

Evaluación de la capacidad de bioabsorción de plomo por hongos filamentosos nativos del relave minero de Ticapampa (Recuay, Ancash)

Mirella Pérez^{1,2,*}, Paola Rosas³, Gretty Villena³, Kety León¹, Marco Espinoza¹

¹ Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN), Laboratorio de Citogenética y Radiobiología, Subdirección de Seguridad Radiológica, Lima, Perú

² Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV), Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Lima, Perú

³ Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Laboratorio de Micología y Biotecnología, Lima, Perú

Resumen

Se determinó la bioabsorción de plomo en cinco biomazas fúngicas aisladas a partir del relave minero de la localidad de Ticapampa (Provincia de Recuay, Región Ancash); de las cuales se estudiaron las cepas con mayor porcentaje de sorción al plomo. El proceso de bioabsorción se evaluó usando un sistema de tubos de polietileno conteniendo, cada uno, 40 ml de solución contaminada con 200 ppm de plomo incubados a 30 °C en agitación constante a 150 rpm, utilizando 1 g/L de biomasa fúngica inactiva. La remoción del plomo fue medida por absorción atómica utilizando la técnica de flama, encontrando que las biomazas de las especies *Talaromyces muroii*, *Talaromyces flavus* y *Penicillium velutinun* (identificadas por secuenciamiento de ADN) son las más eficientes para disminuir la concentración de plomo en solución acuosa, logrando una capacidad máxima de bioabsorción de 189,7 mg/L, 82.7 mg/L y 33.8 mg/L, respectivamente a pH 6.0 en un tiempo aproximado de 48 horas de incubación. Los resultados indican que los hongos nativos, aislados de pasivos ambientales mineros, podrían ser utilizados como un material biosorbente rentable y fácilmente cultivable, para la eliminación de los iones metálicos como el caso del plomo en ambientes contaminados de metales pesados.

Palabras clave: Bioremediación, Rehabilitación emplazamiento de minas, Plomo, Hongos

Evaluation of the biosorption capacity of lead by filamentous fungi native to the Ticapampa mining tailings (Recuay, Ancash)

Abstract

Lead biosorption was determined in five fungal biomasses isolated from the mining waste from the town of Ticapampa (Recuay province, Ancash Region) of which the strains with the highest percentage of lead sorption were studied. The process of biosorption was evaluated using a system of polyethylene tubes each containing 40 ml of solution contaminated with 200 ppm lead incubated at 30 °C under constant agitation at 150 rpm using 1 g/L of inactive fungal biomass. Removal of lead was measured by atomic absorption using the technique of flame, finding that the biomass of the species *Talaromyces muroii*, *Talaromyces flavus* and *Penicillium velutinun* (identified by DNA sequencing) are the most efficient to decrease the concentration of lead in aqueous solution thus achieving a maximum of its capacity of sorption of 189.7 mg/L, 82.7 mg/L and 33.8 mg/L, pH 6.0 respectively in approximately 48 hours of incubation. The results indicate that the native fungi isolated from environmental mining liabilities could be a cost effective biosorbent and easily cultivable for the removing of metal ions such as lead as in the case of environmental contamination by heavy metals.

Keywords: Bioremediation, Mine site rehabilitation, Lead, Fungi

1. Introducción

El plomo es uno de los minerales que más ingresos económicos brindan a nuestro país, sin embargo, a pesar de los beneficios que trae esta actividad, debemos enfrentarnos a los perjuicios que causa. Muchos de los pasivos ambientales se generaron en el pasado

lejano, en una época en que para la extracción de minerales no existían leyes ni* normas ambientales que se encargaran de regular su explotación. Aún hoy en día, estos pasivos ambientales no son controlados de manera adecuada y ocasionan una constante

* Correspondencia autora: mirepefe@gmail.com

contaminación del medio físico como el agua y el suelo.

El Ministerio de Energía y Minas (MINEM) ha inventariado solo 13 de 65 cuencas en las que hay actividad minera, de modo que su actualización no es completa. Se han medido concentraciones importantes de metales pesados como fierro, cobre, zinc, plomo, cadmio, arsénico y antimonio en zonas afectadas con relaves mineros como Ticapampa [1,2].

En esta investigación se trabajó con relave minero, con el fin de extraer microorganismos de flora micota nativa de un medio contaminado por diversos metales, para aprovechar el potencial que poseen algunas de estas cepas fúngicas de remover o inmovilizar metales pesados a través de la bioabsorción, usando como bioabsorbente la pared celular de su propia biomasa viva o inactiva.

Cabe mencionar que los hongos filamentosos han sido reportados como materiales biosorbentes eficientes de diversos elementos metálicos. Según Volke-Sepúlveda y col. [3] la acumulación de metales en estos microorganismos se da como resultado del transporte activo para propósitos metabólicos y el transporte pasivo y retención de especies químicas por los constituyentes de la pared celular. Recientemente, se ha establecido el potencial de adaptación de algunos microorganismos en zonas contaminadas con metales pesados y el uso de su biomasa viva o muerta para tratar de eliminarlos de los diferentes nichos acuáticos contaminados. El objetivo de esta investigación fue investigar la capacidad de bioabsorción de plomo de las especies nativas de hongos filamentosos de un relave minero y cuáles de ellas tienen la capacidad de disminuir significativamente la concentración de plomo de un medio acuoso contaminado.

2. Metodología

2.1. Ubicación y acceso al área de estudio

El Pasivo Ambiental Minero de Ticapampa se encuentra ubicado dentro de la Cordillera Negra, distritos de Ticapampa y Aija, Región de Ancash, con altitudes entre los 4100 y 4975 m es uno de los más grandes en extensión en esta zona. Sus dimensiones son: 750 x 200 metros, con una altura máxima de

19 metros, lo que supone alrededor de 5 millones de toneladas métricas de relaves. El depósito presenta varios niveles y sectores que han sido utilizados en forma alternada desde hace más de 50 años por una empresa minera.



Figura 1. Vista frontal del depósito de relave aledaño al Río Santa, ubicado en la localidad Ticapampa, Distrito de Recuay, Departamento de Ancash.

2.2. Toma de muestra y aislamiento de flora fúngica

La toma de muestra fue realizada entre los días 16 y 17 de octubre de 2015 entre las 10:00 y 14:00 horas. Se delimitó un transecto en el perímetro del depósito de relave, de donde se escogieron 10 puntos de muestreo al azar. El peso aproximado de cada muestra fue de 200 g/200 mL, tomado de la parte superficial del relave. Para ello se emplearon frascos de polietileno nuevos. Se registró el código del punto de muestreo, origen de la fuente, descripción del punto de muestreo, hora, fecha, medida del pH (con un pH-metro marca Hanna, modelo HI98127) y la temperatura en cada punto del muestreo. Las muestras recolectadas fueron llevadas al Laboratorio de Citogenética y Radiobiología dentro de las 48 horas de realizado el muestreo. Para el aislamiento de hongos se pesó 1 g/1 mL de cada muestra. Luego, se sembró por incorporación en Agar Extracto de Malta (AEM) a pH 5 durante 72 horas.

2.3. Prueba de tolerancia al plomo de las cepas fúngicas

Se utilizó AEM contaminado con diferentes concentraciones de plomo (200 ppm, 400 ppm, 800 ppm, 1000 ppm de plomo) en forma de acetato de plomo, en las cuales se inocularon las cepas aisladas. Se dejó incubar a 30 °C durante 11 días. Se midió el diámetro

de crecimiento micelial en placa a partir de las 48 horas de incubación.



Figura 2. Izq.: Toma de muestra sólida (punto 2) del depósito de relave Ticapampa- Recuay. Der.: Toma de muestra líquida (punto 5) del depósito de relave Ticapampa (Recuay, Ancash.)

2.4. Producción de biomasa fúngica viva e inactiva

Para el aumento de biomasa fúngica se usó un inóculo de 1×10^6 esporas en 150 mL de caldo CASO, a pH 4, incubado a 30 °C con agitación de 120 rpm durante 7 días. La biomasa obtenida se separó del medio por decantación a un tubo Falcon y se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos, se realizaron 3 lavados con agua desionizada estéril. Se secó en la estufa a 70 °C durante 2 horas y luego se pesó una cantidad determinada para su evaluación. Para la obtención de biomasa inactiva, una parte de la biomasa obtenida en los matraces fue tratada en autoclave a 121 °C por 35 minutos.

2.5. Determinación del pH óptimo

Se prepararon tres matraces con 200 mL de solución de plomo a 200 ppm, ajustado a pH 4, pH 5 y pH 6, usando ácido nítrico e hidróxido de sodio. Se distribuyeron 10 mL de solución en tubos de polietileno y se añadió 1g/L de biomasa. Se colocó en una incubadora shaker orbital a 30 °C con agitación a 150 rpm durante 72 horas. Se realizó la medición de la concentración de plomo, por el método de absorción atómica, con un equipo espectrómetro de absorción atómica AA800, modelo AS-90, marca Perkin Elmer, por la técnica de flama, usando una lámpara de EDL para Pb, una energía 73 y una longitud de onda de 283.3 nm.



Figura 3. Izq.: Sistema de Incubación en agitación para sorción del plomo Der.: Espectrómetro de absorción atómica AA800 modelo AS-90 marca Perkin Elmer, técnica de flama usando una lámpara de EDL para Pb, energía 73, longitud de onda 283.3 (Laboratorio de Técnicas Analíticas Nucleares de la Dirección INDE-IPEN).

2.6. Determinación de la cinética de sorción

Para esta prueba se usó la biomasa muerta (inactiva), se preparó 650 mL de solución a 200 ppm de Pb y se distribuyó 40 mL a tubos

de polietileno, se le añadió 1 g/L de biomasa fúngica inactiva y se colocó en la incubadora shaker orbital a 30 °C en 150 rpm durante 72 horas. Posteriormente, se extrajo una alícuota en los siguientes tiempos de incubación:

Tiempo	0 horas	1 hora	2 horas	3 horas	6 horas	24 horas	48 horas	72 horas
Alícuota	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml

2.7. Identificación molecular de las cepas con mayor capacidad de sorción de plomo

2.7.1. Extracción de ADN

Se pesaron 300 µg de biomasa molida con nitrógeno líquido en microtubos de 1.5 mL. Se agregaron 700 µl de Buffer de extracción (TrisHCl pH = 7.2, 50 EDTA, SDS y 2-mercaptoetanol) a cada microtubo adicionando 2-mercaptoetanol al 1 % del volumen a trabajar al momento. Se llevó al vórtex por 2 minutos y se incubó a 65 °C por 1 hora. Luego, se agregaron a cada microtubo 600 µl de CHCl₃/alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por inversión y se centrifugó a 14000 rpm a 4 °C por 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante de cada microtubo y se trasladó a uno nuevo. Posteriormente, se adicionó a cada microtubo 0.5 volúmenes de Buffer Acetato de sodio pH=5.8, se mezcló por inversión y se refrigeró a 4 °C por 30 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos y se recuperó el sobrenadante. Se agregaron a cada microtubo 2 volúmenes de isopropanol, se mezcló por inversión y se refrigeró a -20 °C por una hora. Se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet fue lavado con 500 µl de etanol al 70 %, se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante fue descartado. El pellet obtenido se secó a temperatura ambiente y se eluyó en 20 µl de buffer (10 mM TrisHCl pH=8.2). Se colectaron todas las repeticiones de una misma muestra en un solo microtubo y finalmente, se agregaron 15 µl de RNasa (10 mg/mL) a cada microtubo y se incubó a 37 °C por 15 minutos.

2.7.1.1. Análisis cualitativo

Se realizó electroforesis horizontal en gel de agarosa con tampón de corrida TAE 1X y se agregó 1 % de una solución de bromuro de etidio 5 µg/mL en el gel. Se utilizó como marcador de peso el fago lambda digerido con *Hind III*, se cargó el pozo con 1 µl de marcador, 4 µl de agua destilada estéril y 1 µl de tampón de carga. La corrida se realizó a 90

V por 60 minutos y, posteriormente, el gel se llevó al documentador de imágenes para capturar la imagen y evaluar el tamaño de bandas.

2.7.1.2. Análisis cuantitativo

Se leyeron las absorbancias de las muestras de ADN extraídas en el dispositivo NanoDrop™ a 260, 230 y 280 nm. El grado de pureza se obtuvo de las relaciones entre las absorbancias a 260, 230 y 280 nm de cada muestra.

2.7.2. Amplificación de genes de diversidad mediante PCR

Se preparó la mezcla inicial para cada reacción de amplificación de la siguiente manera: Se utilizaron 4 µl de Buffer de PCR 1X, 2 µl de MgCl₂ 2.5 mM, 1 µl de dNTP mix, 1 µl de cebador *Forward* y *Reverse* a 0.5 µM, 0.15 µl de GoTaq 1U, 4µL de ADN a un volumen final de 20 µl. Se programó el termociclador S1000 (BioRad) utilizando los siguientes parámetros de amplificación: Desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, Desnaturalización (95 °C por 1 minuto), Alineamiento (57 °C), Extensión (72 °C) por 30 ciclos y Extensión final a 72 °C. Los cebadores utilizados para amplificación fueron obtenidos de acuerdo al trabajo de Visagiey col. 2014 [4].

2.7.3. Análisis filogenético

Los productos de amplificación fueron enviados a Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur) para secuenciación. Las secuencias obtenidas fueron leídas y editadas en BioEdit 7.2.5, estas secuencias fueron comparadas por el buscador BLASTN con la base de datos del NCBI GenBank. El análisis filogenético fue llevado a cabo con el programa MEGA 6 usando el método *neighbor-joining* con 1000 bootstraps.

3. Resultados

3.1. Aislamiento de flora fúngica tolerante al plomo

Fueron seleccionadas cinco cepas fúngicas a partir de la muestra de relave, que crecieron

favorablemente a la presencia de plomo en medio ácido, con características morfológicas diferentes.

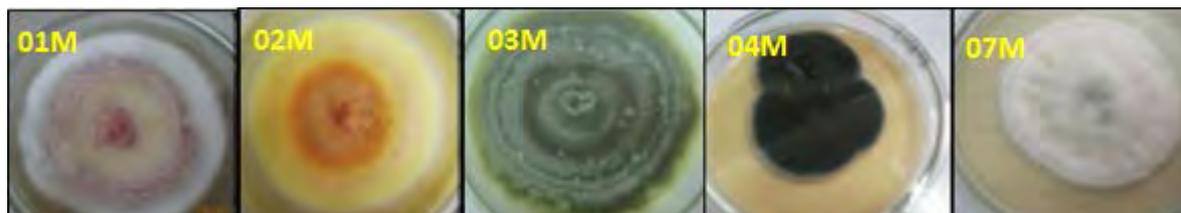


Figura 4. Cinco Cepas de hongos filamentosos aisladas a partir de relave de mina. Medio AEM pH4, 7 días. (01M, 02M, 03M 04M, 07M).

Tabla 1. Se indican los incrementos, en centímetros, de los diámetros de crecimiento durante 11 días de evaluación. Durante esos 11 días los cultivos fueron incubados a 30 °C.

	<i>Control</i>	<i>200 ppm Pb</i>	<i>400 ppm Pb</i>	<i>600 ppm Pb</i>	<i>800 ppm Pb</i>	<i>1000 ppm Pb</i>
Cepa 01M	7.8	7.6	6.9	5.7	5.4	4.7
Cepa 02M	7.5	7.3	6.8	6.0	5.2	4.7
Cepa 03M	5.75	5.6	4.85	4.55	3.75	2.4
Cepa 04M	5.8	5.2	5.3	5.3	5.1	4.2
Cepa 07M	7.7	7.2	6.1	4.9	4.3	3.0

3.2. Análisis de tolerancia al plomo mediante medición del diámetro de crecimiento en medio agarizado

En la Tabla 1 se indican los valores de crecimiento obtenidos de las mediciones del diámetro micelial en placa durante 11 días de incubación.

3.3. Determinación del pH óptimo de sorción de plomo para biomasa inactiva

El pH óptimo fue aquel en el cual hubo la mayor disminución de concentración del plomo inicial en el medio. Las cepas 01M, 02M y 04M hicieron la mayor remoción de plomo a un pH 6, seguida por la cepa 03M con mayor remoción a pH 5 mientras que el pH óptimo para la cepa 07M fue de 4.

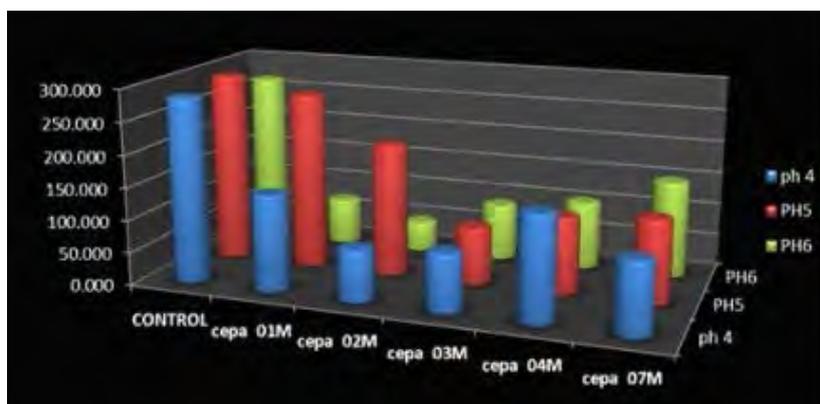


Figura 5. Capacidad de bioabsorción de biomasa muerta en función del pH de la solución según la concentración del metal. El Pb se extrajo a 30 °C y 150 rpm durante 24 h.

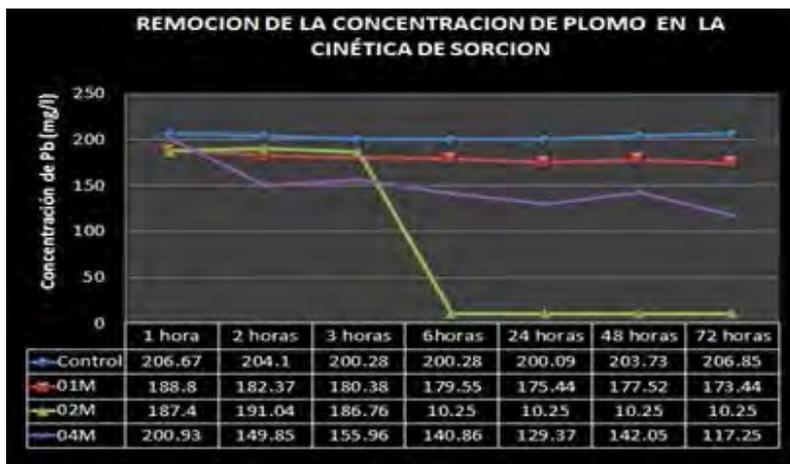


Figura 6. Capacidades de biosorción de Pb por biomasa muerta (1 g/L) de 03 cepas de hongos filamentosos con eficacia de bioabsorción de plomo.

3.4. Cinética de bioabsorción de plomo

En la Figura 2 se muestra la disminución de la concentración de plomo en el medio en un rango de 0 a 72 horas de contacto en proporción al tiempo. La mayor capacidad de biosorción corresponde a la cepa 02M, con una sorción de 190.15 mg/L de plomo a partir de las 6 horas de contacto, manteniendo la cantidad de plomo retenido hasta las 72 horas, seguido de la cepa 04M con 86.48 mg/L de plomo a partir de las 2 horas de incubación; la cepa 01M logró remover 29.33 mg/L de plomo.

3.5 Identificación molecular de las cepas con mayor capacidad de biosorción de plomo

En los cuadros siguientes se muestran los resultados obtenidos en la identificación molecular de las cepas de hongos con mayor eficacia en bioabsorción de plomo (01M, 02M y 04M), mediante comparación de las secuencias de las regiones BT2 y CMD.

A partir de las cepas que fueron identificadas a nivel de especie se construyeron Árboles Filogenéticos de cada cepa identificada.

Tabla 2. Detalles de la identificación molecular de las cepas de hongos con mayor eficacia de bioabsorción de plomo.

Código	Cebadores	Tamaño de Secuencia (bp)	Identificación NCBI	% Cobertura	% Identidad	Accesión
IPEN_001M	Bt2_f	512	<i>Talaromyces flavus</i> voucher BYD07-13 beta-tubulin gene, partial cds	100	99	KF917584.1
	Bt2_r					
	CMD5_f	601	<i>Talaromyces flavus</i> voucher BYD07-13 beta-tubulin gene, partial cds	100	99	KF917585.1
	CMD6_r					
IPEN_002M	Bt2_f	520	<i>Talaromyces muroii</i> strain CBS 756.96 beta-tubulin (tub2) gene, partial cds	100	100	KJ865727.1
	Bt2_r					
	CMD5_f	326	<i>Talaromyces muroii</i> strain CBS 756.96 calmodulin (CmdA) gene, partial cds	100	99	KJ885274.1
	CMD6_r					
IPEN_004M	Bt2_f	555	<i>Penicillium velutinum</i> strain NRRL2069 beta-tubulin gene, Partial cds	100	100	JX141170.1
	Bt2_r					

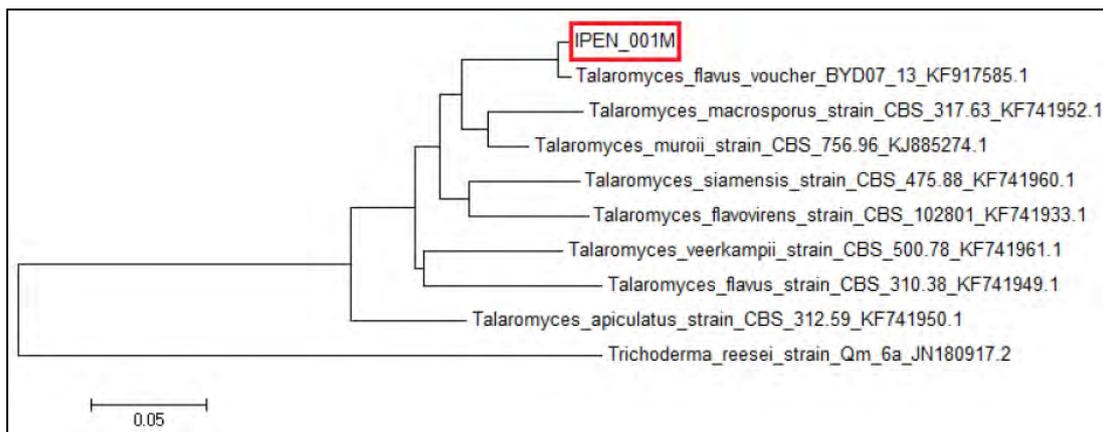


Figura 7. Árbol filogenético de la cepa IPEN_001M usando cebadores *CMD*.

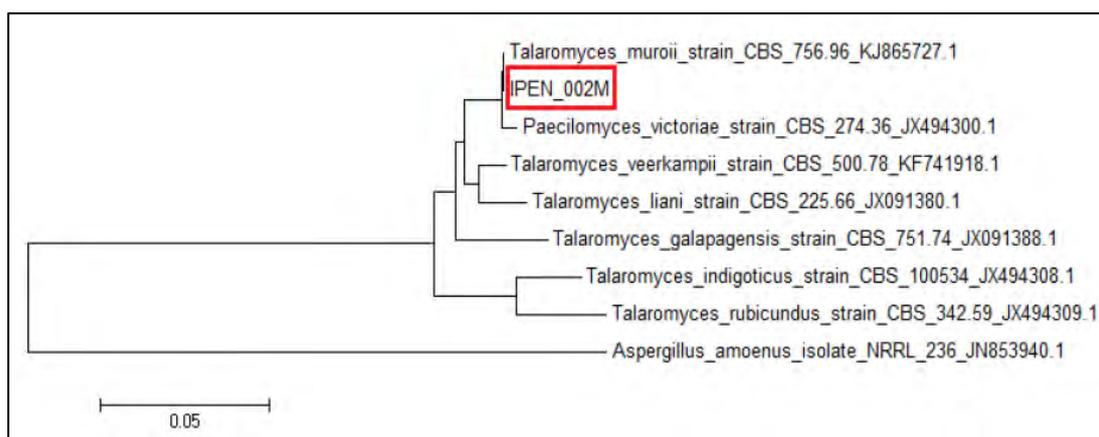


Figura 8. Árbol filogenético de la cepa IPEN_002M usando cebadores *CMD*.

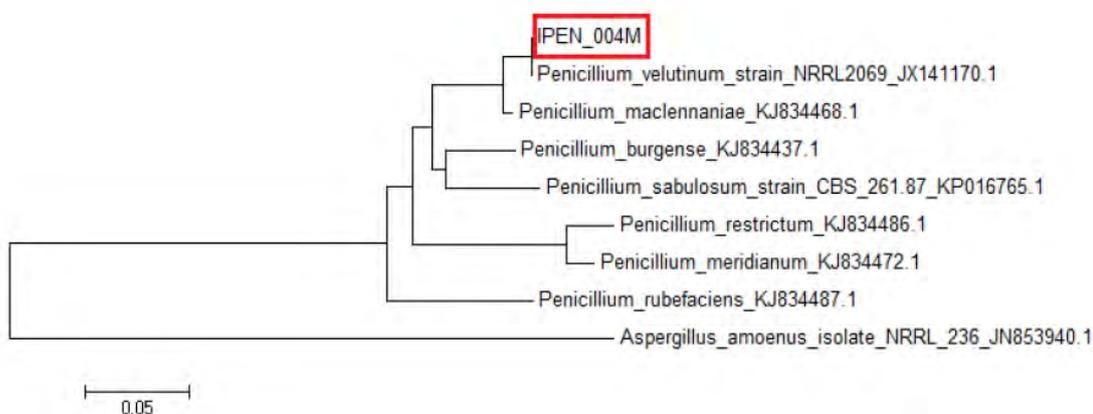


Figura 9. Árbol filogenético de la cepa IPEN_004M usando cebadores *CMD*.

4. Discusión

El número de cepas tolerantes al plomo aisladas coincide con algunos reportes de la literatura sobre aislamientos a partir de desechos mineros [5]. Las cepas evaluadas presentan crecimiento óptimo hasta 400 ppm

de plomo; a mayor concentración se observa inhibición; sin embargo, Cárdenas J. y *col.* [6] reportaron hongos filamentosos del género *Penicillium* y *Aspergillus* que pueden resistir hasta 2000 ppm de plomo. La biomasa inactiva presenta cantidades similares a la

sorción con biomasa viva. Para el proceso de bioabsorción se evaluó la biomasa inerte ya que según Ahluwalia y Goyal [7] el uso de biomasa muerta permite estimar la cantidad del metal que se acumula en la biomasa de forma pasiva (adsorción). Los valores de pH óptimo coinciden con los reportados en el trabajo realizado por Hernández, 2011 [8] en donde la mayor capacidad de biosorción en biomasa inactiva por ambas cepas se obtuvo a pH 6. Otros estudios como el de Say y col., 2001 [9] y Akar y Tunali, 2006 [10] indican que a pH cercano a 6 se alcanzan las máximas capacidades de biosorción de iones metálicos, como Cd^{2+} , Pb^{2+} y Cu^{2+} , en biomasa inactiva de algunas especies como *Phanerochaete chrysosporium* y *A. flavus*. Así mismo, Yan y Viraraghavan en 2003 [11], determinaron que la capacidad de biosorción de iones de Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} y Ni^{2+} en biomasa muerta de *Mucor rouxiense* incrementaba a pH 6.

Ahluwalia y Goyal [7] reportaron que el uso de biomasa muerta permite estimar la cantidad del metal que se acumula en la biomasa de forma pasiva (adsorción). Con el objetivo de evaluar el efecto de la biomasa inactiva en la biosorción de Pb, se determinó la capacidad de biosorción a partir de biomasa muerta o inactiva considerando el pH óptimo obtenido en análisis anterior. Si se compara la capacidad de biosorción de Pb por biomasa inactiva obtenida en este estudio con resultados publicados por Hernández, S. en 2011[8] puede decirse que las biombras de las cepas *O1M*, *O2M* y *O4M* podrían considerarse como un biosorbente efectivo para la remoción de Pb a partir de soluciones diluidas, ya que según Ahluwalia y Goyal, 2007 [7] y Wang y Cheng, 2009 [12], los valores de biosorción hallados se encuentran dentro del rango adecuado para tal propósito. Las diferencias en la bioabsorción pueden deberse a cambios no conocidos en los componentes de la pared celular de los hongos pues se han reportado diferencias en la exposición de sitios de la pared celular con afinidad por metales aún en las mismas especies [12,13].

5. Conclusiones

1. Se aislaron cinco cepas de hongos filamentosos a partir del relave de mina de Ticapampa que presentaron resistencia óptima

a 400 ppm de Pb. Estos bioabsorbentes presentan diferentes porcentajes de remoción al Pb^{+2} en solución y solo 3 de ellos pueden ser utilizados para remediar ambientes contaminados.

2. La remoción del plomo en el medio se atribuye a un proceso de bioabsorción por pared celular de la biomasa fúngica, en este caso la pared celular fúngica, dejando atrás cualquier otro tipo de mecanismo por el cual el hongo pudiera asimilar, acumular o metabolizar el plomo; entendiéndose por bioabsorción un proceso físico-químico de interacción iónica del metal pesado (plomo) con la superficie del bioabsorbente (pared celular fúngica).

3. Las cepas fúngicas *O1M*, *O2M* y *O4M* resultaron ser las más eficaces, en el tiempo, para la sorción del plomo y la disminución del mismo en las soluciones acuosas contaminadas mediante el proceso de bioabsorción por pared celular. Estas cepas fueron identificadas por tecnología molecular como *Talaromyces flavus*, *Talaromyces muroii* y *Penicillium velutinum* respectivamente, siendo la especie *Talaromyces muroii* de mayor eficacia en el proceso de bioabsorción de plomo, logrando una disminución del 94.85 % equivalente a 189.7 mg/L de plomo removido a las 6 horas de sorción a un pH 6.

4. Se concluye que la biomasa de cepas fúngicas obtenidas partir de relave minero son eficaces para disminuir concentraciones de plomo en medios contaminados por soluciones líquidas a nivel de laboratorio y constituyen un material importante para ser utilizado en la biorremediación de ambientes contaminados por plomo producto de pasivos ambientales derivados de la minería.

6. Agradecimientos

Al Laboratorio de Análisis por Activación Neutrónica, de la Dirección de Investigación y Desarrollo (INDE) del IPEN y al Laboratorio de Micología y Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) por el invaluable apoyo y asesoramiento científico que nos dieron durante el desarrollo del trabajo.

7. Referencias bibliográficas

[1] Romero AA, Flores SL, Medina R. Estudio de los metales pesados en el relave

- abandonado de Ticapampa. Rev. Inst. Inv. FIGMMG, UNMSM.2008; 11(22): 13-16.
- [2] Graza FW, Quispe R. Determinación de Pb, Cd, As en aguas del río Santa en el pasivo minero ambiental de Recuay, Ticapampa, Recuay – Ancash [Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2015.
- [3] Volke Sepúlveda T, Velasco-Trejo JA, De la Rosa-Pérez DA. Suelos contaminados por metales pesados y metaloides: Muestreo y alternativas para su remediación. México: Instituto Nacional de Ecología; 2005.
- [4] Visagie CM, Houbraeken J, Frisvad JC, Hong SB, Klaassen CHW, Perrone G, *et al.* Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. Studies in Mycology. 2014 78: 343-371.
- [5] Díaz M, Moctezuma M, Acosta I. Aislamiento de hongos resistentes a metales pesados a partir de desechos mineros y su capacidad de remoción de metales pesados y flúor en solución. Centro de Investigación y de Estudios de Posgrado. Facultad de Ciencias Químicas. UASLP. San Luis Potosí, México; 2008.
- [6] Cárdenas J, Moctezuma-Zarate M, Acosta I. Aislamiento de hongos resistentes a metales pesados a partir de agua de diferentes ríos de la Huasteca Potosina. CIEP. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de San Luis Potosí; 2010.
- [7] Ahluwalia SS, Goyal D. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. Bioresource Technology. 2007; 98(12): 2243-2257.
- [8] Hernández Velázquez S. Propuesta de un sistema de lixiviación-biosorción con hongos filamentosos para la biorremediación de matrices contaminadas con plomo [Tesis de Maestría]. México: Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química; 2011.
- [9] Say R, Denizli A, Yapup AM. Biosorption of cadmium (II), lead (II) and copper (II) with the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Bioresource Technology. 2001; 76: 67-70.
- [10] Akar T, Tunali S. Biosorption characteristics of *Aspergillus flavus* biomass for removal of Pb (II) and Cu (II) ions from an aqueous solution. Bioresource Technology. 2006; 97:1780-1787.
- [11] Yan G, Viraraghavan T. Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus *Mucorrouxii*. Water Res. 2003; 37(18): 4486-96.
- [12] Wang J, Chen C. Biosorbents for heavy metal removal and their future. Biotechnology Advances. 2009; 27: 195-226.
- [13] Fry JC, Gadd GM, Herbert RA, Jones CW, Watson-Craiki IA, eds. Microbial control of pollution. Cambridge: Cambridge University Press; 1992. p. 59–88.