

## **Evaluación del potencial de biorremoción de plomo en fotobiorreactor por *Spirulina platensis* y *Pseudomonas aeruginosa***

### **Evaluation of the bioremoval potential of lead in a photobioreactor by *Spirulina platensis* and *Pseudomonas aeruginosa***

#### ***Chulle Ramos Lucia***

Escuela de Postgrado de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Av. Juan Pablo II s/n, Ciudad Universitaria, PERÚ  
CP 13011// <https://orcid.org/0000-0003-1904-5893>

#### ***Chico Ruiz Julio***

Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Av. Juan Pablo II s/n, Ciudad Universitaria, PERÚ  
CP 13011// <https://orcid.org/0000-0002-7287-321X>

#### ***León Mendoza Luis***

Estación Experimental Agraria Tacna. Dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología, Instituto Nacional de Innovación Agraria, Av. Collpa S/N La Agronomica, distrito Coronel Gregorio Albarracín Lanchipa, Tacna, PERÚ  
[leonmendoza9@gmail.com](mailto:leonmendoza9@gmail.com) // <https://orcid.org/0000-0001-9522-4784>

## Resumen

El plomo es un metal pesado que debido a sus propiedades fisicoquímicas lo convierten en un contaminante bioacumulable, persistente y tóxico en suelo y cuerpos de agua. La biorremediación es una alternativa sustentable y ecológica para la remoción de este contaminante. Microorganismos como *Spirulina platensis* y *Pseudomonas aeruginosa*, son muy empleados por su capacidad de bioadsorber plomo, por tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar el potencial de biorremoción de plomo en fotobiorreactor por ambos microorganismos en estado libre e inmovilizado con alginato de calcio. Se emplearon tres concentraciones diferentes de 10, 20 y 30 mg/L de nitrato de plomo, con *Spirulina platensis* se empleó el medio Hoagland y con *Pseudomonas aeruginosa* caldo CASO. La prueba estadística ANOVA mostró que no existe una diferencia significativa en la concentración de clorofila "a" entre los diferentes tratamientos con *Spirulina platensis*, sin embargo, si existe una diferencia significativa el porcentaje de remoción entre ambos microorganismos, pero, la prueba de Tukey, demostró que no existe una diferencia de las medias entre los tratamientos con *Spirulina platensis*, *Pseudomonas aeruginosa* y consorcio *Spirulina* con *Pseudomonas*, por tanto, la diferencia radica en la capacidad de bioadsorción en diferentes concentraciones de nitrato de plomo. Los autores infieren que ambos microorganismos son excepcionales para la remoción de este contaminante, sin embargo, es necesario realizar más pruebas en diferentes condiciones.

**Palabras clave:** *Spirulina platensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, nitrato de plomo, biorremediación

## Abstract

Lead is a heavy metal that, due to its physicochemical properties, defines it as a bioaccumulative, persistent and toxic contaminant in soil and water bodies. Bioremediation is a sustainable and ecological alternative for the removal of this contaminant. Microorganisms such as *Spirulina platensis* and *Pseudomonas aeruginosa* are widely used for their ability to bioadsorb lead, therefore, the objective of this research was to evaluate the bioremoval potential of lead in a photobioreactor by both microorganisms in a free state and immobilized with calcium alginate. Three different concentrations of 10, 20 and 30 mg/L of lead nitrate were used, Hoagland medium was used with *Spirulina platensis* and CASO broth with *Pseudomonas aeruginosa*. The ANOVA statistical test showed that there is no significant difference in the concentration of chlorophyll "a" between the different treatments with *Spirulina platensis*, however, there is a significant difference in the percentage of elimination between both microorganisms, but, the Tukey test, It stands out that there is no difference in the media between the treatments with *Spirulina platensis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Spirulina* consortium with *Pseudomonas*, therefore, the difference lies in the bioadsorption capacity in different concentrations of lead nitrate. The authors infer that both microorganisms are exceptional for the removal of this contaminant, however, it is necessary to perform more tests under different conditions.

**Keywords:** *Spirulina platensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, lead nitrate, bioremediation

**Citación:** Chulle, L.; J. Chico & L. León. 2022. Evaluación del potencial de biorremoción de plomo en fotobiorreactor por *Spirulina platensis* y *Pseudomonas aeruginosa*. *Arnaldoa* 29(2): 267-276. doi:<http://doi.org/10.22497/arnaldoa.292.29205>

## Introducción

El plomo es un metal pesado cuyas características fisicoquímicas lo convierten en un contaminante ambiental persistente, bioacumulable y de alta toxicidad. La biorremediación surge como una alternativa

con múltiples ventajas en comparación con los tratamientos convencionales para remover estos contaminantes (Bedoya-Vélez *et al.*, 2019). La biorremediación es una tecnología sustentable para la recuperación de áreas contaminadas con

compuestos orgánicos e inorgánicos, se han estudiado diversas alternativas rentables, no invasivas, ecológicas y sustentables. Además, contribuyen a evitar la erosión de los suelos, modificar su composición química, física y biológica. Estos procedimientos hacen uso de plantas, algas y microorganismos asociados para filtrar, remover, degradar, volatilizar y estabilizar los contaminantes, siendo una alternativa efectiva para la recuperación de estos sistemas contaminados (Mendarte-Alquisira *et al.*, 2021).

Dentro de los organismos empleados se encuentran las microalgas como *Spirulina platensis* que ofrece una alternativa para remoción de los contaminantes por su facilidad de bioadsorber y biotransformación, siendo muy empleada para la eliminación de metales pesados como plomo, cadmio, cobre, níquel y zinc. Esta microalga es un excelente bioadsorbente debido a su rápido crecimiento y por su estructura funcional que contiene grupos tales como carboxilos, hidroxilos, sulfatos y otros grupos cargados que son responsables de la unión con metales pesados (Merchán, 2018).

Otros de los microorganismos empleados en los procesos de biorremediación son algunas cepas microbianas con tolerancia y/o resistencia para sobrevivir a altos niveles de toxicidad por metales como plomo, sin afectar sus crecimiento o metabolismo. Entre sus mecanismos metabólicos están, la precipitación extra e intracelular, biotransformación, adsorción por polisacáridos, unión a su pared celular o sistemas de eflujo, algunos géneros identificados con estas cualidades están las Gram positivos, *Bacillus cereus*, *Erthrobacter sp* y *Corynebacterium sp*. Los géneros Gram negativos, *Bulkholderia sp*, *Pseudomonas sp* y *Ralstonia sp*. Siendo el género *Pseudomonas*

los más persistente en desarrollarse ecosistemas de suelo y agua contaminados con metales pesados (Bedoya-Vélez *et al.*, 2019).

Por tanto, debido a que diariamente se depositan elevadas concentraciones de metales pesados, como plomo, en el ambiente, convirtiéndose en un riesgo ecológico, ambiental y sanitario para la biodiversidad, es necesario buscar diferentes alternativas para la remoción de este contaminante de forma eficaz, sustentable y ecológica; en este contexto, el objetivo de esta investigación fue evaluar el potencial de biorremoción de plomo en fotobiorreactor por *Spirulina platensis* y *Pseudomonas aeruginosa*.

## Materiales y métodos

### Selección de los medios de cultivo

Para la adsorción de plomo por *Spirulina platensis*, se realizaron ensayos con dos medios de cultivo para determinar cuál es el que se adapta a mejores condiciones. El medio Zarrouk contuvo 8 g de  $\text{NaHCO}_3$ , 5 g de NaCl, 0.2 g de urea, 2.5 g de  $\text{NaNO}_3$ , 0.5 g de  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 0.16g de  $\text{MgSO}_4$ , 0.05 g de  $\text{FeSO}_4$ , 7 0.052 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  en un 1 litro de medio, con parámetros de temperatura de 25 a 30 °C con una intensidad lumínica de entre 1500 a 3000 lux con ciclos de luz-oscuridad de 14 h luz/10 h oscuridad y un pH 5 (Merchán, 2018). El medio Hoagland contuvo 0.115 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$ , 0.003 g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.656 g  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0.08 mg de  $\text{CuSO}_4$ , 0.005 g de  $\text{Fe}_2(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6)_3$ , 0.24 g de  $\text{MgCl}_2$ , 0.3 g de  $\text{KNO}_3$  y 0.22 mg de  $\text{ZnSO}_4$  en un litro de medio, con parámetros de temperatura de  $24 \pm 2$  °C con una intensidad de  $37.5 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$  y un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad por 10 días (Ilavarasi *et al.*, 2010). La cepa de *Pseudomonas aeruginosa* se cultivó en caldo CASO por 18 horas a 37°C,

se ajustó la turbidez hasta una OD de entre 0.10 y 0.08, para posteriormente realizar la lectura por espectrofotometría a 620 nm (Justo *et al.*, 2014).

### Inmovilización celular y adición de plomo a las muestras de estudio

La inmovilización de las células de *Pseudomonas aeruginosa*, *Spirulina platensis* y consorcio de ambos se realizó por atrapamiento en matrices poliméricas de alginato de calcio, que se obtuvo por gelificación ionotrópica de la suspensión de células en alginato goteada en una solución 100 mM de cloruro de calcio (Arrieta *et al.*, 2018).

La adición de plomo se realizó en forma de nitrato de plomo ( $Pb(NO_3)_2$ ), durante la fase exponencial de *Pseudomonas aeruginosa*, *Spirulina platensis* y consorcio de ambos, en su estado libre e inmovilizado con alginato. Al cabo de 96 horas se tomaron muestras para calcular la concentración final del metal por espectrofotometría (Lee *et al.*, 2015).

### Determinación de la concentración de clorofila "a"

La clorofila "a" fue extraída con acetona mediante filtración, posteriormente se realizó una centrifugación durante 10 minutos a 20 mil rpm. El procesamiento se extracción se repitió hasta que el sobrenadante quedó incoloro. El extracto se fraccionó en una mezcla de éter de petróleo/éter dietílico [1/1 (v/v)], la acetona se eliminó por lavado con agua destilada. El extracto se concentró en rotoevaporador a una temperatura de  $-30^\circ C$ , luego fue lavado con abundante nitrógeno y se mantuvo a  $-37^\circ C$  en oscuridad. La determinación de total de clorofila "a" en extracto se determinó mediante espectrofotometría a 630 nm, 645 nm y 664 nm (Streit *et al.*, 2015).

### Remoción de plomo y factor de transferencia

Para determinar el factor de transferencia y porcentaje de remoción, se realizó un procedimiento similar al descrito por Lee *et al.* (2015). El factor de transferencia fue determinado mediante la división entre el total de metal en la planta y la concentración de metal en la solución. Para el porcentaje de remoción se empleó la siguiente ecuación:

$$\%Remoción = \frac{(C_i \times C_f)}{C_i} \times 100$$

Donde,  $C_i$  es la concentración inicial del metal en la solución y  $C_f$  es la concentración final del metal en la solución.

### Análisis estadístico

Para estimar la variabilidad asociada a la investigación, se realizó un estudio comparativo mediante el análisis de varianza unidireccional de los resultados de la concentración de clorofila "a", índice de transferencia y porcentaje de adsorción, teniendo en cuenta un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ , adicionalmente, para verificar los resultados estadísticos se realizó una prueba de Tukey, mediante Minitab 19 Statistical Software (Lee *et al.*, 2015).

## Resultados y discusión

### Medios de cultivos

Se determinó la curva de crecimiento para *Spirulina platensis*, cuya fase de adaptación fue en 24 horas aproximadamente, con una densidad  $4.10 \times 10^5$  cel/mL en medio de cultivo Zarrouk y  $4.18 \times 10^5$  en medio de cultivo Hoagland, siendo el medio Hoagland el más adecuado. Respecto a *Pseudomonas aeruginosa* se empleó caldo CASO

y se estableció la curva de crecimiento en relación de las unidades formadoras de colonias y horas, mediante lectura de espectrofotometría a 620 nm.

La mayoría de las investigaciones relacionadas a la bioadsorción de metales pesados, se realizaron a escala de laboratorio para establecer las condiciones idóneas de crecimiento y evaluar el potencial de bioadsorción. Para *Spirulina platensis* es recomendable usar el medio Zarrouk, dado a que las células de las microalgas tienen generalmente una carga neta negativa en la superficie que favorece la unión de iones metálicos a los ligando de la superficie, con un tiempo de contacto mínimo de 24 horas para luego dar paso a la medición de metales removidos por la acción de *Spirulina platensis* (Merchán, 2018). De acuerdo con Bedoya-Vélez *et al.* (2019), quienes evaluaron la toleración de plomo de *Pseudomonas spp.*, recomiendan el uso de agar cetrímide para su aislamiento debido que facilita su selección, sin embargo, Justo *et al.* (2014), recomiendan el uso de caldo CASO debido que facilita la producción de plicocina e identificación de *Pseudomonas aeruginosa*.

#### Concentración de clorofila "a"

En el día 11 de la fase exponencial, se determinó la concentración de clorofila "a" en ug/mL producida por *Spirulina platensis*, los datos obtenidos en estado libre son ligeramente mayores en las diferentes concentraciones de plomo respecto a los tratamientos inmovilizados con alginato (Tabla 1).

De acuerdo con Blaz-Aponte y Espejo (2015), los pigmentos fotosintéticos tienen una importancia desde el punto de vista ecofisiológico ya que informan sobre la productividad y eventos de estrés al que están sometidas las plantas y/o algas, el plomo

reduce la producción de clorofila "a", dificultando la absorción de los elementos esenciales como Mg y Fe, debido a la afinidad del plomo por los ligandos de proteínas, la degradación de la clorofila se debe al incremento de la actividad de la clorofilasa, ocasionando que la clorofila "b" se reconvierta en clorofila "a", adicionalmente, estos pigmentos son esenciales para el desarrollo y crecimiento reduciendo el dióxido de carbono a carbohidratos que son fundamentales para el desarrollo de la planta y/o alga.

#### Remoción de plomo y factor de transferencia

En el tratamiento con 30 mg/L de plomo, el mayor porcentaje de remoción fue para el consorcio en estado libre con 86.5%; para el tratamiento con 20 mg/L de plomo, el mayor porcentaje de remoción fue para el consorcio en estado libre con 73.1%; para el tratamiento con 10 mg/L de plomo, el mayor porcentaje de remoción fue para el consorcio con 63.3% (Tabla 1).

Con el factor de transferencia se evaluó el potencial de *Spirulina platensis* y *Pseudomonas aeruginosa*, para captar el plomo en forma de nitrato. Para *Spirulina platensis* el mayor factor de transferencia fue 4.98 en estado libre. Para *Pseudomonas aeruginosa* el mayor factor de transferencia fue 2.47 en estado inmovilizado (Tabla 1).

Los resultados obtenidos con *Spirulina platensis* son similares a los obtenidos por otros autores como Malakootian *et al.* (2016), que evaluaron la eficiencia de microalgas para adsorción de plomo en aguas residuales, en la cual determinaron que *Spirulina platensis* presentó una eficiencia del 92.13% para la absorción de 2 g/L de plomo.

Asimismo, de acuerdo con Bedoya-Vélez *et al.* (2019), que evaluaron la tolerancia al

plomo de *Pseudomonas spp.* aislada de aguas residuales, demostró que tienen la capacidad de tolerancia al plomo en concentraciones de 500 a 2000 mg/L, además, que determinaron que no existe una diferencia significativa entre las diferentes concentraciones de plomo.

### **Análisis estadístico**

La prueba estadística ANOVA mostró que no existe una diferencia significativa en la concentración de clorofila "a", asimismo, no se encontró una diferencia estadística significativa en el factor de transferencia. Sin embargo, si existe una diferencia significativa el porcentaje de remoción (Tabla 2). Por tanto, se realizó la prueba de Tukey, que demostró que no existe una diferencia de las medias entre los tratamientos con *Spirulina platensis*, *Pseudomonas aeruginosa* y consorcio *Spirulina* con *Pseudomonas* (Figura 1, Figura 2).

La adsorción de metales pesados por parte de *Spirulina platensis* se debe las siguientes variables, por la presencia de grupos carboxilos OH-COOH, el efecto del tiempo de contacto en adsorción, dosificación de adsorbente, la concentración inicial de iones metálicos necesarios (Merchán, 2018).

Entre los mecanismos reportados en la literatura de tolerancia de plomo, se destaca la biocumulación intercelular, bioadsorción y bioprecipitación, algunos estudios han reportado que la enzima ureasa influencia en la precipitación de metales pesados. La bioadsorción hace referencia a la captación pasiva de iones metálicos a través de diferentes mecanismos fisicoquímicos o metabólicos, llevados a cabo por células vivas o muertas y/o sus componentes, asimismo, ante la presencia del metal se puede generar la inducción de proteínas de unión a metales, conocidas como metalotioneínas, las cuales permiten que se dé la bioacumu-

lación de metales tóxicos dentro de la bacteria (Bedoya-Vélez *et al.*, 2019; Gabr *et al.*, 2008).

### **Conclusiones**

Se concluyó que *Spirulina platensis*, *Pseudomonas aeruginosa* y consorcio *Spirulina* con *Pseudomonas* presentan la capacidad de bioadsorción en diferentes concentraciones de 10, 20 y 30 mg/L de plomo. Respecto con *Spirulina platensis*, se demostró que no existe una diferencia en la bioadsorción de plomo determinado mediante la concentración de clorofila "a", tampoco existe una diferencia estadística significativa en el índice de transferencia de plomo en ambos microorganismos. Sin embargo, si existe una diferencia significativa entre los porcentajes de adsorción, siendo el de mayor valor el de consorcio con una concentración de plomo al 30 mg/L.

### **Agradecimientos**

Se agradece a todos los involucrados en este proyecto, por su profesionalismo y apoyo incondicional para el desarrollo de esta investigación y tiempo compartido.

### **Contribución de los autores**

C.C.R.L realizó la supervisión y diseño de los análisis fisicoquímicos. C.R.J. colaboró con la evaluación estadística. L.M.L realizó la redacción inicial y final del manuscrito.

### **Conflicto de interés**

Los autores declaran no tener conflicto de interés alguno

### **Declaración de disponibilidad de datos**

Toda la data relevante a la investigación se muestra dentro del mismo manuscrito

## Información de financiamiento

Este estudio fue financiado por los propios autores.

## Literatura citada

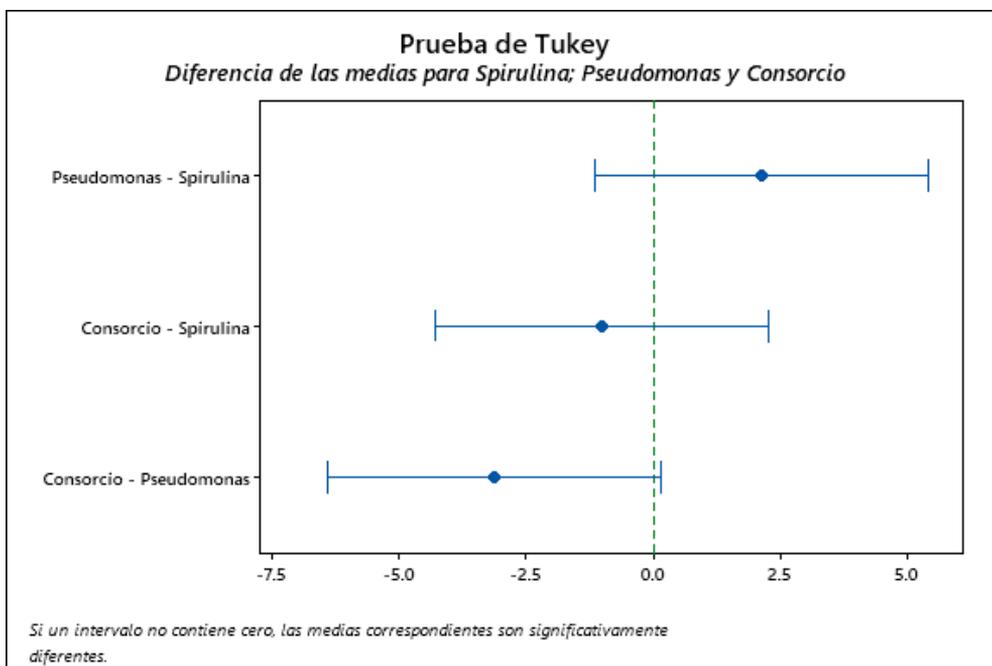
- Arrieta, A.; O. Torres & L. Rebolledo.** 2018. Decarboxilación de ácido L (+) málico por *Leuconostoc oenos* PSU1 inmovilizado en alginato de calcio. *Contribuciones Científicas y Tecnológicas*, 78(1987), 13-17.
- Bedoya-Vélez, J. M.; G. Castaño & S. Ochoa Agudelo.** 2019. Tolerancia al plomo de aislamientos nativos de *Pseudomonas* spp. de aguas residuales del Valle de Aburrá. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(1), 135-143.
- Blaz-Aponte, M. J. & M. R. Espejo.** 2015. Efecto del plomo en el crecimiento de plántulas de *Acacia macracantha* Humb. & Bonpl. ex Willd. "espino" en condiciones de laboratorio. *Sagasteguiana*, 3(1), 87-104.
- Gabr, R. M.; S.H. A. Hassan & A. A. M. Shoreit.** 2008. Biosorption of lead and nickel by living and non-living cells of *Pseudomonas aeruginosa* ASU 6a. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62(2), 195-203.
- Iavarasi, A.; D. Mubarakali; R. Praveenkumar; E. Baldev & N. Thajuddin.** 2011. Optimization of various growth media to freshwater microalgae for biomass production. *Biotechnology*, 10(6), 540-545.
- Justo, S.; T. Churasacari; C. Elías & A. Guerra.** 2014. efecto antibiótico de piocianina de *Pseudomonas aureginosa* sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. *Revista de Ciencias*, 10(1), 127-133.
- Lee, H. C.; M. Lee & W. Den.** 2015. *Spirulina maxima* for phenol removal: study on its tolerance, biodegradability and phenol-carbon assimilability. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(12), 1-11.
- Malakootian, M.; Z. Khodashenas Limoni & M. Malakootian.** 2016. The efficiency of lead biosorption from industrial wastewater by micro-alga *spirulina platensis*. *International Journal of Environmental Research*, 10(3), 357-366.
- Mendarte-Alquisira, C.; A. Alarcón & R. Ferrera-Cerrato.** 2021. Fitorremediación: Alternativa biotecnológica para recuperar suelos contaminados con DDT. Una revisión. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 24(1), 1-15.
- Merchán, L. J. G.** 2018. Uso de *Spirulina platensis* en la bioadsorción de metales pesados presentes en aguas residuales industriales. *Boletín Semillas Ambientales*, 12(1), 58-65.
- Streit, N.; L. G. R. Mérida; L. Q. Zepka; E. J. Lopes & M. I. Queiroz.** 2015. Producción de pigmentos naturales (clorofila-a) en biorrefinerías agroindustriales. *Revista Ciencia y Tecnología*, 8(2), 27-34.

**Tabla 1.** Resultado del análisis sensorial del aceite de oliva extra virgen variedad Farga en el periodo de marzo a octubre de 2021.

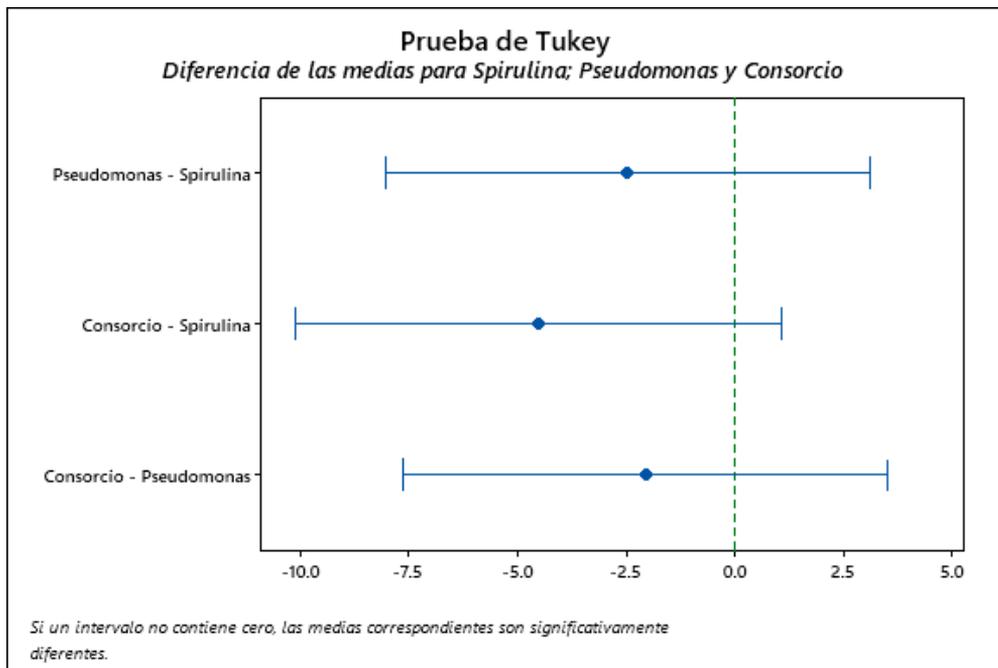
Estado	Microorganismos	C.I de plomo (mg/L)	Clorofila "a" (mg/L)	Remoción de plomo		Factor de Transferencia
				C.F de plomo (mg/L)	% Remoción	
Libre	<i>Spirulina</i>	10	13.72	4.79	52.1	1.09
		20	26.87	6.26	68.7	2.19
		30	15.53	5.02	83.3	4.98
	<i>Pseudomonas</i>	10	*	5.42	45.8	0.85
		20	*	7.83	60.9	1.55
		30	*	9.21	69.3	2.26
	Consortio	10	*	3.67	63.3	*
		20	*	5.37	73.1	*
		30	*	4.05	86.5	*
Inmóvil	<i>Spirulina</i>	10	11.31	7.61	23.9	0.31
		20	14.85	12.87	35.7	0.55
		30	16.03	10.19	66.0	1.94
	<i>Pseudomonas</i>	10	*	5.07	49.3	0.97
		20	*	9.56	52.2	1.09
		30	*	8.64	71.3	2.47
	Consortio	10	*	3.95	60.5	*
		20	*	6.64	66.8	*
		30	*	6.51	78.3	*

**Tabla 2.** Resultado del análisis sensorial del aceite de oliva extra virgen variedad Farga en el periodo de marzo a octubre de 2021.

Análisis	Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Clorofila	Factor	1	2.520	2.520	0.36	0.568
	Error	6	41.497	6.916		
	Total	7	44.017			
Transfe- rencia	Factor	1	0.2914	0.2914	0.17	0.687
	Error	10	16.9460	1.6946		
	Total	11	17.2374			
Remoción	Factor	2	28.69	14.345	2.75	0.096
	Error	15	78.21	5.214		
	Total	17	106.90			



**Fig. 1.** Prueba de Tukey de diferencia de medias para *Spirulina*, *Pseudomonas* y Consorcio en estado libre.



**Fig. 2.** Prueba de Tukey de diferencia de medias para *Spirulina*, *Pseudomonas* y Consorcio en estado inmóvil.