



## Adsorción de metales pesados utilizando sustancias poliméricas extracelulares inmovilizadas en un polisacárido aniónico

Adsorption of heavy metals using extracellular polymeric substances immobilized in an anionic polysaccharide

Josselyn Andreina Arteaga Mesías<sup>1</sup>, Lady Laura Delgado Macías<sup>2</sup>, Ernesto Alonso Rosero Delgado<sup>3</sup>, Naga Raju Maddela<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Universidad Técnica de Manabí, Facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas, Carrera de Ingeniería Química, Portoviejo, Manabí, Ecuador. [jarteaga0180@utm.edu.ec](mailto:jarteaga0180@utm.edu.ec). ORCID: 0000-0003-1939-8947

<sup>2</sup> Universidad Técnica de Manabí, Facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas, Carrera de Ingeniería Química, Portoviejo, Manabí, Ecuador. [ldelgado8696@utm.edu.ec](mailto:ldelgado8696@utm.edu.ec). ORCID: 0000-0003-0509-3843

<sup>3</sup> Universidad Técnica de Manabí, Facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas, Dept. de Procesos Químicos, Portoviejo, Manabí, Ecuador. [ernesto.rosero@utm.edu.ec](mailto:ernesto.rosero@utm.edu.ec). ORCID: 0000-0001-8878-8522

<sup>4</sup> Universidad Técnica de Manabí, Facultad de Ciencias de la Salud, Dept. de Ciencias Biológicas, Portoviejo, Manabí, Ecuador. [raju.maddela@utm.edu.ec](mailto:raju.maddela@utm.edu.ec). ORCID: 0000-0002-7893-0844

### Resumen

En este estudio se evaluó el efecto de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS), inmovilizadas en un soporte de alginato de sodio, sobre la concentración de plomo ( $Pb^{2+}$ ), cromo ( $Cr^{4+}$ ) y cobre ( $Cu^{2+}$ ) presentes en una matriz acuosa sintética. La concentración de carbohidratos totales más alta en EPS fue de  $42.72 \pm 0.17$  ug/L de la cepa E6. Las perlas inmovilizadas con EPS tuvieron valores de humedad crecientes en dependencia del aumento de la concentración. La mayor remoción de los contaminantes se consiguió con el EPS obtenido de la cepa M2-3, de concentración 15% (remoción= 98.97%  $Pb^{2+}$ , 98.05%  $Cr^{4+}$  y 97.25%  $Cu^{2+}$ ) y una capacidad de adsorción del metal pesado de 0.240 mg/g (PS) para  $Pb^{2+}$ , 0.237 mg/g (PS)  $Cr^{4+}$  y 0.471 mg/g (PS)  $Cu^{2+}$ . Estos hallazgos demuestran el gran potencial de las perlas con EPS inmovilizados, para su utilización como biosorbente en el tratamiento de aguas contaminadas con metales pesados.

**Palabras clave:** Exopolisacáridos; inmovilización; biosorción; contaminantes.

## Abstract

In this study, the effect of extracellular polymeric substances (EPS), immobilized on a sodium alginate support, on the concentration of lead ( $Pb^{2+}$ ), chromium ( $Cr^{4+}$ ) and copper ( $Cu^{2+}$ ) present in a synthetic aqueous matrix was evaluated. The highest total carbohydrate concentration in EPS was  $42.72 \pm 0.17$  ug/L of the E6 strain. The EPS immobilized beads had increasing moisture values as a function of increasing concentration. The highest removal of contaminants was achieved with the EPS obtained from the strain M2-3, with a concentration of 15% (removal = 98.97%  $Pb^{2+}$ , 98.05%  $Cr^{4+}$  and 97.25%  $Cu^{2+}$ ) and an adsorption capacity of the heavy metal of 0.240 mg / g (PS) for  $Pb^{2+}$ , 0.237 mg/g (PS)  $Cr^{4+}$  and 0.471 mg/g (PS)  $Cu^{2+}$ . These findings demonstrate the great potential of the beads with immobilized EPS, for their use as a biosorbent in the treatment of water contaminated with heavy metals.

**Keywords:** Exopolysaccharides; immobilization; biosorption; pollutants.

## Introducción

En esta rápida era de industrialización, la contaminación acumulada por metales pesados es una preocupación mundial (Bradl, 2005). Los metales pesados son liberados al medio ambiente por diversas industrias, incluidas la minería, las aguas residuales, el acabado de superficies, el petróleo, la pintura, etc. (Lombardi, Peri, & Guerrero, 2010).

Los metales pesados no son degradables y se acumulan en los organismos vivos, pasando a lo largo de la cadena alimentaria (Tchounwou, Yedjou, Patlolla & Sutton, 2012), en pequeñas concentraciones pueden causar graves enfermedades y desórdenes en el organismo (Chuah, Jumariah, Azni, Katayon, & Choong, 2005), daños en el ambiente, especialmente en la fauna y ecosistemas acuáticos (Bohli, Ouederni, Fiol, & Villaescusa, 2015). El arsénico, cadmio, cromo, plomo y mercurio son los principales metales pesados de importancia para la salud pública (Watt, *et al.*, 2000).

Estudios mencionan que la contaminación por metales pesados en aguas dulces, como es el caso del río Portoviejo (Delgado & Mieles, 2011), se debe a que vulcanizadoras, lubricadoras, gasolineras, cercanas a este, no tienen ningún tipo de cuidado al verter las aguas residuales procedentes de sus procesos, directamente a las redes de distribución de agua fluvial.

Para la remoción de estos iones en solución, se han implementado métodos físicos, químicos y convencionales, como intercambio iónico, ósmosis inversa, precipitación química, extracción química y tratamiento electroquímico (Concórdio, Reis, & Freitas, 2020). Sin embargo, tienen algunos inconvenientes, como la implementación a gran escala, la generación de subproductos indeseables, los altos costos y la ineficiencia para tratar efluentes contaminados con bajas concentraciones de metales (Mehta & Gaur, 2005).

En consecuencia, la biotecnología ambiental se centra en desarrollar alternativas novedosas (Ahmaruzzaman, 2011), uno de los métodos más prometedores es la biosorción de metales pesados, que utiliza microorganismos vivos o muertos, o productos de su metabolismo, como los polímeros (Biswas, *et al.*, 2020).

Investigaciones han demostrado que numerosos exopolisacáridos (EPS) secretados por diferentes microorganismos son eficaces para adsorber metales pesados, tales como,  $Zn^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$ , de sistemas acuosos (Morillo *et al.*, 2008; Salahizadeh & Shojaosadati, 2003).

Las sustancias poliméricas extracelulares son biopolímeros y se definen como exopolisacáridos de origen biológico que participan en la formación de agregados microbianos. Generalmente la composición de los EPS es heterogénea (Wingender, Neu, & Flemming, 1999). Esta variación en su composición se puede atribuir a varios factores, incluido el tipo de cultivo, la fase de crecimiento, el método de extracción y las herramientas analíticas utilizadas (Nielsen & Jahn, 1999).

La capacidad del EPS para adsorber cationes metálicos se debe a la presencia de grupos funcionales cargados negativamente (grupos carboxilo, fosforilo e hidroxilo) (Concórdio &

Freitas, 2019) en las estructuras de estas macromoléculas, que pueden establecer interacciones electrostáticas y unirse al ion metálico cargado positivamente (Gupta & Diwan, 2017).

Algunos de los EPS bacterianos comerciales reportados con la anionicidad requerida son alginato (*Pseudomonas aeruginosa*, *Azotobacter vinelandii*) (Czaczyk & Myszka, 2007), gellan (*Sphingomonas spaucimobilis*) (Freitas *et al.*, 2009), hialuronano (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella multocida*, *Streptococci cepas atenuadas*) (Freitas, Alves & Reis, 2011), xantana (*Pseudomonas campescto oleovorans*) (Freitas *et al.*, 2011), fucopol (*Enterobacter A47*) (Öner, 2013).

El gel de polisacárido y las perlas de alginato se han aplicado ampliamente para inmovilizar diversos microorganismos y enzimas (Arıca, Arpa, Ergene, Bayramođlu, & Genç, 2003). El alginato es un polisacárido natural compuesto de ácido a-L-gulurónico y ácido b-D-manurónico unidos por un  $\alpha \beta 1 \rightarrow 4$  enlaces (Percival, 1979).

También se sabe que estos polímeros se unen fuertemente a los iones metálicos (Hu *et al.*, 2007). El atrapamiento de células microbianas en este soporte de polímeros también podría mejorar el rendimiento de las células microbianas y la capacidad de adsorción del sistema biosorbente para iones de metales pesados (Yan & Viraraghavan, 2001).

El objetivo principal de esta investigación fue evaluar el efecto de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) inmovilizadas en un soporte de alginato de sodio, sobre la concentración de los metales pesados,  $Pb^{+2}$ ,  $Cr^{+4}$  y  $Cu^{+2}$  presentes en una matriz acuosa sintética.

## Metodología

### Obtención de bacterias y preparación del medio de cultivo

Se recolectaron 3 muestras de agua de purga de los sedimentadores de la Planta Potabilizadora en la ciudad de Jipijapa de la provincia de Manabí y 1 muestra del agua de captación hacia la planta. A partir de estas muestras se realizaron aislamientos de bacterias,

utilizando como medios de cultivo; Difco™ Nutrient Broth y Bacto™ Agar, el proceso de incubación se realizó a 37°C por 48 horas, condiciones favorables para el crecimiento (Tortora, Funke, & Case, 2007).

Los cultivos bacterianos se seleccionaron en base a las colonias mucoides (Bala, Yan, Tyagi, & Surampalli, 2010) y la tinción con violeta cristalino (Cain, Hanks, Weis, Bottoms, & Lawson, 2009). Luego, estas bacterias se purificaron (tres rayas repetidas en la superficie del agar), finalmente los cultivos bacterianos purificados se conservaron en la forma de existencias de glicerol (25% p/v) a -20 °C (Gorman & Adley, 2004). Las cepas fueron codificadas con “E” las provenientes del agua de entrada y con “M” provenientes de los sedimentadores de la planta.

## **Extracción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS)**

Para la extracción de EPS, se adoptó el método realizado por Maddela *et al.*, (2018). Se preparó un medio de cultivo utilizando una solución de 50 ml de caldo nutriente (Difco™ Nutrient Broth) con 2,5% de glucosa, se agregó 100 µL de suspensión bacteriana y se incubó en agitación (110-115 rpm) durante 48 horas a 30°C. El medio fue centrifugado por 10 min a 3500 rpm y 4°C. Se desechó el sobrenadante (productos microbianos solubles) y se recogió el pellet (células con EPS). Al pellet se le añadió una solución de NaCl al 0,05% y se sometió a baño maría por 30 min a 60°C. Se realizó un segundo centrifugado a 5000 rpm a 4°C por 10 min, se separó el sobrenadante (suspensión de EPS) y se desechó el residuo (células sin EPS). Este procedimiento se realizó para las 9 muestras de suspensión bacteriana. Finalmente se almacenaron a -20°C.

## **Caracterización de EPS**

Se determinó el contenido de carbohidratos totales de EPS por el método del ácido fenol-sulfúrico (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, & Smith, 1956). A 1 mL de EPS se añadió 1 mL de fenol (5%) y 5 mL de ácido sulfúrico (96%), luego se dejó en reposo por 10 min, se agitó y se colocó durante 20 min en un baño de agua a temperatura ambiente para el desarrollo de color, este procedimiento se realizó para las 9 muestras. La concentración de EPS fue evaluada en un Espectrofotómetro UV-VIS a 450 nm.

## Inmovilización de EPS con perlas de alginato de calcio

Las perlas de EPS-alginato se formularon según la técnica utilizada por Ozdemir *et al.*, (2005), ajustando la concentración de los componentes, se colocaron varias concentraciones de EPS (5%,10%,15%) y 2% de mezcla de alginato de sodio gota a gota con la ayuda de una jeringa en una solución de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  al 5% a 4°C. Las perlas de alginato se dejaron en reposo por 24 horas, posteriormente se recogieron cuidadosamente, se lavaron con agua destilada y se pesaron.

## Preparación de la matriz acuosa sintética

Se preparó una solución sintética de plomo, cromo y cobre, utilizando Nitrato Plumboso ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ) 2mg/L, Dicromato de Potasio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) 2mg/L y Sulfato Cúprico ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 4mg/L respectivamente. El experimento se realizó con soluciones sintéticas para 5L de agua destilada con un pH 6 según lo recomendado por Mohammed (2012).

## Adsorción de EPS sobre contaminantes

Se realizaron estudios de adsorción por lotes con perlas de alginato de calcio a diferentes concentraciones de EPS, en 500mL de agua contaminada con agitación constante por 60min. Las perlas se midieron en estufa a 105°C hasta un peso constante (APHA, 2005). Estos valores de peso seco se emplearon para calcular la capacidad de adsorción del metal. Los contaminantes fueron evaluados al finalizar el proceso de adsorción mediante espectrofotómetro UV-Vis.

## Resultados

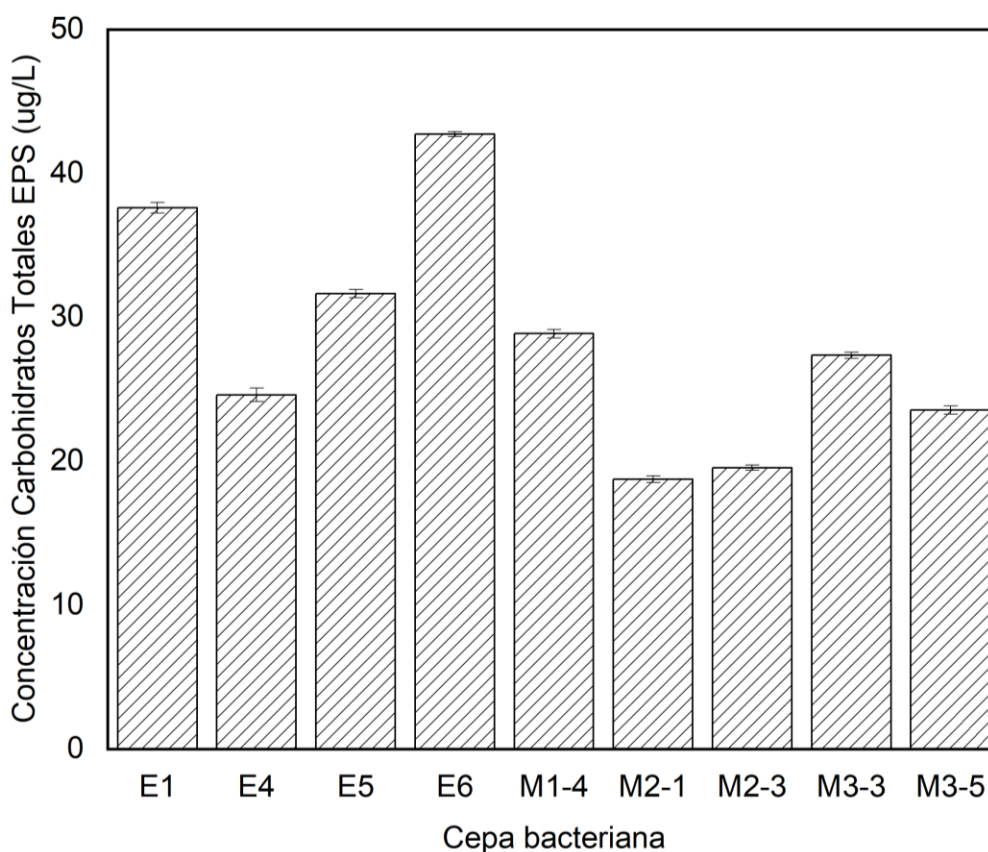
### Obtención de cepas microbianas y caracterización de EPS

A partir de las 4 muestras recolectadas se aislaron 9 cepas de microorganismos (Figura 1). Molecularmente en diversos estudios se han identificado bacterias gram negativas; comúnmente *Pseudomonas* (Bala *et al.*, 2010) y gram positivas de la especie *Bacillus*, aisladas de aguas residuales municipales (Maddela *et al.*, 2018). De las cepas microbianas se extrajeron EPS, cuya

concentración de polisacáridos (carbohidratos totales) mostraron diversos valores, la cepa E6 presentó la mayor concentración;  $42.72 \pm 0.17$  ug/L, la cepa E1 una concentración media;  $37.61 \pm 0.36$  ug/L, y la cepa M2-3 una concentración baja;  $19,54 \pm 0.19$  ug/L.

## Figura 1

Concentración de carbohidratos totales en EPS en cepas aisladas (E1, E4, E5, E6; agua de Entrada / M1-4, M2-1, M2-3, M3-3, M3-5; muestras de sedimentadores)



El estudio realizado por Kumari *et al.*, (2017), demostró que el EPS producido por *P. aeruginosa* N6P6 tuvo una concentración de carbohidratos de 957 ug/mL. Por otro lado, Ozdemir *et al.*, (2005), reportó una concentración de carbohidratos de 33% en el EPS producido por *Chryseomonas luteola* TEM05. Las variaciones en la composición de los polisacáridos dependen en gran medida del tipo y la cantidad de fuente de carbono disponible, los factores de estrés



abiótico como la temperatura y el pH y la fase de crecimiento de la bacteria durante la cual se produce la síntesis (Czaczyk & Myszka, 2017; Sheng, Yu & Li, 2010).

## Obtención de perlas de alginato con EPS inmovilizados

Las perlas PE6 con una concentración de 5% EPS presentó un peso húmedo de  $34.400 \pm 0.035$ g y un peso seco de  $4.290 \pm 0.021$ g. Para el caso de la concentración de 10%,  $38.609 \pm 0.036$ g con un peso seco de  $4.275 \pm 0.044$ g y para las de 15%,  $40.504 \pm 0.058$ g con un peso seco de  $4.177 \pm 0.031$ g. En el caso del blanco (perlas sin EPS),  $30.707 \pm 0.053$ g, y un peso seco de  $4.075 \pm 0.041$ g. La humedad de las perlas PE6 aumentó en dependencia de la concentración de EPS, alcanzando la mayor humedad (93.254%), retención de EPS (33.904%), con la concentración de 15%, y una pérdida de EPS de 5.086% (Tabla 1).

Las perlas PE1 con una concentración de 5% EPS, presentó un peso húmedo de  $33.806 \pm 0.059$ g y un peso seco de  $4.223 \pm 0.044$ g. Para el caso de la concentración de 10%,  $37.800 \pm 0.057$ g con un peso seco de  $4.191 \pm 0.014$ g y para las de 15%,  $41.910 \pm 0.046$ g con un peso seco de  $4.174 \pm 0.028$ g. La humedad de las perlas PE1 aumentó en dependencia de la concentración de EPS, alcanzando la mayor humedad (93.821%) y pérdida de EPS (3.537%) con la concentración de 15%, mayor retención de EPS (33.261%) con la concentración de 5%.

Las perlas PM2-3 con una concentración de 5% EPS, presentó un peso húmedo de  $34.143 \pm 0.039$ g y un peso seco de  $4.263 \pm 0.012$ g. Para el caso de la concentración de 10%,  $38.609 \pm 0.044$ g con un peso seco de  $4.248 \pm 0.047$ g y para las de 15%,  $42.012 \pm 0.021$ g con un peso seco de  $4.132 \pm 0.017$ g. La humedad de las perlas PM2-3 aumentó en dependencia de la concentración de EPS, alcanzando la mayor humedad (93.535 %) y pérdida de EPS (3.554%) con la concentración de 15%, mayor retención de EPS (33.094%) con la concentración de 5%.



**Tabla 1**

*Peso de las perlas de alginato con diferentes concentraciones de EPS*

<b>Código de Perlas</b>	<b>Concentración de EPS (%)</b>	<b>Peso húmedo perlas (g)</b>	<b>Peso seco perlas (g)</b>	<b>Humedad (%)</b>	<b>Retención EPS (%)</b>	<b>Pérdida EPS (%)</b>
PE6	5	34.400 ± 0.035	4.290 ± 0.021	91.453	27.951	1.398
PE1	5	33.806 ± 0.059	4.223 ± 0.044	92.274	33.261	1.663
PM2-3	5	34.143 ± 0.039	4.263 ± 0.012	91.388	33.094	1.655
PE6	10	38.609 ± 0.036	4.275 ± 0.044	92.645	20.879	2.088
PE1	10	37.800 ± 0.057	4.191 ± 0.014	92.944	27.242	2.724
PM2-3	10	38.609 ± 0.044	4.248 ± 0.047	92.744	22.362	2.236
PE6	15	40.504 ± 0.058	4.177 ± 0.031	93.254	33.904	5.086
PE1	15	41.910 ± 0.046	4.174 ± 0.028	93.821	23.579	3.537
PM2-3	15	42.012 ± 0.021	4.132 ± 0.017	93.535	23.692	3.554
Blanco (Sin EPS)	0	30.707 ± 0.053	4.075 ± 0.041	90.719	-	-

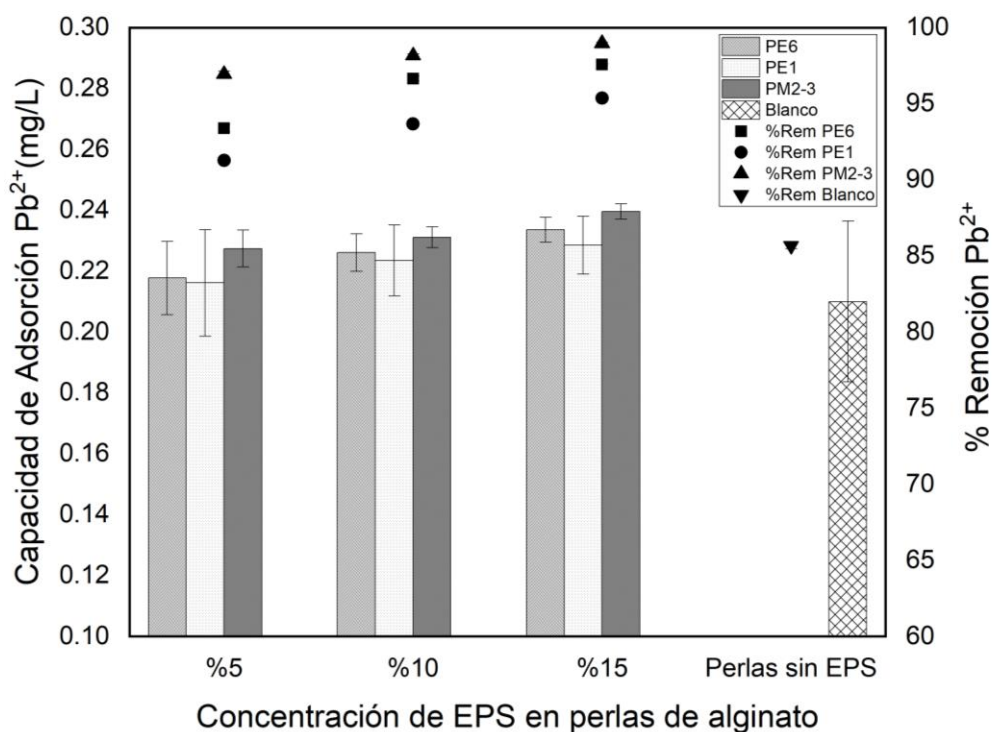
## Efecto de EPS immobilizados en perlas de alginato sobre contaminantes

Los iones de  $Pb^{2+}$  con una concentración inicial de 2mg/L fueron mayormente adsorbidos por las perlas con EPS obtenidos de la cepa M2-3 a una concentración de 15% (Figura 2), la cual presentó una adsorción del metal pesado de  $0.240 \pm 0.002$  mg/g (PS) (Remoción=98,97%), Para el caso de la concentración de 10% se obtuvo una remoción de 98.16%, y para las de 5% una de 96.95%. En el caso del blanco (perlas sin EPS), la remoción fue del 85.67%.

Estos resultados se pueden comparar con los de Kumari *et al.* (2017), quienes obtuvieron en perlas de alginato con EPS una adsorción de  $Pb^{2+}$  de 416,67  $mg\ g^{-1}$  y perlas de alginato sin EPS de 120,48  $mg\ g^{-1}$ , usando concentraciones del metal de 100-600  $mg\ L^{-1}$ .

### Figura 2

Efecto de la concentración de EPS immobilizados en perlas de alginato sobre la capacidad de adsorción y remoción de  $Pb^{2+}$



El tratamiento con perlas inmovilizadas, PE6, PE1 y PM2-3, obtuvieron concentraciones finales de  $Pb^{2+}$  (0.132- 0.020 mg/L) aceptados dentro de la Norma Ambiental Ecuatoriana (TULSMA) para cuerpos de agua dulce (0.2mg/L) y alcantarillado público (0.5mg/L). También se encuentran dentro de la Norma Oficial Mexicana (NOM 001 SEMARNAT1996) para cuerpos de agua (0.2mg/L). En el caso del blanco (perlas sin EPS), los valores en la concentración final (0.286 mg/L) son aceptados por la Norma Ambiental Ecuatoriana (TULSMA) para alcantarillado público.

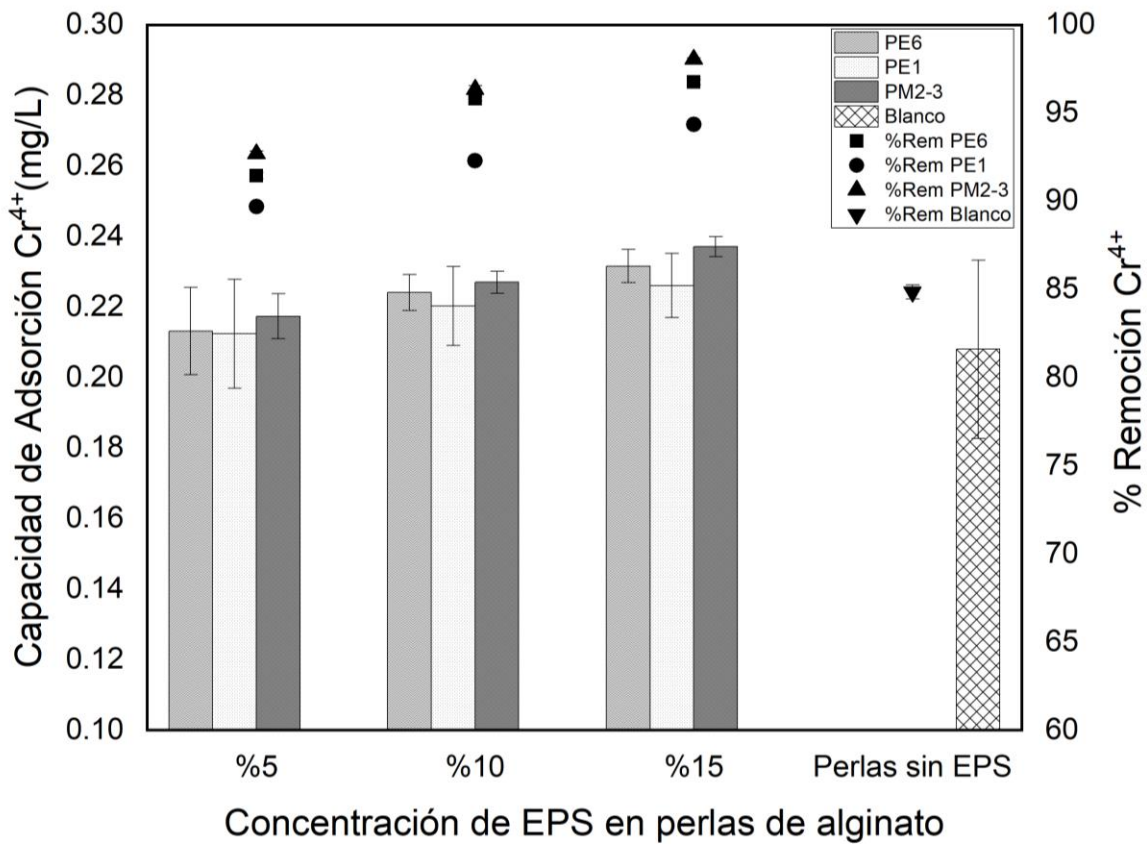
Los iones de  $Cr^{4+}$  con una concentración inicial de 2mg/L, fueron mayormente adsorbidos por las perlas con EPS obtenidos de la cepa M2-3 a una concentración de 15% (Figura 3), la cual presentó una adsorción del metal pesado de  $0.237 \pm 0.003$  mg/g (PS) (Remoción=98,05%), Para el caso de la concentración de 10% se obtuvo una remoción de 96.35%, y para las de 5% una de 92.70%. En el caso del blanco (perlas sin EPS), la remoción fue del 84.85%.

Estos resultados se pueden comparar con los de Anurag *et al.* (2007), quienes obtuvieron un máximo de iones adsorbidos de  $Cr^{4+}$  de 238 mg/g de perlas de alginato de calcio, con una eficacia de remoción del 86%, usando concentraciones del metal de 25-200 mg/L.

El tratamiento con perlas inmovilizadas, PE6, PE1 y PM2-3, obtuvieron concentraciones finales de  $Cr^{4+}$  (0.171- 0.039 mg/L) aceptados dentro de la Norma Ambiental Ecuatoriana (TULSMA) para cuerpos de agua dulce (0.5mg/L) y alcantarillado público (0.5mg/L). También se encuentran dentro de la Norma Oficial Mexicana (NOM 001 SEMARNAT1996) para cuerpos de agua (0.5mg/L). En el caso del blanco (perlas sin EPS), los valores en la concentración final (0.303mg/L) son aceptados por la Norma Ambiental Ecuatoriana (TULSMA) para cuerpos de agua dulce y alcantarillado público; y por la Norma Oficial Mexicana (NOM 001 SEMARNAT1996) para cuerpos de agua.

Figura 3

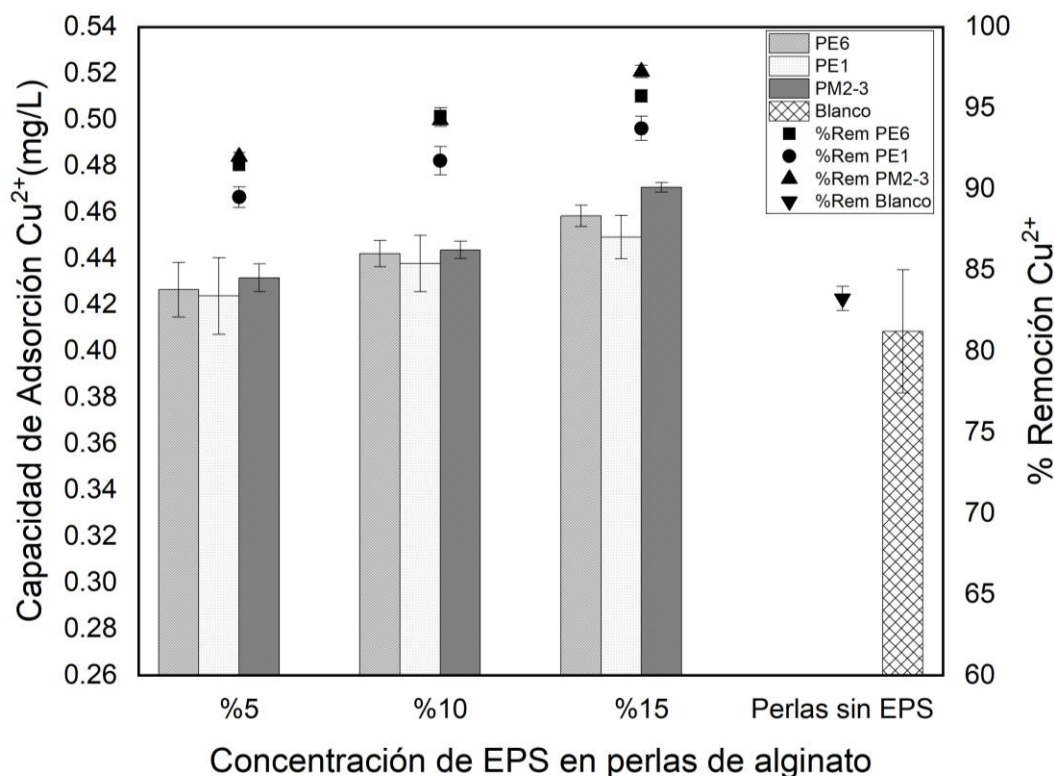
Efecto de la concentración de EPS immobilizados en perlas de alginato sobre la capacidad de adsorción y remoción de  $Cr^{4+}$



Los iones de  $Cu^{2+}$  con una concentración inicial de 4mg/L fueron mayormente adsorbidos por las perlas con EPS obtenidos de la cepa M2-3 a una concentración de 15% (Figura 4), la cual presentó una adsorción del metal pesado de  $0.471 \pm 0.006$  mg/g (PS) (Remoción=97,25%), Para el caso de la concentración de 10% se obtuvo una remoción de 94.26%, y para las de 5% una de 92.00%. En el caso del blanco (perlas sin EPS), la remoción fue del 83.25%.

Figura 4

Efecto de la concentración de EPS inmobilizados en perlas de alginato sobre la capacidad de adsorción y remoción de  $\text{Cu}^{2+}$



Estos resultados se pueden comparar con los de Ozdemir *et al.* (2005), quienes obtuvieron una adsorción de 1,989 mmol de  $\text{Cu}^{2+}$ /g de peso seco de EPS inmobilizado con alginato, mientras que las perlas de alginato sola, una eficiencia de 1,505 mmol de  $\text{Cu}^{2+}$ /g de peso seco, utilizando concentraciones iniciales del metal de 0.39-4.72 mM.

El tratamiento con perlas inmobilizadas, PE6, PE1 y PM2-3, obtuvieron concentraciones finales de  $\text{Cu}^{2+}$  (0.34- 0.11 mg/L) aceptados dentro de la Norma Ambiental Ecuatoriana (TULSMA) para cuerpos de agua dulce (1mg/L) y alcantarillado público (1mg/L). También se encuentran dentro de la Norma Oficial Mexicana (NOM 001 SEMARNAT1996) para cuerpos de

agua (4mg/L). En el caso del blanco (perlas sin EPS), los valores en la concentración final (0.67mg/L) son aceptados por la Norma Ambiental Ecuatoriana (TULSMA) para cuerpos de agua dulce y alcantarillado público; y por la Norma Oficial Mexicana (NOM 001 SEMARNAT1996) para cuerpos de agua.

Los resultados de este estudio demuestran que, a mayor concentración de EPS, mayor fue la capacidad de adsorción del metal pesado. Sin embargo, Wei *et al.* (2016) mencionan que, al aumentar la concentración inicial del metal, la eficiencia de eliminación puede disminuir cuando la concentración de EPS exceda el nivel óptimo. Realizar una cinética de adsorción de metal pesado, incrementando su concentración inicial, permitirá probar la capacidad de retención o tiempo de saturación de las perlas con EPS durante el tratamiento.

Los EPS, producto de las cepas E1, E6 y M2-3, aislados de aguas purgas obtenidos del proceso de potabilización de agua, mostraron valores bajos en la concentración de polisacáridos (carbohidratos totales), sin embargo, resultaron ser capaces de adsorber metales pesados, en comparación con el EPS utilizado en el estudio de Kumari *et al.* (2017), que fue obtenido de una bacteria marina, con una concentración muy alta de polisacáridos. Puesto que, los EPS presentan en sus macromoléculas distintos grupos funcionales (amino, carboxílico, sulfhidrilo y fosfato), hacen que difieran en su afinidad y especificidad para la unión de metales, por lo tanto, se podrían lograr resultados diferentes dependiendo de las características del EPS. Realizar un estudio más profundo sobre las propiedades funcionales del EPS, permitirá una mejor comprensión del mecanismo de adsorción del mismo.

Los valores de remoción obtenidos en este estudio a escala de laboratorio sugieren que los EPS inmovilizados en perlas de alginato, podrían ser adecuado para el desarrollo de procesos sostenibles y amigables con el medio ambiente para la remoción de plomo, cromo y cobre en aguas contaminadas. Realizar experimentos, utilizando aguas residuales industriales para la obtención de EPS son una opción viable como tratamiento de biorremediación.



## Conclusiones

De los EPS de microorganismos útiles en los procesos de biorremediación tenemos a la cepa E6 que presentó la mayor concentración de polisacáridos (carbohidratos totales) con un  $42.72 \pm 0.17$  ug/L, la cepa E1 una concentración media de  $37.61 \pm 0.36$  ug/L, y la cepa M2-3 obtuvo la concentración más baja;  $19,54 \pm 0.19$  ug/L.

En el ensayo de concentración del biosorbente se estableció que 15% sería el óptimo para la remoción de los contaminantes presentes en una matriz acuosa sintética. Comprobando que, a mayor concentración del biosorbente mayor será la capacidad de remoción.

Para los tratamientos con y sin EPS inmovilizados hubo diferencia significativa demostrando que los tratamientos que poseen EPS (E6, E1, M2-3) tiene una mayor capacidad de remoción a diferencia del que no tiene (Blanco).

Los datos experimentales de adsorción de  $Pb^{2+}$ ,  $Cr^{4+}$ , y  $Cu^{2+}$ , con el tratamiento de sustancias poliméricas extracelulares inmovilizadas en un soporte de alginato se ajustaron favorablemente. La mayor capacidad de reducción de los contaminantes utilizando EPS la obtuvo la cepa M2-3 con una concentración máxima de remoción del 98.97% de  $Pb^{2+}$ , 98.05% de  $Cr^{4+}$  y 97.25% de  $Cu^{2+}$ . Una capacidad de adsorción de 0.240 mg/g (PS) para el  $Pb^{2+}$ , 0.237 mg/g (PS) para el  $Cr^{4+}$  y 0.471 mg/g (PS) para el  $Cu^{2+}$ .

El porcentaje de remoción es indiferente de la concentración de carbohidratos totales que presente una cepa microbiana, como es el caso de la cepa E6 que presentó una mayor concentración ( $42.71$   $\mu$ g/L) de carbohidratos totales, sin embargo, su porcentaje de remoción (97.58%  $Pb^{2+}$ , 96.75%  $Cr^{4+}$  y 95.75% de  $Cu^{2+}$ ), no fue significativo en comparación con la cepa M2-3 de concentración ( $19.39$   $\mu$ g/L) de carbohidratos totales.

La biosorción de metales pesados con EPS inmovilizados en perlas de alginato es una de las técnicas más novedosas dentro de la biotecnología, la cual resulta más eficiente a comparación de otros métodos convencionales, obteniendo valores aceptables en sus concentraciones finales, los cuales se encuentran dentro de la Norma Ambiental Ecuatoriana



(TULSMA) para cuerpos de agua dulce y alcantarillado público. También están dentro de la Norma Oficial Mexicana (NOM 001 SEMARNAT1996) para cuerpos de agua. Por lo tanto, este tratamiento se podría emplear para procesos de biorremediación.

## Referencias Bibliográficas

Watt, G., Britton, A., Gilmour, H., Moore, M., Murray, G., & Robertson, S. (2000). Public health implications of new guidelines for lead in drinking water: a case study in an area with historically high water lead levels. *Food and Chemical Toxicology*, 38(1), S73-S79.

Wingender, J., Neu, T., & Flemming, H. (1999). *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure, and Function*.

Ahmaruzzaman, M. (2011). Industrial wastes as low-cost potential adsorbents for the treatment of wastewater laden with heavy metals. *Advances in Colloid and Interface Science*, 166(1-2), 36–59.

Anurag, P., Debabrata, B., Anupam, S., & Lalitagauri, R. (2007). Studies on Cr(VI), Pb(II) and Cu(II) adsorption–desorption using calcium alginate as biopolymer. *Chemical Speciation & Bioavailability*, 19(1), 17-24.

APHA. (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21st ed. Washington, DC.

Arıca, M., Arpa, Ç., Ergene, A., Bayramođlu, G., & Genç, Ö. (2003). Ca-alginate as a support for Pb (II) and Zn (II) biosorption with immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *Carbohydr. Polym.*, 52, 167–174.

Bala, S. S., Yan, S., Tyagi, R., & Surampalli, R. (2010). Extracellular polymeric substances (EPS) producing bacterial strains of municipal wastewater sludge: isolation, molecular identification, EPS characterization and performance for sludge settling and dewatering. *Water Resources*, 44, 2253–2266.



- Biswas, J. K., Banerjee, A., Sarkar, B., Sarkar, D., Sarkar, S. K., Rai, M., & Vithanage, M. (2020). Exploration of an Extracellular Polymeric Substance from Earthworm Gut Bacterium (*Bacillus licheniformis*) for Bioflocculation and Heavy Metal Removal Potential. *Applied Sciences*, *10*, 349.
- Bohli, T., Ouederni, A., Fiol, N., & Villaescusa, I. (2015). Evaluation of an activated carbon from olive stones used as an adsorbent for heavy metal removal from aqueous phases. *Comptes Rendus Chimie*, *18*(1), 88–99 .
- Bradl, H. (2005). *Heavy Metals in the Environment: Origin, Interaction and Remediation*. London: Elsevier/Academic Press.
- Cain, D., Hanks, H., Weis, M., Bottoms, C., & Lawson, J. (2009). *Microbiology laboratory manual*. McKinney, TX: Collin County Community College District.
- Chuah, T. G., Jumariah, A., Azni, I., Katayon, S., & Choong, S. Y. (2005). Rice husk as a potentially low-cost biosorbent for heavy metal and dye removal: an overview. *Desalination*, *175*(3), 305–316.
- Concórdio, P., & Freitas, F. (2019). *Environmental Applications: Biopolymer Sorbents for Heavy Metal Removal*. FL, USA: CRC Press: Boca Raton.
- Concórdio, R. P., Reis, M. A., & Freitas, F. (2020). Biosorption of Heavy Metals by the Bacterial Exopolysaccharide FucoPol. *Applied Sciences*, *10*, 6708.
- Czaczyk, K., & Myszk, K. (2007). Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. *Polish Journal of Environmental Studies*, *16*, 799-806.
- Delgado, V. A., & Mieles, L. E. (2011). Identificación de metales pesados para establecer el nivel de contaminación en el río Portoviejo entre los puentes Velasco Ibarra y El Salto en la ciudad de Portoviejo durante el período 2009 - 2010. *La Técnica*, 64-69.

- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350–356.
- Freitas, F., Alves, V. D., & Reis, M. A. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 29, 388-398.
- Freitas, F., Alves, V. D., Torres, C. A., Cruz, M., Sousa, I., Melo, M. J., Ramos, A.M. & Reis, M. A. (2011). (Fucose-containing exopolysaccharide produced by the newly isolated Enterobacter strain A47 DSM 23139. *Carbohydrate Polymers*, 83, 159-165.
- Freitas, F., Alves, V., Pais, J., Costa, N., Oliveira, C., Mafra, L., Hilliou, L., Oliveira, R. & Reis, M. (2009). Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a Pseudomonas strain grown on glycerol. *Bioresource technology*, 100, 859-865.
- Gorman, R., & Adley, C. C. (2004). An evaluation of five preservation techniques and conventional freezing temperatures of  $-20^{\circ}\text{C}$  and  $-85^{\circ}\text{C}$  for long-term preservation of *Campylobacter jejuni*. *Letters in applied microbiology*, 38(4), 306-310.
- Gupta, P., & Diwan, B. (2017). Bacterial Exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A Review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnology Reports*, 13, 58–71.
- Hu, Z., Jin, J., Abruna, H., Houston, P., Hay, A., & Ghiorse, W. (2007). Spatial distributions of copper in microbial biofilms by scanning electrochemical microscopy. *Environmental Sciences Technology*, 41, 936-41.
- Kumari, S., Mahapatra, S., & Das, S. (2017). Ca-alginate as a support matrix for Pb(II) biosorption with immobilized biofilm associated extracellular polymeric substances of *Pseudomonas aeruginosa* N6P6. *Chemical Engineering Journal*, 328, 556-566.
- Lombardi, P., Peri, S., & Guerrero, N. (2010). ALA-D and ALA-D reactivated as biomarkers of lead contamination in the fish *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73 (7), 1704–1711.



- Maddela, N., Zhou, Z., Yu, Z., Zhao, S., & Meng, F. (2018). Functional determinants of extracellular polymeric substances to membrane biofouling: Experimental evidence from pure-cultured sludge bacteria. *Applied and Environmental Microbiology Biotechnol.*, 84(15). doi:10.1128/AEM.00756-18
- Mehta, S. K., & Gaur, J. P. (2005). Use of Algae for Removing Heavy Metal Ions from Wastewater: Progress and Prospects. *Critical Review in Biotechnology*, 25 (3), 113–152. doi: 10.1080/07388550500248571
- Mohammed, S. (2012.). *Removal of cadmium from simulated wastewater using biosorption*. [Master Thesis, University of Baghdad].
- Morillo, J. A., García, R., Quesada, T., Aguilera, M., Ramos, A., & Monteoliva, M. (2008). Biosorption of heavy metals by the exopolysaccharide produced by *Paenibacillus jamilae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(11), 2699–2704. doi: 10.1007/s11274-008-9800-9
- Nielsen , P., & Jahn, A. (1999). Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure and function. In *Extraction of EPS* (pp. 49-72). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Öner, E. T. (2013). Microbial production of extracellular polysaccharides from biomass. In *Pretreatment Techniques for Biofuels and Biorefineries*. 35-56. Springer.
- Ozdemir, G., Ceyhan, N., & Manav, E. (2005). Utilization in alginate beads for Cu (II) and Ni (II) adsorption of an exopolysaccharide produced by *Chryseomonas luteola* TEM05 . *World Journal of Microbiology and Biotechnology.*, 21 (2), 163–167. doi: 10.1007/s11274-004-1563-3
- Percival, E. (1979). The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: their basic structure, biosynthesis and function. *British Phycological Journal*, 14(2), 103-117.



- Salehizadeh, H., & Shojaosadati, S. A. (2003). Removal of metal ions from aqueous solution by polysaccharide produced from *Bacillus firmus*. *Water Resources*, 37, 4231–4235.
- Sheng, G.-P., Yu, H.-Q., & Li, X.-Y. (2010). Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review. *Biotechnology Advances*. *Biotechnology Advances*, 28, 882-894.
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Heavy Metal Toxicity and the Environment. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*, 101, 133–164. doi: 10.1007/978-3-7643-8340-4\_6.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología*. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana.
- Wei, W., Wang, Q., Li, A., Yang, J., Ma, F., Pi, S., & Wu, D. (2016). Biosorption of Pb (II) from aqueous solution by extracellular polymeric substances extracted from *Klebsiella* sp. J1: Adsorption behavior and mechanism assessment. *Scientific Reports*, 6(31575). <https://doi.org/10.1038/srep31575>
- Yan, G., & Viraraghavan, T. (2001). Heavy metal removal in a biosorption column by immobilized *M. rouxii* biomass. *Bioresource Technology*, 78 (3), 243–249. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00020-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00020-7)