

Bioadsorción de plomo (II) por biomasa microbiana seca: Efecto del pH

Biosorption of Lead (II) by Microbial dry Biomass: pH Effect

Lic. Enieyis Tur-Naranjo¹, MSc. Teresa de los Milagros Orberá-Ratón¹, Yanet Romagosa-Álvarez¹,

Dra.C. Rosa María Pérez-Silva²

etur@cnt.uo.edu.cu



¹Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba; ²Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba

● Resumen

Numerosos efluentes industriales presentan concentraciones relativamente elevadas de metales pesados, como el Plomo, caracterizado por su alta toxicidad a bajas concentraciones y su capacidad para acumularse en diferentes organismos. En este trabajo se valoraron las potencialidades de la biomasa seca de *Bacillus subtilis* CCEBI 1032, *Pseudomonas aeruginosa* CCEBI 1044 y *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 para la bioadsorción de Pb (II) en soluciones acuosas, teniendo en cuenta tres niveles de pH. Los mejores resultados de remoción de Plomo se obtuvieron a 60 min de exposición y a valores de pH 4,2; 5,2 y 6,2 unidades para *Bacillus subtilis* CCEBI 1032, *Pseudomonas aeruginosa* CCEBI 1044 y *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011, respectivamente.

Palabras clave: plomo, bioadsorción, aguas residuales, contaminación, metales pesados.

● Abstract

Some industrial effluents have high concentrations of heavy metals like lead, which have high toxicity at low concentrations and its capacity of been absorbed and accumulated in living organisms. In this work was valuated the potential biosorption of Pb(II), in aqueous solution, performing the influence of three pH values, using dry biomass of *Bacillus subtilis* CCEBI 1032, *Pseudomonas aeruginosa* CCEBI 1044 and *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011. The best results of lead removal was at 60 min, and pH 4,2; 5,2 y 6,2 for *Bacillus subtilis* CCEBI 1032, *Pseudomonas aeruginosa* CCEBI 1044 and *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011, respectively.

Keywords: lead, biosorption, wastewater, contamination, heavy metal.

● Introducción

Numerosos efluentes industriales presentan concentraciones relativamente elevadas de metales pesados, entre los que se encuentran tratamientos superficiales como las galvanoplastias, que producen habitualmente efluentes con contenido metálico. Los metales pesados son compuestos químicos no degradables ni biológica ni químicamente en la naturaleza. Portal motivo, una vez vertidos al ambiente,

sólo pueden distribuirse entre los entornos aire-agua-suelo, a veces cambiando su estado de oxidación, o incorporándose a los seres vivos.

Debido a la movilidad que presentan en los ecosistemas acuáticos naturales y a su toxicidad para las formas superiores de vida, los iones de metales pesados presentes en los abastecimientos de aguas superficiales y subterráneos, se les ha dado prioridad como los contaminantes inorgánicos más importantes en el ambiente /1/. Entre los metales pesados, se

encuentra el plomo, caracterizado por su alta toxicidad a bajas concentraciones y su capacidad para acumularse en diferentes organismos /2/.

Las industrias asociadas a metales pesados efectúan el tratamiento de efluentes basados en la precipitación química /3, 4/. Sin embargo, dicha precipitación no permite la remoción de concentraciones bajas de los metales, en ocasiones complejados y en coexistencia con material orgánico /5, 6/. Estos métodos convencionales resultan costosos e ineficientes, especialmente cuando los iones de metales pesados están en soluciones de 1-100 mgL⁻¹ /7/.

En los últimos años se ha incrementado el empleo de sistemas biológicos para el tratamiento de las aguas contaminadas con metales pesados /8-10/. Los procesos en los cuales los microorganismos interactúan con metales tóxicos son muy diversos; sin embargo, existen tres categorías de procesos biotecnológicos: biosorción, precipitación extracelular y captación a través de polímeros purificados y de otras moléculas especializadas de origen microbiano. Estos no son excluyentes y pueden involucrar fenómenos físicos-químicos y biológicos /11, 12/.

Cuando se trabaja con microorganismos es necesario evaluar cuál será el destino de los residuos biológicos del proceso involucrado. Resulta entonces imprescindible conocer la inocuidad, desde el punto de vista sanitario y la implicación de la liberación de dichos microorganismos al ambiente. Teniendo en cuenta lo anterior es recomendable la detoxificación de metales mediante el empleo de estrategias basadas en la adsorción superficial microbiana del metal de interés. Este mecanismo se denomina biosorción /13, 14/.

La eficiencia de un proceso de bioadsorción depende de las condiciones físico-químicas de la solución en que se encuentre el metal, entre los que se encuentran, el pH, la temperatura, la concentración inicial del metal, la fuerza iónica, entre otros /15/. En tal sentido, este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto del pH en el proceso de biosorción de plomo por la biomasa seca de las cepas *Pseudomonas aeruginosa* CCEBI 1044, *Bacillus subtilis* CCEBI 1032 y *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011.

● Métodos experimentales

La presente investigación se llevó a cabo en los Laboratorios de Química Ambiental del Departamento de Química (DQ), Laboratorio Analítico del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI) y en el Laboratorio de Bioquímica del Departamento de Biología, todos pertenecientes a la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Oriente y el Laboratorio de Minerales "Elio Trincado" de la Empresa Geominera Oriental.

Cepas microbianas

Las cepas empleadas en este trabajo fueron: *Pseudomonas aeruginosa* CCEBI 1044, *Bacillus subtilis* CCEBI 1032 y *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011, las cuales poseen potencialidades para degradar hidrocarburos y adsorber metales pesados /16-18/.

Cultivos microbianos y obtención de biomasa seca

Con el objetivo de obtener mayor cantidad de biomasa, se realizó un pre-inóculo a partir de cada una de las cepas empleadas, para lo cual se partió de muestras frescas (18 h de incubación) y se inoculó 100 mL de caldo nutriente (BIOCEN) estéril para el cultivo de *P. aeruginosa* CCEBI 1044 y *B. subtilis* CCEBI 1032, así como caldo YPG (Extracto de levadura 1g · L⁻¹, peptona micológica 2 g · L⁻¹ y glucosa 2 g · L⁻¹), para *K. marxianus* CCEBI 2011, contenidos en frascos erlenmeyers de 250 mL de capacidad. Los cultivos se incubaron durante 48 h a 150 rpm y 32 °C. El pH se ajustó a 7,2 unidades.

Para el cultivo de *Bacillus subtilis* CCEBI 1032 y *Pseudomonas aeruginosa* CCEBI 1044 se tomaron los 100 mL del pre-inóculo y se sembraron en erlenmeyers de 2 000 mL de capacidad, conteniendo 1 000 mL de caldo nutritivo estéril. El cultivo se dejó crecer entre 5-7 días a 32 °C con agitación continua a 150 rpm. Para el cultivo de *K. marxianus* CCEBI 2011, se realizó el mismo procedimiento, pero en este caso el medio de cultivo fue caldo YP G.

Recuperación y secado de la biomasa

Los cultivos se centrifugaron a 4 500 rpm durante 10 min, el precipitado se lavó tres veces con agua destilada para eliminar iones u otros residuos propios del medio. El secado de la biomasa se realizó en estufa a 105 °C durante 8 -10 h hasta peso constante. Se determinó el peso seco /19/. La biomasa seca pulverizada se conservó en frascos secos herméticamente cerrados.

Ensayos de bioadsorción de plomo

Preparación de las soluciones de plomo

Las soluciones de plomo se prepararon a partir del nitrato de plomo ($Pb[NO_3]_2$) grado reactivo MERCK. Los valores de pH de trabajo oscilaron entre 4 y 6 unidades, los cuales fueron ajustados utilizando NaOH 0,01N o HCL 0,01N.

Cuantificación de plomo

La concentración de Pb (II) remanente en los sobrenadantes, previamente centrifugados y filtrados, se determinó por Espectroscopia Óptica de Emisión Atómica mediante Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-AES) en un espectrómetro AMETEK, ALEMANIA.

Estudio del pH óptimo de bioadsorción por la biomasa

Se utilizó como material adsorbente 0,6 g.L⁻¹ de la biomasa seca de los microorganismos escogidos para el estudio /20/, depositadas en erlenmeyers que contenían 25 mL de solución de Pb (II) de concentración de 2,0 mgL⁻¹. El pH, se ajustó a. 4,2; 5,2 y 6,2 unidades. Todos los experimentos se realizaron bajo agitación en zaranda a 150 rpm durante 1 h, a temperatura ambiente (32 °C).

El cálculo de la eficiencia de bioadsorción se determinó según la ecuación 1.

$$EBA = (([Pb_0] - [Pb_f]) / [Pb_0]) \cdot 100 \quad (1)$$

Donde: Pb_0 = concentración de plomo inicial en la solución acuosa; Pb_f = concentración de plomo final en la solución acuosa.

La determinación de la capacidad de adsorción (Q_e) fue evaluada según ecuación 2.

$$Q_e = (C_0 - C_e) / X \quad (2)$$

donde: Q_e es la capacidad de adsorción de Pb (II) por las biomásas evaluadas, expresada en mg/g biomasa seca; C_0 y C_e son las concentraciones de Pb (II) en disolución inicial y disolución final luego del contacto con el bioadsorbente respectivamente, expresadas en mgL⁻¹; X es la concentración de biomásas, expresada en g de células secas por L⁻¹.

Análisis estadístico de los resultados

Los datos fueron procesados por el programa estadístico Statgraphics plus, versión 5.1. Todos los gráficos fueron realizados utilizando el Microsoft Excel versión 2003.

Se realizó un análisis de varianza simple (ANOVA-S), tomando como factor la variable: pH y como variables dependientes: porcentaje de eficiencia de remoción (EBA) y capacidad de adsorción (Q_e).

● Resultados y discusión

La bioadsorción es una tecnología basada en la recuperación de metales, que utiliza biomásas de organismos vivos y no vivos como bacterias, hongos, levaduras, microalgas, plantas, etcétera. Ocurre cuando los cationes de los metales se unen por interacciones electrostáticas, a los sitios aniónicos que se encuentran en la pared celular de los citados materiales adsorbentes. Estos sitios que sirven como centros activos se encuentran ubicados en los grupos carboxilo, hidroxilo, amino, imino, sulfónico, que forman parte de la estructura molecular de la mayoría de los polímeros de origen biológico /21/.

Estudio del pH óptimo de bioadsorción

El pH es el parámetro más importante a tener en cuenta en el proceso de bioadsorción, este afecta la solubilidad de los metales o la activación de los grupos funcionales en la biomasa, por lo tanto la interacción de los cationes metálicos con los sitios de unión de la biomasa es muy sensible a los valores de este parámetro.

Se ha demostrado que este puede modificar la adsorción de los metales dependiendo del tipo de biomasa y del sorbato empleado.

El pH de la solución tiene un efecto significativo en la capacidad de biosorción de las biomazas microbianas, debido fundamentalmente al fenómeno de protonización que ocurre a bajos valores de pH y al efecto del mismo en la química de la solución; por lo que, la capacidad de adsorción puede verse afectada por el pH.

Los sitios de unión más potenciales en los microorganismos son los grupos: carboxilos, aminas, fosfatos, sulfatos e hidroxilos. El aumento de estos sitios disponibles a grupos funcionales, se puede realizar mediante el desplazamiento de protones que está en función del pH /22/.

La figura 1 y la tabla 1 muestran la variación de la remoción del plomo en función del pH, el cual tiene un efecto notable en la eficiencia de remoción de este metal para las tres cepas estudiadas.

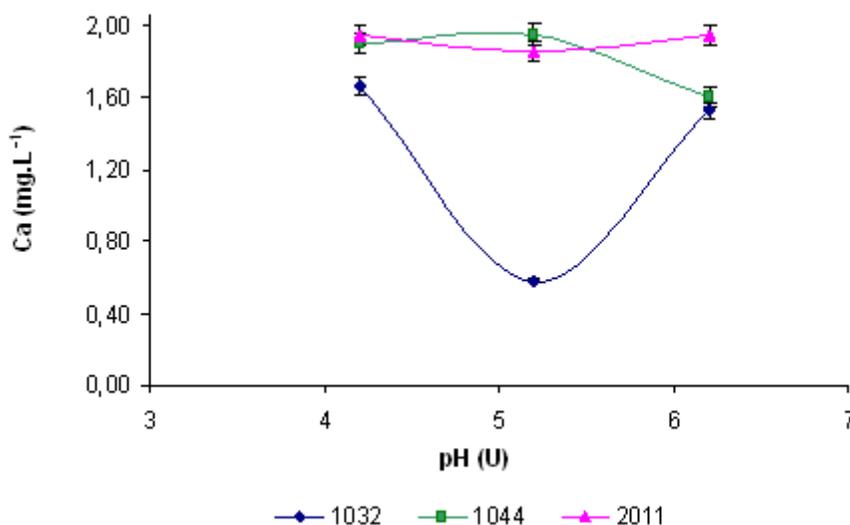


Fig. 1 Variación de la remoción del plomo (II) en función del pH, por las cepas *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011; *Pseudomonas aeruginosa* CCEBI 1044; *Bacillus subtilis* CCEBI 1032.

TABLA 1. PARÁMETROS OBTENIDOS DE LA ADSORCIÓN DE PB (II) POR LAS CEPAS ENSAYADAS A 3 NIVELES DE PH

pH (U)	CCEBI 1032		CCEBI 1044		CCEBI 2011	
	C _e (mg·L ⁻¹)	ER (%)	C _e (mg·L ⁻¹)	ER (%)	C _e (mg·L ⁻¹)	ER (%)
4,2	0,34	83,1	0,10	95,0	0,06	97,2
5,2	1,42	29,1	0,05	97,4	0,14	93,0
6,2	0,47	76,6	0,40	80,2	0,06	97,2

Leyenda: Ce- concentración de Pb (II) remanente en solución donde se ha alcanzado el equilibrio; ER- eficiencia de remoción; *Bacillus subtilis* CCEBI 1032; *Pseudomonas aeruginosa* CCEBI 1044; *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011.

En el ensayo de adsorción de plomo utilizando la biomasa obtenida a partir de la cepa *Bacillus subtilis* CCEBI 1032, se alcanza el mayor valor de bioadsorción de plomo ($1,66 \text{ mgL}^{-1}$) al pH de 4,2 unidades, este valor desciende hasta $0,58 \text{ mgL}^{-1}$ a pH 5,2 unidades y luego hay un incremento en los valores de bioadsorción ($1,53 \text{ mgL}^{-1}$) a pH 6,2.

Estadísticamente no existen diferencias significativas en la cantidad de plomo removida entre los valores de pH de 4,2 y 6,2 unidades, pero estos dos valores sí difieren significativamente con lo obtenido para el pH 5,2 U. Por la coincidencia con los resultados obtenidos por otros autores para el pH óptimo de adsorción de metales por bacterias de género *Bacillus*, se considera que el valor de pH al cual se obtiene mejores resultados en el proceso de bioadsorción es a 4,2 U y que la disminución del contenido de plomo en solución al valor de pH de 6,2 U puede estar asociado no solo al fenómeno de adsorción sino también a procesos de precipitación de plomo.

Fein *et al.* en 1997, realizaron un estudio donde se cuantificó la cantidad de metales pesados adsorbidos por la pared celular de *Bacillus subtilis*, demostrándose que esta bacteria es capaz de adsorber cadmio, cobre y plomo a diferentes valores de pH, siendo 4,2 unidades el valor de pH óptimo para la adsorción de plomo /21/.

Según Wightman y Fein (2005), la pared celular de *Bacillus subtilis* tiene capacidad para adsorber hierro a valores de pH cercanos a 4 U, pero garantizando con tratamientos previos que no ocurra protonación, y a la vez competencia por los sitios activos de las superficies celulares /23/.

De literatura es conocido que las levaduras son capaces de remover metales pesados presentes en soluciones acuosas, por esto a pesar de no existir reportes del género *Kluyveromyces*, en esta investigación se determinó la capacidad que ésta presenta para la adsorción de plomo a los tres niveles de pH estudiados.

Los resultados obtenidos demuestran que *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 es capaz de adsorber plomo a los tres niveles de pH ensayados, logrando remoción superior al 90 % del plomo II presente en solución.

Independientemente de que existan diferencias estadísticamente significativas en los resultados mostrados entre pH 5,2 con 4,2 y 6,2 unidades, remoción superior a pH 4,2 y 6,2 unidades (97,2 %) y más baja a pH 5,2 unidades (93 %), los resultados sugieren que *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 posee potencialidades para la remoción de plomo en el intervalo de pH de 4,2 a 6,2 unidades.

Estos resultados coinciden con lo reportado por varios autores acerca de la capacidad de adsorción de metales por cepas de hongos y levaduras; tal es el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, la cual posee capacidad de adsorber plomo /24/, destacando que el pH de 6,2 unidades fue el óptimo para la bioadsorción de este metal en soluciones de 20 mgL^{-1} , resultados que coinciden con el pH al cual *K. marxianus* CCEBI 2011 obtuvo los mejores valores de adsorción. Sin embargo, otro estudio realizado /25/, con la misma cepa de *S. cerevisiae*, difiere de lo reportado por los autores antes mencionados, lo que evidencia que son diversos los factores que influyen sobre el proceso de bioadsorción de metales.

Autores en estudios realizados sobre el efecto que provocan las condiciones de operación en la biosorción de plomo II, cadmio II y cromo III en solución residual por *S. cerevisiae*, a un rango de pH entre 3 y 5 unidades, mostraron que la capacidad de biosorción de esta levadura se incrementó con el aumento del pH, siendo más alta a pH de 5,0 U para plomo II /26/.

Lo anterior expuesto puede estar dado a que la pared celular de las levaduras está compuesta fundamentalmente por β -glucanos y mananos. Las mananoproteínas, glicoproteínas ricas en mananos, se encuentran alrededor de la capa interna que consiste en β -(1,3) glucanos y β -(1,6) glucanos, además de contener quitina en su composición. Esta compleja estructura posibilita una mayor disponibilidad de sitios para la adsorción /27/.

Para el caso de *Pseudomonas aeruginosa* CCEBI 1044, se obtuvieron los mayores valores de remoción de plomo a pH igual a 5,2 U. Estos resultados concuerdan con lo reportado por los autores de las bibliografías consultadas, donde existen reportes de la capacidad de adsorción de metales pesados por

diferentes especies del género *Pseudomonas*. Lin y Lai en el 2006, evaluaron la capacidad de adsorción de metales pesados por células inactivadas (muertas por calor) de *Pseudomonas aeruginosa*, se observó que estas no fueron capaces de bioadsorber diferentes metales, incluido el plomo, a un pH por debajo de tres unidades, sin embargo cuando el pH se elevó significativamente, incrementó la capacidad de inmovilizar estos metales pesados /28/.

Otra especie perteneciente a este género, reportada por su capacidad de adsorber metales, es *Pseudomonas aureofaciens*, la cual mostró los mayores valores de remoción de cobre a valores de pH de 5,5 unidades /29/.



Conclusiones

Se demostró que el pH influye en la capacidad de adsorción de plomo II por la biomasa seca de las cepas utilizadas.

Los mejores resultados de remoción por la biomasa de *Bacillus subtilis* CCEBI 1032 y *Pseudomonas aeruginosa* CCEBI 1044, se logra a valores de pH de 4,2 y 5,2 unidades respectivamente.

***Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 posee potencialidades para remover plomo II en los tres niveles de pH ensayados, demostrando ser la biomasa más efectiva en las condiciones ensayadas.**



Bibliografía

1. CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O. "Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana". *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 2000. 42, 131-141.
2. "Plomo: Propiedades químicas y efectos sobre la salud y el medio ambiente". en: <http://www.lennotech.com/espanol/tabla-peiodica/Pb.htm>. Marzo 2006.
3. DEMIR, A., M. ARISOY. "Biological and chemical removal of Cr (VI) from waste water: cost and benefit analysis". *Journal of Hazardous Materials*. 2007. 147, 275-280.
4. ZOBOLIS, A.I., M. X. LOUKIDOU, K. A. MATIS. "Biosorption of Toxic Metals from Aqueous Solutions by Bacteria Strains Isolated from Metal-Polluted Soils". *Process Biochemistry*. 2004. 39, 909- 916.
5. LIM, P.E., K. Y. MAK, N. MOHAMED, A. M. NOOR. "Removal and Speciation of Heavy Metals Along the Treatment Path of Wastewater in Subsurface-Flow Constructed Wetlands". 2003. *Water Science and Technology*. 48, 5, 307-313.
6. VAN VEEN, E., N. BURTON, S. COMBER, M. GARDNER. "Speciation of Copper in Sewage Effluents and its Toxicity to *Daphnia magna*". *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2002. 21, 275.
7. VOLESKY, B., Z. R. HOLAN. "Biosorption of Heavy Metals". *Biotech. Prog.* 1995. 11, 235-250.
8. GADD, G. M. "Bioremedial Potential of Microbial Mechanisms of Metal Mobilization and Immobilization". *Current Opinion in Biotechnology*. 2000. 11, 271-279.
9. BARRIONUEVO, M., *et al.* "Tratamiento Biológico de efluentes industriales con contenido en metales: factores a tener en cuenta para un diseño eficiente". *Química Viva*. 2009. 2, 8. 106-124.
10. MENDOZA, J.C. "Biosorción de Cromo, Arsénico y Plomo de soluciones acuosas por cultivos bacterianos en suspensión". *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias*. 2010. 1, 2, 67-73.
11. Lloyd, J. R., D. R. Lovley. "Microbial Detoxification of Metals and Radionuclides". *Current Opinion in Biotechnology*. 2001. 12, 248-253.
12. GADD, G. M. "Microbial Influence on Metal Mobility and Application for Bioremediation". *Geoderma*. 2004. 122, 109-119.
13. AHLUWALIA, S. S., D. GOYAL. "Microbial and Plant Derived Biomass for Removal of Heavy Metals from Wastewater". 2007. *Bioresource Technology*. 98, 12, 2243-2257.
14. GUIBAUD, G., *et al.* "Sorption of Cd (II) and Pb (II) by Exopolymeric Substances (EPS) Extracted from Activated Sludges and Pure Bacterial Strains: Modeling of the Metal/Ligand Ratio Effect a Role of the mMineral Fraction". 2009. *Bioresource Technology*. 100, 2959-2968.
15. GUTIÉRREZ, M., L. GONZÁLEZ, E. SÁNCHEZ, D. MELLADO. "Biosorción de Pb+2, por biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*. 2005". Informe de Investigación. Laboratorio de Investigación de Química y Bioquímica Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, México.
16. FONSECA, G. G., E. HEINZLE, C. WITTMANN, A. K. GOMBERT. "The Yeast *Kluyveromyces marxianus* and its Biotechnological Potential". *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008. 79, 3, 339-354.
17. PÉREZ, R. M. *et al.* "Biosorption of Chromium, Copper, Manganese and Zinc by *Pseudomonas aeruginosa* AT18 Isolated from a Site Contaminated with Petroleum". *Bioresource Technology*. 2009. 100, 1533-1538.
18. XU, J. *et al.* "Characterization of Metal Removal of Immobilized Bacillus strain CR7 Biomass from Aqueous Solutions". *Journal of Hazardous Materials*. 2011. 187, 450-458.
19. APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20th Edición.. Washington D.C. USA. 1998. 1193.

20. JONG, T., D. L. PARRY. "Adsorption of Pb²⁺, Cd, Zn, Ni, Fe y As on bacterially produce metal sulfides". *Journal of Colloid and Interface Science*. 2004. 275, 61–71.
21. FEIN, J., *et al.* "A chemical Equilibrium Model for Metal Adsorption Onto Bacterial Surfaces". *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 1997. 61, 16, 3319-3328.
22. GUPTA, R. *et al.* "Microbial Biosorbents: Meeting Challenges of Heavy Metal Pollution in Aqueous Solutions". *Current Science*. 2000.78, 8.
23. WIGHTMAN, P. G., J. B. FEIN. "Iron adsorption by *Bacillus subtilis* Bacterial Cell Walls". *Chemical Geology*. 2005. 216, 177–189.
24. PALACIOS, E., L. VILLALOBOS. "Biosorción de metales pesados en solución acuosa mediante la biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*". Tesis de Licenciatura en Ciencias Farmacéuticas. Universidad de las Américas Puebla, México. 2007.
25. PAURO, J.J. *et al.* "Estudios de bioadsorción de plomo por *Saccharomyces cerevisiae* en soluciones acuosas". *Rev. Colomb. Biotecnol.* 2009. XI, 1, 33-39.
26. RODRÍGUEZ, M. E. *et al.* "Efectos de las Condiciones de Operación Sobre la Biosorción de Pb²⁺, Cd²⁺ y Cr³⁺ en Solución por *Saccharomyces cerevisiae* Residual". *Información Tecnológica*. 2008.19, 6.
27. YOSHIDA, Y. *et al.* "Side-Chain Structure of Cell Surface Polysaccharide, Mannan, Affects Hypocholesterolemic Activity of Yeast". *J. Agric. Food Chem.* 2009. 57,17.
28. LIN, C. C., Y. T. LAI. "Adsorption and Recovery of Lead (II) from Aqueous Solutions by Immobilized *Pseudomonas aeruginosa* PU21 beads". *J. Hazard. Mater.* 2006.137, 99–105.
29. González, A. G. "Adsorption of Copper on *Pseudomonas aureofaciens*: Protective Role of Surface Exopolysaccharides". *Journal of Colloid and Interface Science*. 2010. 350, 305–314.