

PRECIPITACIÓN ENZIMÁTICA DEL CADMIO UTILIZANDO BACTERIAS NATIVAS DEL GÉNERO *CITROBACTER*.

R. RODRÍGUEZ M* , N. E. RAMÍREZ, L. I. MOGOLLÓN and F. ZAUCHER‡.

‡ Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander.
Ecopetrol - Instituto Colombiano del Petróleo, A.A. 4185 Bucaramanga, Santander, Colombia.
e-mail:lmogollo@infantas.ecp.com

Se aislaron bacterias nativas del género *Citrobacter*, de aguas y suelos contaminados con metales pesados. La selección de los microorganismos se realizó con base en la actividad de la enzima fosfatasa, con lo cual se obtuvieron cepas de *Citrobacter* que cultivadas en batch, presentan hasta cinco veces más actividad enzimática que las cepas de cultivos de colección y las reportadas previamente. Los resultados de captura muestran que la remoción del cadmio se incrementa a través del tiempo de exposición de las células cuando éstas se encuentran en presencia del sustrato de la enzima, glicerol-2-fosfato. Al elevar el pH de la solución a valores entre 8-10 aumenta la afinidad de la enzima por el metal. La precipitación se da por la unión pasiva del cadmio a los sitios reactivos de la pared celular, y por la acumulación "in situ" del metal como fosfato insoluble sobre las células microbianas.

Native strains were isolated from heavy metal contaminated waters and soils. The microorganism selection was conducted based on the quantification of the phosphatase enzyme activity. *Citrobacter* cells in batch studies showed five times more enzymatic activity than that of available collection cultures and the reported values in previous studies using other strains. Uptake results show that cadmium removal increases with cell exposure time when the cell are in the presence of the enzymes substrate glycerol 2- phosphate. Metal enzyme affinity improves by increasing solution pH to 8-10. Precipitation is caused by passive bounding of cadmium to reactive groups at the cell wall and the "in situ" metal accumulation as nonsoluble phosphate on microbial cells wall.

Palabras claves: *citrobacter spp*, fosfatasa, cadmio, biosorción.

* A quien se debe enviar la correspondencia.

INTRODUCCIÓN

Dentro del grupo de metales pesados considerados por la US EPA, 1980 (United States Environmental Protection Agency) como altamente peligrosos clase A se encuentra el cadmio, el cual, aún en cantidades traza, presenta efectos tóxicos sobre cualquier sistema de vida. El cadmio es utilizado en forma industrial en la fabricación de pigmentos y pinturas, fungicidas, electrolitos, tetraetilplomo y reactores nucleares entre otros. Además, se encuentra en algunas aguas de producción y de refinación (Plunkett, 1978; Badillo, 1988).

Dado que este metal posee un tiempo de vida media largo, se acumula sobre cada uno de los niveles de la cadena alimenticia y presenta diferentes efectos sobre los miembros de la biota: puede ser asimilado por las plantas y provocar marchitamiento, causa la muerte en los peces al depositarse en las branquias, y se acumula en los tejidos del hombre principalmente en hígado y riñón con efectos cancerígenos (Niosh, 1976; Carson *et al.*, 1987; Friedland, 1990).

En la actualidad, existen varias tecnologías para el tratamiento de efluentes que contienen metales contaminantes. Las más usadas son de tipo físico-químico: adsorción sobre carbón activado, precipitación química, intercambio iónico, entre otras. Sin embargo, a pesar de que con estas tecnologías se logran buenas remociones, los altos costos asociados con su implementación y desarrollo las hacen poco factibles de utilizar. Además, involucran nuevos problemas operativos y ambientales al generar otras formas de desecho.

Otras alternativas las constituyen los sistemas de tipo biológico, las cuales implican la utilización de microorganismos o sus componentes celulares en la recuperación de iones metálicos contaminantes. Estos procesos presentan ventajas adicionales sobre las formas de tratamiento convencionales: el metal es capturado en forma eficiente y rápida; la sorción del metal es selectiva, esto es, permite remover específicamente un metal cuando esta formando parte de una mezcla; la biomasa puede ser producida a bajo costo y ser reutilizada. (Volesky, 1990).

Aickin y Dean (1977) describieron el sistema fosfatasa de las bacterias del género *Citrobacter spp* utilizado en la precipitación de metales. La acumulación del metal es posible gracias a la acción de la enzima fosfatasa de tipo ácido, que resiste en forma atípica

concentraciones limitantes de metales pesados.

El proceso de recuperación del metal se lleva a cabo por el depósito y acumulación "in situ" del fosfato metálico insoluble, firmemente unido a la pared celular. El aporte localizado de fosfato inorgánico se obtiene por la hidrólisis que cataliza la enzima fosfatasa sobre un donador de fosfato orgánico, añadido a la solución metálica (Macaskie *et al.*, 1995).

En este trabajo se evaluó la factibilidad de recuperar cadmio a partir de una solución sintética, mediante la utilización de bacterias nativas del género *Citrobacter* que presenten una elevada actividad de la enzima fosfatasa. Los resultados logrados servirán de soporte científico a investigaciones relacionadas con el manejo del Cd y son un aporte a la búsqueda de una solución sencilla, económica y segura para el tratamiento de los residuos acuosos contaminados por éste y otros metales pesados.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Aislamiento e identificación de los microorganismos

Las bacterias del género *Citrobacter* fueron aisladas a partir de diversas matrices, entre las que se incluyen aguas y suelos contaminados con metales pesados.

Las muestras se cultivaron en caldo Lauril Sulfato, dejándolas en agitación a 150 rpm, a 303 K (30 °C) durante 18 horas. Transcurrido este tiempo se tomó una submuestra, se sembró por dilución en placas con agar MacConkey y se incubó a 303 K por 24 horas.

Las colonias lactosa positivo fueron nuevamente repicadas en agar MacConkey, luego se sembraron en agar nutritivo y al final se cultivaron tres veces consecutivas en agar citrato de Simmons. En cada uno de los pasos se hizo coloración de Gram y se observó la morfología de las bacterias. La identificación de los microorganismos con las características preliminares del género *Citrobacter*, se realizó utilizando el sistema de identificación API 20E (Analytical Profile Index, 1992).

Además de las cepas nativas procedentes de sitios contaminados con metales, en este estudio se evaluó la cepa 3.393, proveniente del Cultivo de Colección de Checoslovaquia, CCM y la cepa Andes, del Centro de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad de

los Andes, CIMIC.

Condiciones del crecimiento

Las bacterias se mantuvieron en agar nutritivo, y para su crecimiento se utilizó un medio salino (MS1) cuya composición fue la siguiente, g·dm⁻³ (g/l): tampón Tris, 12; glicerol 2,0; (NH₄)₂SO₄, 0,96; glicerol-2-fosfato (G-2-P), 0,67; KCl, 0,62; MgSO₄*7H₂O, 0,063; FeSO₄*7H₂O, 0,00032. El pH del medio se ajustó a 7,0 con HCl 2M (Macaskie and Dean, 1984b).

Para obtener biomasa se crecieron lotes de 400 cm³ en agitación rotacional 150 rpm a 303 K, utilizando como inóculo 40 cm³ de un cultivo crecido durante la noche en medio salino. Las células fueron recolectadas por centrifugación a 6.000 rpm/15 min y 277 K, lavadas en solución salina isotónica 0,85% y almacenadas en refrigeración por 15 días, durante los cuales se emplearon en el ensayo de la actividad enzimática y de la captura del metal.

Determinación de la actividad enzimática

La actividad de la enzima fosfatasa se calculó por la liberación del p-Nitrofenol a 405 nm (nanómetros), a partir del sustrato p-Nitrofenil fosfato, tal como se ha reportado previamente (Hambling *et al.*, 1987).

Para el ensayo se tomó 1 cm³ de bacterias de concentración 1,2 g·dm⁻³ en peso seco, se diluyó en 10 cm³ de tampón Tris 0,2 M pH 7,0. A esta solución se le adicionó 0,1 cm³ de MgCl₂*6H₂O, 0,15 mM y se dejó en reposo 15 min /303 K. La reacción se inició al adicionar 2 cm³ de p-Nitrofenil ortofosfato 45,6 mM, el cual se dejó durante 5 minutos. La reacción finalizó al adicionar 4 cm³ de NaOH a 2 cm³ de la mezcla. El color amarillo-naranja dado por la liberación del p-Nitrofenol se determinó espectrofotométricamente a 405 nm.

El cálculo de unidades de enzima producida se realizó con base en la siguiente ecuación (Hambling *et al.*, 1987):

$$\text{Actividad específica de la enzima (unidades)} = \frac{\text{nmol de p - Nitrofenol liberado/ minuto}}{\text{mg de proteína bacteriana}}$$

La concentración de proteína se calculó por el método modificado de Lowry, según el manual de procedimientos Bio-rad (1988), basado en la reacción

de la proteína con la solución alcalina de tartrato de cobre, y la subsecuente reducción del reactivo de Folin.

Cinética de crecimiento y producción de la enzima fosfatasa

El ensayo, que tuvo como objeto cuantificar la actividad de la enzima durante el tiempo de generación de las células, se realizó empleando la cepa nativa que presentó mayor rendimiento enzimático. Se tomaron 11 erlenmeyes de 125 cm³, a cada uno de los cuales se le adicionó 50 cm³ de medio salino y 0,5 cm³ de un cultivo de 12 horas. Las muestras se dejaron en agitación rotacional, 150 rpm, a 303 K con un periodo de incubación fijo para cada uno de los cultivos: 4, 7, 9, 10, 11, 12, 15, 24, 32, 48 y 56 horas.

Pasado el tiempo respectivo, las células fueron centrifugadas y resuspendidas en NaCl, 0,9%. Después se realizó el ensayo de la actividad enzimática y la concentración de proteína microbiana.

Ensayos de biosorción en batch

En la realización de los ensayos de captura del metal, se estudiaron las siguientes variables: pH, tiempo, concentración de metal y de la presencia de la fuente donadora de fosfato orgánico.

La concentración de bacterias *Citrobacter* utilizada en cada uno de los ensayos fue de 1,2 g·dm⁻³ en peso seco. La fuente de metal utilizada se preparó a partir de una solución tritisol de cloruro de cadmio, Merck, ajustando a la concentración requerida en cada prueba. El medio de reacción fue tampón Tris 0,1M, suplementado con G-2-P, 2 mM. Para todos los ensayos, el volumen final fue de 50 cm³.

La determinación del metal fue realizada en un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer 5.100. Los análisis se hicieron de acuerdo con los métodos estándar, propuestos en el manual de Perkin Elmer.

Los resultados se presentan como capacidad de captura del metal, calculados a partir de la ecuación:

$$q = \frac{V (C_i - C_f)}{M}$$

donde, q es la captura del metal (mg metal capturado/g de biomasa en peso seco), V : volumen de reacción (dm³), C_i : concentración inicial de metal (mg·dm⁻³) C_f : concentración final de metal (mg·dm⁻³), y M :

gramos de biomasa en peso seco.

Microscopía electrónica de barrido y análisis elemental de rayos X (SEM - EDX)

Con el fin de verificar que la acumulación y captura del metal sobre la superficie de las células se da en forma de fosfato de cadmio, se tomaron bacterias del género *Citrobacter* expuestas al metal y se analizaron por microscopía electrónica empleando un microscopio de barrido (SEM) Cambridge Instruments Stereoscan 240, equipado con un sistema analítico de Rayos X EDX. Se utilizó la modalidad backscatter la cual permitió determinar zonas de alta densidad electrónica donde se acumulan de preferencia los elementos pesados.

Los agregados celulares ("pellets") o partículas de biosorbente fueron removidos en forma aséptica del medio de reacción (ensayos de sorción). Luego de una deshidratación convencional en concentraciones crecientes de metanol, la biomasa fue sometida a secado de punto crítico y recubiertas con oro para su posterior observación (Cobaleda y Pachón, 1992).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de los microorganismos

De los diferentes sitios en los que se tomaron muestras de aguas y suelos contaminados con metales pesados, se aislaron nueve cepas con las características morfológicas del género *Citrobacter*. La identificación de las cepas se llevó a cabo mediante pruebas bioquímicas empleando el sistema API 20E. En la Tabla 1 se presentan los resultados obtenidos.

Las nueve cepas fueron identificadas como *Citrobacter freundii*, las cuales se reunieron en cuatro grupos debido a que entre éstos se presentaron variaciones en la asimilación de uno o más compuestos. Puede observarse que las cepas R3 y R8, a diferencia de las demás, utilizan inositol, mientras que las cepas CP1, CT1, emplean la arginina. Por su parte, el *Citrobacter VO* y CT2 transforman la ornitina, pero no son capaces de asimilar la sacarosa como fuente de carbono.

Actividad enzimática de las bacterias *Citrobacter*.

El ensayo permitió seleccionar la mejor cepa productora de la enzima fosfatasa a partir de las bacterias

aisladas y caracterizadas como *Citrobacter freundii*. En la Tabla 2 aparecen las velocidades máximas de p-Nitrofenol y las concentraciones de proteína bacteriana obtenida. Se puede apreciar que tanto el p-Nitrofenol producido en la reacción de hidrólisis del p-Nitrofenilfosfato como la actividad de la enzima fosfatasa, varían en todos los microorganismos utilizados, aún entre cepas que presentaron igual patrón bioquímico en el sistema API 20E.

La cepa CP1 fue la que mayor actividad enzimática presentó, alcanzando valores que oscilan entre 1.570 y 1.680 unidades. Otras cepas como la R8 y CT1 mostraron una actividad entre el 70% y 72% con relación al valor presentado por el *Citrobacter* CP1. Sin embargo, cepas como la R1 y CP2 mostraron limitada capacidad de expresión de la enzima, con porcentajes del 4,38% al 3,88%, respecto a la mejor cepa.

En el ensayo se incluyeron dos cepas provenientes de colección de cultivos, *Citrobacter* 3.393 y *Citrobacter* Andes. La Figura 1 permite apreciar la superioridad que tienen varias cepas nativas frente a estas cepas de colección. Para la cepa CCM 3.393 se obtuvo un valor promedio de enzima de 693,43 unidades y para el *Citrobacter* Andes 88,8 unidades, lo cual equivale al 42,8% y 5,47% de actividad frente a la cepa CP1.

Macaskie (1990), trabajando con células precultivadas en batch y utilizando una cepa la cual denominó N14, obtuvo 330 unidades de actividad enzimática. En este trabajo se logró obtener un promedio de 1.620 unidades con la cepa CP1, mostrando de esta manera que la cepa nativa presenta una elevada actividad enzimática en comparación con bacterias de cultivos de colección y frente a las cepas reportadas en trabajos anteriores.

Producción de la enzima a través del tiempo de cultivo

El estudio se realizó empleando la bacteria *Citrobacter* CP1, que produjo la mayor actividad enzimática. La producción de la enzima se incrementa con la concentración de proteína bacteriana en el cultivo, alcanzando la máxima actividad al final de la fase logarítmica (Figura 2). A las 12 h se obtienen niveles de enzima que oscilan entre 1.500 a 1.600 unidades con un valor de proteína de 2,68 mg, siendo estos valores similares a los presentados en la Figura 1.

Tabla 1. Bioquímica de los microorganismos identificados como *Citrobacter freundii*.

PRUEBA BIOQUÍMICA	Nombre del Microorganismo			
	Citrob. R1-R2 CP2	Citrob. R3-R8	Citrob. CP1-CT1	Citrob. VO-CT2
O-Nitrofenil galactiósido	+	+	+	+
Arginina	-	-	+	-
Lisina	-	-	-	-
Ornitina	-	-	-	+
Citrato	+	+	+	+
H ₂ S	+	+	+	+
Inositol	-	+	-	-
Sorbitol	+	+	+	+
Ramnosa	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	-
NO ₂	+	+	+	+
N ₂	-	-	-	-
MacConkey	+	+	+	+

Se utilizó el sistema de identificación API 20E. (+) prueba positiva (-) prueba negativa.

Tabla 2. Concentración de proteína bacteriana y valores de p-Nitrofenol liberados por la enzima fosfatasa de cepas nativas y de cultivos de cultivos de colección

CEPA	Proteína (mg)	p-Nitrofenol (nmol/min)	% de Actividad respecto a la cepa CP1
CP1	0,85	1381,9	100,0
CT1	0,65	763,5	72,2
R8	0,48	552,6	71,5
R3	0,94	721,1	47,5
CCM3393	0,46	318,7	42,8
R2	0,88	326,1	22,6
CT2	0,49	174,0	21,7
V.O	0,49	78,2	9,9
ANDES	0,54	47,7	5,5
R1	0,60	42,7	4,4
CP2	0,57	35,9	3,9

Inmediatamente, se inició la fase estacionaria, la actividad de la enzima empezó a decaer, y alcanzó valores promedio de 880 unidades a las 56 horas de

cultivo. Sin embargo, si las células son colectadas al final de la fase logarítmica y almacenadas por 15 días a 277 K, mantienen su actividad enzimática. Estos resul-

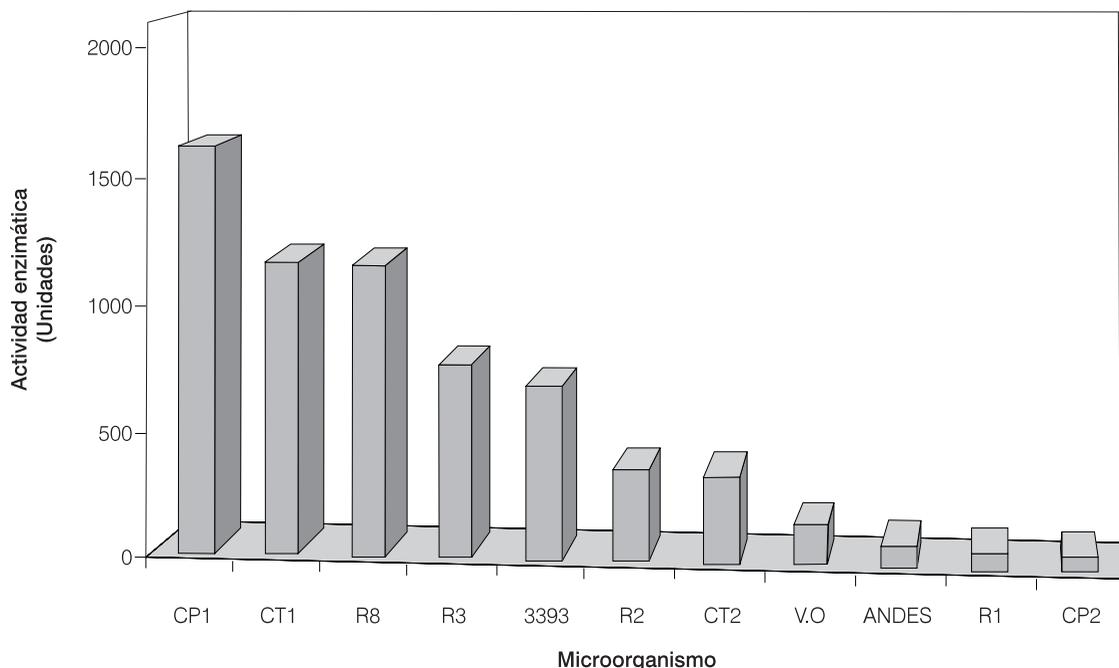


Figura 1. Actividad enzimática de las bacterias *Citrobacter freundii*

tados son similares a los reportados por Macaskie y Dean (1984a), quienes encontraron que células cultivadas en medio libre de metal, pueden almacenarse por largos periodos de tiempo sin que haya disminución en la capacidad de captura del metal, ni de la actividad enzimática.

La producción de la enzima por parte de las células está sujeta a la concentración de carbono disponible en el medio de cultivo. Así, la disminución de la fuente de carbono hasta un estado limitante para las células permite expresar mayor cantidad de enzima (Macaskie, 1990). Esta afirmación se comprueba en el presente trabajo en el que se empleó 1 g de glicerol por dm^3 de cultivo, con el cual se alcanzó una actividad enzimática cinco veces mayor frente a cultivos reportados en los que utilizan un medio enriquecido con 3 $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ de glicerol (Macaskie *et al.*, 1995).

Por otra parte, en cada una de las réplicas del ensayo se presentan variaciones en la actividad enzimática. Al respecto Montgomery *et al.* (1995), explican que factores como el pH del medio y la presión parcial de oxígeno durante el crecimiento del cultivo, son los causantes de las variaciones enzimáticas obtenidas en cultivos en batch y aconsejan el empleo de cultivos continuos para evitar estos inconvenientes, y lograr

concentraciones más estables de enzima.

Influencia del pH en la captura de cadmio.

Los resultados de los experimentos llevados a cabo en este trabajo, muestran que la remoción de cadmio presenta una elevada sensibilidad al variar el pH del medio de reacción.

A pH ácido la captura del metal disminuyó entre el 30% y el 60% respecto de los ensayos realizados a pH neutro (Tabla 3). A bajos valores de pH el fosfato metálico es más soluble, presentándose protonación o aumento del número de iones H^+ , los cuales compiten por los sitios reactivos de la biomasa (Volesky, 1990).

Por otra parte, el HCl requerido para ajustar el pH a valores ácidos, puede formar complejos con el cadmio al aumentar la especiación del metal a través de Cd^{2+} , CdCl^+ y CdCl_2 , y disminuir de esta manera la afinidad por las células bacterianas (Macaskie and Dean, 1984a).

La disminución en la captura del metal a pH bajo es indeseable pero entendible, ya que según Volesky (1990), se requieren soluciones ácidas para eludir y recuperar metales cargados en la biomasa. Sin embargo, se ha reportado que utilizando células con elevada actividad de enzima fosfatasa, se puede superar

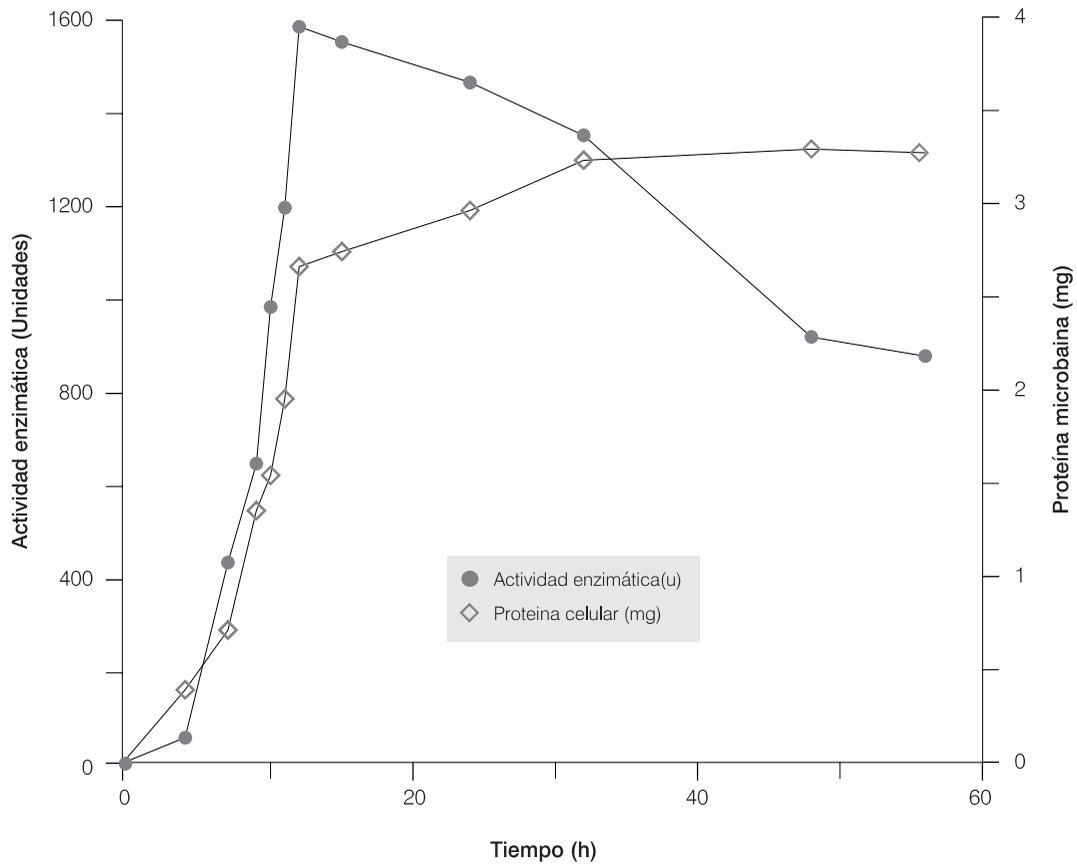


Figura 2. Producción de la enzima fosfatasa en función del tiempo de crecimiento del Citrobacter CP1. Se utilizó una solución de tampón Tris (0,1M), que contenía 50 gm^{-3} de Cd, y G-2-p (2mM)

Tabla 3. Efecto del pH en la captura del Cd.

pH	Concentración inicial Cd ($\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$)	Concentración final Cd ($\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$)	Captura del metal mg Cd/g biomasa
4	51,1	45,9	5,1
5	51,0	45,2	5,7
6	51,1	40,8	10,2
7	50,7	33,9	16,8
8	47,8	24,0	23,7
9	46,0	18,3	27,6
10	45,0	13,1	31,8

Las células se incubaron en tampón Tris (0.1M), con 50 gm^{-3} de Cd, G-2-P (2mM) y se ajustó al pH respectivo. La concentración de células fue $1,2 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$.

este problema y lograr que el metal precipite como fosfato metálico, aún a pH bajo (Macaskie *et al.*, 1995).

El límite superior de pH para la liberación de la enzima fosfatasa se encuentra entre 8,5 y 9,0 (Montgomery *et al.*, 1995). Por lo tanto, cuando se eleva el pH de la solución se incrementa la afinidad de la enzima por el metal. Los resultados muestran que a pH 4 la capacidad de captura del cadmio fue 5,17 mg, mientras que a pH 9 fue de 27,63 mg Cd/g biomasa seca (Tabla 3). Según Macaskie (1990), para metales con alta solubilidad de fosfato es necesario trabajar a pH's elevados, con el fin de lograr una máxima captura del metal. El pH superior para lograr la acumulación de cadmio es 9,25.

Por otra parte, los controles de los experimentos a pH superiores a 8 (datos no tabulados), muestran una leve disminución en la concentración inicial del metal, lo cual corresponde a una precipitación espontánea como consecuencia de la adición de NaOH utilizado en el ajuste del pH. En este caso el metal estaría precipitando como CdOH (Hinchee *et al.*, 1995).

Influencia del tiempo en la precipitación de cadmio.

Los resultados de la Figura 3 revelan que la captura de cadmio es exponencial a través del tiempo del ensayo, al emplear células precultivadas en un medio libre de metal y en presencia de G-2-P en el buffer de reacción.

Transcurridas dos horas de la exposición de las células, la captura del metal fue de 3,63 mg/g de bacterias en peso seco. Sin embargo, la remoción del metal

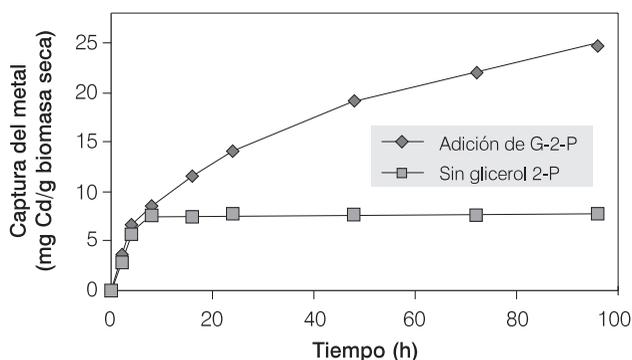
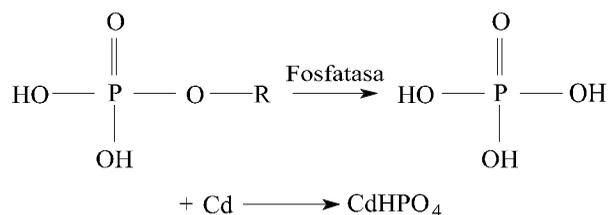


Figura 3. Acumulación de Cd a través del tiempo de exposición de las células *Citrobacter* CP1.

aumentó progresivamente con el tiempo hasta alcanzar los 24,6 mg de Cd/g de biomasa a las 96 h del ensayo. Lo anterior indica que la enzima continúa funcionando en las células en reposo, liberando el HPO_4 de un fosfato orgánico y precipitando el metal a la célula en forma de MHPO_4 (Macaskie and Dean 1984b; Macaskie *et al.*, 1987). La enzima funciona como un biocatalizador que se autorregenera, y a la que, suministrándole fosfatos orgánicos, precipita el metal continuamente por largos periodos de tiempo, sin que exista disminución en la eficiencia de la captura (Macaskie 1990).

Según Ehrlich (1996), el fósforo unido a una molécula orgánica, como en el caso del G-2-P, se libera mediante el proceso de mineralización en el que se produce clivaje hidrolítico catalizado por enzimas del tipo fosfatasa. La fosfomonoesterasa ataca las uniones monoéster, liberando fosfato inorgánico el cual precipita los metales como fosfato metálico. La reacción que ocurre es la siguiente:



Las células que se trabajaron en ausencia de G-2-P, sólo acumularon 7,53 mg Cd/g biomasa seca luego de 8 horas de exposición, y permanecieron sin grandes variaciones durante el resto del tiempo. Esta capacidad de captura en ausencia del fosfato, permite establecer que el proceso de remoción de cadmio utilizando células del género *Citrobacter*, puede darse de dos maneras: por una parte la precipitación mediada enzimáticamente, la cual depende de una fuente de fósforo orgánico y, por otra, la unión pasiva del metal a los sitios de la pared celular cargados negativamente, como son los grupos carboxil, fosforil, hidroxil, entre otros. (Aickin and Dean, 1977).

Influencia de la concentración del metal.

La captura de cadmio se incrementa con la concentración del metal a que son sometidas las células. Cuando se emplean 10 gm^{-3} de metal, la concentración final en la solución fue de $6,9 \text{ gm}^{-3}$. Sin embargo, se presentan grandes variaciones en la captura de cadmio,

cuando se emplean 200 gm⁻³. En este caso se logró disminuir hasta 113,6 gm⁻³, correspondiendo a una captura del metal de 85,6 mg Cd/g biomasa seca, (Tabla 4). Reportes anteriores Macaskie y Dean (1984a, b), muestran que para las mismas concentraciones de cadmio, 10 y 200 gm⁻³, se logran capturas de 3,65 y 51,6 mg de Cadmio/g biomasa seca, respectivamente.

Los resultados obtenidos permiten clasificar a las cepas del género *Citrobacter* que fueron aisladas, en el grupo de microorganismos que pueden ser utilizados en procesos de remoción de metales. Macaskie y Dean (1984a) describieron que una cepa debe atrapar el metal en un 1,6% de su peso seco, 16 mg Cd/g biomasa seca, para satisfacer los criterios necesarios de una alta captura de cadmio.

Análisis mediante la técnica instrumental de microscopía electrónica.

En el espectro de rayos X, emitido por las células *Citrobacter* que no estuvieron en contacto con el metal, Figura 4a, sólo se observa un pequeño pico característico del fósforo, que puede estar asociado tal como lo describe Macaskie *et al* (1987), al que normalmente se encuentra en el material biológico.

En el espectro de las células expuestas al metal, Figura 4b, se observa con claridad la presencia de dos picos de similar altura detectados a 2,1 y 3,1 KeV, los cuales corresponden al grupo fosfato y al cadmio, respectivamente. Los resultados encontrados con esta técnica resultan coherentes con los estudios cinéticos realizados con anterioridad (Aickin *et al.*, 1979, Macaskie and Dean, 1982), que favorecen la hipótesis de

la acumulación del metal como fosfato metálico, MHPO₄.

CONCLUSIONES

- Se lograron aislar e identificar bacterias nativas del género *Citrobacter* con una elevada actividad enzimática y con capacidad de remover en forma efectiva el cadmio presente en la solución. La selección de los microorganismos se realizó con base en la producción en batch de la enzima fosfatasa, la cual varió en todos los microorganismos, aun entre los que presentaron igual patrón bioquímico en la identificación. Los mejores valores de enzima se obtuvieron con las cepas CP-1 (1.620 U), CT1 (1.170 U) y R8 (1.159 U). De esta manera, las cepas nativas alcanzaron valores de actividades enzimáticas cinco veces más altos frente a las cepas de cultivos de colección (*Citrobacter* CCM 3.393 y Andes).
- La producción de la enzima fosfatasa por parte de las bacterias del género *Citrobacter*, está condicionada a la cinética de crecimiento, alcanzando su máxima actividad al final de la fase logarítmica.
- Los resultados de los ensayos a diferentes valores de pH en la solución metálica, muestran que éste es un factor primordial en los ensayos de captura. Al elevar el pH de la solución en el rango entre 8 - 10, se incrementa la afinidad de la enzima por el cadmio, obteniéndose mayores remociones de este metal.
- La acumulación del metal se incrementó de manera exponencial con relación al tiempo de exposición de las bacterias. La remoción se realizó en presencia de glicerol-2-fosfato, lo cual permitió la precipitación del metal en un amplio período de tiempo, sin disminuir la eficiencia de la captura.
- La remoción del metal depende de su concentración en el medio de reacción. En los ensayos realizados en batch al incrementar la concentración de cadmio se presentó una elevada captura del metal. Con 200 g·m⁻³ de cadmio, se logran capturar 85,6 mg Cd/g biomasa. Trabajos realizados anteriormente bajo las mismas condiciones sólo reportan capturas de 52 mg Cd/g biomasa. De esta manera, se de-

Tabla 4. Efecto de la concentración del metal en la captura realizada por la cepa bacteriana *Citrobacter* CP1

Concentración inicial cadmio (g·m ⁻³)	Concentración final (g·m ⁻³)	Captura de metal mg Cd/g biomasa
11,1	6,9	4,20
20,8	12,83	7,97
50,4	33,5	16,90
103,6	66,47	37,13
199,2	113,6	85,60

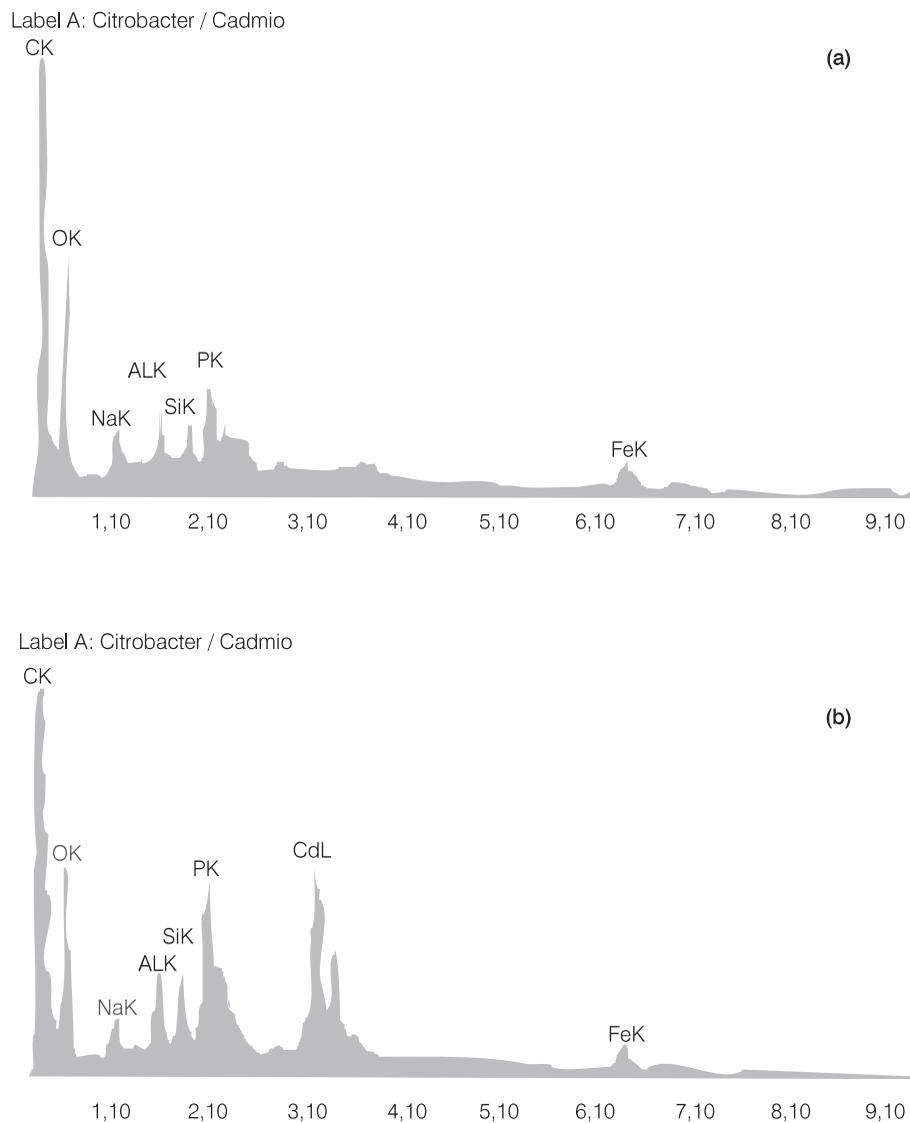


Figura 4. Espectro de Rayos X de las bacterias del género *Citrobacter*.
 (a) Células retiradas antes de la exposición al cadmio;
 (b) Depósito del metal en la superficie de las bacterias.

muestra que las bacterias nativas *Citrobacter*, empleadas en el presente trabajo, remueven en forma efectiva el metal presente en la solución. La precipitación del metal está dado por procesos de biosorción y por la formación de complejos de baja solubilidad como es el fosfato de cadmio.

- Utilizando microscopía electrónica y la sonda SEM-EDX, se demostró que el cadmio efectivamente se acumula sobre la superficie de la células. En el espectro de rayos X se observaron dos picos, uno de fosfato y otro de cadmio, los cuales presenta-

ron similar altura, estableciendo de esta manera que el metal se deposita como fosfato de cadmio (CdHPO_4).

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Industrial de Santander y la Universidad Javeriana a través del programa de Maestría en Microbiología Industrial, de cuyo tema de tesis se deriva el presente artículo.

Al grupo del laboratorio de Biotecnología - ICP, en

especial a la química Amanda L. Mora y a los ingenieros, William Larrota y Rodrigo Torres S.

A Ecopetrol - ICP, que permite la realización de esta clase de investigaciones encaminadas a mantener un ambiente limpio.

REFERENCIAS

- Aickin, R.M. and Dean, A.C.R., 1977. "Lead accumulation by microorganism", *Microbios Letters*, 5:129 - 133.
- Aickin, R. M., Cheetham, A. K. and Skarnulis, A. J., 1979. "Electron microscope studies on the uptake of lead", *Microbios Letters*, 9: 7 - 15.
- Analytical Profile Index, API 20E., 1992. *Enterobacteriaceae and other Gram negative bacteria*, Biomérieux Vitek inc. USA, 10th edition.
- Badillo German, J. F., 1988. "Cadmio", *Curso Básico de Toxicología Ambiental*, Albert Lilia, A.(ed), Mexico, Editorial Limusa: 145 - 169.
- Bio-rad laboratories, 1988. "Total Cellular Protein Determination Using the New DC Protein Assay", *US/EG Bulletin 1770*, California USA.
- Carson, B. L., Ellis III, H. V., and Mccann, J. L., 1987. *Toxicology and Biological Monitoring of Metals in Humans*, Lewis Publishers, INC. 51-58.
- Cobaleda, G. E., Pachón, Z., 1992. "Microscopía electrónica: principios y aplicaciones", *Boletín Técnico del Instituto Colombiano del Petróleo*, 5 (12).
- Ehrlich, H. L., 1996. "Inorganic Hazardous Waste", in *Biotechnology for the Treatment of Hazardous Waste*, Boca Raton: Lewis Publisher/CRC Press: 45 - 47.
- EPA - Environmental Protection Agency, 1980. *Ambient Water Quality Criteria for Cadmium*, Springfield, V.A: National Technical Information Service, PB81-117368.
- Friedland, J., 1990. "The movement of metals through soils and ecosystems", *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects*, Boca Raton, Florida: CRC Press: 8 - 17.
- Hambling S. G., Macaskie, L. E., and Dean, A.C.R., 1987. "Phosphatase synthesis in a *Citrobacter sp.* growing in continuous culture", *Journal of General Microbiology*, 133: 2.743 - 2.749.
- Hinchee, R. E., Means, J. L. and Burris, D. R., 1995. *Bioremediation of Inorganics*, Battelle Press: 1- 16.
- Macaskie, L. E., 1990. "An immobilized cell bioprocess for the removal of heavy metals from aqueous flows", *J. Chem. Tech. Biotechnol*, 49: 357 - 379.
- Macaskie, L. E., and Dean, A.C.R., 1982. "Cadmium accumulation by microorganism", *Environmental Technology Letters*, 3: 49 - 56.
- Macaskie, L. E. and Dean, A. C. R., 1984a. "Cadmium accumulation by a *Citrobacter sp.*", *Journal of General Microbiology*, 130: 53 - 62.
- Macaskie, L. E. and Dean, A. C. R., 1984b. "Heavy metal accumulation by immobilized cells of a *Citrobacter sp.*", *Biotechnology Letters*, 6 (2): 71 - 76.
- Macaskie, L. E., Dean, A. C. R., Cheetham, A. K., Jakeman, R. J. and Skarnulis, A. J., 1987. "Cadmium accumulation by a *Citrobacter sp.* the chemical nature of the accumulated metal precipitate and its location on the bacterial cells", *Journal of General Microbiology*, 133: 539 - 544.
- Macaskie, L. E., Hewitt, C. J., Shearer, J. A. and Kent C. A., 1995. "Biomass production for the removal of heavy metals from aqueous solutions at low pH using growth decoupled cells of a *Citrobacter sp.*", *International Biodeterioration and Biodegradation*: 73 - 92.
- Montgomery, D.M., Dean, A.C.R., Wiffen, P., and Macaskie, L.E., 1995. "Phosphatase production and activity in *Citrobacter freundii* and a naturally occurring, heavy metal accumulating *Citrobacter sp.*", *Microbiology*, 141: 2.433 - 2.441.
- NIOSH., Natl. Inst. Occupational Safety and Health. "Criteria for a Recommended Standard. Occupational exposure to Cadmium", Washington, D.C: US. Government Printing Office, *HEW Publication No (NIOSH)*: 76 - 192.
- Perkin Elmer Corporation, 1992. *Condición estándar para absorción atómica*: 48 - 49.
- Plunkett, E. R., 1978. *Enciclopedia de la química industrial, Manual de Toxicología Industrial*, Bilbao, Ediciones Urmo, Tomo 12: 125 - 127.
- Volesky, B., 1990. "Biosorption and Biosorbents", *Biosorption of Heavy Metals*, Boca Raton CRC Press: 3 - 20.