

## BIORREMOCIÓN DE PLOMO EN SOLUCIÓN POR FIBRAS DE *FURCRAEA ANDINA* Y BIOPELÍCULAS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Anita-Ríos<sup>1</sup>, Roque-García<sup>2</sup>, Víctor García<sup>1</sup>, Cecilia García<sup>3</sup>

Universidad Nacional de Chimborazo, Ecuador<sup>1</sup>, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo<sup>2</sup>, Pontificia Universidad Católica, Ecuador<sup>3</sup>

### R esumen

El objetivo de esta investigación fue estudiar la biorremoción de plomo en solución por fibras de *F. andina* y fibras de *F. andina* con biopelículas de *P. aeruginosa* en su superficie. Para lograr nuestro objetivo: (1) Se aislaron y diferenciaron *P. aeruginosa* de muestras de sedimentos contaminados. (2) Se extrajeron fibras naturales de *F. andina* y se caracterizaron. (3) Se crecieron biopelículas de *P. aeruginosa* en la superficie de las fibras de *F. andina*. (4) Se evaluó la cantidad más pequeña que se necesita de plomo para inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa* en estado plantónico y en biopelículas. (5) Se evaluó el potencial de remoción de plomo de fibras de *F. andina* y de *F. andina* más biopelículas. Nuestros resultados confirman que la concentración mínima de plomo (aprox. 500 mg L<sup>-1</sup>) que inhibe sustancialmente el crecimiento de *P. aeruginosa* es alrededor de 5 veces superior cuando las células de *P. aeruginosa* se encuentran formando una biopelícula, cuando se compara con la concentración mínima inhibitoria del crecimiento de células en su estado plantónico (aprox. 200 mg L<sup>-1</sup>). En los dos casos estudiados, el plomo en suspensión con una concentración inicial de 50 mg L<sup>-1</sup> fue removida en un 99,99 % en 2 horas. Sin embargo, la presencia de la biopelícula de *P. aeruginosa* aceleró el proceso de remoción, consiguiendo que alrededor del 90% de la cantidad inicial fuese adsorbida en la EPS y fibras durante la primera hora de tratamiento. La mayor tasa de remoción de Plomo en suspensión se obtuvo cuando el cociente que resulta de dividir la cantidad de fibra (expresada en gramos) entre el volumen del contenedor (expresado en mL) es aproximadamente igual a 0,15. El empleo de fibras naturales (*P. andina*) en conjunto con biopelículas de *P. aeruginosa* resultan una alternativa eficiente, simple y económica para la biorremoción de plomo en suspensión.

**Palabras claves:** adsorción, biorremoción, fibras naturales, plomo.

### A bstract

The objective of this research was to study the bioremoval of lead in solution by fibers of *F. andina* and fibers of *F. andina* with biofilms of *P. aeruginosa* on its surface. To achieve our objective: (1) *P. aeruginosa* were isolated and differentiated from contaminated sediment samples from an aquaculture plant. (2) Natural fibers were extracted from *F. andina* and characterized. (3) *P. aeruginosa* biofilms were grown on the surface of *F. andina* fibers. (4) The smallest amount of lead required to inhibit the growth of *P. aeruginosa* in planktonic state and in biofilms was evaluated. (5) The lead removal potential of fibers *F. andina* and *F. andina* plus biofilms of *P. aeruginosa* was evaluated. Our results confirm that the minimum lead concentration (about 500 mg L<sup>-1</sup>) that substantially inhibits the growth of *P. aeruginosa* is about 5 times higher when *P. aeruginosa* cells form a biofilm when compared to the minimal inhibitory concentration of the cell growth in its planktonic state (approx. 200 mg L<sup>-1</sup>). In the two cases studied, lead in suspension with an initial concentration of 50 mg L<sup>-1</sup> was removed by 99.99% in 2 hours. However, the presence of the biofilm of *P. aeruginosa* accelerated the removal process, obtaining about 90% of the initial amount adsorbed in the EPS and fibers during the first hour of the treatment. The highest removal rate of lead in suspension was obtained when the ratio resulting from dividing the amount of fiber (expressed in grams) between the volume of the container (expressed in mL) is approximately equal to 0.15. The uses of natural fibers (*P. andina*) together with biofilms of *P. aeruginosa* are an efficient, simple and economical alternative for the bioremoval of lead in suspension.

**Key words:** adsorption, bioremoval, agave, lead.

## INTRODUCCIÓN

Uno de los retos de la Tecnología Ambiental actual es el desarrollo de procesos de bioremediación de fácil acceso, desde el punto de vista técnico y económico. La biorremediación se fundamenta en el empleo de microorganismos, plantas, o las enzimas derivadas de ellos para retornar a un medio sea agua, suelo u aire que ha sido alterado por contaminantes a su condición natural. El término biorremediación usualmente comprende degradación de la naturaleza de elementos contaminante, pero este no se aplica a metales pesados ya que su naturaleza química no pueden ser degradada. Sin embargo, los metales pesados pueden ser adsorbidos o alternativamente, se puede cambiar su estado de oxidación a uno menos contaminante. Así, los metales pesados no son degradados por plantas, pero si pueden ser adsorbidos y removidos del medio que contaminan. En la biorremoción se usan microorganismos, plantas, o las enzimas derivadas de ellos para remover elementos y extraerlos del medio contaminado (1). Los metales y metaloides suponen una de las amenazas al medio ambientales de mayor relevancia en la actualidad. Se estima que la toxicidad total de estos, por el elevado volumen en que se vierten, es incluso mayor que la de los residuos radioactivos y orgánicos juntos (2). Las presencias de metales pesados en el medio ambiente tienen diversos orígenes. Principalmente actividades de minería y agricultura, y, en menor medida, procesos industriales, combustibles y aguas urbanas (3). Sin embargo, los metales más tóxicos son producidos por la industria del metal, minera y manufacturera (4). La toxicidad de esos elementos se incrementa debido a su capacidad de bioacumularse y transferirse a través de la cadena trófica. A partir de ciertas concentraciones, pueden ocasionar efectos nocivos en la salud de los humanos (problemas en el desarrollo embrionario e infantil, alteraciones en la reproducción, daños neuronales, etc.) (5). El plomo es uno de los metales pesados que suscita mayor preocupación, tanto por el volumen en que es liberado al medio ambiente, como por su toxicidad y persistencia. Según la "Environmental protection agency (EPA) de los Estado Unidos de Norte América" el nivel permisible de Pb en el agua potable es  $0,015 \text{ mg L}^{-1}$  (6). Por tanto, para tratar aguas contaminadas con plomo se requieren métodos altamente efectivos. Los mecanismos involucrados en la remoción de contaminantes son de tres tipos: físicos, químicos y biológicos. En un proceso de bioremediación pueden darse varios simultáneamente. Entre las alternativas para la remoción de metales pesados en soluciones acuosas se

pueden incluir: el intercambio iónico, la precipitación química, ósmosis inversa, procesos electroquímicos y la retención de una sustancia por otra cuando están en contacto (sorción) (5,7).

Cuando los contaminantes están dispersos en un medio como el suelo, es necesaria una etapa previa para movilizarlos. En este contexto la fitorremediación (en conjunto o no con el uso de microorganismos) es una opción de bajo coste muy interesante (8). La fitorremediación consiste en el empleo de la capacidad de ciertas plantas de acumular metales y, en algunos casos, de mineralizarlos o volatilizarse. Cuando una planta tiene una alta capacidad de acumulación de metales se la denomina hiperacumuladora. Este término puede llevar a engaño, ya que la capacidad de remoción de estas plantas es marginal si se la compara con carbones activos o biomasa bacterianas o lignocelulósicas. Por ejemplo, en el caso del plomo una remoción de tan solo  $1 \text{ mg g}^{-1}$  es necesaria para considerar a una planta como hiperacumuladora. Otro inconveniente de la fitoremediación es la gran cantidad de biomasa necesaria para la eliminación de los contaminantes y que el tiempo necesario para la remoción es normalmente de meses o años. Por sus características, las técnicas de fitoremediación son útiles cuando no existe riesgo de que los contaminantes se trasladen o filtren a superficies extensas y cuando existen niveles bajos de contaminantes.

En la \* *Tabla 1* se listan algunas ventajas y desventajas de los principales métodos de remoción de metales.

La mayoría de estos procesos tienen como inconveniente su alto costo, ya que precisan una importante inversión inicial en equipamiento y/o tienen costos operacionales altos. Los procesos que involucran adsorción del contaminante son muy prometedores

debido su versatilidad, eficacia y bajo coste. El empleo de carbón activado es muy eficiente, sin embargo, en los últimos años el interés se ha desplazado a los adsorbentes de origen vegetal (por ejemplo: fibra de coco, fibra de trigo, polvo de tabaco, piel de plátano, etc.) (9). Otra de las ventajas que destaca en los adsorbentes de origen vegetal, es lo simple que puede ser el proceso de desorción, el cual, normalmente consiste en una disminución del pH mediante adición de HCl (11).

Además, del empleo de subproductos vegetales, biomasa de origen microbioso y biopelículas "biofilm" han sido propuestos en procesos de remoción de metales (12). Las biopelículas (tapiz bacteriano) se forma cuando células plantónicas se adhieren a una superficie o sustrato, formando una comunidad, que se caracteriza por la existencia de una ma-

triz extracelular mucilaginosa y protectora, que sirve de soporte a la estructura tridimensional de la biopelícula. Esta matriz está formada entre otras cosas por exopolisacáridos o sustancias poliméricas extracelulares (EPS). Los EPS son macromoléculas de carbohidratos que son sintetizadas por enzimas bacterianas que son excretadas por las células que se acumulan extracelularmente. Por ejemplo, la eliminación de Cu, Cd y Pb por medio de biomasa inactivada de *Aspergillus niger* resultó ser más efectiva que la adsorción empleando carbón activo (F-400) (13). Los EPS actúan como un polímero orgánico y comprenden una gran variedad de moléculas orgánicas, tanto de alto peso molecular, como de moléculas pequeñas (14). La función de la matriz de EPS es la de proteger las células de entornos adversos y facilitar su supervivencia. Entre otros procesos, la matriz influye en la degradación de material particulado, adsorción de nutrientes, reducción del estado de oxidación de moléculas y adsorción de metales. En general, cuando se emplean microorganismos como adsorbentes el proceso es conocido como biosorción. Por ahora, los mecanismos exactos de biosorción de metales pesados no han sido totalmente clarificados. Lo que sí parece estar claro, es que no existe un único mecanismo,

*Adaptada de Volesky (10).*

PROCESO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
<b>Precipitación / Filtración</b>	Simplicidad	Baja efectividad
		Produce lodo
		No aplicable a bajas concentraciones
<b>Oxidación / Reducción química</b>	Permite la recuperación del metal	Requiere sustancias químicas
		No aplicable a bajas concentraciones
		Alto Coste
<b>Oxidación / Reducción biológica</b>	Bajo coste	
<b>Ósmosis inversa</b>	Permite concentrar metales	Alto coste operacional y de inmovilizado
<b>Intercambio iónico</b>	Efectividad	Alto coste
	Permite la recuperación del metal	Problemas con material particulado
<b>Adsorción</b>	Bajo coste	Baja efectividad para ciertos metales (depende del adsorbente)
	Multitud de opciones (tantas como adsorbentes)	
<b>Evaporación</b>	Simplicidad	Requiere energía
		Alto coste
		Produce lodo
<b>Fitorremediación</b>	Permite tratar suelos directamente	No aplicable a altas concentraciones
	Bajo coste	Produce gran cantidad de biomasa
	Aplicable a bajas concentraciones	Tiempos de tratamiento de meses

\* *Tabla 1. Ventajas y desventajas de los principales métodos de remoción de metales*

debido entre otras razones, a que en ambientes acuosos los metales están presentes en diferentes formas. Así, por ejemplo, pueden encontrarse disueltos o particulados, en forma iónica libre, complejados, etc.

La biosorción se distingue de la bioacumulación en que en esta segunda se producen procesos de activos de transporte. La biosorción puede ser definida como la habilidad de ciertas biomoléculas o biomasa de unirse a contaminantes. De esta manera, los procesos de biosorción pueden usar tanto biomasa vivas como inactivadas o, incluso, productos obtenidos de la biomasa (por ejemplo, EPS). El problema principal del uso de microorganismos vivos es el efecto tóxico que altas concentraciones de contaminantes puedan tener para ellos, ya que el sistema requeriría del suministro constante de nueva biomasa. La respuesta ante el elemento tóxico depende de la cepa del microorganismo en cuestión y de la aclimatación previa. Estudios recientes, han mostrado que las cepas microbianas aisladas de ambientes contaminados tienen una mayor capacidad de resistencia ante metales y son más efectivas en procesos de descontaminación (12).

Además, el empleo de biopelículas resulta interesante porque permite simultáneamente la remoción de una amplia variedad de contaminantes, incluyendo materia orgánica, nitratos, sulfatos, compuestos orgánicos, metales, entre otros (15,16). Más recientemente, Mayacela Rojas et al. (2017) han mostrado la alta capacidad de remoción de Cu, Zn, Cd y Pb en suspensión que exhiben las fibras de *P. andina*. (17).

El objetivo de esta investigación fue estudiar la biorremoción de plomo en solución por fibras de *F. andina* y fibras de *F. andina* con biopelículas de *P. aeruginosa* en su superficie.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

Para lograr nuestro objetivo: (1) Se aislaron y diferenciaron *P. aeruginosa* de muestras de sedimentos contaminados provenientes de una planta acuícola. (2) Se extrajeron fibras naturales de *F. andina* y se caracterizaron. (3) Se crecieron biopelículas de *P. aeruginosa* en la superficie de las fibras de *F. andina*. (4) Se evaluó la cantidad más pequeña que se necesita de plomo para inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa* en estado plantónico (libres en suspensión) y en biopelículas. (5) Se evaluó el potencial de remoción de plomo de fibras de *F. andina* y fibras más biopelículas de *P. aeruginosa*.

Para la obtención y aislamiento de *P. aeruginosa* se recolectó cerca de 1 kg de sedimentos de una planta acuícola (Andes ecuatorianos) en botes plásticos de polipropileno, previamente tratados con HCl 0,1 M para eliminar posibles impurezas y esterilizados a 121°C durante 15 minutos. A partir de una muestra de 1 mL de sedimentos, se realizaron diluciones hasta  $10^{-6}$  previa agitación vigorosa con agitador Vortex. *P. aeruginosa* fueron selectivamente aisladas y diferenciadas usando un agar de aislamiento de *Pseudomonas* DIFCO™ con glicerol.

Una vez aisladas fueron cultivadas a 32 °C en condiciones anóxicas (ausencia de oxígeno puro en la forma de O<sub>2</sub>) con la presencia de nitratos (NO<sub>3</sub>) como agentes de oxidación y glicerol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>) como fuente de carbono en el proceso de fermentación y fomentación del crecimiento bacteriano.

Se extrajeron fibras naturales de hojas de la planta de la especie *F. andina*. Esta fibra, nativa de la Región Andina, es de fácil obtención y su extracción origina un bajo impacto ambiental. Inicialmente se procedió al corte y recolección de hojas maduras, desfibrado manual observando que las fibras se encontraban correctamente desfibradas, lavado asegurando que existía un máximo de 2% de pulpa adherida a la fibra y secado de las fibras. Antes de su uso, las fibras se secaron en estufa a 75°C durante 24 horas y se dosificaron en términos del peso requerido. De esta manera se logrando haces de fibras exhibieron las siguientes dimensiones (valores promedios aproximadamente): el diámetro D= 0,0002m y la longitud L=0,2m; un volumen V=0,000000251m<sup>3</sup> y una superficie total S=0,000126m<sup>2</sup>, con una superficie específica S<sub>e</sub>=5005m<sup>-1</sup> (16). En la literatura se reporta que la composición de las fibras de *F. andina* es (aproximadamente) un 73% de celulosa, un 1,90% de resinas, ceras y grasas, un

11,30% de lignina y 10,50% de (18,19) pentosanos.

Se evaluó la cantidad más pequeña que se necesita de plomo para inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa* en estado plantónico (libres en suspensión) y en biopelículas: (1) Para el estudio de inhibición del crecimiento de bacterias libres en suspensión, se tomó 0,5 mL de una suspensión con concentración de bacterias conocida ( $OD_{650}=0,5$ ) y se añadió a tubos de cultivo con diferentes concentraciones de nitrato de plomo (1; 0,5; 0,2; 0,1; 0,05 g L<sup>-1</sup>) y 100 mM de NaCl. Para determinar la concentración mínima inhibitoria del crecimiento de *P. aeruginosa*, se midió la densidad óptica de la suspensión a una longitud de onda de 650 nm ( $OD_{650}$ ) una vez que han transcurrido 24 horas después de haber añadido las bacterias a los tubos de cultivo con diferentes concentraciones de nitrato de plata. (2) Para el estudio de la inhibición del crecimiento de bacterias en biopelículas, se empleó una biopelícula formada sobre agar (Culture Agar, DIFCO<sup>TM</sup>, suministrados por Fisherscientific, Hampton, New Hampshire, Estados Unidos) en placas Petri con número similar de bacterias al usado en el ensayo con células en estado plantónico (Determinado previamente). Todo la biopelícula fue retirada y suspendida en solución de NaCl (100 mM); la concentración de bacterias se determinó a través de la medida de densidad óptica. La biopelícula fue expuesta a las mismas soluciones de nitrato de plomo especificadas previamente. Una vez transcurrido 24 horas, la solución fue retirada y sustituida por otra de NaCl (100 mM). La biopelícula fue removida, la solución con la biopelícula fue homogeneizada y luego se procedió a medir su densidad óptica.

El porcentaje de inhibición del crecimiento de las bacterias, fue calculado de la siguiente manera:

$$I(\%) = \frac{DO_{t=0h} - DO_{t=24h}}{DO_{t=0h}} \cdot 100 \quad (1)$$

donde DO es la densidad óptica medida en la suspensión de bacterias a una longitud de onda de 650 nm.

Para la evaluación del potencial de remoción de plomo de fibras de *F. andina* y fibras más biopelículas de *P. aeruginosa*. Se prepararon soluciones con diferentes concentraciones de plomo, disolviendo nitrato de plomo en agua destilada (50 mg L<sup>-1</sup>). Los ensayos de biorremoción de plomo fueron realizados en tubos de cultivo de 10 mL en los que se introdujeron diferentes cantidades (expresadas en gramos) de fibras de *F. andina*. Además, se realizaron ensayos empleando cultivos de *P. aeruginosa* que fueron añadidos 24 horas antes para permitir la formación de biopelículas. Luego, la solución acuosa se sustituyó por la solución con diferentes concentraciones de Plomo. La determinación de Plomo se realizó empleando un espectrómetro de Absorción Atómica (PerkinElmer 1100, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Para la determinación de plomo las muestras previamente se centrifugaron y filtraron (0,45 micras).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 incluye los resultados obtenidos en los ensayos realizados para determinar la concentración mínima inhibitoria del crecimiento de *P. aeruginosa*. Se ensayaron soluciones con concentraciones de plomo entre 50 y 1000 mg·L<sup>-1</sup>. En el caso de *P. aeruginosa* en su estado plantónico se encontró un importante porcentaje de inhibición del crecimiento de las células incluso cuando la concentración de Plomo fue de 50·mg L<sup>-1</sup>. Los resultados sugieren que la disponibilidad de nutrientes tuvo un ligero efecto positivo aun cuando las concentraciones de Plomo fue de 50 y 100 mg·L<sup>-1</sup>. En el caso del biopelículas de *P. aeruginosa*, la biopelícula aporta un importante grado de protección a las células, así, hasta concentraciones de 200 mg·L<sup>-1</sup>, el porcentaje de inhibición registrado fue menor de un 20%. Resultados similares, que resaltan el efecto protector de la matriz de EPS que integra la biopelícula, fueron reportados por Teitzel y Parsek (20). Esto autores encontraron que la concentración de Plomo mínima inhibitoria del crecimiento de *P. aeruginosa* fue hasta dos veces mayor en células que se encontraban formando biopelículas, cuando se comparó con la concentración mínima inhibitoria del crecimiento de células en su estado plantónico. Por otro lado, para concentraciones de Plomo

de 500 y 1000 mg·L<sup>-1</sup>, prácticamente todas las bacterias experimentaron el efecto tóxico del Plomo independientemente del estado en que se encontraban. Película

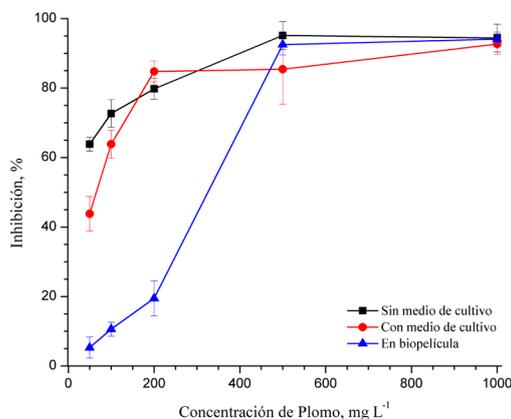


Figura 1. Valores relativos de la inhibición del crecimiento de *P. aeruginosa* en estado platóntico y formando biopelículas, en soluciones con diferentes concentraciones de Plomo.

Aunque todos los microorganismos son sensibles a los metales pesados, su desarrollo y proliferación en ambientes contaminados puede llevar a la aparición de cepas más resistentes. Las bacterias del género *P. aeruginosa* son de gran interés para los procesos de biorremediación por su alta resistencia a metales pesados y su capacidad de adaptarse a diferentes ambientes y modos nutricionales (21). La cepa de *P. aeruginosa* aislada en este estudio exhibió valores aceptables de tolerancia del plomo existente en solución a diferentes concentraciones. Estos valores de tolerancia del Plomo la hacen un candidato potencial para el diseño de procesos de bioremediación y biorremoción de Plomo. En un estudio similar, Ceylan y Ugur encontraron que las concentraciones de Plomo mínimas de inhibición del crecimiento de *P. fluorescens* y *P. putida* fueron de alrededor de 2000 y 500 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente (22).

La Figura 2 muestra la tasa de remoción de Plomo — cantidad de plomo removida por unidad de tiempo — de la solución en función del tiempo y de la cantidad de fibras de *F. andina*. En la Figura 2, se incluyen los resultados de los ensayos realizados con biopelículas de *P. aeruginosa*. La concentración inicial de 50 mg·L<sup>-1</sup> de plomo fue removida en un tiempo de 2 horas en todos los casos. La cantidad de fibra no tuvo influencia en la tasa de remoción de plomo, sugiriendo que la menor cantidad ensayada es suficiente para la remoción del plomo. La presencia de la biopelícula aceleró el proceso de remoción de plomo, consiguiendo que alrededor del 90% de la cantidad inicial fuese adsorbida en la EPS y fibras durante la primera hora de trata-

miento. En la Figura 3, se ilustra como varia la tasa de remoción de Plomo en función de la cantidad de fibra natural utilizada.

En la Figura 3 se puede observar un valor alto de la tasa de remoción de Plomo por unidad de tiempo cuando la cantidad de fibra natural utilizada fue de 1,5 g (recordemos que esta cantidad de fibra se colocó en un contenedor que tenía volumen de 10 mL). Los resultados sugieren que la tasa de remoción de Plomo es sustancialmente alta cuando el cociente que resulta de dividir la cantidad de fibra (expresada en gramos) entre el volumen del contenedor (expresado en mL) es menor o igual a 0,15.

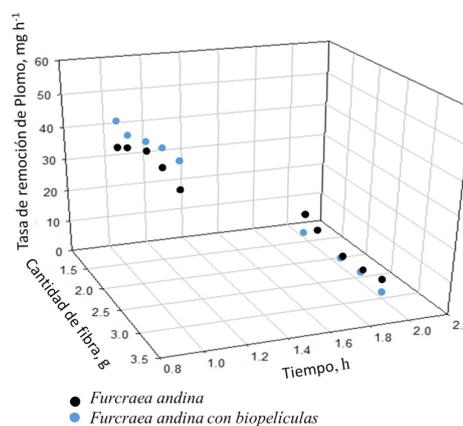
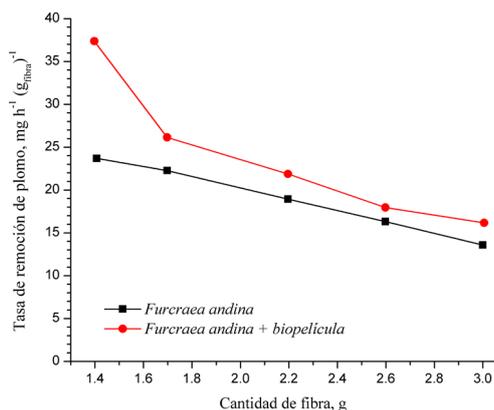


Figura 2. Tasa de remoción de Plomo en función del tiempo y de la cantidad de fibras de *F. andina* para ensayos realizados con o sin biopelícula de *P. aeruginosa*.

La capacidad de las fibras naturales para la adsorción de contaminantes está ligada a la estructura interna y a la composición. Para ser usadas en procesos de bioremediación, es muy importante la superficie específica de la fibra, es decir, la superficie por unidad de volumen de fibra utilizada, que cuanto mayor sea, mayor velocidad de adsorción de contaminantes tendrá y, que será aún mayor en el caso de emplear biopelículas, pues mayor cantidad de bacterias podrá soportar.



**Figura 3. Máxima remoción de plomo frente a la cantidad de fibra para los ensayos realizados con fibras de *F. andina* y con fibra más biopelícula de *P. aeruginosa*.**

En la remoción de metales pesados se han empleado históricamente un gran número de fibras y biomásas obtenidas de diferentes fuentes (normalmente de plantas ligno-celulósicas). La lignina es un polímero natural de estructura compleja, no soluble en agua y que presenta ramificaciones tridimensionales y numerosos grupos hidroxilos. El contenido de lignina en las fibras influye en la estructura interna y externa. Debido a la alta área superficial ( $180 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) de esta, las fibras naturales con un alto contenido en lignina son adecuadas para procesos de biorremoción. En este caso, *F. andina* con un 10% de lignina en su composición es un candidato muy adecuado para este tipo de procesos. Uno de los problemas cuando las fibras tienen un alto contenido en lignina es que esta molécula puede inhibir el crecimiento de microorganismos. Sin embargo, en un trabajo previo, la cepa aislada de *P. aeruginosa* se adhirió sin problemas a este soporte, mostrando incluso velocidades mayores de adhesión que los observados en sustratos de polietileno tereftalato (PET) u otras fibras naturales (23).

Generalmente, los resultados obtenidos en ensayos de adsorción con biomásas son muy dispares, ya que en muchas

ocasiones se emplean diferentes grados de molienda para la biomasa (aumentando la superficie específica al disminuir el tamaño de partícula y, por tanto, la velocidad de adsorción) e incluso niveles de mezcla mecánica. En el caso del presente estudio, los ensayos se realizaron en condiciones estáticas (una solución contaminada con Plomo en un contenedor) y con la fibra sin moler. Estas son condiciones que se pueden considerar muy desfavorables, aunque también, son las condiciones que más se asemejan a las de operación en procesos de biorremoción, donde el factor económico y operacional son determinantes. En particular, para la remoción de plomo se han reportado valores desde 10 hasta  $300 \text{ mg h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  (24,25). Los valores máximos obtenidos en este estudio se ubicaron alrededor de los  $40 \text{ mg h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  (Figura 3).

Cuando se emplean microorganismos vivos para la remoción de metales, los mecanismos son diversos y complejos. Sin embargo, se sabe que esta remoción ocurre en al menos dos etapas: una primera fase de biosorción, la cual es la más rápida (esta puede darse también con biomásas inactivadas) y una segunda, más lenta, dependiente del metabolismo celular (26). Aunque esta segunda etapa es responsable de un porcentaje más pequeño de remoción, el uso de biopelículas vivas presenta otras importantes ventajas que pueden redundar en un mejor sistema de biorremoción. Por ejemplo, Chang *et. al* (27), empleando biomásas de *P. aeruginosa*, encontraron casi un 40% de mejora en la remoción de plomo cuando se usaron biomásas vivas en lugar de inactivadas.

Además, el uso de microorganismos mejora la capacidad del sistema de soportar ciclos de adsorción/desorción, por lo que la vida útil del sistema de remoción aumenta considerablemente. En el caso de *P. aeruginosa* se han reportado la ejecución de hasta 4 ciclos de adsorción/desorción con solo un 20% de pérdida de capacidad de remoción del plomo (27). Como ventaja adicional, en contraste con los métodos químico-físicos, el uso de biopelículas vivas permite simplificar el proceso, ya que los microorganismos se producen *in situ* y son capaces, a la vez, de eliminar a través de su metabolismo otros contaminantes como por ejemplo materia orgánica.

Los resultados muestran el gran potencial que tiene el uso de fibras naturales de *F. andina* conjuntamente con biopelículas de *P. aeruginosa* en procesos de biorremoción de plomo en aguas contaminadas.

## CONCLUSIONES

La concentración mínima de plomo (aprox. 500 mg L<sup>-1</sup>) que inhibe sustancialmente el crecimiento de *P. aeuruginosa* es alrededor de 5 veces superior cuando la células de *P. aeuruginosa* se encuentran formando una biopelícula y cuando se compara con la concentración mínima inhibitoria del crecimiento de células en su estado plantónico (aprox. 200 mg L<sup>-1</sup>).

En los dos casos estudiado, el plomo en suspensión con una concentración inicial de 50 mg·L<sup>-1</sup> fue removida en un 99,99 % en 2 horas. Sin embargo, la presencia de la biopelícula de *P. aeuruginosa* aceleró el proceso de remoción, consiguiendo que alrededor del 90% de la cantidad inicial fuese adsorbida en la EPS y fibras durante la primera hora de tratamiento.

La mayor tasa de remoción de Plomo en suspensión se obtuvo cuando el cociente que resulta de dividir la cantidad de fibra (expresada en gramos) entre el volumen del contenedor (expresado en mL) es aproximadamente igual a 0,15.

El empleo de fibras naturales (*P. andina*) en conjunto con biopelículas de *P. aeuruginosa* resultan una alternativa eficiente, simple y económica para la biorremoción de plomo en suspensión.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a la Universidad Nacional de Chimborazo y la Secretariado de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENES-CYT) de la República del Ecuador, por el financiamiento recibido a través del programa Prometeo.

## Referencias

1. Martín, A. 1994. Biodegradation and Bioremediation. Bioremediation Technologies. Academic Pres. New York
2. Nriagu, J. O, Pacyna, J. M. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. Nature. 1988; 333(6169), 134-139.
3. Araújo, C. S, Carvalho, D. C, Rezende, H. C, Almeida, I. L, Coelho, L. M, Coelho, N. M., ... Alves, V. N. Bioremediation of waters contaminated with heavy metals using Moringa oleifera seeds as bio-sorbent. Applied bioremediation—active and passive approaches. InTech, Crucial. 2013; 225-253.
4. Wiessner, A, Remmler, M, Kusch, P, Stottmeister, U. The treatment of a deposited lignite pyrolysis wastewater by adsorption using activated carbon and activated coke. Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects. 2009; 139(1), 91-97.
5. Järup, L. Hazards of heavy metal contamination. British medical bulletin. 2003; 68(1), 167-182.
6. U.S. Environmental Protection Agency. www.epa.gov
7. Keleş, E, Özer, A. K, Yörük, S. Removal of Pb 2+ from aqueous solutions by rock phosphate (low-grade). Desalination. 2010; 253(1), 124-128.
8. Elouear, Z, Bouzid, J, Boujelben, N, Feki, M, Jamoussi, F, Montiel, A. Heavy metal removal from aqueous solutions by activated phosphate rock. Journal of Hazardous Materials. 2008; 156(1), 412-420.
9. Reichenauer, T. G, Germida, J. J. Phytoremediation of organic contaminants in soil and groundwater. ChemSusChem. 2008; 1(8-9), 708-717.

10. Demirbas, A. Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials: a review. *Journal of hazardous materials*. 2008; 157(2), 220-229.
11. Volesky, B. Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. *Hydro-metallurgy*. 2001; 59(2), 203-216.
12. Senthil Kumar, P. Adsorption of lead (II) ions from simulated wastewater using natural waste: a kinetic, thermodynamic and equilibrium study. *Environmental Progress & Sustainable Energy*. 2014; 33(1), 55-64.
13. Malik, A. Metal bioremediation through growing cells. *Environment international*. 2004; 30(2), 261-278.
14. Kapoor, A, Viraraghavan, T, Cullimore, D. R. Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus niger*. *Bioresource technology*. 1999; 70(1), 95-104.
15. Wingender, J, Neu, T. R, Flemming, H. C. What are bacterial extracellular polymeric substances? In *Microbial extracellular polymeric substances*. 1999; 1-19. Springer Berlin Heidelberg.
16. Chan, Y.J., Chong, M.F., Law, C.L. & Hassell, D.G. A review on anaerobic-aerobic treatment of industrial and municipal wastewater. *Chemical Engineering Journal*. 2009; 155, 1-
17. Mayacela, C, Rivera, M, Tavolaro, A, Molinari, A, Fallico, C. Use of Vegetable Fibers for PRB to Remove Heavy Metals from Contaminated Aquifers—Comparisons among Cabuya Fibers, Broom Fibers and ZVI. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2017. 14(7), 684.
18. Arroyave, P., & Velásquez, D. Aprovechamiento integral de *Furcraea macrophylla* Backer. Universidad EAFIT, 2001. 250.
19. Delvasto, S. An appropriate vacuum technology for manufacture of corrugated fique fiber reinforced cementitious sheets. *Construction and Building Material*. 2010; 187-192.
20. Teitzel, G. M, Parsek, M. R. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and environmental microbiology*. 2003. 69(4), 2313-2320.
21. Pardo, R, Herguedas, M, Barrado, E, Vega, M. Biosorption of cadmium, copper, lead and zinc by inactive biomass of *Pseudomonas putida*. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2003. 376(1), 26-32.
22. Ceylan, Ö, Uğur, A. Bio-monitoring of heavy metal resistance in *Pseudomonas* and *Pseudomonas* related genus. *J. Biol. Environ. Sc.* 2012; 6(18), 233-242.
23. Gallardo-Rodríguez, J. J, Ríos-Rivera, A, Felipe-Hernández, D. Evaluation of *Furcraea Andina* Fibers as Bacterial Support for Biological Denitrification. *Journal of Natural Fibers*. 2016. 13(6), 691-701.
24. Chakravarty, S, Mohanty, A, Sudha, T. N, Upadhyay, A. K, Konar, J, Sircar, J. K, ... Gupta, K. K. Removal of Pb (II) ions from aqueous solution by adsorption using bael leaves (*Aegle marmelos*). *Journal of hazardous materials*. 2010; 173(1), 502-509.
25. García, G, Colín, A. Biosorption of lead by maize (*Zea mays*) stalk sponge. *Journal of environmental management*. 2010; 91(11), 2079-2086.
26. Garnham, G. W, Codd, G. A, Gadd, G. M. Kinetics of uptake and intracellular location of cobalt, manganese and zinc in the estuarine green alga *Chlorella salina*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1992; 37(2), 270-276.
27. Chang, J. S, Law, R, Chang, C. C. Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21. *Water research*. 1997; 31(7), 1651-1658.