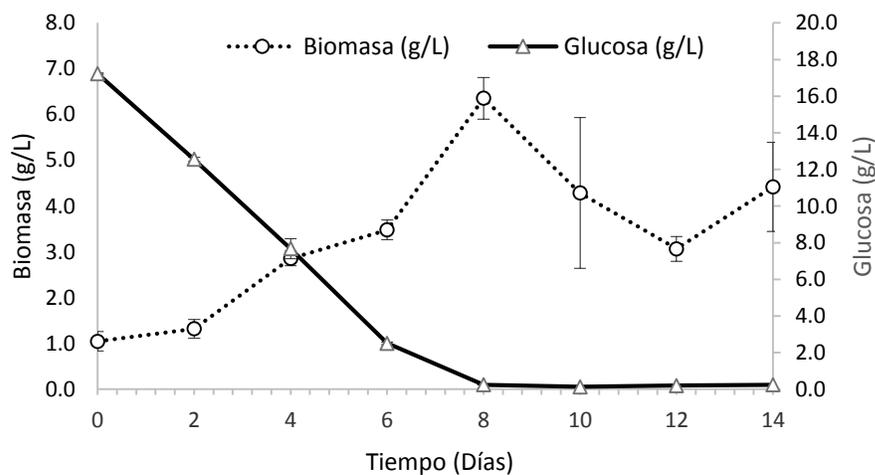


Figura 18. Producción de biomasa y consumo de azúcares de *P. placenta* en medio Sivakumar a 28°C y 125 rpm. Promedio (\pm desviación estándar, n=3).

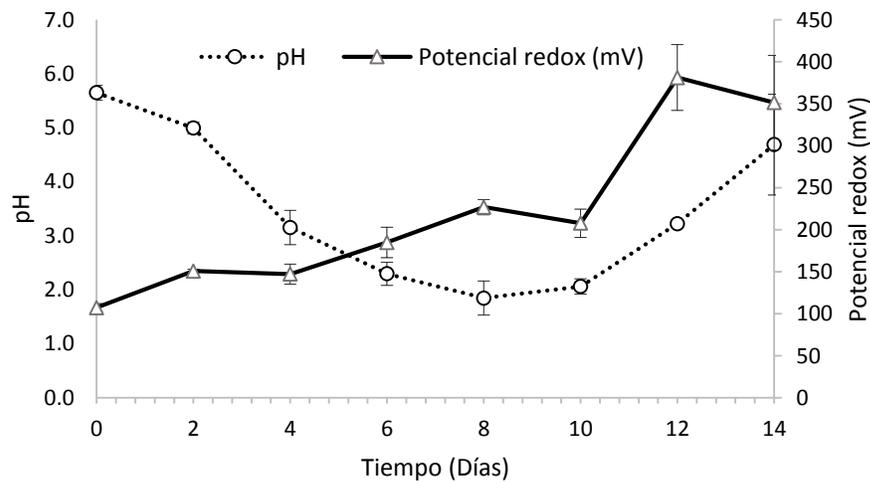


Figura 19. Monitoreo de pH y potencial redox de *P. placenta* en medio Sivakumar a 28°C y 125 rpm. Promedio (\pm desviación estándar, n=3).

7.2.1.2 *Phanerochaete chrysosporium*

P. chrysosporium a diferencia de *P. placenta* fue crecido en agar papa dextrosa a 39°C (Temperatura óptima de crecimiento) durante 5 días. Posteriormente, se adicionaron 6 discos de agar (d=6 mm) en 170 mL de medio Sivakumar modificado para la obtención del inóculo. La densidad de biomasa adecuada se obtuvo a los tres días, se filtró la biomasa y se inocularon los matraces Erlenmeyer de 125 mL con 1.5 g/L de biomasa en 40 mL de medio Sivakumar modificado. Los matraces se mantuvieron con agitación (125 rpm) en una incubadora a 39°C. Las mediciones de los parámetros se hicieron por triplicado cada 2 días. La mayor producción de biomasa se obtuvo a los 8 días y el consumo total de los azúcares hasta los 10 días de estudio (Figura 20). Se observa la caída del pH desde los 4 días y ésta se mantiene hasta los 8 días (pH=4), que es cuando se tienen los valores más altos de potencial redox para este hongo (309 mV) (Figura 21).

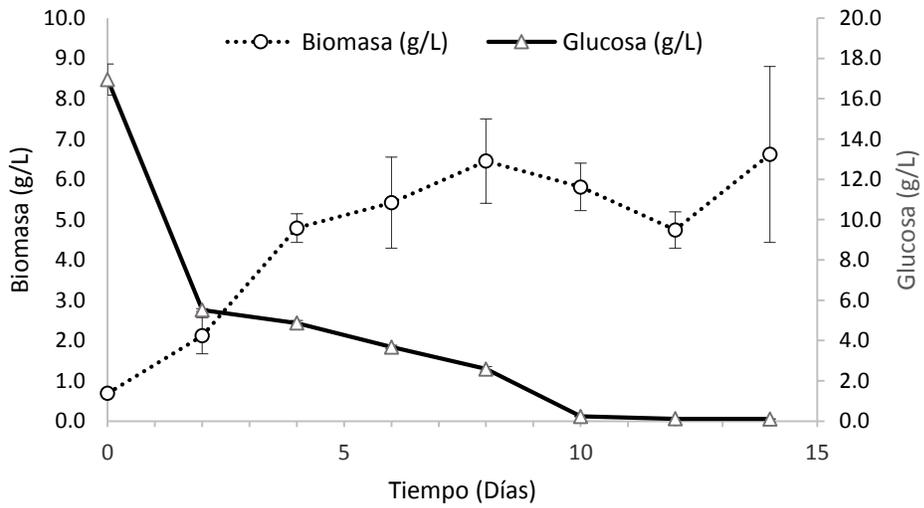


Figura 20. Producción de biomasa y consumo de azúcares de *P. chrysosporium* en medio Sivakumar a 39°C y 125 rpm. Promedio (\pm desviación estándar, n=3).

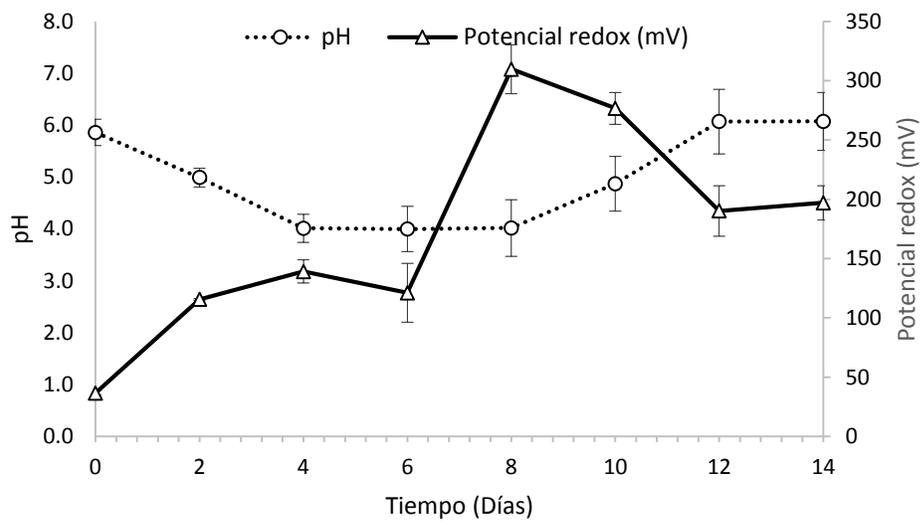


Figura 21. Monitoreo de pH y potencial redox de *P. chrysosporium* en medio Sivakumar a 28°C y 125 rpm. Promedio (\pm desviación estándar, n=3).



7.2.2 Ascomicetos

Para el crecimiento de los hongos ascomicetos; *A. niger* y *T. atroviride* en medio líquido se utilizó medio Wunder modificado (Tabla 7) (Cortés-Espinosa *et al.*, 2006), el cual tiene la mitad de glucosa requerida por los basidiomicetos y utilizada en el medio Sivakumar.

Para la obtención del inóculo, ambos hongos fueron crecidos en medio sólido agar papa dextrosa a 28 °C durante 5 días. Después se inocularon 6 discos de agar (d=6 mm) en 170 mL de medio Wunder modificado. Los matraces se mantuvieron a 28 °C y 125 rpm. Después de 3 días se filtró la biomasa, se determinó humedad y se inocularon 1.5 g/L de biomasa peso seco en matraces Erlenmeyer con 40 mL de medio Wunder modificado.

Tabla 7. Composición del medio Wunder modificado (Wunder *et al.*, 1994)

NO.	COMPONENTE	CONCENTRACIÓN (g/L)
1	Dextrosa	10.0
2	Polipeptona	1.0
3	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0
4	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
5	KH ₂ PO ₄	0.875
6	K ₂ HPO ₄	0.125
7	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1
8	NaCl	0.1
9	MnSO ₄ ·H ₂ O	0.02
10	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.001



7.2.2.1 *Aspergillus niger*

El hongo *A. niger* consumió el total de azúcares a los 4 días de crecimiento, 4 días después se observa la mayor producción de biomasa (Figura 22). La caída en la concentración de azúcares coincide con el valor más bajo de pH (1.67) y los valores más altos de potencial redox (294 mV) (Figura 23), este último superado por *P. placenta* (381.3 mV) a los 12 días de crecimiento y *P. chrysosporium* (309 mV) a los 8 días.

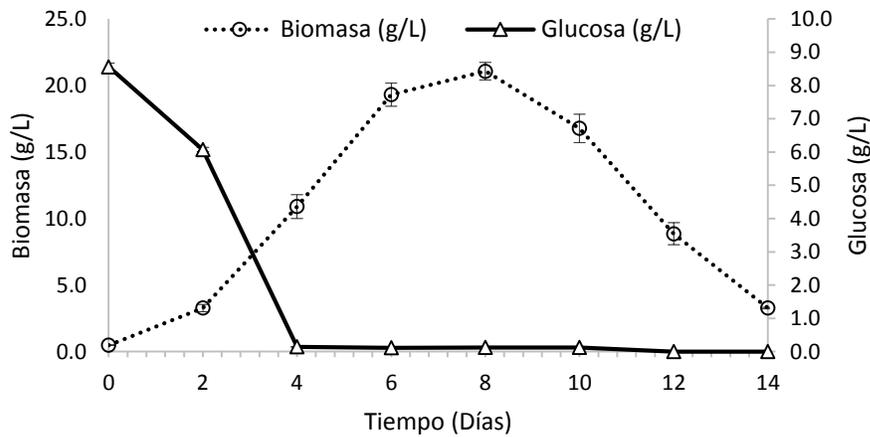


Figura 22. Producción de biomasa y consumo de azúcares de *A. niger* en medio Wunder a 28°C y 125 rpm. Promedio (\pm desviación estándar, n=3).

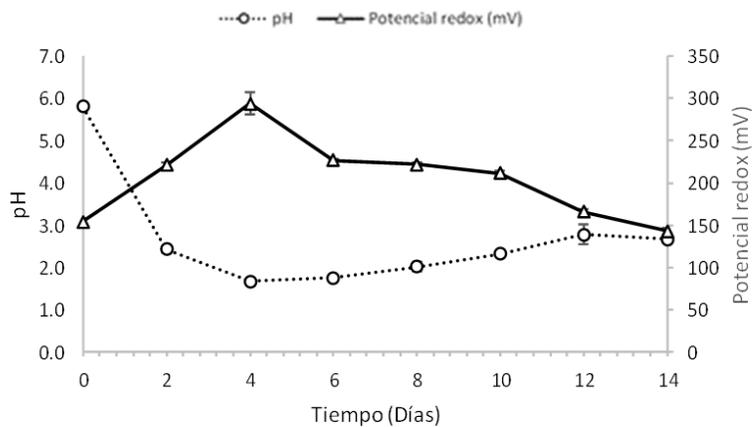


Figura 23. Monitoreo de pH y potencial redox de *A. niger* en medio Wunder a 28°C y 125 rpm. Promedio (\pm desviación estándar, n=3).



7.2.2.2 *Trichoderma atroviride*

Finalmente se presentan los datos del hongo *T. atroviride*, que tuvo la caída de azúcares y la mayor producción de biomasa a los 2 días (5.44 g/L) (Figura. 24). El valor más bajo de pH (2.27) se obtiene a los dos días de crecimiento coincidiendo con la caída de azúcares, y a los cuatro días el mayor potencial redox (212.53 mV) (Figura 25).

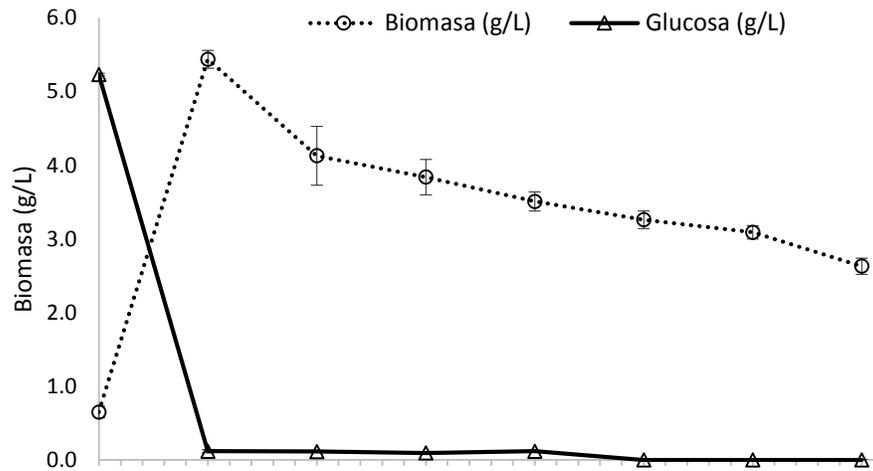


Figura 24. Producción de biomasa y consumo de azúcares de *T. atroviride* en medio Wunder a 28°C y 125 rpm. Promedio (\pm desviación estándar, n=3).

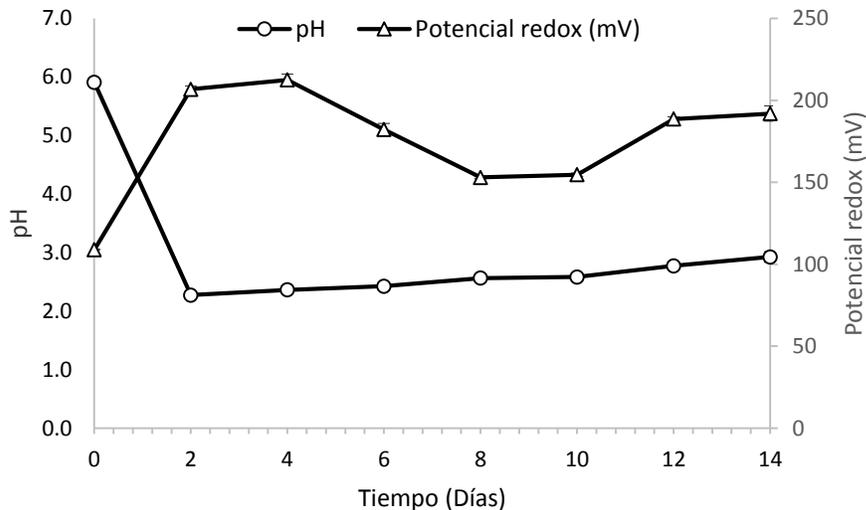


Figura 25. Monitoreo de pH y potencial redox de *T. atroviride* en medio Wunder a 28°C y 125 rpm. Promedio (\pm desviación estándar, n=3).



En la Tabla 8 se muestran los valores máximos de potencial redox obtenidos para cada cepa, así como los valores de pH y el día del cultivo en que se obtuvieron estos valores. El valor más alto de potencial redox en los basidiomicetos, especialmente en *P. placenta* se puede deber a la producción de H_2O_2 y radicales hidroxilos ($\cdot OH$), los cuales son parte de las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Bisarro *et al.*, 2018) que podrían estar involucradas en la oxidación de As^{III} a As^V . Las condiciones ácidas fueron alcanzadas en menos tiempo en los ascomicetos *T. atroviride* y *A. niger*. Estas condiciones se pueden deber a la producción de ácidos orgánicos durante el metabolismo secundario de los hongos como se ha reportado en investigaciones previas (Lira-Pérez *et al.*, 2022, Li *et al.*, 2022) los ácidos orgánicos, tales como el ácido cítrico, oxálico, succínico, gluconico, entre otros, producidos durante el ciclo de Krebs.

Tabla 8. Valores máximos de potencial redox durante el cultivo líquido de hongos

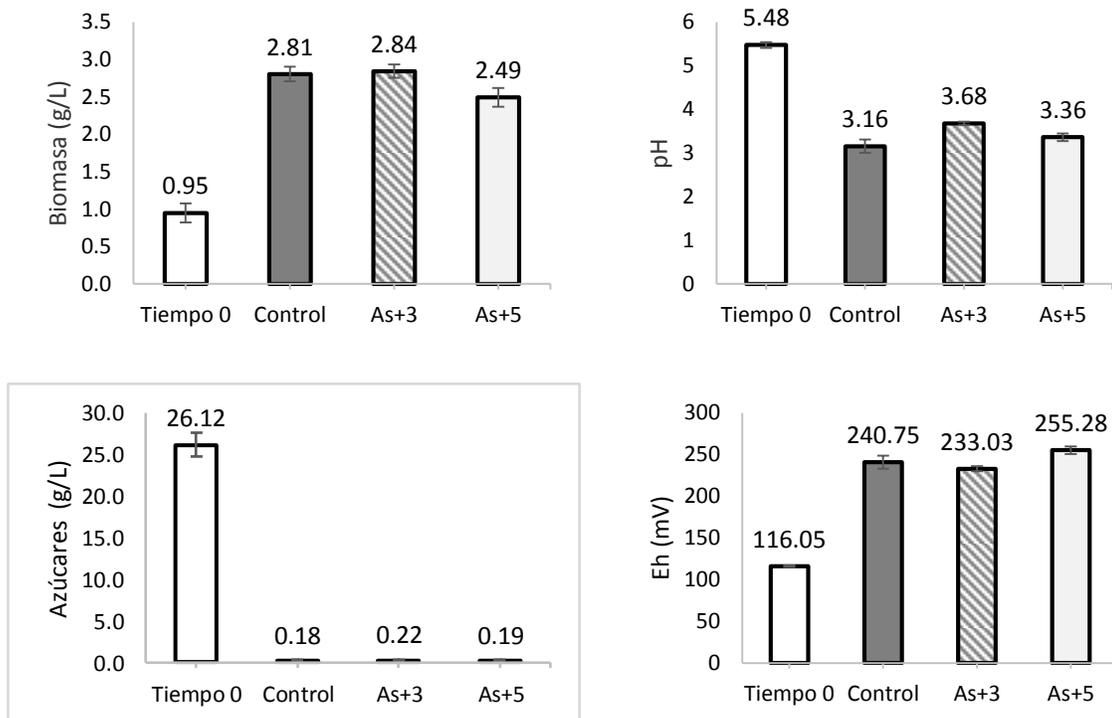
Hongo	Valor máximo de Eh (mV)	pH	Día
<i>A. niger</i>	294.00 ± 12.49	1.67 ± 0.01	4
<i>T. atroviride</i>	212.53 ± 3.49	2.27 ± 0.03	4, 2
<i>P. placenta</i>	381.30 ± 39.23	3.22 ± 0.00	12
<i>P. chrysosporium</i>	309.00 ± 20.71	4.02 ± 0.54	8

Una vez obtenidos estos datos, con la finalidad de conocer el comportamiento de la cepas en medio líquido en presencia de las sales de arsénico, se volvieron a realizar los cultivos de las cuatro cepas en las condiciones previamente descritas, pero la medición de los parámetros se realizó en presencia de As^{III} y As^V en los días de cultivo en los que se obtuvieron los valores más altos de potencial redox (Tabla 8), es decir, a los 4 días para *A. niger* y *T. atroviride*, a los 8 días para *P. chrysosporium* y a los 12 días para *P. placenta*. Los parámetros analizados fueron



consumo de azúcares, producción de biomasa, pH, potencial redox, actividad de las enzimas lacasa, manganeso peroxidasa y glucosa oxidasa.

En la Figura 26 se muestra el comportamiento de *P. placenta*, en los parámetros; producción de biomasa, pH, consumo de azúcares, potencial redox y enzima lacasa. No se observan diferencias entre el control (sin As) y los tratamientos con As^{III} (59 mg/L) y As^V (30.50 mg/L). El potencial redox es ligeramente mayor en presencia de As^V y el pH ligeramente mayor al control en presencia de sales de As. En el caso de la enzima glucosa oxidasa, se tiene mayor actividad en presencia de As^V, aunque es menor que en el control. No se detectó la presencia de H₂O₂ ni de la enzima manganeso peroxidasa.



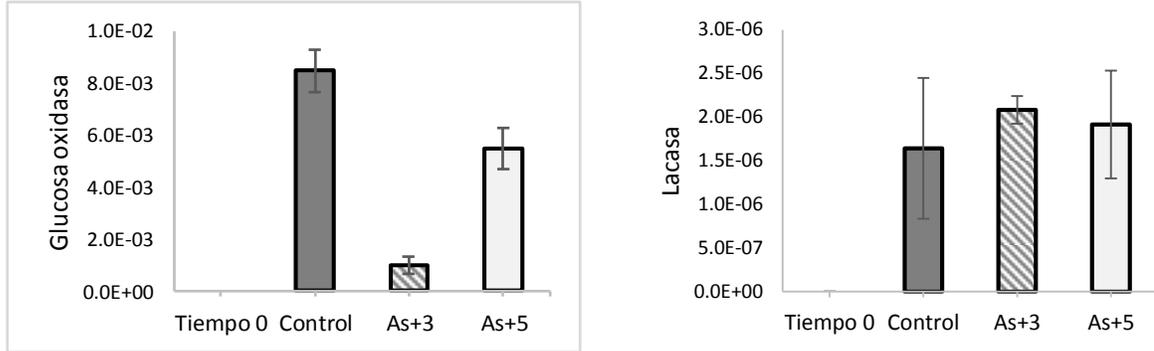
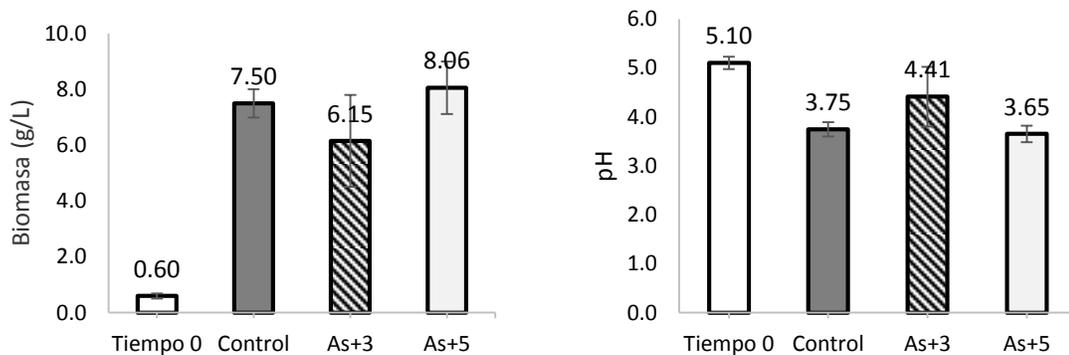


Figura 26. *P. placenta* a los 12 días de cultivo líquido en medio Sivakumar a 28°C y 125 rpm. Promedio (\pm desviación estándar, n=3).

En el cultivo de *P. chrysosporium* no se observan diferencias en los parámetros de producción de biomasa, pH y consumo de azúcares entre el control y los tratamientos con As^{III} (100.56 mg/L) y As^V (64.45 mg/L). El potencial redox fue mayor en el control (146.2 mV), seguido por el tratamiento con As^V (102.5 mV) y finalmente el tratamiento con As^{III} (55.5 mV). La actividad de las enzimas lacasa y mangaseo peroxidasa disminuye en presencia de las sales de As. No se detectó actividad de la enzima glucosa oxidasa y H_2O_2 sólo en el tratamiento con As^{III} (0.5 mg/L) (Figura 27).



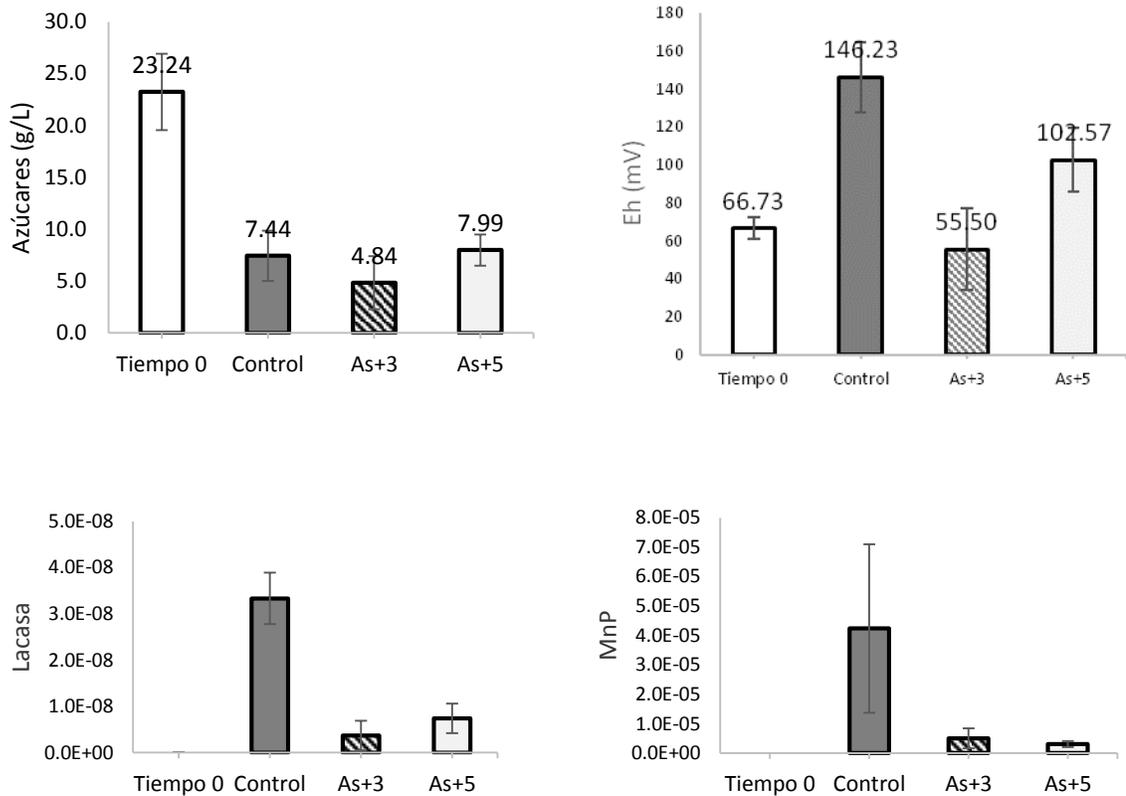
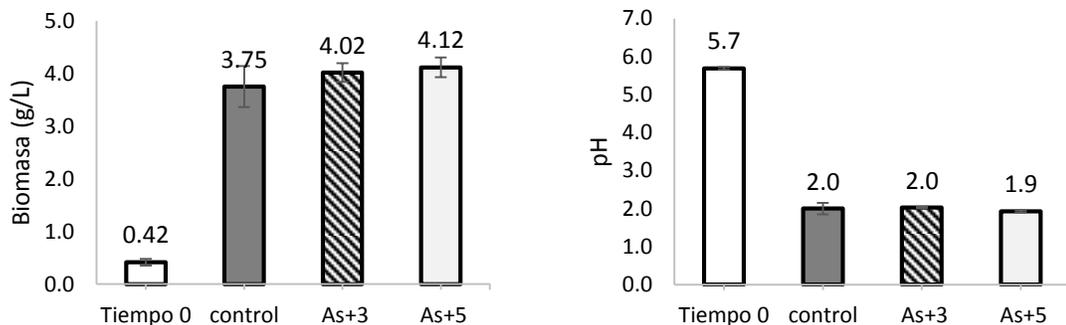


Figura 27. *P. chrysosporium* a los 8 días de cultivo líquido en medio Sivakumar a 39°C y 125 rpm. Promedio (\pm desviación estándar, n=3).

En el cultivo de *A. niger* (Figura 28) no se observan diferencias entre el control y los tratamientos con As^{III} y As^V (19.50 mg/L). Tampoco se detectó actividad de la enzima glucosa oxidasa ni la producción de H_2O_2 .



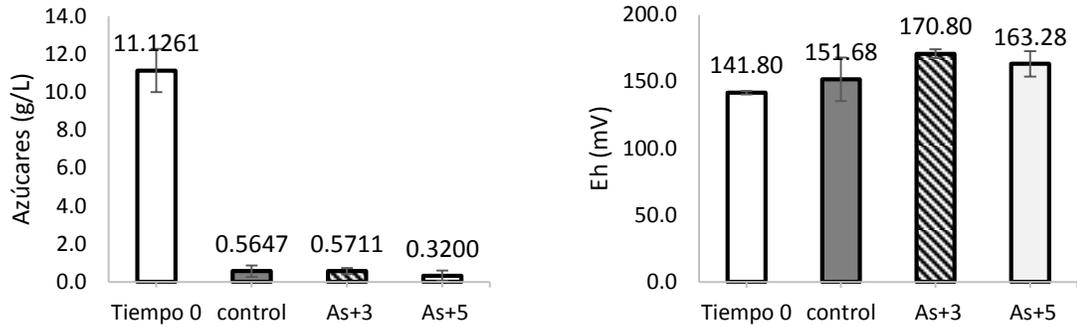
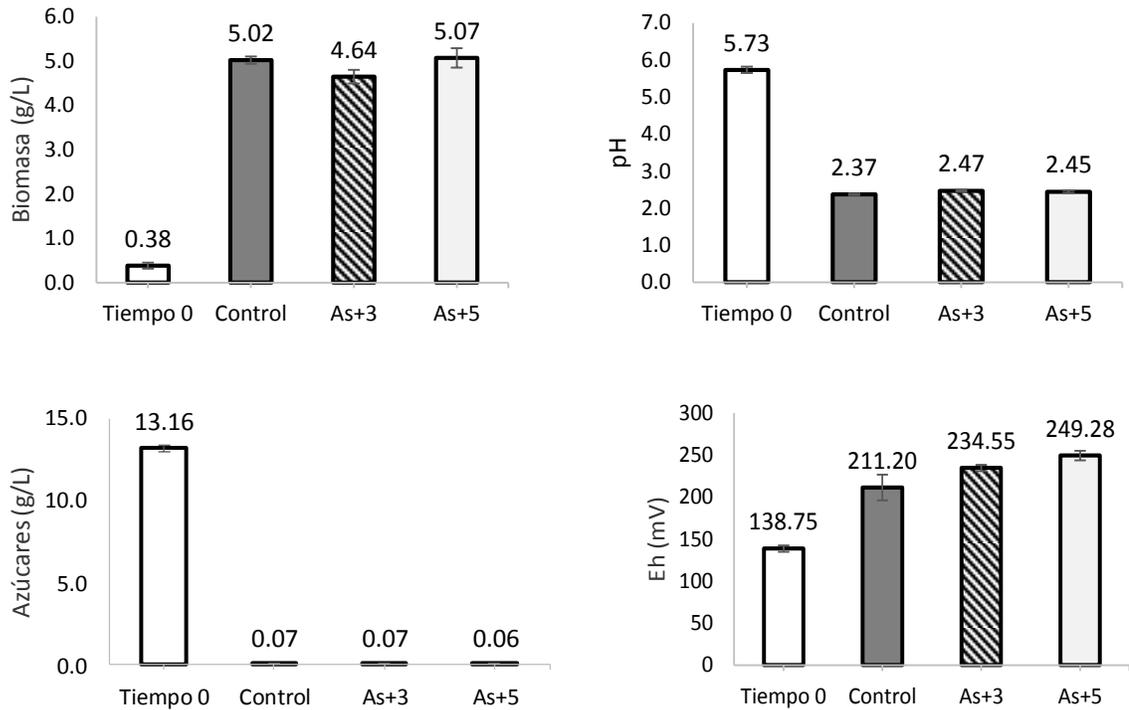


Figura 28. *A. niger* a los 4 días de cultivo líquido en medio Wunder a 28°C y 125 rpm. Promedio (\pm desviación estándar, n=3).

Trichoderma atroviride mostró un comportamiento similar a *A. niger* en cuanto a producción de biomasa, pH y consumo de azúcares, no presentando diferencias entre el control (sin As) y tratamientos con As^{III} (42.52 mg/L) y As^V (20.01 mg/L). El potencial redox, la producción de H₂O₂ y la actividad de glucosa oxidasa fueron ligeramente mayores en los tratamientos con las sales de As (Figura 29).



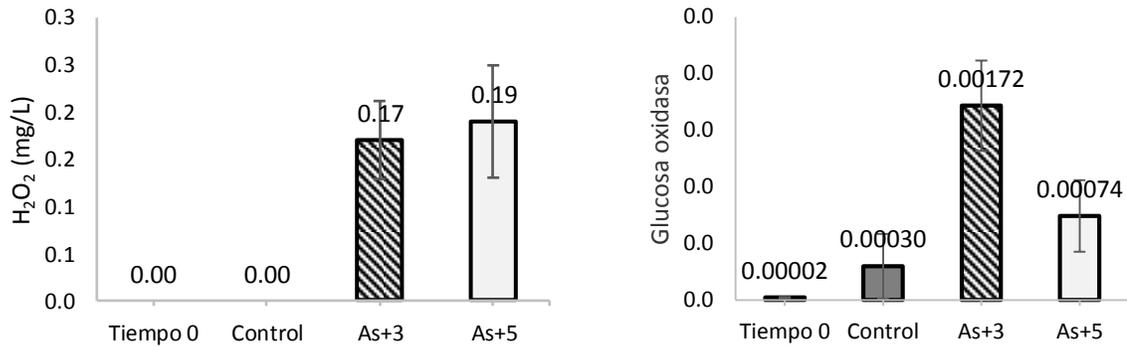


Figura 29. *T. atroviride* a los 4 días de cultivo líquido en medio Wunder a 28°C y 125 rpm. Promedio (\pm desviación estándar, n=3).

7.2.3 Producción de peróxido de hidrógeno por hongos

Para determinar las condiciones de cultivo que permitieran la formación del mineral en la última etapa de la investigación se realizó el seguimiento de la producción de H₂O₂ a lo largo de 14 días en los cuatro hongos. La determinación de este elemento perteneciente al grupo de especies reactivas de oxígeno es muy importante en el mecanismo propuesto para la oxidación de As^{III} a As^V al igual que en la degradación de otros compuestos orgánicos.

La mayor producción de H₂O₂ se obtuvo a los 8 días de cultivo con el hongo basidiomiceto *P. placenta* (0.64 mg/L) (Figura 30), que coincide en ser el hongo con el que se obtuvieron los valores más altos de potencial redox en el medio de cultivo. Además es importante destacar que en este tipo de hongos, las reacciones de tipo Fenton producen radicales hidroxilos (\cdot OH), reportado como un fuerte oxidante (2.8 V) (Wang, X. & Zhang, L., 2018). Enseguida se encuentra *P. chrysosporium* con una producción de H₂O₂ de 0.50 mg/L a los 14 días de cultivo (Figura 31). Cabe destacar que el medio Sivakumar utilizado para el cultivo de basidiomicetos tiene el doble de concentración de la fuente de carbono; dextrosa, lo cual podría favorecer una mayor producción de H₂O₂ en estos hongos comparado con los ascomicetos.

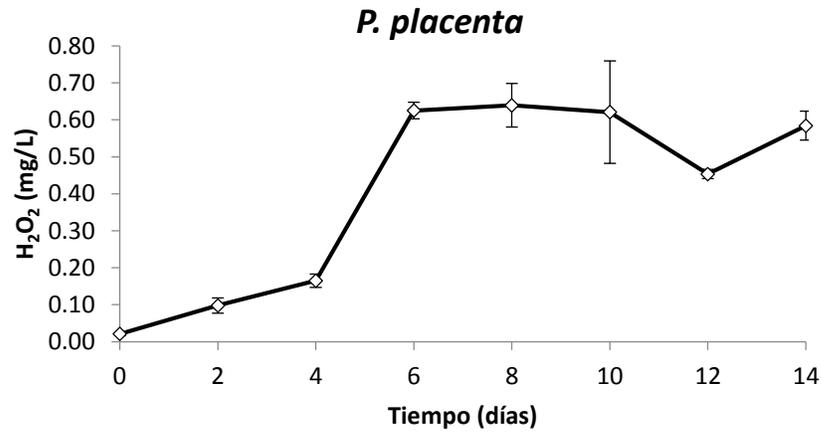


Figura 30. Producción de H₂O₂ por el hongo *P. placenta* a 28°C y 125 rpm. Promedio (\pm desviación estándar, n=3).

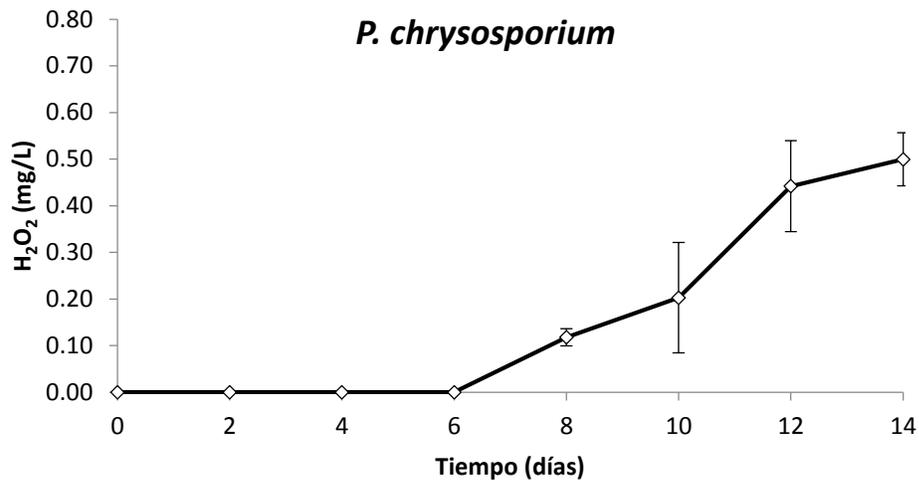


Figura 31. Producción de H₂O₂ por el hongo *P. chrysosporium* a 39°C y 125 rpm. Promedio (\pm desviación estándar, n=3).

Los ascomicetos tuvieron valores máximos más bajos de producción de H₂O₂; *T. atroviride*, 0.43 mg/L a los 4 días de cultivo (Figura 32) y *A. niger*, 0.13 mg/L a los 4 días (Figura 33).

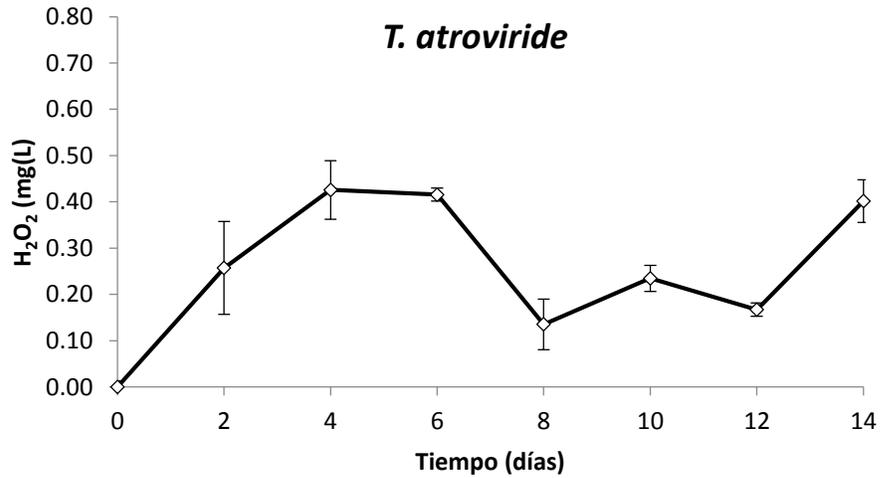


Figura 32. Producción de H₂O₂ por el hongo *T. atroviride* a 28°C y 125 rpm. Promedio (\pm desviación estándar, n=3).

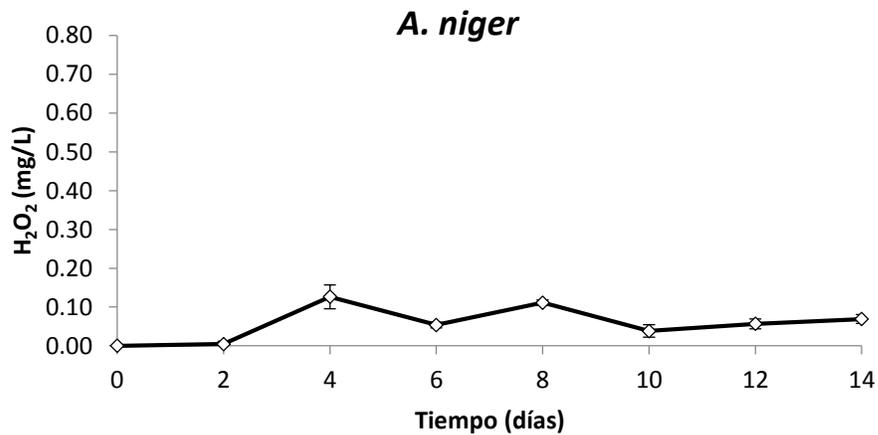


Figura 33. Producción de H₂O₂ por el hongo *A. niger* a 28°C y 125 rpm. Promedio (\pm desviación estándar, n=3).

Las oxidasas que se encuentran en todos los hongos descomponedores de madera son productores conocidos de H₂O₂ y pertenecen a las superfamilias de las glucosa-metanol-colina (GMC) oxidoreductasas (AA3) o cobre radical oxidasas (CRO: AA5). Entre las AA3; aril-alcohol oxidasas (AAO), glucosa oxidasa (GOX) y alcohol oxidasas (AOX) son las enzimas más relacionadas filogenéticamente, seguidas de la



piranosa 2-oxidasa (P2O) y la celobiosa deshidrogenasa (CDH), que comparten el ancestro más antiguo con otros GMC oxidoreductasas. En los hongos de la podredumbre blanca, un papel obvio de estas oxidadasas es alimentar a las enzimas lignina peroxidadasas con H_2O_2 . En los hongos de la pudrición café, que carecen de las enzimas lignina peroxidadasas, el H_2O_2 se puede usar para impulsar los sistemas Fenton que son únicos para estos hongos. Es importante destacar que los sistemas Fenton pueden no ser el único sumidero de H_2O_2 , ya que existe un fuerte concurrencia de genes que codifican enzimas AA9 monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMOs) y AA3 en hongos de la pudrición café, y que las LPMOs usan H_2O_2 eficientemente para catalizar la escisión oxidativa de polisacáridos (Bissaro *et al.*, 2018).

7.2.4 Aplicación del diseño factorial fraccionado 2^{3-1}

Para la aplicación del diseño factorial fraccionado 2^{3-1} planteado en esta segunda etapa, se seleccionó el hongo *T. atroviride*, debido a que presenta una alta tasa de crecimiento de diámetro (TCD) en presencia de sales de arsénico y fue la única cepa donde se detectó la presencia de H_2O_2 y actividad de la enzima glucosa oxidasa bajo las condiciones estudiadas en medio líquido. Además se ha reportado que distintas cepas de *Trichoderma* han demostrado ser tolerantes a altas concentraciones de arsénico, ya sea porque fueron aisladas de sitios contaminados con arsénico o bien, fueron probadas bajo condiciones de laboratorio (Srivastava *et al.*, 2011, Su *et al.*, 2011, Tripathi *et al.*, 2017, Jaiswal *et al.*, 2018).

Antes de aplicar el diseño experimental, se realizó el cultivo líquido de la cepa durante 14 días para el seguimiento de los parámetros: Producción de biomasa, consumo de azúcares, pH, potencial redox y producción de H_2O_2 . La cepa tuvo la mayor producción de biomasa a los dos días de cultivo y la caída de azúcares desde los 3 días (Figura 34). El valor más bajo de pH (2.42) se obtiene a los dos días de



crecimiento, coincidiendo con el día del valor más alto de potencial redox (257.77 mV) (Figura 35) y producción de H₂O₂ (Figura 36).

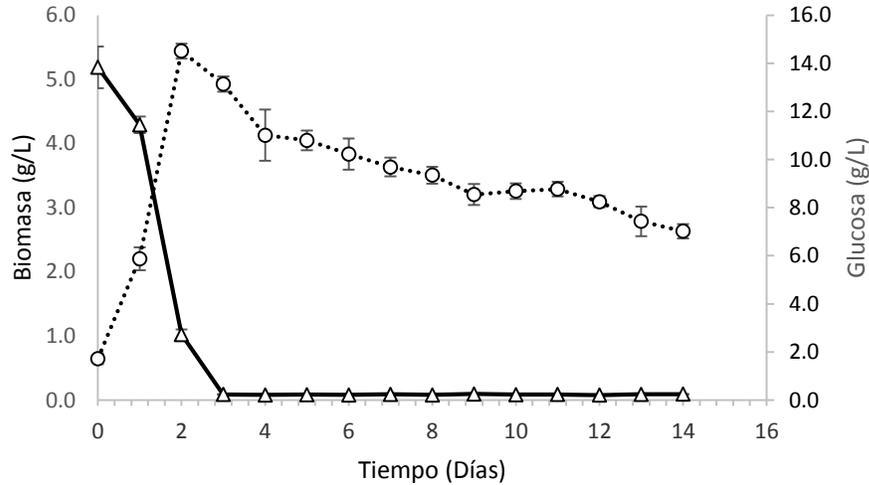


Figura 34. Producción de biomasa y consumo de azúcares de *T. atroviride* en medio Wunder a 28°C y 125 rpm. Promedio (\pm desviación estándar, n=3).

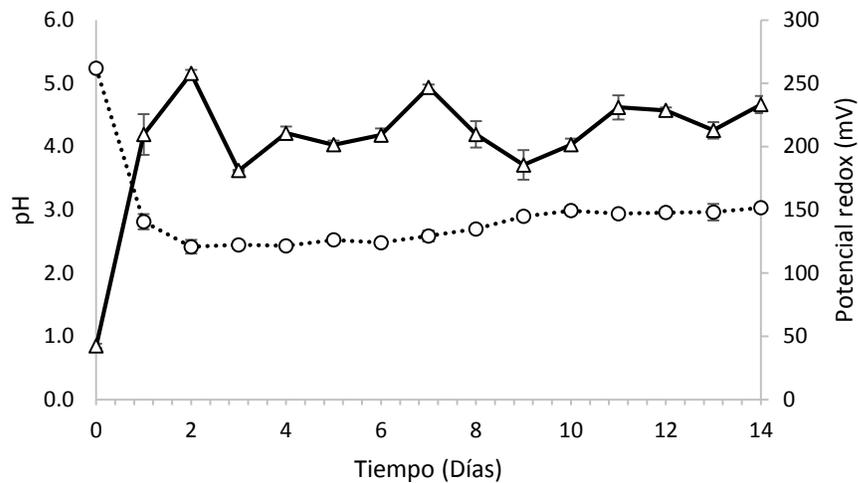


Figura 35. Monitoreo de pH y potencial redox de *T. atroviride* en medio Wunder a 28°C y 125 rpm. Promedio (\pm desviación estándar, n=3).

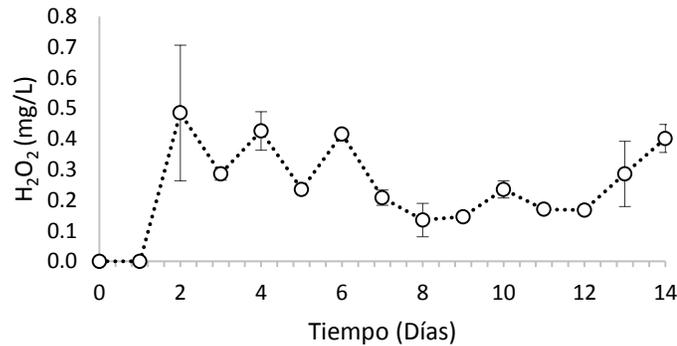


Figura 36. Producción de H₂O₂ de *T. atroviride* en medio Wunder a 28°C y 125 rpm. Promedio (\pm desviación estándar, n=3).

Para la obtención del inóculo de *T. atroviride*, el hongo fue crecido en medio sólido agar papa dextrosa a 28 °C durante 5 días. Después se inocularon 6 discos de agar (d=6 mm) en 170 mL de medio Wunder modificado. Los matraces se mantuvieron a 28 °C y 125 rpm. Después de 3 días se filtró la biomasa, se determinó humedad y se inocularon 1.5 g/L de biomasa peso seco en matraces Erlenmeyer con 40 mL de medio Wunder modificado (Tabla 7) considerando las variables independientes del diseño experimental.

El diseño experimental aplicado fue un factorial fraccionado 2^{3-1} (Tabla 9). Como variables independientes se utilizaron la fuente de carbono (dextrosa y lactosa), fuente de hierro (FeSO₄ y FeCl₃) y fuente de fósforo (KH₂PO₄, K₂HPO₄). Como variables dependientes; producción de biomasa, pH, potencial redox y producción de H₂O₂. Estos parámetros de respuesta se midieron a los seis días de cultivo, considerando que también se tiene un valor alto de producción de H₂O₂, condición que favorece la reacción Fenton en el sistema, permitiendo la oxidación de As^{III} a As^V.

**Tabla 9.** Diseño factorial fraccionado 2^{3-1} con las variables reales.

Tratamiento	FACTORES		
	Fuente de carbono	Fuente de hierro	Fuente de fósforo
1	Lactosa	FeCl ₃	KH ₂ PO ₄
2	Dextrosa	FeCl ₃	K ₂ HPO ₄
3	Lactosa	FeSO ₄	K ₂ HPO ₄
4	Dextrosa	FeSO ₄	KH ₂ PO ₄

A= Fuente de carbono, B=Fuente de hierro, C= Fuente de fósforo

La mayor producción de biomasa y el valor más bajo de pH se obtuvo con el tratamiento T3, que consiste en lactosa como fuente de carbono, sulfato ferroso como fuente de hierro y K₂HPO₄ como fuente de fósforo (Figura 37 y 38). El monitoreo del pH es importante debido a que este parámetro puede afectar indirectamente la respuesta del hongo al metal por su efecto en la especiación, fisiología celular y metabolismo. Cuando aumenta el valor del pH, la superficie de la célula fúngica se carga más negativamente, condición favorable para la absorción de metales cargados positivamente o cationes (Srivastava *et al.*, 2011), situación que no aplica en el caso de arsénico, que se comporta como anión. Sin embargo, cuando el pH es ácido se llevan a cabo reacciones de tipo Fenton (Berkani *et al.*, 2021, Izcapa-Treviño *et al.*, 2009), donde son generados radicales hidroxilos ($\cdot\text{OH}$) a partir del H₂O₂ y las sales de Fe^{II} produciendo condiciones oxidantes que permitiría la oxidación del As^{III} a As^V.

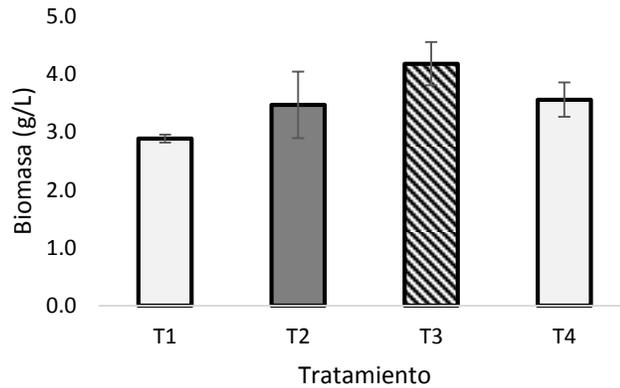


Figura 37. Producción de biomasa de *T. atroviride* en medio Wunder modificado (Tabla 7) a 28°C y 125 rpm. Promedio (\pm desviación estándar, n=3).

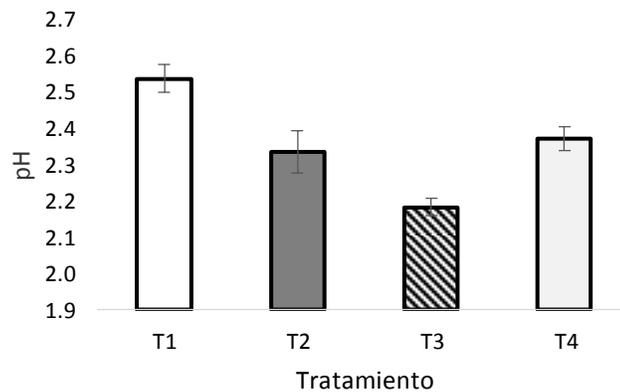


Figura 38. Monitoreo de pH en cultivo de *T. atroviride* en medio Wunder modificado (Tabla 7) a 28°C y 125 rpm. Promedio (\pm desviación estándar, n=3).

En cuanto al potencial redox, el tratamiento T3 también mostró el valor más alto (324.75 mV) como se muestra en la Figura 39, presentándose un incremento aproximado del 78% respecto al valor obtenido en el cultivo líquido de *T. atroviride* a los 6 días, que fue de 182.30 mV (Fig. 25).

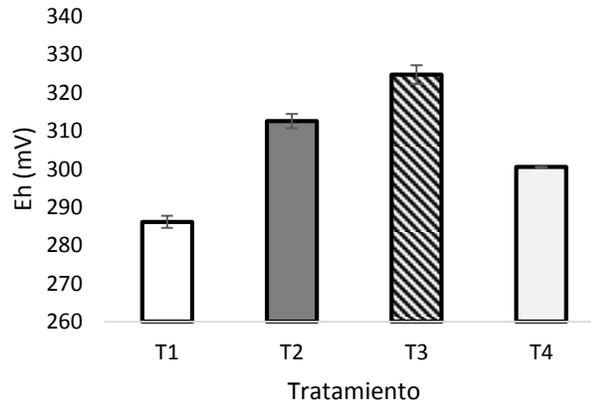


Figura 39. Determinación del potencial redox en cultivo de *T. atroviride* en medio Wunder modificado (Tabla 7) a 28°C y 125 rpm. Promedio (\pm desviación estándar, n=3).

La producción de H_2O_2 se ve favorecida en los tratamientos T2 y T3, con valores de 0.61 y 0.55 mg/L, respectivamente (Figura 40), valores por arriba de los obtenidos con *P. placenta* utilizando dextrosa como fuente de carbono al 0.5% (0.19 mg/L) (Ritschkoff *et al.*, 1995). Cabe destacar que el exceso de nitrógeno y carbohidratos en el medio de cultivo de algunos hongos puede afectar la detección de H_2O_2 cuando éste es producido por la enzima glucosa oxidasa, además otra razón puede ser que la concentración de H_2O_2 producido es tan bajo que el método de detección no es lo suficientemente sensible para detectarlo (Highley, 1987).

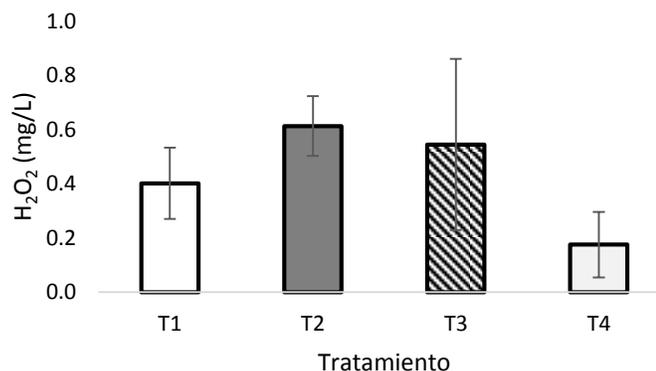


Figura 40. Producción de H_2O_2 en cultivo de *T. atroviride* en medio Wunder modificado (Tabla 7) a 28°C y 125 rpm. Promedio (\pm desviación estándar, n=3).



Los datos obtenidos de biomasa, pH, potencial redox y H₂O₂ fueron analizados en el programa SAS versión 9.0 mediante un análisis ANOVA y de comparación de medias, con un nivel de confianza del 95% (Anexo B), encontrando que las variables biomasa, pH, y potencial redox se ven afectadas por la fuente de hierro y la fuente de fósforo, mientras que la producción de peróxido de hidrógeno sólo se afectó por la última.

Al realizar la comparación de medias en la producción de biomasa y pH no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos T2 y T4. En el caso de potencial redox, no hay diferencia entre los tratamientos T1, T2 y T4. Finalmente, para la producción de H₂O₂ no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos T1, T2 y T3.

Los modelos de regresión de las variables de respuesta; producción de biomasa, pH, potencial redox y producción de H₂O₂ se presentan a continuación:

$$\text{Biomasa (g/L)} = 3.53 + 0.035\text{Fe} - 0.30\text{P}$$

$$\text{pH} = 2.35 - 0.079\text{Fe} + 0.09\text{P}$$

$$\text{Eh (mV)} = 303 + 9.41\text{Fe} - 9.89\text{P}$$

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ (mg/L)} = 0.43 - 0.15\text{P}$$



7.3. ETAPA III. FORMACIÓN DEL MINERAL BIOSCORODITA

Considerando los antecedentes sobre obtención de escorodita (Singhania *et al.*, 2005, Taboada *et al.*, 2008) y bioscorodita con otros microorganismos, como las arqueas (González-Contreras *et al.*, 2012, Okibe *et al.*, 2017), en esta parte del proyecto se investigó la formación del mineral probando condiciones de temperatura, pH y tiempo de reacción ya reportadas en la literatura, para después usar el medio líquido obtenido del cultivo de *T. atroviride*, *A. niger*, *P. chrysosporium* y *P. placenta* en la formación de bioscorodita.

7.3.1 Evaluación de parámetros para la formación de escorodita

Antes de buscar obtener bioscorodita con el medio de cultivo de los hongos se trabajó en la obtención de escorodita, químicamente, la cual fue utilizada como control positivo. Se probaron tres condiciones que se describen a continuación:

Reacción 1. En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se colocaron 0.24 g de Fe^{III} como cloruro férrico (FeCl₃·6H₂O) con 0.28 g de As^V como arsenato de sodio heptahidratado (Na₂HAsO₄·7H₂O) en 100 mL de agua destilada, se ajustó el pH a 1.3 con H₂SO₄, se agregó la semilla, en este caso se utilizaron 0.56 g de yeso (CaSO₄·2H₂O), y se mantuvo la reacción a 92°C durante 2 horas en agitación. Se utilizó la relación Fe/As reportada por González-Contreras *et al.*, 2012. En este sistema no se obtuvo el material esperado, debido posiblemente al poco tiempo de reacción y al sistema abierto utilizado como se muestra en la Figura 41.



Figura 41. Sistema de calentamiento y agitación para la obtención de scorodita atmosférica.

Reacción 2. En un matraz Erlenmeyer se agregó 0.18 g de Fe^{II} como sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), se adicionó 1.75 mol/L de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y se agitó durante 1 hora a 125 rpm con la finalidad de oxidar el Fe^{II} , se ajustó el pH a 1.3 con H_2SO_4 y se agregó 0.25 g de As^{V} como arsenato de sodio heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) en 100 mL de agua destilada. Se colocó en la autoclave y se mantuvo por 2 horas a 123 °C. Tampoco se obtuvo la formación del cristal (Figura 42), posiblemente por la precipitación del hierro al adicionar H_2O_2 para cambiar el estado de oxidación, además no se alcanzó la temperatura deseada en la autoclave, que era de 150°C, como lo plantea Singhanía *et al.*, 2005 en su estudio.

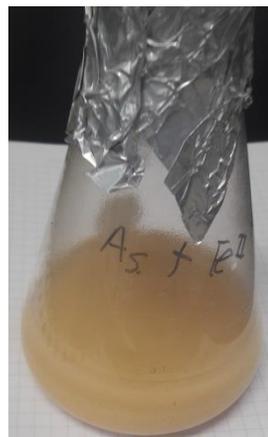


Figura 42. Unidad experimental utilizada para la obtención de scorodita hidrotermal en autoclave.



Reacción 3. En un matraz balón de 250 mL se adicionaron 0.24 g de Fe III como sulfato férrico ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) con 50 mL de H_2O destilada, se ajustó el pH a 1.3 con H_2SO_4 concentrado y se agregaron 0.28 g de arsenato de sodio heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Al mezclarlos la solución cambio de color a amarillo lechoso, como semilla se agregó 0.56 g de yeso ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), concentración reportada por Singhanía *et al.*, 2005 y se adicionó H_2SO_4 concentrado para clarificar la solución. Sobre el matraz se colocó un condensador con la finalidad de evitar perdida de agua por evaporación. El sistema se mantuvo a 92°C durante 21 horas en agitación, después se dejó enfriar la solución y se filtró con papel poro grueso y fino, se secó en un desecador a temperatura ambiente, quedando un sólido color verde pálido (Figura 43) parecido al reportado por González-Contreras *et al.*, 2012.



Figura 43. Proceso de obtención de escorodita atmosférica utilizando sulfato férrico como fuente de Fe^{III} .

7.3.2 Producción de bioscorodita usando medio de cultivo de hongos basidiomicetos y ascomicetos

7.3.2.1. Basidiomicetos

Para las reacciones de generación de bioscorodita usando los dos hongos basidiomicetos; *P. placenta* y *P. chrysosporium*, se utilizó el medio de cultivo Sivakumar (Tabla 6).



En el caso de *P. placenta*, se sembró el hongo en agar papa dextrosa, estuvo en incubación durante 12 días a 28°C. Se colocaron seis discos de agar con el hongo en 170 mL de medio Sivakumar, a los 7 días que se tuvo una densidad de biomasa adecuada, esta se filtró y se añadieron 0.06 g de biomasa en 40 mL de medio Sivakumar modificado en matraces Erlenmeyer de 125 mL (1.5 g/L biomasa peso seco). Los matraces fueron mantenidos en una incubadora a 28 °C y 125 rpm de agitación. A los 6 días de cultivo cuando se tiene la mayor producción de H₂O₂ (Figura 30), se separó el medio de cultivo para llevar a cabo la reacción.

El medio de cultivo fue filtrado para eliminar la biomasa, se colocaron 85 mL del medio en un matraz balón de 250 mL, se adicionaron 2.4 g/L de Fe^{III} como sulfato férrico (Fe₂(SO₄)₃.nH₂O), 2.8 g/L de As^{III} como arsenito de sodio (NaAsO₂) y se ajustó el pH a 1.3 con H₂SO₄ concentrado. Como semilla se agregaron 5.6 g/L de sulfato de calcio (CaSO₄.2H₂O). Sobre el matraz se colocó un condensador con la finalidad de evitar pérdida de agua por evaporación. El sistema se mantuvo a 92°C durante 32 horas. Posteriormente, se dejó enfriar la solución y se filtró (Fig. 44). El proceso se realizó por duplicado.



Figura 44. Proceso de obtención de bioscorodita utilizando las diferentes cepas.

Para *P. chrysosporium*, se sembró el hongo en agar papa dextrosa, estuvo en incubación durante 5 días a 39°C. Se colocaron seis discos de agar con el hongo en 170 mL de medio Sivakumar, a los 3 días que se tuvo una densidad de biomasa adecuada, ésta se filtró y se añadieron 0.06 g de biomasa en 40 mL de medio



Sivakumar modificado en matraces Erlenmeyer de 125 mL (1.5 g/L biomasa peso seco). Los matraces fueron mantenidos en una incubadora a 39 °C y 125 rpm de agitación hasta los 8 días de cultivo cuando se tiene el valor más alto de potencial redox.

El medio de cultivo fue filtrado para eliminar la biomasa, se colocaron 75 mL del medio en un matraz balón de 250 mL y se siguió el mismo procedimiento descrito para *P. placenta* (Figura 45).



Figura 45. Proceso de obtención de bioscorodita utilizando el hongo *P. chrysosporium*.

7.3.2.2. Ascomicetos

Para los hongos ascomicetos; *A. niger* y *T. atroviride* se utilizó medio Wunder modificado (Tabla 7), el cual tiene la mitad de dextrosa utilizada en el medio Sivakumar.

Para la obtención del inóculo, ambos hongos fueron cultivados en medio sólido agar papa dextrosa a 28 °C durante 5 días. Después se inocularon 6 discos de agar (d=6 mm) en 170 mL de medio Wunder modificado. Los matraces se mantuvieron a 28 °C y 125 rpm. Después de 3 días se filtró la biomasa, se determinó humedad y se inocularon 1.5 g/L de biomasa peso seco en matraces Erlenmeyer con 40 mL de medio Wunder modificado.



Tanto el cultivo de *A. niger* como el de *T. atroviride* se detuvo a los 4 días, que es cuando tienen las concentraciones más altas de H₂O₂ (Figuras 32 y 33).

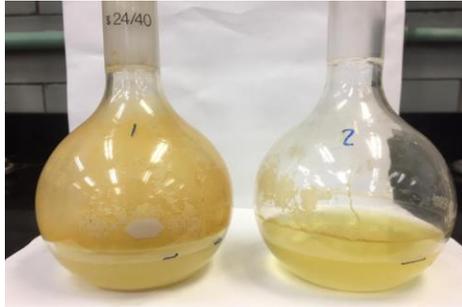


Figura 46. Solución final obtenida utilizando el medio de cultivo de *A. niger*.

En el caso particular de la reacción con el medio de *T. atroviride*, no se ajustó el pH a 1.3 con ácido sulfúrico, la reacción se llevó a cabo al pH del medio a los 4 días de cultivo que fue de 2.38 ± 0.08 . El proceso de la reacción para la formación de bioscorodita fue como el descrito para *P. placenta*.

En la figura 47 se muestran las imágenes de los sólidos obtenidos en las diferentes reacciones llevadas a cabo con los cuatro hongos. Sin embargo, ninguno de los sólidos presentó el color verde pálido característico de la escorodita, los colores observados fueron entre café claro y amarillo.



Figura 47. Muestras de los sólidos obtenidos con las diferentes cepas.



7.3.3 Uso de medio de cultivo de *Trichoderma atroviride* para la formación de bioscorodita

Una vez obtenido el control positivo de escorodita (Reacción 3), se trabajó en la generación de bioscorodita a partir del medio de cultivo de *T. atroviride*. Para ello, el hongo fue crecido en medio sólido y líquido como se ha descrito en apartados anteriores. Después de dos días de cultivo, se midieron los parámetros; pH, potencial redox, biomasa, azúcares y producción de H₂O₂ (Tabla 10).

Tabla 10. Medición de parámetros en cultivo líquido de *T. atroviride*.

Parámetro	t _{inicial}	t _(2 días)
Biomasa	0.64 ± 0.10	5.22 ± 0.23
Azúcares (g/L)	10.37 ± 0.22	0.49 ± 0.27
pH	5.97 ± 0.01	2.54 ± 0.01
Potencial redox (mV)	149.90 ± 3.80	318.93 ± 3.07
H ₂ O ₂ (mg/L)	0.00	0.14 ± 0.03

Reacción 4. El medio de cultivo del hongo fue filtrado para eliminar la biomasa, se colocaron 50 mL del medio en un matraz balón de 250 mL, se adicionaron 0.24 g de Fe^{II} como sulfato ferroso (FeSO₄·7H₂O), se ajustó el pH a 1.3 con H₂SO₄ concentrado y se agregaron 0.28 g de As^{III} como arsenito de sodio (NaAsO₂), como semilla se agregaron 0.56 g de yeso (CaSO₄·2H₂O). La solución cambio de amarilla a blanquecina por lo que se agregó H₂SO₄ para clarificar. Sobre el matraz se colocó un condensador con la finalidad de evitar pérdida de agua por evaporación. El sistema se mantuvo a 92°C durante 27 horas en agitación, se dejó enfriar la solución (Figura 47). El sólido obtenido de esta reacción fue color café, el cual no es característico de escorodita.



Figura 47. Proceso de obtención de scorodita atmosférica utilizando medio de cultivo de *T. atroviride*.

Reacción 5: El medio de cultivo fue filtrado para eliminar la biomasa, se colocaron 100 mL del medio en un matraz balón de 250 mL, se adicionaron 0.085 g de Fe^{III} como sulfato férrico ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), y se adicionó 0.1 g de As^{III} como arsenito de sodio (NaAsO_2). Como semilla se agregó 0.2 g de scorodita ($\text{FeAsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Sobre el matraz se colocó un condensador con la finalidad de evitar la pérdida de agua por evaporación. El sistema se mantuvo a 92°C durante 32 horas, se dejó enfriar la solución y se filtró. El sólido obtenido fue color verde pálido, color característico de la scorodita (Figura 48).

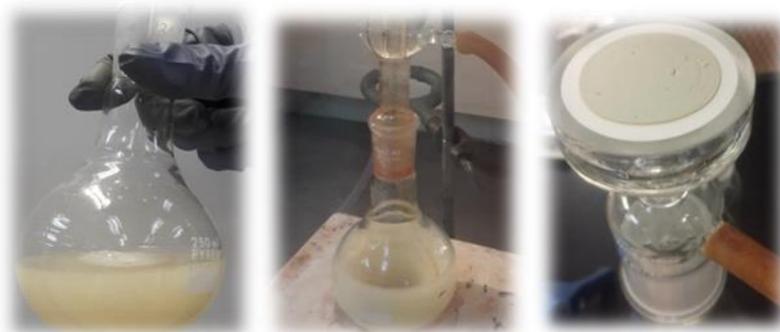
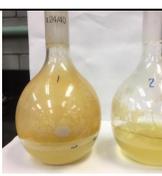


Figura 48. Proceso de obtención de bioscorodita utilizando *T. atroviride*.

En la Tabla 11 se presenta un condensado de las condiciones de reacción que se llevaron a cabo.

**Tabla 11.** Condiciones probadas en el laboratorio para la formación de escorodita.

Reacción	Semilla	pH, t, T	Color
Reacción 1 (Fe III + As V) 0.24g FeCl ₃ .6H ₂ O + 0.28g Na ₂ HAsO ₄	0.56g CaSO ₄ .2H ₂ O (yeso)	pH=1.3 t= 2h T= 92°C	Amarillo claro 
Reacción 2 (Fe II + As V) 0.18 g FeSO ₄ .7H ₂ O + 0.25 g Na ₂ HAsO ₄ .7H ₂ O (H ₂ O ₂ para oxidar el FeII)	Sin semilla, En autoclave	pH=1.3 t= 2h T=123°C	
Reacción 3 (Fe III + As V) 0.24g Fe ₂ (SO ₄) ₃ .nH ₂ O + 0.28g Na ₂ HAsO ₄ .7H ₂ O	0.56g CaSO ₄ .2H ₂ O (yeso)	pH=1.3 t=21h T=92°C	Verde pálido 
Reacción 4 Medio de cultivo <i>T. atroviride</i> Fe(II) + As (III) 0.24g FeSO ₄ .7H ₂ O + 0.28g NaAsO ₂	0.56g CaSO ₄ .2H ₂ O (yeso)	pH=1.3 t=27 h T=92°C	Café 
Reacción 5 Medio de cultivo <i>T. atroviride</i> Fe(III) + As(III) 0.085 g Fe ₂ (SO ₄) ₃ .nH ₂ O + 0.1 g NaAsO ₂	0.2 g FeAsO ₄ .2H ₂ O (Escorodita química)	pH=1.3 t=32 h T=92°C	Verde pálido 
Reacción con medio de cultivo de hongos Medio de cultivo de hongos (Fe III + As III) 0.24g Fe ₂ (SO ₄) ₃ .nH ₂ O + 0.28g NaAsO ₂	.56g CaSO ₄ .2H ₂ O (yeso)	pH=1.3 t=32 h T=92°C	



7.3.4 Caracterización de la scorodita atmosférica obtenida químicamente

Para el análisis de las características estructurales por difracción de rayos X de los sólidos obtenidos de las distintas reacciones se utilizó un difractómetro Bruker D2Phaser en un rango 2θ de $10-80^\circ$. El sólido obtenido de la tercera reacción (Tabla 11) y el sulfato de calcio utilizado como semilla fueron analizados por difracción de rayos X (Figuras 49, 50 y 51), coincidiendo el patrón de difracción del sólido obtenido con el de la scorodita reportada por Caetano *et al.*, 2009 (Figura 52).

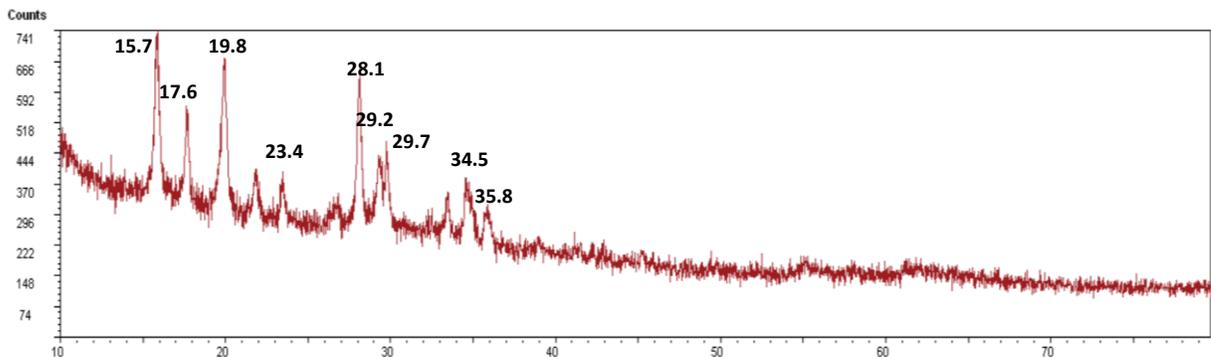


Figura 49. Difractograma de rayos X de scorodita atmosférica precipitada químicamente a 92°C filtrada en papel poro grueso.

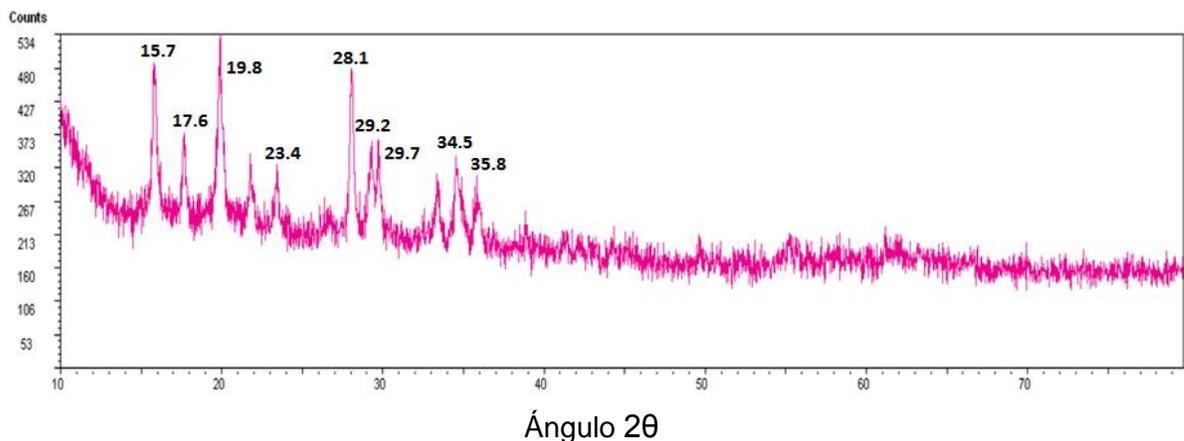


Figura 50. Difractograma de rayos X de scorodita atmosférica precipitada químicamente a 92°C filtrada en papel con diámetro de $45\ \mu\text{m}$.

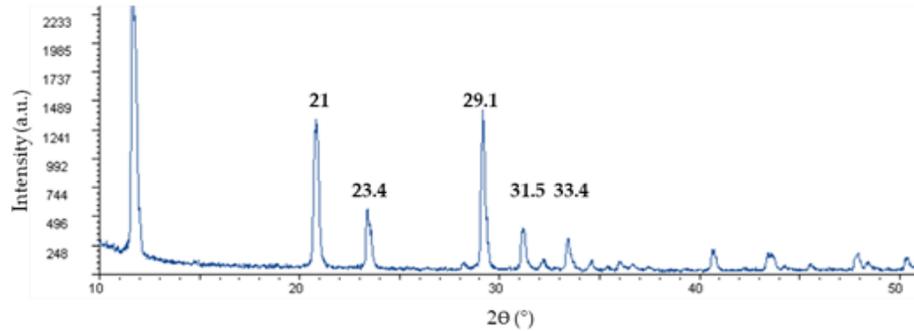


Figura 51. Difractograma de rayos X de sulfato de calcio utilizado como semilla para la formación de escorodita atmosférica precipitada químicamente a 92 °C.

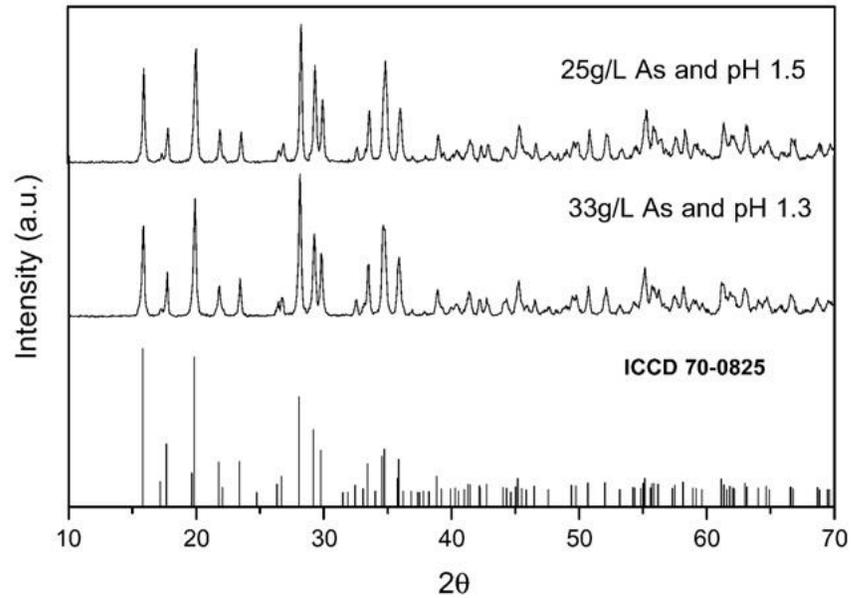


Figura 52. Patrón de rayos X de escorodita hidrotermal obtenida por Caetano *et al.*, 2009.

También se realizó un análisis por microscopía electrónica de barrido del sólido y la semilla (Figuras 53, 54 y 55). La morfología de las muestras fue obtenida en un microscopio electrónico de barrido Tescan Vega3 con filamento LaB6.

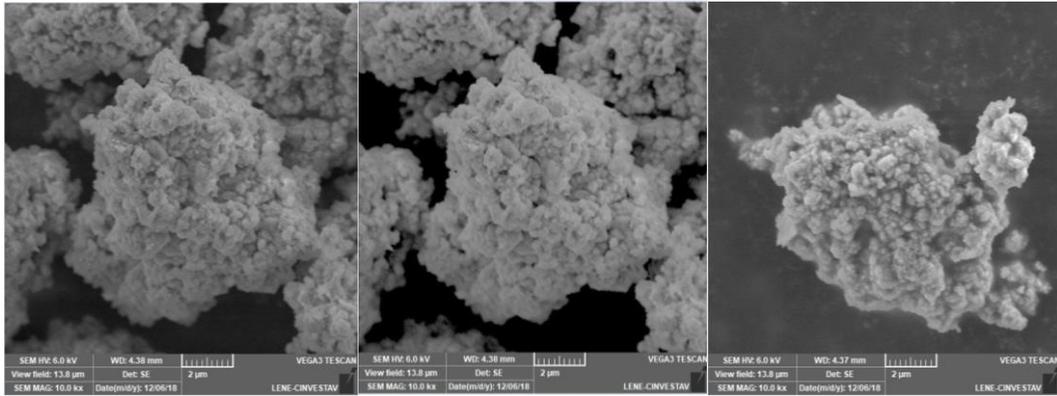


Figura 53. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de scorodita atmosférica precipitada químicamente a 92 °C filtrada en papel poro grueso.

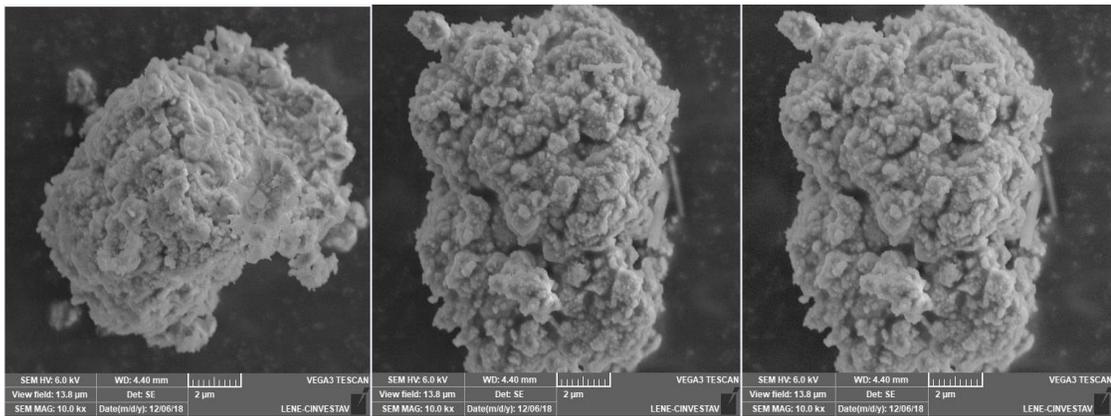


Figura 54. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de scorodita atmosférica precipitada a 92°C filtrada en papel con diámetro de 45 µm.

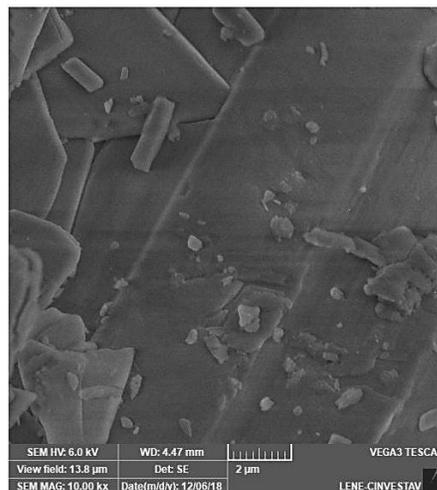


Figura 55. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de sulfato de calcio (CaSO₄.2H₂O).



7.3.5 Caracterización del la bioscorodita obtenida usando el medio de cultivo de hongos

En la Figura 56 se muestra el difractograma del sólido obtenido con la reacción 5 utilizando el medio de cultivo de *T. atroviride* (Tabla 11), en el cual se hizo un acercamiento y se pueden identificar algunos ángulos característicos de la escorodita reportada por Caetano *et al.*, 2009

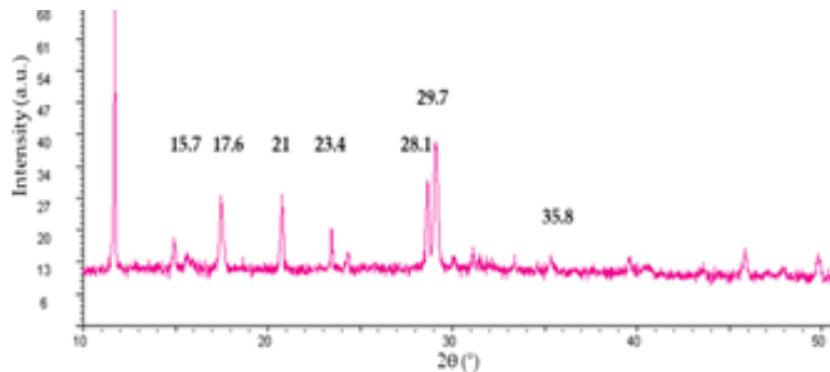


Figura 56. Difractogramas de rayos X del sólido obtenido de la reacción 5, utilizando el medio de cultivo filtrado de *T. atroviride*.

La imagen SEM del sólido de la reacción 5 (Figura 57) es más parecida a la morfología de escorodita, también descrita por González-Contreras *et al.*, 2012 quienes obtuvieron bioscorodita y afirman que la composición química, el color y la caracterización estructural de la bioscorodita es muy similar al mineral escorodita encontrado en la naturaleza.

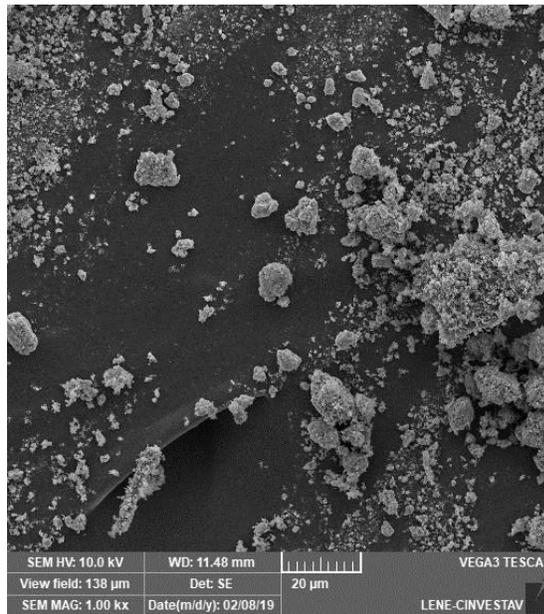


Figura 57. Imagen SEM del sólido obtenido de la reacción 5 utilizando medio de cultivo de *T. atroviride*.

En la figura 47 se muestran las imágenes de los sólidos obtenidos en las diferentes reacciones llevadas a cabo con los cuatro hongos, las cuales fueron analizadas por microscopía electrónica de barrido (Figuras 58, 59,60 y 61).

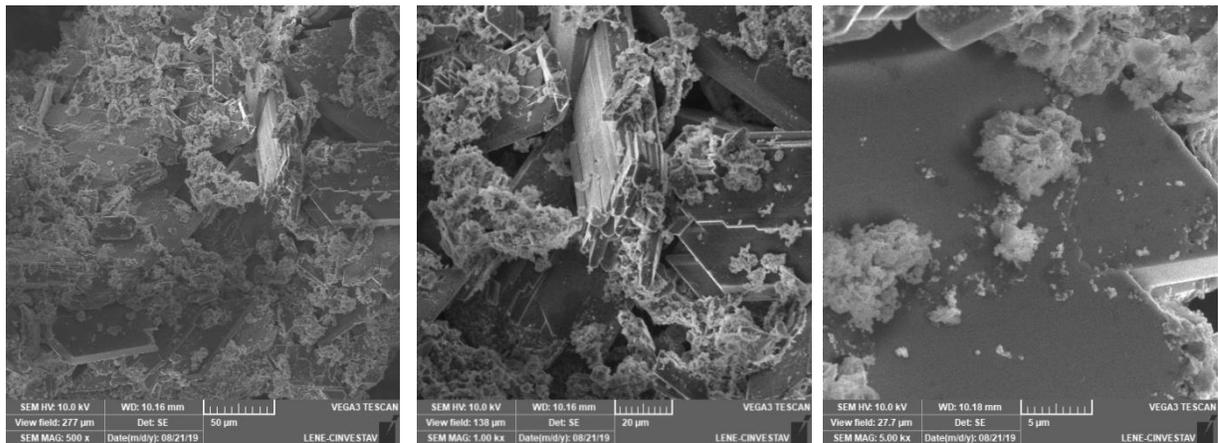


Figura 58. Microscopía electrónica de barrido de la reacción con medio de *A. niger*.

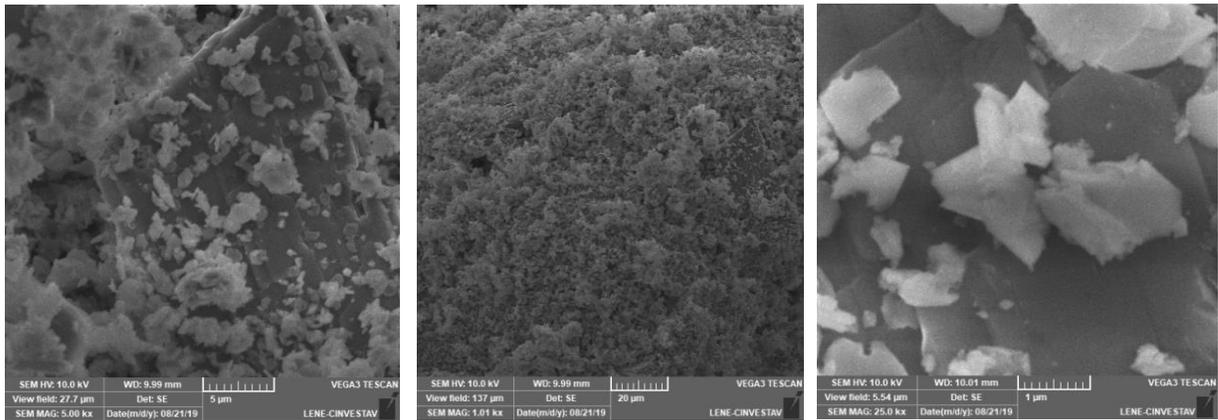


Figura 59. Microscopía electrónica de barrido de la reacción con medio de *T. atroviride*.

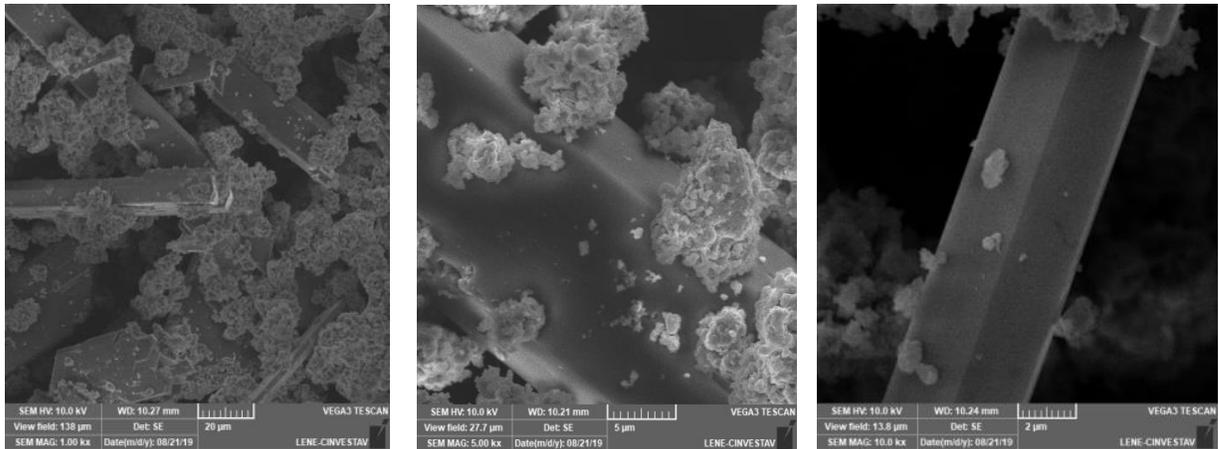


Figura 60. Microscopía electrónica de barrido de la reacción con medio de *P. chrysosporium*.

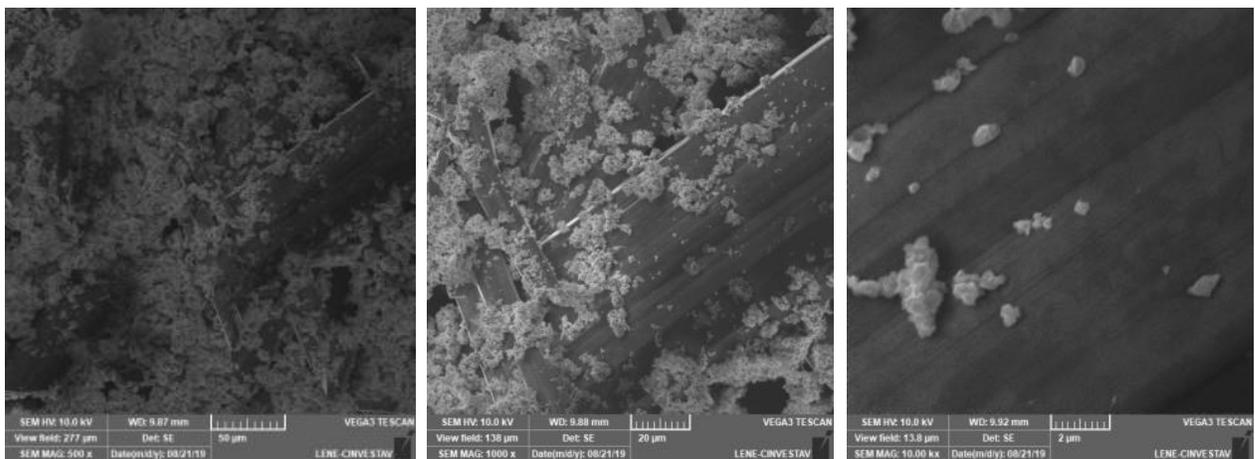


Figura 61. Microscopía electrónica de barrido de la reacción con medio de *P. placenta*.



Los sólidos obtenidos de las reacciones con el medio de cultivo de los hongos también fueron analizados por difracción de rayos X en un difractómetro Bruker D2Phaser en un rango 2θ de $10-80^\circ$ (Figuras 62, 63, 64 y 65).

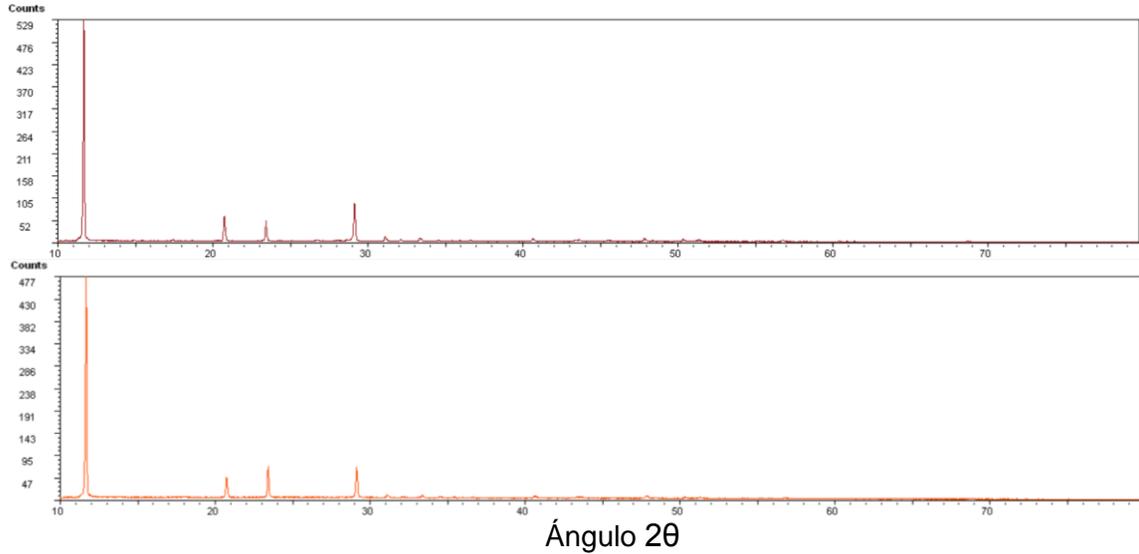


Figura 62. Difractograma de rayos X del sólido obtenido con *A. niger*.

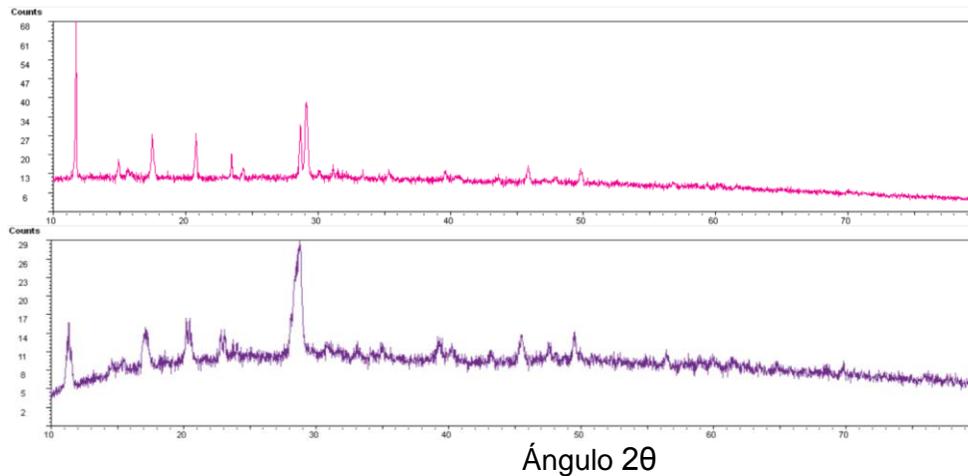


Figura 63. Difractograma de rayos X del sólido obtenido con *T. atroviride*.

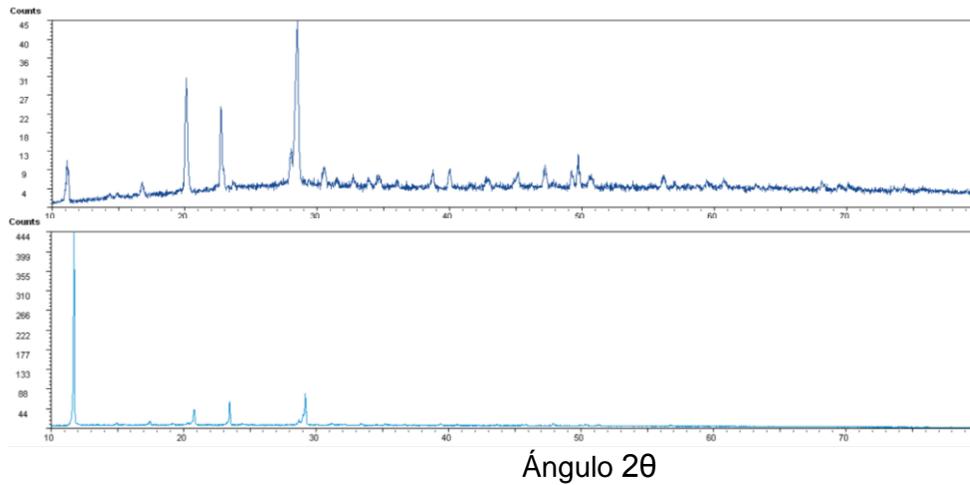


Figura 64. Difractograma de rayos X del sólido obtenido con *P. placenta*.

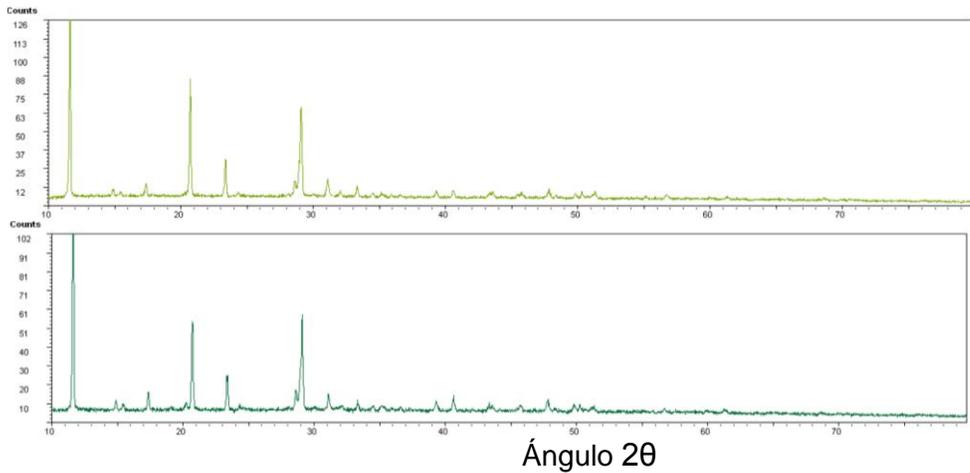


Figura 65. Difractograma de rayos X del sólido obtenido con *P. chrysosporium*.

Finalmente, se realizó el análisis de As en solución, con el objetivo de corroborar la remoción del arsénico. Para la determinación de As se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica Shimadzu 6300, encontrando una disminución en la concentración de arsénico total en dos de las soluciones analizadas, incluso en algunas reacciones aumentó la concentración, lo cual se puede deber a una pérdida en el volumen de agua por evaporación.



En las reacciones 3 y 5, se observa una disminución del metaloide, estas dos reacciones coinciden en que el sólido final es color verde pálido. En la reacción 3 que corresponde a escorodita química, se obtiene una remoción de arsénico de 95% (As residual = 142 mg/L) y en la reacción 5, donde se obtuvo la bioscorodita, la remoción fue del 73% (As residual = 445 mg/L), valor inferior a lo reportado con bacterias extremófilas de hasta 99% (González-Contreras *et al.*, 2012).

De los seis materiales sólidos obtenidos utilizando el medio de cultivo de hongos para llevar a cabo los procesos de oxidación, el obtenido en la reacción 5 utilizando *T. atroviride* (Figuras 48, 56, y 57) fue el que presentó las características de bioscorodita reportadas en la literatura en cuanto a color y el análisis por difracción de rayos X (González-Contreras *et al.*, 2012); sin embargo; la remoción de arsénico total (73 %) en el medio fue baja comparada con la obtenida con bacterias extremófilas.

No obstante lo anterior, el uso del medio de cultivo de hongos presenta ventajas respecto al uso de bacterias extremófilas para la generación de bioscorodita, como es el menor consumo de energía, debido a que el cultivo de hongos para la obtención de condiciones ácidas y oxidantes se realiza a bajas temperaturas (28 °C), a excepción de *P. chrysosporium* (39 °C), mientras que con bacterias extremófilas son requeridas temperaturas arriba de 80 °C (González-Contreras *et al.*, 2012,) para llevar a cabo la bioreacción. Adicionalmente, los hongos reducen por sí mismos el pH mediante la producción de ácidos orgánicos, en comparación con bacterias que requieren la adición de mayor cantidad de ácido inorgánico. Por lo que se concluye que la producción de bioscorodita con cultivo de hongos es una alternativa sustentable de remover este metaloide tóxico del agua.



IX. Conclusiones

- Los hongos basidiomicetos y ascomicetos estudiados presentan mayor tolerancia al As^{III} que al As^V , el cual es considerado más tóxico en los seres humanos.
- Como resultado de las pruebas de toxicidad; *P. chrysosporium* y *T. atroviride* representan alternativas de tratamiento debido a una mayor tolerancia al arsénico, así como su rápido crecimiento comparado con *P. placenta* y *A. niger*, respectivamente.
- Considerando las condiciones ácidas y oxidantes requeridas para la oxidación de As^{III} a As^V ; de los basidiomicetos, *P. placenta* presenta las condiciones más favorables y de los ascomicetos; *A. niger*.
- En el cultivo líquido de *T. atroviride* se presentó el valor más alto de potencial redox y más bajo de pH (condiciones que favorecen la oxidación de As III) utilizando lactosa como fuente carbono, sulfato ferroso como fuente de hierro y fosfato de potasio dibásico como fuente de fósforo.
- La mayor producción de H_2O_2 se obtiene con los basidiomicetos, en particular, *P. placenta* con 0.64 mg/L a los 8 días de cultivo, seguido de *P. chrysosporium* con 0.50 mg/L.
- Utilizando el medio de cultivo de *T. atroviride* se obtuvo un sólido con las características de bioscorodita, reportadas en la literatura, lo cual se comprobó por difracción de rayos X y microscopía electrónica de barrido. La remoción de As fue de 73% corroborado por espectrofotometría de absorción atómica.



IX. Recomendaciones

1. Realizar pruebas en agua de algún sitio contaminado con arsénico que permite ver el efecto de la composición del agua en la formación del mineral.
2. Determinar la producción de ácidos orgánicos en el medio de cultivo de *T. atroviride*, realizar la identificación y cuantificación.
3. Mejorar las condiciones de formación de escorodita (Tiempo de reacción, agitación) que permita aumentar los porcentajes de remoción.
4. Realizar el análisis de especiación del arsénico en el proceso de obtención de bioscorodita.



XI. Referencias

- Abejón, R., Garea, A. (2015). A bibliometric analysis of research on arsenic in drinking water during the 1992-2012 period: An outlook to treatment alternatives for arsenic removal. *J. Water Process Engineering*. **6**: 105-119.
- Acosta-Rubí, S.M. (2011). Enzimas involucradas en la degradación del 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano (DDT) por un hongo filamentoso. Tesis de maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México, D.F., México.
- Acosta-Rubí, S., Tomasini Campocosio, A., Montes- Horcasitas, M.C., Quintanar-Vera, L., Esparza-García, F., Rodríguez-Vázquez, R. (2017) Production of a halotolerant biofilm from green coffee beans immobilized on loofah fiber (*Luffa cylindrica*) and its effect on phenanthrene degradation in seawater. *J Environ Science and Health, Part A*. Páginas
- Alarcón-Herrera, M.T., Bunduschuh, J., Nath, B., Nicolli, H.B., Gutierrez, M., Reyes-Gomez, V.M., Nuñez, D., Martín-Domínguez, I.R., Sracek, O. (2013). Co-occurrence of arsenic and fluoride in groundwater of semi-arid regions in Latin America: Genesis, mobility and remediation. *J. Hazard. Mater.* **262**:960-969.
- Armienta, M.A. y Segovia, N. (2008). Arsenic and fluoride in the groundwater of Mexico. *Environ. Geochem. Health*. **30**:345-353.
- Arreguín Cortés, F.I., Chávez Guillén, R., Soto Navarro, P.R. (2010). Una revisión de la presencia de arsénico en el agua subterránea en México. XXIV Congreso Latinoamericano de Hidráulica, Punta del Este, Uruguay, Noviembre 2010.



- ATSDR, 2007. Toxicological profile for arsenic. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. August 2007.
- Batista, B., Veronez, C., Oliveira, J., Cavalheiro, A., Alves, B., Moraes, A., Roberta, F., Übida, G., Tonani, L., Regina, M., Barbosa, F. (2016). A low-cost and environmentally-friendly potential procedure for inorganic-As remediation based on the use of fungi isolated from rice rhizosphere. *J. Environ. Chem. Eng.* **4**:891-898.
- Baldrian, P. (2003). Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme Microb. Technol.* **32**:78-91.
- Basu, A., Saha, D., Saha, R., Ghosh, T., Saha, B. (2014). A review on sources, toxicity and remediation technologies for removing arsenic from drinking water. *Res Chem Intermed.* **40**:447-485.
- Bissaro, B., Várnai, A., Rohr, AK., Eijsink, VGH. 2018. Oxidoreductases and reactive oxygen species in conversion of lignocellulosic biomass. *Microbial Mol Biol Rev.* **82** (4): e00029-18. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00029-18>.
- Bowell, R.J., Alpers, C.N., Jamieson, H.E., Nordstrom, D.K., Majzlan, J. (2014). The environmental geochemistry of arsenic –An Overview-. *Rev. Mineral. Geochem.* **79**:1-16.
- Bourbonnais, R., Paice, M. (1988). Veratryl Alcohol oxidases from the lignin-degrading basidiomycetes *Pleurotus sajor-caju*. *Biochem. J.* **255**:445-450.
- Caetano, M.L., Ciminelli, V.S.T., Rocha, S.D.F, Spitale, M.C., Caldeira, C.L (2009). Batch and continuous precipitation of scorodite from dilute industrial solutions. *Hydrometallurgy.* **95**:44-52.



- Chan-Cupul, W., Heredia-Abarca, G.P., Rodríguez-Vázquez, R. (2016). Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática ligninolítica de macromicetos del estado de Veracruz, México. *Rev. Int. Contam. Ambie.* **32**(3) 339-351.
- Cernaský, S., Kolencik, M., Sevc, J., Urík, M., Hiller, E. (2009). Fungal volatilization of trivalent and pentavalent arsenic under laboratory conditions. *Biores. Technol.* **100**:1037-1040.
- Cortés-Espinosa, D., Fernández, F.J., Ainhoa Arana, A., Rodríguez-Vázquez, R. (2006). Selection and identification of fungi isolated from sugarcane bagasse and their application for phenanthrene removal from soil, *J Environ Science and Health Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering.* **41**(3):475-486. doi:10.1080/10934520500428351.
- Dávila-Vázquez, G., Vázquez-Duhalt, R. (2006). Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. Mensaje Bioquímico, Vol. XXX. Depto. Bioquímica, Fac Medicina, UNAM. México. ISSN-0188-137X.
- Díaz-Báez, M.C., Bulus-Rossini, G.D., Pica-Granados, Y. (2004). Métodos estadísticos para el análisis de resultados de toxicidad. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Gabriela Castillo (Ed.), IMTA, México, IDRC, Canadá. ISBN: 968-5536-33-3. Pp. 99-112.
- DOF, 2000. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Diario Oficial de la Federación, 22 de Noviembre de 2000.



- DOF, 2022. Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-2021, Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de la calidad del agua. Diario Oficial de la Federación, 5 de Mayo de 2022.
- Glenn, J.K., Gold, M.H. (1983). Decoloration of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:1741-1747.
- González-Contreras, P., Weijma, J., Buisman, C.J.N., (2009). Arsenic immobilization by biological scorodite crystallization: effect of high ferric concentration and foreign seeds. *Adv. Mater. Res.* 629-632.
- González-Contreras, P., Weijma, J., Van del Weijden R., Buisman, C.J.N. (2010). Biogenic scorodite crystallization by *Acidianus sulfidivorans* for arsenic removal. *Environ. Sci. Technol.* **44**:675-680.
- González-Contreras, P., Weijma, J., Buisman C.J.N., (2012). Continuous bioscorodite crystallization in CSTRs for arsenic removal and disposal. *Water Res.* **46**:5883-5892.
- Highley, T (1987). Effect of carbohydrate and nitrogen on hydrogen peroxide formation by wood decay fungi in solid medium. *FEMS Microbiol. Lett.* **48**:373-377.
- Hughes, M. F. (2002). Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol. Lett.* **133**:1-16.
- Jadhav, S., Bringas, E., Yadav, G., Rathod, V., Ortiz, I., Marathe, K. (2015). Arsenic and fluoride contaminated groundwaters: A Review of current technologies for contaminants removal. *J. Environ. Manage.* **162**:306-325.



- Jaiswal, V., Saxena, S., Kaur, I., Dubey, P., Nand, S., Naseem, M., Singh, S., Kumar, P., Kanta, S. (2018). Application of four novel fungal strains to remove arsenic from contaminated water in batch and column modes. *J. Hazard. Mater.* **356**:98-107.
- Kapoor, A., Viraraghavan, T. (1995). Fungal Biosorption- An alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: A review. *Biores. Technol.* **53**: 195-206.
- Klassen, N.V., Marchington, D., McGowan, H.C.E. 1994. H₂O₂ determination by the I₃- method and by KMnO₄ titration. *Anal. Chem.* **66**:2921-2925.
- Kowalski, K. (2014). Advanced Arsenic Removal Technologies Review. Advanced Environmental Purification Processes of Water. Fundamentals and Applications. Chapter 8, Elsevier. Pp.319-337.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* **31**:426-428.
- Mohd, S., Singh Kushwaha, A., Shukla, J., Mandrah, K., Shankar, J., Arjaria, N., Narain Saxena, P., Khare, P., Narayan, R., Dixit, S., Haris Siddiqui, M., Tuteja, N., Das, M., Kumar Roy, S., Kumar, M. (2019). Fungal mediated biotransformation reduces toxicity of arsenic to soil dwelling microorganism and plant, *Ecotoxicol Environ Safety.* **176**:30, 108-118. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.03.053.
- Montgomery, D.C. (2007). Diseño y análisis de experimentos. 2^a ed. Limusa Wiley, México. ISBN-13:978-968-18-6156-6. Pp. 303-350.
- Murugesan, G.S., Sathishkumar, M., Swaminathan, K. (2006). Arsenic removal from groundwater by pretreated waste tea fungal biomass. *Biores. Technol.* **97**:483-487.



- Nordstrom, D.K. (2002). Worldwide Occurrences of Arsenic in Ground Water. *Science*. **296**:2143-2145.
- Okibe, N., Morishita, S., Tanaka, M., Sasaki, K., Hirajima, T., Hatano, K., Ohata, A. (2017). Bioscorodite crystallization using *Acidianus brierleyi*: Effects caused by Cu(II) present in As(III)-bearing copper refinery wastewaters. *Hydrometallurgy*. **168**:121-126.
- Park, S., Kim, SH., Chung, H., An, J., Nam, K. (2022). Effect of organic substrate and Fe oxides transformation on the mobility of arsenic by biotic reductive dissolution under repetitive redox conditions, *Chemosphere*. **305**: 135431. doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.135431.
- Li, G., Qi, X., Shi, J., Yan, G., Wang, H., Zhang, A. (2022). Removal of arsenic from smelting wastewater using Fe₃O₄ as an in situ Fe source: the effect of pre-dissolution and the evolution process of scorodite. *Environmental Science, Water Research Technol.* **8**(11): 2796-2806.
- Li, Z., Bai, T., Dai, L., Wang, F., Tao, J., Meng, S., Hu, Y., Wang, S., Hu, S. (2016). A study of organic acid production in contrasts between two phosphate solubilizing fungi: *Penicillium oxalicum* and *Aspergillus niger*. *Sci. Rep.* **6**:25313. doi.org/10.1038/srep25313.
- Lira-Pérez, J., Rodríguez- Vázquez, R. (2022). Removal of orange G dye by *Aspergillus niger* and its effect on organic acid production, *Preparative Biochem. Biotechnol.* doi: 10.1080/10826068.2022.2153368.
- Litter, M.I., Farías, S.S., Morgada, M.E (2009). Capítulo 1. Formas arsenicales en agua y suelos. Iberoarsen, Metodologías analíticas para la determinación y



especiación de arsénico en aguas y suelos. Editado por CYTED. Argentina, Octubre 2009. ISBN: 978-84-96023-71-0. Pp. 19-27.

- Quintero, D., Feijoo, C., Lema, R. (2006). Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. **13** (2):61-67.
- Rangel Montoya, Edelweiss Airam, Montañez Hernández, Lilia E., Luévanos Escareño, Miriam P., & Balagurusamy, Nagamani. (2015). Impacto del arsénico en el ambiente y su transformación por microorganismos. *Terra Latinoamericana*, **33**(2), 103-118.
- Ratnaike, R. N. (2003). Acute and chronic arsenic toxicity. *Postgrad Med J*. **79**:391-396.
- Ritschkoff, A., Rättö, M., Buchert, J., Viikari, L. (1995). Effect of carbon source on the production of oxalic acid and hydrogen peroxide by brown-rot fungus *Poria placenta*. *J. Biotechnol.* **40**:179-186.
- Riveros, P.A., Dutrizac, J.E., Spencer, P., 2001. Arsenic disposal practices in the metallurgical industry. *Can. Metall. Q.* **40**:395-420.
- Say, R., Denizli, A., Arica, Y. (2001). Biosorption of cadmium (II), lead(II) and copper(II) with the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biores. Technol.* **76**: 67-70.
- Sharma, V. K., Sohn, M. (2009). Aquatic arsenic: Toxicity, speciation, transformations, and remediation. *Environment international*. **35**:743-759.
- Singh, H., Mycoremediation, Fungal bioremediation. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey. ISBN-13:978-0-471-75501-2. Pp. 16-18.



- Singh, S., Yadav, R., Sharma, S., Narain Singh, A. (2023). Arsenic contamination in the food chain: A threat to food security and human health, *J Appl Biol Biotechnol*, 1-10, doi:10.7324/JABB.2023.69922.
- Singhania, S., Wang, Q., Filippou, D., 2005. Temperature and seeding effects on the precipitation of scorodite from sulfate solutions under atmospheric pressure conditions. *Metall. Mater. Trans. B.* **36**: 327-333.
- Sivakumar, R., Rajendran, R., Balakumar, C., Tamilvendan, M. (2010). Isolation, screening and optimization of production medium for thermostable laccase production from *Ganoderma sp.* *Int. J. Eng. Sci. Technol.* **2**(10):7133-7141.
- Smedley, P.L., Kinniburgh, D.G. (2002). A review of the source, behavior and distribution of arsenica in natural water. *Appl. Geochem.* **17**:517-568.
- Srivastava, P. K., Vaish, A., Dwivedi, S., Chakrabarty, D., Singh, N., Tripathi, R.D. (2011). Biological removal or arsenic pollution by soil fungi. *Sci. Total Environ.* **409**:2430-2442.
- Su, S., Zeng, X., Bai, L., Li, L., Duan, R. (2011). Arsenic biotransformation by arsenic-resistant fungi *Trichoderma asperellum* SM-12F1, *Penicillium janthinellum* SM-12F4, and *Fusarium oxysporum* CZ-8F1. *Sci. Total. Environ.* **409**:5057-5062.
- Taboada, M.E., Hernández, P., Flores, E., Graber, T., 2008. Cristalización de sales de arsénico. *Rev. Soc. Quím. Perú.* **74**(4): 343-349.
- Tarr, M.A. (2003). Capítulo 4 Fenton and Modified Fenton Methods for Pollutant Degradation. En *Chemical degradation methods for wastes and pollutants. Environmental and Industrial Applications*. Edited by Matthew A. Tarr.



- Tobin, J., White, C., Gadd, F. (1994). Metal accumulation by fungi: applications in environmental biotechnology. *J. Ind. Microbiol.* **13**:126-130.
- Tripathi, P., Singh, P., Mishra, A., Srivastava, S, Chauhan, R., Awasthi, S., Mishra, S., Dwivedi, S., Tripathi, P., Kalra, A., Tripathi, R., Nautiyal, C. (2017). Arsenic tolerant *Trichoderma sp.* reduces arsenic induced stress in chickpea (*Cicer arietinum*). *Environ. Pollut.* **223**:137-145.
- Tsai, S. L., Singh, S., Chen., W. (2009). Arsenic metabolism by microbes in nature and the impact on arsenic remediation. *Curr.Opin. Biotechnol.* **20**: 659-667.
- Vega, S. (2001). Riesgo sanitario ambiental por la presencia de arsénico y fluoruros en los acuíferos de México. Comisión Nacional del Agua. Gerencia de Saneamiento y Calidad del Agua. México, D.F.
- Wang, P., Sun, G., Jia, Y., Meharg, A., Zhu, Y. (2014). A review on completing arsenic biogeochemical cycle: Microbial volatilization of arsines in environment. *J. Environ. Sci.* **26**:371-381.
- Wang, X., Zhang, L. (2018). Kinetic study of hydroxyl radical formation in a continuous hydroxyl generation system, *RSC Adv* **8**, 40632-40638.doi:10.1039/C8RA08511K.
- WHO, 2011. Guidelines for Drinking-water Quality. Fourth Edition. World Health Organization. ISBN: 978 92 4 154815 1.Geneva, Switzerland. Pp.315-318.
- Wong, C.M., Wong, K.H., Chen, X.D. (2008). Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Appl. Microbial. Biotechnol.* **78**:927-938.



Wunder, T., Kremer, S., Sterner, O., Anke, H. (1994). Metabolism of the polycyclic aromatic hydrocarbon pyrene by *Aspergillus niger* SK 9317. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 636-641.1

**ANEXO A.** Análisis Probit para la determinación de la Concentración Media Efectiva (CME₅₀)Probit Analysis on dosis (As^{III}, *Trichoderma atroviride*, 3 días)

Probability	dosis	95% Fiducial Limits	
0.01	4.59401	3.66044	5.55735
0.02	5.94600	4.85773	7.04662
0.03	7.00335	5.81199	8.19385
0.04	7.92095	6.65064	9.17958
0.05	8.75532	7.42055	10.06924
0.06	9.53440	8.14501	10.89500
0.07	10.27433	8.83754	11.67541
0.08	10.98545	9.50681	12.42233
0.09	11.67483	10.15877	13.14383
0.10	12.34758	10.79773	13.84576
0.15	15.57114	13.88961	17.18654
0.20	18.72337	16.94689	20.43190
0.25	21.93167	20.07582	23.72987
0.30	25.27873	23.34302	27.18015
0.35	28.83462	26.80212	30.87110
0.40	32.67026	30.50516	34.89538
0.45	36.86623	34.51075	39.35973
0.50	41.52149	38.89265	44.39415
0.55	46.76460	43.75054	50.16451
0.60	52.77076	49.22468	56.89346
0.65	59.79043	55.51869	64.89723
0.70	68.20099	62.94004	74.65358
0.75	78.60936	71.98054	86.93661
0.80	92.07927	83.49475	103.11660
0.85	110.71988	99.16039	125.94176
0.90	139.62529	122.98268	162.14119
0.91	147.67110	129.53053	172.36584
0.92	156.93805	137.03324	184.21404
0.93	167.80021	145.77819	198.19384
0.94	180.82259	156.19763	215.07668
0.95	196.91269	168.98246	236.10878
0.96	217.65500	185.33237	263.48080
0.97	246.17285	207.59642	301.54597
0.98	289.94872	241.35452	360.84151
0.99	375.27853	305.97342	478.96313

Probit Analysis on dosis (As^V , *Trichoderma atroviride*)

Probability	dosis	95% Fiducial Limits	
0.01	4.12788	3.40050	4.87046
0.02	5.12172	4.29841	5.94978
0.03	5.87297	4.98675	6.75637
0.04	6.50990	5.57583	7.43505
0.05	7.07860	6.10557	8.03759
0.06	7.60162	6.59559	8.58920
0.07	8.09192	7.05720	9.10431
0.08	8.55769	7.49756	9.59207
0.09	9.00454	7.92160	10.05867
0.10	9.43645	8.33282	10.50855
0.15	11.45651	10.27112	12.60059
0.20	13.36615	12.12113	14.56521
0.25	15.25622	13.96350	16.50276
0.30	17.18029	15.84571	18.47280
0.35	19.17919	17.80364	20.52149
0.40	21.29058	19.86978	22.69229
0.45	23.55436	22.07784	25.03229
0.50	26.01712	24.46658	27.59742
0.55	28.73738	27.08420	30.45861
0.60	31.79296	29.99488	33.71047
0.65	35.29297	33.28928	37.48532
0.70	39.39925	37.10310	41.97865
0.75	44.36816	41.65266	47.49959
0.80	50.64215	47.31171	54.58264
0.85	59.08350	54.80623	64.27541
0.90	71.73147	65.84061	79.07788
0.91	75.17217	68.80960	83.15365
0.92	79.09731	72.18181	87.82604
0.93	83.65020	76.07500	93.27432
0.94	89.04553	80.66502	99.76808
0.95	95.62497	86.23070	107.73815
0.96	103.97870	93.25169	117.93247
0.97	115.25517	102.65668	131.81507
0.98	132.16079	116.62021	152.86231
0.99	163.98001	142.53267	193.13300

Probit Analysis on dosis (As^{III}, *Phanerochaete chysosporium*, 2 días)

Probability	dosis	95% Fiducial Limits	
0.01	79.99519	.	.
0.02	82.16953	.	.
0.03	83.57962	.	.
0.04	84.65630	.	.
0.05	85.54231	.	.
0.06	86.30376	.	.
0.07	86.97697	.	.
0.08	87.58420	.	.
0.09	88.14014	.	.
0.10	88.65500	.	.
0.15	90.81885	.	.
0.20	92.57621	.	.
0.25	94.11095	.	.
0.30	95.51087	.	.
0.35	96.82668	.	.
0.40	98.09201	.	.
0.45	99.33197	.	.
0.50	100.56758	.	.
0.55	101.81855	.	.
0.60	103.10562	.	.
0.65	104.45301	.	.
0.70	105.89201	.	.
0.75	107.46717	.	.
0.80	109.24878	.	.
0.85	111.36276	.	.
0.90	114.08086	.	.
0.91	114.74724	.	.
0.92	115.47559	.	.
0.93	116.28179	.	.
0.94	117.18885	.	.
0.95	118.23199	.	.
0.96	119.46941	.	.
0.97	121.00843	.	.
0.98	123.08502	.	.
0.99	126.43057	.	.

Probit Analysis on dosis (As^v, *Phanerochaete chrysosporium*, 2 días)

Probability	dosis	95% Fiducial Limits	
0.01	10.97559	9.22929	12.68918
0.02	13.50569	11.58931	15.35936
0.03	15.40548	13.38732	17.34209
0.04	17.00879	14.91905	19.00370
0.05	18.43525	16.29128	20.47465
0.06	19.74325	17.55636	21.81837
0.07	20.96626	18.74439	23.07111
0.08	22.12547	19.87447	24.25579
0.09	23.23527	20.95960	25.38799
0.10	24.30600	22.00909	26.47884
0.15	29.29007	26.91722	31.54783
0.20	33.97051	31.53883	36.31595
0.25	38.57766	36.07485	41.04105
0.30	43.24516	40.63618	45.87991
0.35	48.07296	45.30210	50.95492
0.40	53.15150	50.14377	56.37886
0.45	58.57513	55.23717	62.26882
0.50	64.45282	60.67270	68.75864
0.55	70.92031	66.56455	76.01444
0.60	78.15709	73.06365	84.25712
0.65	86.41379	80.37883	93.79833
0.70	96.06084	88.81524	105.10378
0.75	107.68322	98.84970	118.91671
0.80	122.28743	111.29490	136.52835
0.85	141.82851	127.71546	160.47158
0.90	170.91118	151.76138	196.77904
0.91	178.78706	158.20493	206.73307
0.92	187.75499	165.51036	218.12485
0.93	198.13579	173.92728	231.38428
0.94	210.40942	183.82781	247.15719
0.95	225.33825	195.80074	266.47425
0.96	244.23648	210.85652	291.12186
0.97	269.65508	230.94598	324.59039
0.98	307.58635	260.62023	375.14783
0.99	378.49126	315.26336	471.37421

Probit Analysis on dosis (As^V , *Aspergillus niger*, 3 días)

Probability	dosis	95% Fiducial Limits	
0.01	5.17722	4.43052	5.89977
0.02	6.04777	5.25377	6.80762
0.03	6.67453	5.85306	7.45562
0.04	7.18847	6.34806	7.98401
0.05	7.63557	6.78105	8.44177
0.06	8.03797	7.17246	8.85242
0.07	8.40820	7.53390	9.22923
0.08	8.75415	7.87270	9.58054
0.09	9.08112	8.19379	9.91193
0.10	9.39288	8.50067	10.22740
0.15	10.80171	9.89499	11.64801
0.20	12.07063	11.15873	12.92323
0.25	13.27740	12.36451	14.13512
0.30	14.46361	13.55082	15.32808
0.35	15.65721	14.74305	16.53269
0.40	16.88077	15.96109	17.77443
0.45	18.15551	17.22303	19.07805
0.50	19.50399	18.54765	20.47052
0.55	20.95263	19.95667	21.98386
0.60	22.53486	21.47768	23.65867
0.65	24.29588	23.14839	25.54960
0.70	26.30088	25.02385	27.73501
0.75	28.65061	27.18982	30.33566
0.80	31.51500	29.79112	33.55547
0.85	35.21719	33.10236	37.78416
0.90	40.49938	37.75025	43.92359
0.91	41.88975	38.96142	45.55731
0.92	43.45434	40.31904	47.40368
0.93	45.24223	41.86397	49.52332
0.94	47.32612	43.65660	52.00631
0.95	49.82022	45.79152	54.99464
0.96	52.91890	48.42921	58.73091
0.97	56.99368	51.87515	63.68102
0.98	62.90022	56.82939	70.92451
0.99	73.47682	65.59697	84.07415

Probit Analysis on dosis (As^{III} , *Postia placenta*, 3 días)

Probability	dosis	95% Fiducial Limits	
0.01	1.05667	0.55137	1.71410
0.02	1.69350	0.95879	2.58763
0.03	2.28429	1.36158	3.36136
0.04	2.86102	1.77231	4.09327
0.05	3.43597	2.19586	4.80543
0.06	4.01550	2.63485	5.50918
0.07	4.60353	3.09101	6.21134
0.08	5.20276	3.56564	6.91647
0.09	5.81519	4.05984	7.62791
0.10	6.44247	4.57457	8.34824
0.15	9.84571	7.48692	12.14876
0.20	13.79237	11.04312	16.41662
0.25	18.41747	15.35565	21.33468
0.30	23.87892	20.53974	27.13528
0.35	30.37571	26.70222	34.15304
0.40	38.16788	33.94084	42.87208
0.45	47.60445	42.38897	53.94759
0.50	59.16651	52.29969	68.22458
0.55	73.53672	64.11014	86.84171
0.60	91.71785	78.49147	111.47061
0.65	115.24588	96.45497	144.73666
0.70	146.60110	119.58934	191.01090
0.75	190.07366	150.56993	258.09963
0.80	253.81254	194.34581	361.35112
0.85	355.55343	261.38201	535.51203
0.90	543.37440	379.07688	879.44316
0.91	601.98779	414.63448	991.51674
0.92	672.85022	457.03174	1130
0.93	760.43241	508.64526	1304
0.94	871.79053	573.17803	1530
0.95	1019	656.78905	1837
0.96	1224	770.67596	2277
0.97	1532	938.00829	2966
0.98	2067	1218	4214
0.99	3313	1837	7332

Probit Analysis on dosis (As^V, *Postia placenta*, 3 días)

Probability	dosis	95% Fiducial Limits	
0.01	0.08543	0.00843	0.32528
0.02	0.17011	0.02161	0.56027
0.03	0.26334	0.03927	0.79120
0.04	0.36584	0.06154	1.02585
0.05	0.47799	0.08867	1.26727
0.06	0.60015	0.12099	1.51713
0.07	0.73270	0.15889	1.77654
0.08	0.87605	0.20279	2.04633
0.09	1.03063	0.25314	2.32724
0.10	1.19692	0.31047	2.61990
0.15	2.22347	0.72236	4.28107
0.20	3.63745	1.41177	6.33161
0.25	5.54867	2.50536	8.86914
0.30	8.10739	4.18638	12.02429
0.35	11.52106	6.72006	15.98162
0.40	16.08074	10.48709	21.01935
0.45	22.20315	16.01336	27.60113
0.50	30.50014	23.93423	36.62136
0.55	41.89760	34.73269	50.04494
0.60	57.84925	48.49325	71.87075
0.65	80.74417	65.84593	108.63879
0.70	114.74207	88.90396	171.66795
0.75	167.65422	121.54136	284.46777
0.80	255.74469	171.08071	502.37612
0.85	418.38160	253.80410	978.82102
0.90	777.21101	415.60242	2273
0.91	902.61485	468.02901	2786
0.92	1062	532.45177	3477
0.93	1270	613.50625	4436
0.94	1550	718.62297	5824
0.95	1946	860.56224	7945
0.96	2543	1063	11445
0.97	3533	1379	17928
0.98	5468	1948	32567
0.99	10889	3357	83468



ANEXO B. Análisis estadístico del diseño factorial fraccionados 2^{3-1}

Análisis de varianza usando SAS 9.0

```

The SAS System           12:23 Thursday, July 27, 2018   1
Obs   Glu   Fe   P     Bio     pH     Eh     H202
  1   -1   -1   1     2.9250   2.48   288.5   0.5681
  2   -1   -1   1     2.9675   2.56   285.5   0.3690
  3   -1   -1   1     2.8175   2.56   285.1   0.2511
  4   -1   -1   1     2.8525   2.55   285.5   0.4218
  5    1   -1  -1     3.2475   2.32   310.5   0.5518
  6    1   -1  -1     4.3325   2.31   312.9   0.6900
  7    1   -1  -1     3.1650   2.29   314.2   0.4909
  8    1   -1  -1     3.1475   2.42   268.3   0.7225
  9   -1   1   -1     4.3350   2.20   325.4   0.2877
 10   -1   1   -1     4.3675   2.18   327.5   0.5924
 11   -1   1   -1     4.4050   2.15   321.5   0.9744
 12   -1   1   -1     3.6225   2.20   324.6   0.3283
 13    1   1   1     3.4500   2.41   297.5   0.3446
 14    1   1   1     3.8800   2.38   302.2   0.1577
 15    1   1   1     3.7100   2.33   302.0   0.0561
 16    1   1   1     3.2050   2.37   300.4   0.1455
    
```

```

The SAS System           12:23 Thursday, July 27, 2018   2

      The GLM Procedure

      Class Level Information

      Class          Levels  Values
      Glu              2    -1  1
      Fe                2    -1  1
      P                 2    -1  1

      Number of Observations Read      16
      Number of Observations Used      16
    
```



The SAS System 12:23 Thursday, July 27, 2018 3

The GLM Procedure

Dependent Variable: Bio

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	3.35491562	1.11830521	7.95	0.0035
Error	12	1.68790312	0.14065859		
Corrected Total	15	5.04281875			

R-Square Coeff Var Root MSE Bio Mean
 0.665286 10.63391 0.375045 3.526875

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Glu	1	0.00150156	0.00150156	0.01	0.9194
Fe	1	1.90440000	1.90440000	13.54	0.0032
P	1	1.44901406	1.44901406	10.30	0.0075

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Glu	1	0.00150156	0.00150156	0.01	0.9194
Fe	1	1.90440000	1.90440000	13.54	0.0032
P	1	1.44901406	1.44901406	10.30	0.0075

Dependent Variable: pH

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	0.25501875	0.08500625	52.24	<.0001
Error	12	0.01952500	0.00162708		
Connected Total	15	0.27454375			

R-Square Coeff Var Root MSE pH Mean
 0.928882 1.711466 0.040337 2.356875

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Glu	1	0.00015625	0.00015625	0.10	0.7620
Fe	1	0.10080625	0.10080625	61.96	<.0001
P	1	0.15405625	0.15405625	94.68	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Glu	1	0.00015625	0.00015625	0.10	0.7620
Fe	1	0.10080625	0.10080625	61.96	<.0001
P	1	0.15405625	0.15405625	94.68	<.0001



Dependent Variable: Eh

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	3060.935000	1020.311667	8.08	0.0033
Error	12	1514.675000	126.222917		
Corrected Total	15	4575.610000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Eh Mean
0.668968	3.705136	11.23490	303.2250

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Glu	1	79.210000	79.210000	0.63	0.4436
Fe	1	1417.522500	1417.522500	11.23	0.0058
P	1	1564.202500	1564.202500	12.39	0.0042

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Glu	1	79.210000	79.210000	0.63	0.4436
Fe	1	1417.522500	1417.522500	11.23	0.0058
P	1	1564.202500	1564.202500	12.39	0.0042

Dependent Variable: H2O2

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	0.44949242	0.14983081	4.16	0.0310
Error	12	0.43226905	0.03602242		
Corrected Total	15	0.88176147			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	H2O2 Mean
0.509766	43.68204	0.189796	0.434494

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Glu	1	0.02509848	0.02509848	0.70	0.4202
Fe	1	0.08680389	0.08680389	2.41	0.1465
P	1	0.33759005	0.33759005	9.37	0.0099

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Glu	1	0.02509848	0.02509848	0.70	0.4202
Fe	1	0.08680389	0.08680389	2.41	0.1465
P	1	0.33759005	0.33759005	9.37	0.0099



Modelo de regresión

The SAS System 22:47 Wednesday, August 19, 2018 11

The REG Procedure
Model: MODEL1
Dependent Variable: BioNumber of Observations Read 16
Number of Observations Used 16

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	3.35492	1.11831	7.95	0.0035
Error	12	1.68790	0.14066		
Corrected Total	15	5.04282			

Root MSE	0.37504	R-Square	0.6653
Dependent Mean	3.52688	Adj R-Sq	0.5816
Coeff Var	10.63391		

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	3.52688	0.09376	37.62	<.0001
C	1	-0.00969	0.09376	-0.10	0.9194
Fe	1	0.34500	0.09376	3.68	0.0032
P	1	-0.30094	0.09376	-3.21	0.0075



The SAS System 22:47 Wednesday, August 19, 2018 12

The REG Procedure
Model: MODEL1
Dependent Variable: pH

Number of Observations Read 16
Number of Observations Used 16

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	0.25502	0.08501	52.24	<.0001
Error	12	0.01953	0.00163		
Corrected Total	15	0.27454			

Root MSE 0.04034 R-Square 0.9289
Dependent Mean 2.35688 Adj R-Sq 0.9111
Coeff Var 1.71147

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	2.35688	0.01008	233.72	<.0001
C	1	-0.00312	0.01008	-0.31	0.7620
Fe	1	-0.07938	0.01008	-7.87	<.0001
P	1	0.09812	0.01008	9.73	<.0001



The SAS System 22:47 Wednesday, August 19, 2018 13

The REG Procedure
Model: MODEL1
Dependent Variable: Eh

Number of Observations Read 16
Number of Observations Used 16

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	3060.93500	1020.31167	8.08	0.0033
Error	12	1514.67500	126.22292		
Corrected Total	15	4575.61000			

Root MSE 11.23490 R-Square 0.6690
Dependent Mean 303.22500 Adj R-Sq 0.5862
Coeff Var 3.70514

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	303.22500	2.80872	107.96	<.0001
C	1	-2.22500	2.80872	-0.79	0.4436
Fe	1	9.41250	2.80872	3.35	0.0058
P	1	-9.88750	2.80872	-3.52	0.0042



The SAS System 22:47 Wednesday, August 19, 2018 14

The REG Procedure
Model: MODEL1
Dependent Variable: H2O2

Number of Observations Read 16
Number of Observations Used 16

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	0.44949	0.14983	4.16	0.0310
Error	12	0.43227	0.03602		
Corrected Total	15	0.88176			

Root MSE 0.18980 R-Square 0.5098
Dependent Mean 0.43449 Adj R-Sq 0.3872
Coeff Var 43.68204

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	0.43449	0.04745	9.16	<.0001
C	1	-0.03961	0.04745	-0.83	0.4202
Fe	1	-0.07366	0.04745	-1.55	0.1465
P	1	-0.14526	0.04745		



Anexo C. Artículo publicado



Article

Bioscorodite Production from As(III) and Fe(II) Salts under Oxidizing and Acidic Conditions of *Trichoderma atroviride* Culture

Jesús Adriana Ramírez-Castillo ^{1,2}, Refugio Rodríguez-Vázquez ^{1,*}, Ricardo Aguilar-López ¹ and José Roberto Zúñiga-Silva ³

¹ Biotechnology and Bioengineering Department, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (CINVESTAV-IPN), Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, AP 14-740, Col. Zacatenco, Mexico City 07360, Mexico; adriana.ramirez@cinvestav.mx (J.A.R.-C.)

² Subdirection of Health Risks, CENAPRED, Secretary of Security and Citizen Protection, Coyoacán, Mexico City 04360, Mexico

³ Faculty of Biological Sciences, Meritourius Autonomous University of Puebla, Puebla City 74570, Mexico

* Correspondence: rrodri@cinvestav.mx; Tel.: +52-55-57473316

Abstract: Arsenic (As) contamination of groundwater is widespread and significantly affects drinking water, posing a threat to public health due to its classification as a human carcinogen. Arsenic (As) can be removed from contaminated water using sustainable technologies (e.g., biotechnological processes). The process of removing Arsenic from water through reactions with iron under acidic and oxidizing conditions in a fungal broth has been proposed alongside the production of bioscorodite (FeAsO₄·2H₂O) crystals by *Trichoderma atroviride* culture. This ascomycete was selected based on tests with three other fungi (*Aspergillus niger*, and the basidiomycetes, *Postia placenta*, and *Phanerochaete chrysosporium*) because it decreased the pH to 2.2, raised the redox potential (Eh) to 207 mV, and was the quickest to produce 0.39 µg/L of H₂O₂ in a modified Wunder medium. The Eh was further increased to 324.80 mV under improved fungal culture conditions, selected using a 2³⁻¹ fractional factorial design (FFD). The fungal broth was then used for bioscorodite production by adding Fe(III)/As(III) salts and scorodite seeds at 92 °C for 21 h. Scorodite seeds and bioscorodite were characterized by X-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscopy (SEM). Arsenic was determined in solution by atomic absorption spectrophotometry (AAS), and a 73% reduction in the initial As concentration (0.30 g/100 mL) was observed after bioscorodite production. Bioscorodite production under appropriate fungal culture conditions could be an option for sustainable As removal from water. The production of H₂O₂ by the fungus resulted in the oxidation of As(III) into As(V) and acidification of the culture broth, which created the necessary conditions for the production of bioscorodite without the need for chemical acids or oxidants. This approach is environmentally friendly and cost effective, making it a promising alternative for the treatment of arsenic-contaminated water.

Keywords: bioscorodite; *T. atroviride*; arsenic; iron; mycoremediation



Citation: Ramírez-Castillo, J.A.; Rodríguez-Vázquez, R.; Aguilar-López, R.; Zúñiga-Silva, J.R. Bioscorodite Production from As(III) and Fe(II) Salts under Oxidizing and Acidic Conditions of *Trichoderma atroviride* Culture. *Water* **2023**, *15*, 1905. <https://doi.org/10.3390/w15101905>

Academic Editor: Eftimia A. Kaprara

Received: 9 March 2023

Revised: 10 April 2023

Accepted: 19 April 2023

Published: 17 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Arsenic (As) is a metalloid that is widely distributed in the environment due to natural processes and anthropogenic activities. It is classified as a human carcinogen [1] and constitutes a threat to public health. In natural waters, As is generally found as a dissolved species, having formed arsenic species. Its predominant oxidation states are the As(III) and As(V), and less frequently As(0) and As(-III). As(V) is more commonly found, as arsenic acid (H₃AsO₄) is the major species found in water, whereas under reducing conditions, As(III) is found [2]. The redox potential (Eh) and pH fundamentally control the oxidation state and mobility of As. Among the various chemical forms, As(V) exists as arsenic acid (H₃AsO₄) and its corresponding dissociation products (H₂AsO₄⁻, HAsO₄²⁻, and AsO₄³⁻),



Anexo D. Capítulo de libro

Chapter 4 Mycoremediation Through Redox Mechanisms of Organic Pollutants



Refugio Rodríguez-Vázquez, Edgar N. Tec-Caamal, Juana Lira-Pérez,
Ricardo Aguilar-López, and Adriana de J. Ramírez-Castillo

Contents

4.1 Introduction.....	95
4.2 Fungi for Remediation Purposes.....	96
4.3 Fenton Reaction for Toxins Oxidation with Fungi.....	99
4.4 Remediation of Contaminated Water with Benzene and MTBE Using Fungi Associated with Green Coffee Beans: The Role of Reactive Species.....	100
4.4.1 Contaminated Water with Benzene and MTBE: Fungi for Remediation.....	104
4.5 Dyeing Pollution and Dye Biosorption to Active Fungal Biomass.....	110
4.5.1 Biosorption Optimization of VBD in Fungal Biomass and the Role of Hydrogen Peroxide in Decolorization of Water.....	111
4.6 Conclusions.....	112
References.....	113

4.1 Introduction

Nowadays, environmental pollution has become a global concern; however, due to population growth, there is an increased demand for products and services, which translates into greater production of basic products by industries. This results in an increase in pollutants generated by anthropogenic causes, which are released into the environment and cause damage to ecosystems. Because toxins in the environment endanger human health, physicochemical and biological procedures have been developed as an attempt to mitigate the pollution. Biological methods seem to

R. Rodríguez-Vázquez (✉) · E. N. Tec-Caamal · J. Lira-Pérez · R. Aguilar-López
Department of Biotechnology and Bioengineering, CINVESTAV, Instituto Politécnico
Nacional, México City, México
e-mail: rrodrig@cinvestav.mx

A. d. J. Ramírez-Castillo
National Center for Disaster Prevention, Ministry of Interior, México City, México

© The Editor(s) (if applicable) and The Author(s), under exclusive license to
Springer Nature Switzerland AG 2021
R. Prasad et al. (eds.), *Mycoremediation and Environmental Sustainability*,
Fungal Biology, https://doi.org/10.1007/978-3-030-54422-5_4

95



Anexo E. Artículo por ser enviado

Effect of oxygenation with micro-nanobubbles on the culture parameters of *Trichoderma atroviride* for bioscorodite production

A. G. Morales-Mendoza¹, R. Rodríguez-Vázquez^{2*}, A.K.I. Flores-Trujillo³, J.A. Ramírez-Castillo^{2,3} and S. Gallardo-Hernández⁴

¹Doctorate Program in Nanosciences and Nanotechnology at CINVESTAV-IPN

²Department of Biotechnology and Bioengineering, CINVESTAV-IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional, No. 3508, 07360, Mexico.

³Subdirectorato de Health Riks, CENAPRED, Ministry of Security and Citizen Protection, 04360, Coyoacán, Mexico.

⁴Department de Physics, CINVESTAV-IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional, No. 3508, 07360, Mexico.

ABSTRACT

This study investigated the effect of oxygenation with micro-nanobubbles on the behavior of fungal culture parameters during the fungal metabolism of biogenic scorodite ($\text{FeAsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) production, aiming to address the worldwide environmental problem of arsenic contamination in drinking water. Bioscorodite was generated with *Trichoderma atroviride* broth culture amended with $\text{Fe}^{2+}/\text{As}^{3+}$ salts at 92 °C for 32 h. The fungal culture was obtained in a tubular reactor (FCTR) provided with an air diffusor for micro-nanobubbles (M-NB) production to oxygenate the *T. atroviride* culture grown in a modified Wunder medium, and in shaking flasks (FCSF) at 120 rpm, both cultures at 28 for 5 days. The *T. atroviride* metabolism cultivated in the FCTR and oxygenated with M-NB resulted in increased reduction-oxidation (RedOx) potential, which is one of the parameters that promoted bioscorodite production, in the FCTR this value (306 mV) was significantly higher ($p < 0.05$) than that in the FCSF (244 mV). However, dissolved oxygen (DO) (2.6 mg/L) and pH (2.7-3.0) at the end of the culture did not show significant differences between the two systems. Bioscorodite was characterized, and 50% residual As was determined in the liquid that did not show significant differences between systems. However the XRD, and SEM scorodite analyses show that bioscorodite produced with the FCTF presented a typical XRD pattern and morphology of scorodite, as well as the FTIR analysis, that presented the strong vibration bonding of As-O in scorodite, at 516, 510, y 509 cm^{-1} , and those for As-OH at 422-434 cm^{-1} . However, in the FCSF system, the formation of less solids, possibly to As-complexes and As adsorption to biomass, were observed. Therefore, conducting bioassays to assess toxicity will be of interest in future research.

Key words: Bioscorodite, Micro-nanobubbles, *Trichoderma atroviride*, Fe, As, RedOx.