

UCh-FC
Biotecnología
D 191
C 1



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS

Estudios de medios de cultivo, materiales de soporte y
desarrollo de inóculo industrial, para un proceso de
biosorción de metales desde efluentes mineros

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

por

CARLA MARIETTA BALLESTEROS LEÓN



2005

Santiago-Chile

Director de Memoria: Dr. Davor Cotoras T.



**“ESTUDIOS DE MEDIOS DE CULTIVO, MATERIALES
DE SOPORTE Y DESARROLLO DE INÓCULO
INDUSTRIAL, PARA UN PROCESO DE BIOSORCIÓN DE
METALES DESDE EFLUENTES MINEROS”**

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

CARLA MARIETTA BALLESTEROS LEON

Dr. Davor Cotoras Tadic
Director de Memoria de Título

Una firma manuscrita en tinta negra sobre una línea horizontal.



Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dr. Nicolás Guiliani
Presidente Comisión

Una firma manuscrita en tinta negra sobre una línea horizontal.

Dra. Mónica Vásquez

Una firma manuscrita en tinta negra sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, Marzo de 2006



*"...A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar,
pero el mar sería menos si le faltara esa gota..."*

Madre Teresa de Calcuta

AGRADECIMIENTOS



A mis queridísimos padres, que siempre me han apoyado en todos los ámbitos de mi vida, enseñándome la visión espiritual de todas las cosas. A mi hermana Daniela, amiga y compañera desde mi nacimiento. A mi querido Lama Gendun Yarphal, quien me ha mostrado caminos y realidades que han cambiado mi mente y corazón. A mi querido Tutor de Memoria, el Dr. Davor Cotoras y su esposa Pabla Viedma, por su excelente guía como profesores y por la alegría de sus corazones. A mis compañeros de laboratorio por todos los momentos de amistad y chacoteo (Mariela, Betty, Miguel, Francisco). A mis compañeros de universidad, (Paula, Barbarita, Nuria, Ceci, Vania, Pato, Pancho, Enrico...), a todos mis compañeros y amigos budistas (Ivonne, Dieguis, Pía, Faby y Andrés, Pedro, Claudio...), y músicos (Rodrigo, Rana...)....

Y en especial, a una persona que me alborota y alegra el corazón siempre: mi pololo Eduardito. Un beso desde mi alma.

Les doy las gracias a todos por lo que me han brindado a lo largo de este camino.

¡Muchas gracias!

Índice



Índice	i
Tabla de Contenido	ii
Índice de Figuras	v
Índice de Tablas	vii
Lista de Abreviaturas	viii
Resumen	ix
Abstract	xi
Introducción	1
Materiales y Métodos	15
Resultados	34
Discusión	71
Conclusiones	85
Referencias	87

Tabla de Contenido



	Página
<u>1. Introducción</u>	
1.1. Biosorción	3
1.2. Biopelículas	5
1.3. Medio de cultivo	8
1.4. Soporte de las biopelículas	10
1.5. Desarrollo de un inóculo industrial	11
1.6. Objetivos	14
<u>2. Materiales y Métodos</u>	
2.1. Mantención de la cepa en medio sólido	15
2.2. Preparación de precultivo para cultivo en columna	15
2.3. Evaluación de crecimiento en matraz	16
2.3.1. Cultivo de <i>Bacillus</i> sp. F1 en matraz	16
2.3.2. Determinación de biomasa y floculación	16
2.3.3. Medios de cultivo alternativos: Fuentes de nitrógeno	17
2.3.4. Medios de cultivo alternativos: Fuentes de carbono	19
2.4. Evaluación de la adherencia de biomasa con medios de cultivo alternativos	19
2.4.1. Descripción del biorreactor	21
2.4.2. Inoculación de la columna	22
2.4.3. Vaciado y enjuague de la columna	22
2.4.4. Evaluación de biomasa adherida y no adherida	23
2.4.5. Esterilización de la columna	23
2.5. Materiales de soporte para el biorreactor de lecho fijo	24
2.5.1. Preparación de soportes	24
2.5.2. Estandarización de la superficie de los diferentes soportes	25

2.5.3.	Biosorción	27
2.6.	Desarrollo de un inóculo industrial de <i>Bacillus</i> sp. F1	28
2.6.1.	Análisis de esporulación en diferentes medios de cultivo	28
2.6.2.	Evaluación de $k_L a$ en matraces	29
2.6.3.	Escalamiento de transferencia de oxígeno	30
2.6.4.	Evaluación de la transferencia de oxígeno en el biorreactor Braun Biotech	31
2.6.5.	Cultivo de <i>Bacillus</i> sp. F1 en el biorreactor Braun Biotech	31
2.6.5.A.	Descripción del biorreactor	31
2.6.5.B.	Preparación de precultivo	32
2.6.5.C.	Preparación de medio de cultivo	32
2.6.5.D.	Desarrollo del cultivo	33
2.6.5.E.	Cosecha de biomasa esporulada	33

3. Resultados

3.1.	Evaluación de medios de cultivo alternativos	34
3.1.1.	Evaluación del crecimiento y floculación en matraces	34
3.1.1.A.	Fuentes de nitrógeno	35
3.1.1.B.	Fuentes de carbono	39
3.1.2.	Adherencia de biomasa de <i>Bacillus</i> sp. F1 con medios de cultivo alternativos	41
3.1.2. A.	Ensayo comparativo de licor de maíz y el medio A.S.	41
3.1.2. B.	Medición de adherencia utilizando licor de maíz	42
3.1.2. C.	Medición de adherencia utilizando jarabe de maíz	43
3.1.2. D.	Elección de medio de cultivo para el proceso de biosorción	45
3.2.	Evaluación de soportes para la adherencia de biomasa de <i>Bacillus</i> sp. F1	46
3.2.1.	Evaluación de adherencia de biomasa a soportes en unidad de superficie	46



3.2.1. A.	Piedras de acuario	47
3.2.1. B.	PET	47
3.2.1. C.	Anillos Rashig	49
3.2.1. D.	Anillos de PVC partido en dos	49
3.2.1. E.	Anillos de PVC	50
3.2.1. F.	Tela Raschel	50
3.2.1. G.	Perlita	50
3.2.1.H.	Comparación de resultados y elección de soporte apropiado.	50
3.2.2.	Evaluación de adherencia de biomasa a soportes en unidad de lecho	51
3.3.	Desarrollo de un inóculo industrial de <i>Bacillus</i> sp. F1	53
3.3.1.	Evaluación de esporulación en diferentes medios de cultivo	53
3.3.2.	Escalamiento	53
3.3.2.A.	Efecto de la aireación	54
3.3.2.B.	Evaluación de $k_L a$ en matraces	54
3.3.2.C.	Cálculos de escalamiento de transferencia de oxígeno	57
3.3.2.C. i	Cálculo de la velocidad de gas superficial, V_s	58
3.3.2.C. ii	Cálculo de la potencia de gasificación, P_g	59
3.3.2.C. iii	Cálculo de $k_L a$ para el biorreactor Braun Biotech	61
3.3.2.D.	Medición de $k_L a$ en biorreactor Braun Biotech	62
3.3.3.	Producción de esporas de <i>Bacillus</i> sp. F1 en biorreactor	63
3.3.3. A.	El primer cultivo	63
3.3.3. B.	El segundo cultivo	65
3.3.3. C.	El tercer cultivo	67
3.3.3. D.	Evaluación de formación de biopelículas	69
<u>4. Discusión</u>		71
<u>5. Conclusiones</u>		85
<u>6. Referencias</u>		87

Índice de Figuras



	Página
1. Etapas del proceso de biosorción.	4
2. Etapas en la formación de una biopelícula.	6
3. Diagrama del biorreactor utilizado para el estudio de la adherencia de biomasa de <i>Bacillus</i> sp. F1 y para la biosorción de cobre.	21
4. Soportes utilizados en los estudios de adherencia de biomasa de <i>Bacillus</i> sp. F1.	25
5. Biorreactor Braun Biotech.	32
6. A. Crecimiento de <i>Bacillus</i> sp. F1 en matraces, utilizando licor de maíz (A) Sin filtrar. (B) Filtrado.	38
7. Crecimiento y floculación de <i>Bacillus</i> sp. F1 en matraces utilizando concentrado proteico de maíz.	39
8. Efecto de la utilización de fuentes de carbono alternativas en el crecimiento y floculación de <i>Bacillus</i> sp. F1.	41
9. Crecimiento y adherencia de biomasa a anillos Rashig en biorreactor utilizando medio A.S. o licor de maíz.	42
10. Crecimiento y adherencia de <i>Bacillus</i> sp. F1 a anillos Rashig en biorreactor utilizando licor de maíz.	44
12. Adsorción de cobre obtenida utilizando una misma cantidad de superficie de soporte dentro del biorreactor, para la adherencia de biomasa.	48
13. Adsorción de cobre obtenida utilizando un volumen constante de soporte dentro del biorreactor, para la adherencia de biomasa.	52

14. Esporulación de <i>Bacillus</i> sp. F1 en diferentes medios de cultivo.	54
15. Flóculo de <i>Bacillus</i> sp. F1 mostrando esporulación obtenida al realizar el cultivo en matraces con diferentes proporciones de superficie de aireación por volumen de cultivo.	55
16. Evaluación de la oxidación de sulfito en el tiempo, en matraces.	56
17. Medición de la transferencia de oxígeno en biorreactor Braun Biotech a diferentes niveles de aireación.	62
18. Cultivo de <i>Bacillus</i> sp. F1 en biorreactor Braun Biotech a una aireación de 9 l/min y 190 rpm de agitación.	64
19. Cultivo de <i>Bacillus</i> sp. F1 en biorreactor Braun Biotech a una aireación de 20 l/min y 120 rpm de agitación.	66
20. Cultivo de <i>Bacillus</i> sp. F1 en biorreactor Braun Biotech a 120 rpm de agitación con aumento progresivo de aireación desde 5 l/min hasta 20 l/min.	68
21. Biomasa, floculación y consumo de glucosa del tercer cultivo de <i>Bacillus</i> sp. F1 en biorreactor Braun Biotech.	70
22. Cultivo de <i>Bacillus</i> sp. F1 en biorreactor de 360 ml, utilizando como inóculo esporas producidas en el biorreactor Braun Biotech, sometidas a diferentes condiciones de almacenamiento.	70



Índice de Tablas

	Página
1. Composición de medio de cultivo de Allison y Sutherland.	16
2. Composición de licor de maíz, mazoferm®137100.	18
3. Composición de concentrado proteico de maíz, mazoferm®137770.	18
4. Composición de jarabe de maíz, glucosaglobe®010210.	20
5. Producción y características de licor Kraft y cocción de astillas de eucaliptos.	20
6. Características de los soportes evaluados.	26
7. Composición del Medio 1.	29
8. Composición del Medio TS.	29
9. Concentraciones utilizadas para evaluación de fuente de nitrógeno, en el crecimiento y floculación de la bacteria <i>Bacillus</i> sp. F1.	36
10. Floculación del cultivo de <i>Bacillus</i> sp. F1 en matraces, utilizando licor de maíz con y sin sales, filtrada y sin filtrar, a 28°C y 150 rpm.	37
11. Biosorción de cobre realizada utilizando una superficie de soporte constante.	49
12. Biosorción de cobre utilizando un volumen constante de soportes PET, tela Raschel y anillos de PVC partidos en cuarto partes.	52
13. Coeficiente de transferencia de masa (k_La) para 100 ml de cultivo dispuesto en matraces de 250 y 500 ml de capacidad.	56
14. Valores de agitación y aireación, según estimación realizada utilizando ecuaciones de Van't Riet y de Michel y Miller, que permiten mantener el k_La en un valor de 33 [h^{-1}].	67

Lista de Abreviaturas

- A: área
A.S.: medio de cultivo de Allison y Sutherland
C.P.: concentrado proteico de maíz
 $C_{i \text{ sulfito}}$: concentración inicial de sulfito
 $C_{f \text{ de sulfito}}$: concentración final de sulfito
 C_o : concentración de cobre en la alimentación de la columna
 C_s : concentración de saturación de oxígeno
SPE: sustancias poliméricas extracelulares
EPS: exopolysaccharides
% F: porcentaje de floculación
gN: gramos de nitrógeno
H: altura de biorreactor
 k_{La} : coeficiente de transferencia de masa
L.M.: licor de maíz
 N_p : número de potencia
 p_{O_2} : presión parcial de oxígeno
 P_g : potencia de gasificación
PET: polietilentereftalato
PVC: cloruro de polivinilo
rpm: revoluciones por minuto
rps: revoluciones por segundo
r: radio
RIL: residuo industrial líquido
stirr: agitación
T: temperatura
t: tiempo
 V_L : volumen de reactor
 V_s : velocidad de gas superficial

RESUMEN

El tratamiento de residuos industriales líquidos (RILes) con metales en solución es una preocupación permanente de las industrias minera y manufacturera. Para el cumplimiento de la normativa vigente, el tratamiento de éstos se ha llevado a cabo tradicionalmente utilizando tecnologías con altos costos económicos, obstaculizando su implementación. Frente a esta problemática, la biosorción surge como una alternativa biotecnológica de bajo costo, que permite la remoción de los metales mediante biomasa. La biomasa puede ser inmovilizada en un soporte, facilitando el proceso. Este trabajo se enfocó en la búsqueda de estrategias que permitiesen disminuir más aún los costos que este proceso conlleva. Estas medidas incluyeron la evaluación de medios de cultivo y soportes sólidos alternativos y de bajo costo, y el desarrollo de un inóculo industrial. La bacteria utilizada fue *Bacillus* sp F1.

Se logró obtener biomasa adherida en biorreactores de lecho fijo, utilizando residuos industriales como medio de cultivo. Las fuentes de nitrógeno analizadas fueron licor de maíz y concentrado proteico de maíz, y las fuentes de carbono, jarabe de maíz, licor kraft y cocción de astillas de eucaliptos. La fuente de nitrógeno que produjo mejores resultados fue el licor de maíz, mientras que de las fuentes de carbono, fue el jarabe de maíz. Al utilizarlos juntos se obtuvo 3,4 g/l de biomasa adherida, mayor a lo obtenido anteriormente con el medio de Allison y Sutherland (igual a 1,3 g/l).

La utilización de soportes alternativos de bajo costo (comercialmente destinados a otras áreas industriales como construcción, agricultura, entre otras) para la adherencia de biomasa permitió aumentar los niveles de captación de metales. Los soportes analizados en la adherencia fueron piedras de acuario, perlita expandida, anillos de PVC, fragmentos de PET, tela Raschel y anillos Rashig. La evaluación de la cantidad de biomasa adherida formada se llevó a cabo midiendo la biosorción de cobre generada por éstas, en 2 litros de una solución de 20 mg/l de cobre. La mayor biosorción de cobre

(86% de captación) se obtuvo al utilizar tela Raschel, un material de polietileno, de alta proporción superficie-volumen.

Por otro lado, se elaboró un método de producción de un inóculo industrial de *Bacillus* sp. F1 en un biorreactor de estanque agitado de 20 litros, que logró la obtención de esporas con alta sedimentación, permitiendo la recuperación de éstas desde el biorreactor sin necesidad de dispositivos especiales. El desarrollo del inóculo industrial tuvo cuatro etapas: evaluación de medios de cultivo para la producción de esporas en matraces, escalamiento para trabajo en biorreactor, ajustes necesarios para la obtención de esporas con alta sedimentación en biorreactor y evaluación de la obtención de biomasa adherida utilizando el producto generado. En una primera etapa, se eligió el medio de cultivo de Allison y Sutherland. Este medio produjo 100 % de esporas en 24 horas, en matraces. Luego, en el escalamiento, se evaluó la transferencia de oxígeno en dichos matraces ($k_La = 33 \text{ h}^{-1}$) y se determinó, utilizando las ecuaciones de Cooper y Michel y Miller, los valores de las variables del biorreactor (agitación y aireación), que reprodujesen la transferencia de oxígeno de los matraces. La realización de tres cultivos en el biorreactor permitió el ajuste de estas variables. Finalmente, la obtención de flóculos totalmente esporulados fue llevada a cabo utilizando una aireación progresiva desde 5 l/min hasta 20 l/min y una agitación 120 rpm, luego de 13 horas de cultivo. Las esporas fueron recuperadas por sedimentación y luego secadas al vacío o congeladas. La evaluación de adherencia indicó que el inóculo secado al vacío generó 0,70 g/l de biomasa adherida y el inóculo congelado 0,97 g/l, levemente menor a lo obtenido con el control (1,27 g/l de biomasa adherida).

A futuro, los estudios de medios de cultivo, soportes y producción de un inóculo industrial aquí expuestos, actuarán como conocimiento base para el escalamiento, estudio y desarrollo de un sistema de biosorción de metales, para la descontaminación de efluentes mineros.

ABSTRACT

The treatment of liquid industrial residue (RIL) with metals in solution is a constant concern for the mining and manufacturing industry. In order to carry out the current legal normative, the treatment is performed using technology of high economic cost, which hinders its implementation. In front of this problem, biosorption arises as a low-cost biotechnological alternative that allows the metal removal by biomass. To facilitate this process the biomass can be immobilized in a (solid) support. The focus of this work was the search of strategies that allow to reduce even more the cost that the process means. These strategies include the evaluation of alternative low cost culture medium and solid support, and the development of an industrial inoculum. The bacteria used were *Bacillus* sp F1.

It was achieved to obtain attained biomass in a packed bed reactor by using industrial residues for culture medium. The analyzed nitrogen sources were corn steep liquor and corn protein concentrated, and the carbon sources were corn syrup, sulfite waste liquor and boiled eucalyptus chips. The nitrogen source which produced better results was corn steep liquor, while the better carbon source was corn syrup. When these were used together it was obtained 3.4 g/l of attached biomass, more than before this work, using the Allison y Sutherland medium (1.3 g/l).

The utilization of alternative low cost support (traditionally destined to other industrial areas as like building, agriculture, among others) for the attained biomass allow to increase the metals uptake level. The analyzed supports in the adherence was aquarium stones, expanded perlite, PVC rings, PET fragments, Raschel net, and Rashig rings. The evaluation of the supports was performed measuring the copper biosorption by the attained biomass formed, in 2 liter of a 20 mg/l copper solution. The higher copper uptake was obtained using Raschel net (86% uptake), a polystyrene material, with large surface to volume ratio.

It was achieved a production method of industrial inoculum of *Bacillus* sp. F1, in a stirred tank reactor, obtaining high sedimentation spores allowing the harvesting from the reactor without any special dispositive. The industrial inoculum development had four steps: culture medium evaluation for spore production in flasks, scale up for bioreactor work, adjustments needed for high sedimentation spores and attained biomass evaluation by using the inoculum produced. In the first step, the Allison y Sutherland culture medium was choused. This medium produce 100% spores in 24 hours, in flasks. Later, it was evaluated the oxygen transfer rate in these flasks ($k_{La} = 33 \text{ h}^{-1}$), and by using the Cooper and Michel and Miller equation, it was calculated the value of the variables of the reactor (stir and gas flow rate) which reproduce the oxygen transfer rate of the flaks. The development of three cultures in bioreactor allows the adjustment of these variables. Finally, the totally sporulated flocs obtainment was performed using an increasing gas flow rate from 5 l/min to 20 l/min, and 120 rpm stirring, after 13 hours of culture. The spores were harvested by sedimentation and then dried in vacuum or freeze. The final evaluation showed that the inoculum dried in vacuum produced 0.7 g/l of attained biomass, and the freeze inoculum produced 0.97 g/l, slightly lesser than the control (1.27 g/l).

In the future, these studies related to alternative low cost culture medium, solid supports and industrial inoculum production will be the basic knowledge to scale up, research and development of a metal biosorption system for the decontamination of mine waste water.

1. INTRODUCCION

En Chile la actividad minera asociada a la extracción de cobre es una de las principales fuentes de ingreso del estado. La empresa estatal CODELCO es la principal productora de cobre en el mundo, controlando alrededor del 20 por ciento de las reservas mundiales de este elemento metálico. En el año 2004 las ventas físicas de cobre ascendieron a 1.840.035 toneladas métricas de contenido fino, generando más del 16 por ciento de las exportaciones de Chile. Los ingresos totales por las ventas de cobre y subproductos alcanzaron los 8.204 millones de dólares (CODELCO, 2004).

El cobre es un elemento esencial para los seres vivos. Si bien los humanos necesitan ingerir cobre todos los días, una exposición continua puede acarrear complicaciones con síntomas tales como malestar estomacal, náusea o diarrea. Una ingestión elevada puede causar daño al hígado y los riñones, e incluso la muerte. No ha sido determinado aún si el cobre es cancerígeno. En términos ambientales, la presencia de cobre a nivel de suelos produce acumulación en plantas y animales, e influencia negativamente la diversidad de plantas, la actividad de los microorganismos y la descomposición de materia orgánica, (Lenntech, 2004).

El cumplimiento de las Normas Ambientales que regulan la descarga de residuos es una preocupación permanente de las industrias minera y manufacturera, debido a que sus procesos conllevan la generación de efluentes con elevada cantidad de metales tóxicos. Las industrias que producen residuos industriales líquidos (RILes) deben cumplir con la

normativa vigente para la descarga de los mismos en un cuerpo de agua superficial (D.S. SEGPRESS N° 90/2000) para ser utilizado con fines de riego (CONAMA, 2004). El valor límite para descarga de cobre en los cuerpos de agua fluviales es de 1 mg/l mientras que para cuerpos de agua lacustre es de 0,1 mg/l (CONAMA, 2004).

Tradicionalmente, el tratamiento convencional se lleva a cabo mediante diversos métodos entre los cuales se destacan (Blais *et al.*, 2000): precipitación química (precipitación del metal mediante variación de pH, temperatura y reacciones químicas), intercambio iónico (una resina sólida permite remoción de metales en solución mediante intercambio iónico), extracción con solventes (reacción química del metal en solución con una molécula orgánica disuelta en el diluyente apropiado), osmosis reversa (utilización de membranas semipermeables para recuperar iones metálicos), tecnología electrolítica (depositación electrolítica utilizando un cátodo de cierto voltaje), cementación (un metal con mayor potencial de oxidación pasa a reemplazar a un metal con más bajo potencial en solución). Aunque estos sistemas de tratamiento pueden alcanzar una alta eficiencia, los altos costos que generan a las empresas obstaculizan su implementación. Esto da origen a la búsqueda de métodos alternativos en el tratamiento de remoción de metales desde los RILes, que permitan cumplir con las normas establecidas y que disminuyan los costos requeridos en tal proceso. Una alternativa biotecnológica para este problema es la biosorción (Gadd y White., 1993; Vieira y Volesky, 2000).

1.1. Biosorción

Biosorción se define como la unión de iones metálicos a biomasa viva o muerta vía mecanismos fisicoquímicos como adsorción, quelación, complejación, siendo intercambio iónico el principal mecanismo de biosorción de metales (Kratochvil y Volesky, 1998; Characklis, 1990). Se ha utilizado como material biosorbente bacterias, levaduras, algas, moho, conchas de cangrejo (Vieira y Volesky, 2000). En bacterias, este proceso ocurre principalmente en las sustancias poliméricas extracelulares (SPE) dispuestas en la pared celular, por lo que no se requiere que la biomasa esté viva (Cotoras *et al.*, 1995). Las SPE son una mezcla de polisacáridos secretados por las células bacterianas. En general, son moléculas polianiónicas que varían mucho en su composición, y con ello sus propiedades físicas y químicas (Sutherland, 2001). La captación de cobre se lleva a cabo hasta alcanzar una concentración de equilibrio (Kratochvil y Volesky, 1998). Este proceso depende del tipo de biomasa, el tipo de preparación de la biomasa y del medio ambiente físico-químico. La aplicación de este proceso requiere una técnica apropiada de inmovilización de biomasa (Cotoras *et al.*, 1995). Las bacterias pueden ser inmovilizadas utilizando geles porosos, resinas o polímeros que embeben físicamente las células, o mediante la formación de biopelículas. Las biopelículas están formadas por células que se adsorben en un soporte de manera natural, al ser expuestas a flujo de agua (Qureshi, 2001).

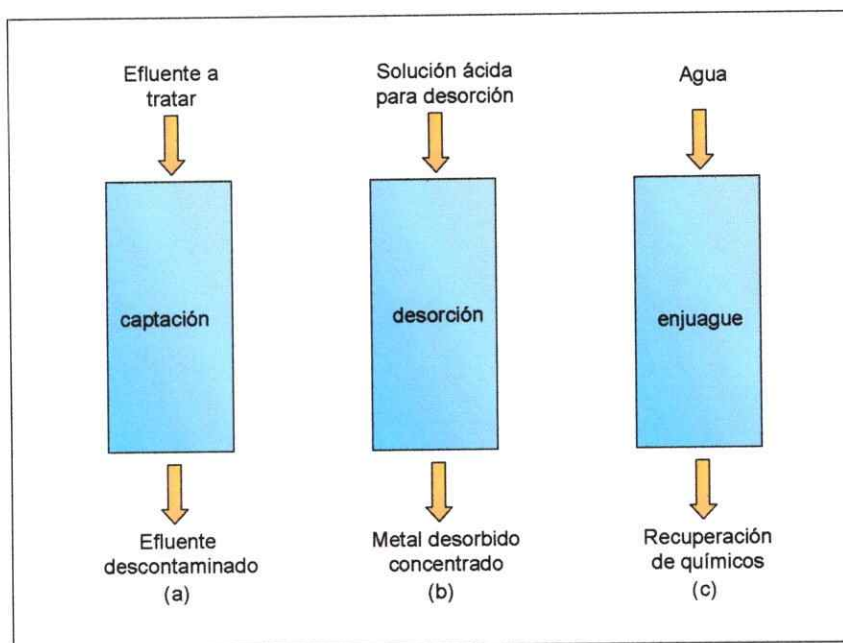


Figura 1. Etapas del proceso de biosorción. (a) Captación de metales en la columna que contiene las biopelículas o material biosorbente. (b) Desorción de los metales captados mediante la adición de solución ácida. (c) Enjuague y regeneración de la columna.

Para realizar la biosorción a un nivel de procesos industriales se ha diseñado un proceso de tres etapas (Fig. 1). La operación comienza con la inmovilización de biomasa en un soporte, dentro de biorreactores. Posteriormente, éstos se utilizan como columnas de sorción. Para ello, se hace pasar el efluente a tratar para que la biomasa capte los metales (biosorción). Al disponer varias columnas en forma paralela, es posible una remoción continua de los metales. Cuando la capacidad del biosorbente se agota, se retira la columna. Posteriormente, en la desorción, los lechos son tratados con ácido para la liberación de los metales captados, permitiendo la recuperación de éstos. El enjuague es la remoción con agua de los compuestos restantes y sólidos suspendidos captados por la columna (Kratochvil y Volesky, 1998).

1.2. Biopelículas

Una biopelícula es una matriz de células adheridas a una superficie sólida (substratum), acumulándose típicamente en superficies expuestas a flujo de agua (Hjortso y Roos, 1994) generando protección frente a sustancias tóxicas y otros factores medioambientales adversos. Las biopelículas pueden generar problemas si crecen en equipos industriales o dispositivos médicos, pero son útiles en procesos de biorremediación de sustancias tóxicas y tratamiento de agua.

Las etapas de formación de una biopelícula son (Fig. 2):

- Las moléculas orgánicas son transportadas desde el fluido al substratum, donde algunas de ellas se adsorben, resultando en un substratum condicionado (Fig. 2A).
- Una fracción de células planctónicas (vida libre) se transportan desde el fluido al sustrato condicionado (Fig. 2Ba).
- Una fracción de células chocan con el substratum, adsorbiéndose y luego desorbiéndose (adsorción reversible, Fig. 2Bb, c) o permaneciendo un tiempo crítico (adsorción irreversible, Fig. 2Bd).
- La desorción de células puede ser resultado de fuerzas de roce, pero otros factores químicos y físicos pueden influenciar el proceso (Fig. 2c).

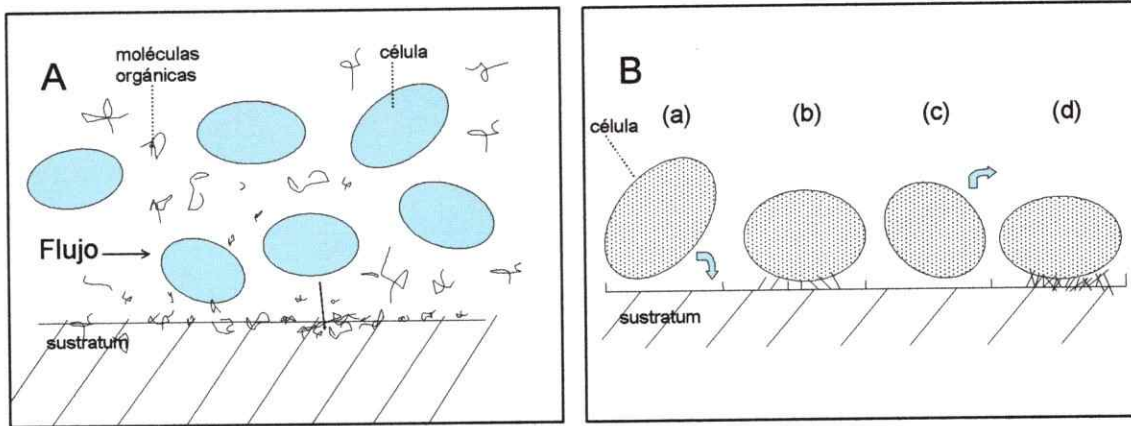


Figura 2. Etapas en la formación de una biopelícula. (A) Transporte y adsorción de moléculas orgánicas a una superficie limpia, formando una película condicionante sobre el sustratum. (B) (a) Transporte de células microbianas al sustrato condicionado, (b) adsorción, (c) desorción y (d) adsorción irreversible en el sustratum. (Characklis, 1990).

- Las células adsorbidas irreversiblemente crecen con los nutrientes, incrementado el número de células en la biopelícula. Producen diversas moléculas que pueden ser excretadas. Entre éstas están las sustancias poliméricas extracelulares (SPE), que mantienen unida la biopelícula.
- Otras células y partículas se anclan a la biopelícula, incrementando la acumulación.
- Algunas porciones de la biopelícula se desanclan y quedan en el fluido. El desanclaje es la pérdida de materia desde la biopelícula, mientras que la desorción es desde el sustratum. Otra forma de liberación de células hijas es la multiplicación celular.

La tasa de adsorción de células a la superficie aumenta con la concentración celular y con la velocidad de flujo del fluido, ya que aumenta la tasa de transporte de células al

substratum. Las SPE son responsables de la integridad de la biopelícula (Characklis, 1990; Sutherland, 2001). La motilidad celular, gravedad y movimiento browniano también tienen efecto en la adsorción de las células en el soporte (Hjortso y Roos, 1994).

Por otro lado, una biopelícula puede ser considerada un gel de polímero orgánico con microorganismos atrapados en él. Las SPE pueden variar en su composición y extensión de acuerdo con el estado fisiológico del organismo (Characklis, 1990). Pueden ocurrir cambios cuando hay iones presentes, de manera que algunos iones pueden interactuar con grupos de ácido carboxílico expuestos en las SPE produciéndose redes de macromoléculas e incrementando la viscosidad, llegando incluso a la gelificación (Sutherland, 2001).

Los flóculos son agregados de microorganismos que se mantienen unidos a causa de sus SPE y permanecen en suspensión (no anclados a un sustrato) (Characklis, 1990). Las SPE presentes en las biopelículas y flóculos son similares a las de células planctónicas (Sutherland, 2001). Una vez alcanzado el tamaño suficiente, los flóculos precipitan.

El estudio de los parámetros que controlan la adherencia de biomasa es fundamental para llevar a cabo el proceso de biosorción de una manera efectiva y económica. En este trabajo, se estudiaron tres parámetros importantes: medios de cultivo adecuados para el crecimiento de microorganismos, diferentes soportes para la adherencia de biomasa, y la producción de un inóculo industrial que permita preservar la cepa bajo condiciones ambientales adversas.

1.3. Medio de cultivo

Existe una enorme diversidad de microorganismos, y con ello una amplia gama de requerimientos nutricionales. El medio de cultivo para microorganismos aerobios está compuesto por una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, sales minerales y oxígeno (Greasham, 1991).

Al realizar el proceso de biosorción en una escala industrial, es necesario tomar en cuenta los costos que éste involucra. A nivel industrial, se trabaja con medios complejos y poco definidos, frecuentemente por razones económicas. Generalmente son subproductos de otras industrias y varían mucho en su composición. Éstos deben presentar buen rendimiento y una alta disponibilidad de abastecimiento. Algunas fuentes de carbono comúnmente usadas son cerelese (glucosa comercial), glicerol, melasa (barra negra o caña), licores sulfitos, aceites (soya, maíz, semilla de algodón), fécula de maíz, (dextrina e hidrolizados), suero, alcoholes, etc. Dentro de las fuentes de nitrógeno se encuentran: harina de semilla de trigo, harina de soya, harina de maíz, levadura (extracto o hidrolizado), licor de maíz, harina de gluten de maíz, harina de linaza, harina de pescado, urea, amonio sulfato, etc. (Greasham, 1991).

El licor de maíz se obtiene como un derivado del proceso de extracción del almidón de maíz. Fue el primero usado en la producción de penicilina en 1946 cuando Moyer y Coghil descubrieron que su adición aumentaba considerablemente la producción de antibióticos. En el proceso de producción, los granos de maíz son dispuestos en un

tanque con una solución en base a agua, liberando el almidón. Esta agua de remojo o licor de maíz se usa comúnmente en la industria de alimentos, en fermentación y otros procesos. Contiene alta cantidad de sustancias nitrogenadas, ácido láctico, sustancias reductoras y cenizas con muchos elementos trazas (Sykita, 1983). El licor de maíz producido por Inducorn S.A. es un líquido viscoso de color café claro, usado principalmente como enriquecedor de proteínas para nutrición animal y vehículo de control de plagas. Al ser almacenado en lugar seco y ventilado, tiene una duración de dos meses. En general el licor de maíz presenta fluctuaciones de calidad debido a diferencias en los procesos y calidad del maíz utilizado, causando variaciones en los procesos microbianos. La empresa Inducorn S.A. además ha elaborado un tipo de licor de maíz con un mayor porcentaje de proteínas, llamado concentrado proteico de maíz, manejando la temperatura de condensación en el proceso de producción. Es un polvo fino de color crema amarillento de sabor ácido y olor característico. Tiene una duración de 6 meses.

Las tres fuentes de carbono disponibles en Chile, con posibilidades de utilización en el crecimiento de biomasa bacteriana, son jarabe de maíz, licor Kraft y licor de cocción de astillas de eucaliptos. El jarabe de maíz es una solución acuosa, transparente y concentrada producida mediante una conversión del almidón refinado de maíz. Se utiliza principalmente en confitería, heladería y pastelería. Posee una vida útil es de 6 meses. El licor Kraft se produce mediante la cocción de chips de madera con sulfito en una solución acuosa ácida, mientras que en el caso de cocción de astillas de eucaliptos, la cocción es realizada en agua. Sus composiciones están determinadas por el tipo de

madera y la tecnología empleada en el proceso, originando acentuadas variaciones. La calidad de estos subproductos industriales dependen de la cantidad de componentes volátiles, siendo esto y especialmente el contenido de SO₂ inhibidores del crecimiento microbiano (Sikyta, 1983).

1.4. Soporte de las biopelículas

El substratum o soporte sólido juega un rol principal en los estados iniciales de acumulación de la biopelícula, pudiendo influenciar la tasa de acumulación y distribución de la población. El material soporte utilizado es muy importante ya que determina características de la biopelícula a obtener.

Uno de los principales criterios que caracterizan a un buen soporte es una elevada proporción superficie/volumen. Al iniciar la búsqueda de un soporte es importante tener en cuenta propiedades mecánicas, químicas y biológicas. Dentro de las propiedades mecánicas están la duración del material, que su forma disminuya la fuerza de roce del agua, que no obstaculice el flujo del efluente a tratar, etc. Las propiedades químicas se refieren a características tales como que el material sea inerte, posea resistencia a cambios de pH, etc. Las propiedades biológicas tienen relación con que el tipo de material sea apropiado para la adherencia bacteriana, no tóxico, sin unión a sustancias indeseables (Stumm, 1992). El transporte de células al substratum está influenciado por la geometría macroscópica del sistema experimental. La rugosidad aumenta la tasa de transporte (Characklis, 1990).

Tradicionalmente se han utilizado diferentes tipos de materiales, entre ellos piedras, arena, plásticos, látex, papel y acero inoxidable en diversas formas y tamaños. Los materiales de vidrio no son buenos soportes, ya que las bacterias tienen dificultad de anclarse a superficies lisas. El más comúnmente ocupado en tratamiento biológico de efluentes es PVC, de modo que una variedad de soportes ha sido desarrollada. Están disponibles comercialmente, pero su alto costo económico hace poco financiable el proceso (Qureshi *et al.*, 2001).

1.5. Desarrollo de un inóculo industrial

La formulación de un inóculo estándar del microorganismo es uno de los factores que aseguran la reproducibilidad del cultivo. La calidad y cantidad de un cultivo semilla es esencial para un alto rendimiento en términos de metabolitos y de biomasa (Pilat y Prokop, 1975). Este inóculo puede ser de células vegetativas o de esporas. El inóculo a base de esporas tiene como ventaja permitir una preservación del microorganismo por mayor tiempo y en condiciones más extremas (Sykita, 1983).

Las esporas bacterianas son estructuras diferenciadas altamente resistentes, formadas por algunos tipos de bacterias. Se encuentran metabólicamente latentes, y se forman frente a cambios adversos en el medio tales como falta de nutrientes, shock de temperatura, desecación, irradiación UV, químicos nocivos, etc. En el proceso de esporulación la célula original replica su material genético y lo rodea con una envoltura dura. Entonces la célula se desintegra, liberando la espora (Darling, 2004).

La elaboración de un inóculo industrial, al igual que cualquier proceso de microbiología industrial, consta de tres etapas: desarrollo a escala de laboratorio, escalamiento, puesta en marcha y ajustes a una escala industrial. A escala de laboratorio, se define un método de preservación de la cepa, un medio de cultivo adecuado para la obtención del producto a desarrollar y técnicas de cultivo. En la etapa de escalamiento, se estudia cómo emular las condiciones dadas en el laboratorio para el cultivo en un biorreactor. Finalmente, en la puesta en marcha se observa empíricamente las variaciones obtenidas, ajustando los parámetros necesarios para la obtención de dichas condiciones medioambientales (Sykita, 1983).

El oxígeno disuelto en el medio de cultivo puede ser considerado un nutriente más, ya que regula todas las actividades metabólicas de la células (Wang *et al.*, 1978). Sin embargo, la solubilidad de éste es muy limitada comparada con otros nutrientes, convirtiéndose por lo general en un nutriente limitante del crecimiento. Para llevar a cabo un escalamiento desde matraces a biorreactor es necesario estudiar la transferencia de oxígeno de los cultivos. La estimación del coeficiente de transferencia de masa ($k_L a$) permite relacionar variables que afectan la transferencia de oxígeno.

El desarrollo de un inóculo industrial a base de esporas permitirá almacenar la bacteria de manera apropiada, posibilitando la obtención de biopelículas adecuadas para llevar a cabo el proceso de biosorción de metales a un nivel industrial. Para esto se realizó estudios de crecimiento y esporulación de *Bacillus* sp. F1 en diferentes condiciones, a nivel de laboratorio y escalamiento a nivel industrial.

En el laboratorio de Microbiología y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile se ha aislado desde muestras ambientales una bacteria, *Bacillus* sp. F1, capaz de captar cationes metálicos en solución y además de formar biopelículas. Para la investigación del proceso de formación de biopelículas y biosorción, se desarrolló un biorreactor de lecho fijo y un proceso para la remoción de los metales. La formación de biopelículas de *Bacillus* sp. F1 en dichas condiciones, fue demostrada por microscopía de barrido (Cotoras *et al.*, 1995).

El siguiente trabajo, tuvo como finalidad el estudio de estrategias que permitieran mantener o aumentar la eficiencia del proceso de biosorción, a un menor costo económico. Estas medidas incluyeron la elección de un medio de cultivo proveniente de desechos industriales, la evaluación de un soporte de bajo costo para la adherencia de biomasa de *Bacillus* sp. F1, y desarrollo de un inóculo industrial adecuado para llevar a cabo el proceso a nivel industrial.

Este estudio se enmarca en el proyecto FONDEF D0111038 titulado "Proceso de biorremediación de aguas para la industria minera y manufacturera". Esta iniciativa tiene como objetivo el desarrollo de un proceso de captación de metales desde RILes, permitiendo así la descarga de los efluentes en cuerpos de agua superficiales a un menor costo económico, para el cumplimiento de normativa vigente.

En el desarrollo del proyecto y en su transferencia tecnológica están comprometidas tres empresas productivas, CODELCO-División Andina, Minera Los Pelambres y

Química Panamericana Sur; la empresa tecnológica Biohídrica (Chile); cuatro instituciones públicas nacionales, Dirección General de Aguas, CONAMA, SERNAGEOMIN y la organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS).

1.6. Objetivos

Objetivo general

Optimización del proceso de remoción de metales mediante evaluación de medios de cultivo, soportes sólidos y desarrollo de un inóculo industrial de *Bacillus* sp. F1.

Objetivos específicos

- Evaluación de medios de cultivo alternativos provenientes de desechos o subproductos industriales.
- Evaluación de diversos soportes de materiales de bajo costo económico, incluyendo variaciones en su proporción superficie/volumen, para la adherencia de biomasa.
- Desarrollo de un inóculo industrial de *Bacillus* sp. F1.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Mantención de la cepa en medio sólido

Se sembró la cepa *Bacillus* sp. F1 en TSA (Tryptic Soy Agar, Difco), en estría. Se dejó creciendo 24 horas a 28°C en incubador (Low temperature Incubator 815, Precision Scientific, Alemania). Posteriormente, se almacenó a 4°C.

2.2. Preparación de precultivo para cultivo en columna

La inoculación de los biorreactores se realizó a partir de un cultivo líquido (precultivo) en medio de Allison y Sutherland (Allison y Sutherland, 1987). Este medio se diseñó especialmente para obtener adherencia celular, ya que estimula la síntesis de polisacáridos extracelulares, facilitando la adhesión bacteriana. Su composición se detalla en la Tabla 1.

Para la inoculación, mediante una picadura desde el medio sólido TSA, se sembró 100 ml de medio de Allison y Sutherland (A.S.) bajo campana de flujo laminar, para luego mantener el cultivo 20 horas a 28°C en agitador orbital, a 150 rpm (Agitador Inforfht RC-TK, Bottmingen-Alemania).

Tabla 1. Composición de medio de cultivo de Allison y Sutherland (A.S.)

Compuesto	Concentración [g/l]
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O (Merck)	1,253
KH ₂ PO ₄ (Merck)	0,300
K ₂ SO ₄ (Merck)	0,100
NaCl (Merck)	0,100
MgSO ₄ · 7H ₂ O (M & B)	0,020
CaCl ₂ · 2H ₂ O (Merck)	0,0132
FeSO ₄ · 7H ₂ O (Merck)	0,0018
Extracto de Levadura (Difco)	1,00
Bacto triptona (Difco)	1,00
D-glucosa ¹ (Scharlau)	10,00

¹ La glucosa se autoclavó por separado.

2.3. Evaluación de crecimiento en matraz

2.3.1 Cultivo de *Bacillus* sp. F1 en matraz

Luego de agregar la fuente de carbono a la fuente de nitrógeno presente en el matraz, se inoculó *Bacillus* sp. F1 mediante una picadura desde el medio sólido TSA y se dispuso en un agitador orbital a 28°C y 150 rpm por 24 horas. El volumen total de medio de cultivo fue de 100 ml, dispuesto en un matraz de 250 ml de capacidad.

2.3.2. Determinación de biomasa y floculación

A partir de los matraces con cultivo ya crecido, se tomó una muestra de 10 ml con pipeta aforada y se dispuso en un tubo de centrifuga. Con el objeto de tener una medición de la floculación del cultivo, la muestra se dejó 10 minutos en reposo. Posteriormente, se traspasaron 5 ml de la parte superior del tubo a otro tubo. Para calcular el aporte en peso dado por el medio de cultivo, se midió el peso seco en medios

de cultivo similares a los analizados, y que habían sido expuestos a las mismas condiciones, pero sin haber sido inoculados. Cada alícuota se centrifugó a 8000 rpm por 10 minutos (centrífuga Sorwall® RC5B con rotor SS-34, Newton Conn, USA), se eliminó el sobrenadante y el pellet se dejó a 105°C por 48 hrs. La fórmula utilizada para el cálculo de la medición de la floculación es la siguiente:

$$\% F = \frac{(P_2 - P_1) - (S_2 - S_1)}{(P_2 - P_1) + (S_2 + S_1)}$$

donde % F es el porcentaje de floculación, P_2 y S_2 son el peso seco obtenido desde la región inferior y superior del tubo y P_1 y S_1 , el peso seco obtenido desde la región inferior y superior de las muestras colectadas desde medios de cultivo no inoculados. Para calcular el peso seco total de biomasa bacteriana, se sumó la biomasa obtenida en los 5 ml de la zona superior del tubo y los 5 ml de la inferior.

2.3.3. Medios de cultivo alternativos: Fuentes de nitrógeno

Las fuentes de nitrógeno analizadas fueron licor de maíz (Mazoferm®137100, Inducorn S.A., Chile) y concentrado proteico de maíz (Mazoferm®137770, Inducorn S.A., Chile). Las composiciones de estos productos se detallan en las Tablas 2 y 3. Las concentraciones a utilizar fueron estimadas mediante la cantidad promedio de nitrógeno de las proteínas, siendo éste igual a 16 % (New Jersey Fedd Lab Inc., 2004). El porcentaje de proteína fue entregado por la empresa productora. Se eligieron diferentes concentraciones, tomando como referencia la cantidad de nitrógeno presente en el medio A.S. Debido a la alta presencia de sólidos suspendidos en las fuentes de nitrógeno, se

Tabla 2. Composición de licor de maíz, mazoferm®137100*.

Especificaciones	Mínimo	Máximo
Humedad %	40	63
Proteína % b.s.**	48,0	51,0
°Bé, %21	21,0	
Cenizas,% b.s.**		20,0
Fibra cruda, %b.s.**		0,5
pH	3,7	

*Fuente: Inducorn S.A. ** b.s.: Base seca

Tabla 3. Composición concentrado proteico de maíz, mazoferm®137770*.

Especificaciones físico químicas		Perfil aminoacídico	
Humedad	Máx 5%	Alanina	5,13 %
Proteína b.s.**	58-62%	Glicina	3,86 %
Ácido Láctico b.s.**	16-20%	Valina	2,43 %
Cenizas b.s.**	18-22%	Treonina	2,55 %
Fósforo b.s.**	5-7%	Serina	3,16 %
Potasio b.s.**	2-3%	Leucina	3,80 %
Magnesio b.s.**	1-2%	Isoleucina	1,23 %
Sodio b.s.**	Máx 0.1%	Prolina	7,15 %
Fibra cruda b.s.**	Máx 1%	Metionina	0,16 %
Extracto etéreo b.s.**	Máx 0.5%	Ác. Aspártico	2,92 %
Solubilidad	Mín 98%	Fenilalanina	1,08 %
Higroscopicidad***	Muy baja	Ác. Glutámico	10,61 %
		Lisina	3,55 %
		Tirosina	3,55 %
		Arginina	3,22 %
		Histidina	4,03 %
		Ác. Cistéico	2,63 %
		Total	61,00 %

*Fuente: Inducorn S.A. ** b.s.: Base seca. *** higroscópica, es decir, que absorbe o desprende humedad.

evaluó el efecto de una filtración con papel filtro de los medios de cultivo antes de ser esterilizados. El pH del licor de maíz es aproximadamente 4,2, por lo que se ajustó el pH a 7,0 agregando KOH. Para los experimentos se utilizó 10 g/l de glucosa, igual a la del medio A.S. Los ensayos se realizaron en triplicado.

2.3.4. Medios de cultivo alternativos: Fuentes de carbono

Las fuentes de carbono analizadas fueron licor Kraft (llamado también licor sulfito), licor de cocción de astillas de eucaliptos (ambas proporcionadas por el Dr. Hernán Poblete, Universidad Austral de Chile) y jarabe de maíz (Glucosa Globe®010210, Inducorn S.A, Chile). Para los cálculos de la cantidad a utilizar, se recurrió a la concentración aproximada de carbono de cada medio de cultivo alternativo, publicada en la literatura (Sykita, 1983). Algunas características de estas fuentes de carbono se muestran en las Tablas 4 y 5. Para la evaluación del crecimiento y floculación de *Bacillus* sp. F1 en matraces utilizando dichas fuentes de carbono, se utilizó una concentración constante de nitrógeno de 0,311 g/l (licor de maíz). Para jarabe de maíz, se realizaron ensayos en triplicado, mientras que para licor Kraft y cocción de astillas de eucaliptos se realizó solo un ensayo.

2.4. Evaluación de la adherencia de biomasa con medios de cultivo alternativos

El cultivo de microorganismos se realizó en un biorreactor de lecho fijo para cultivo en lotes (esquemático en la Fig. 3), para aproximadamente 360 ml de medio. Se utilizó una aireación de 165,3 ml/min y recirculación de medio a un flujo de 196 ml/min. Para

Tabla 4. Composición de jarabe de maíz, glucosaglobe®010210*.

Especificaciones Físico-químicas	Tipo de Producto	Mínimo	Máximo
Sustancia seca, %		77,0	79,0
Dextrosa equivalente, % b.s. **		37,0	39,0
pH		4,8	5,2
SO ₂ , ppm	Granel		150
	Fibrotambores	150	300
Densidad a 16°C, kg/l		1,407	
Perfil de carbohidratos, % b.s. **	Dextrosa	19	
	Maltosa	19	22
	DP3 y superiores		62

*Fuente: Inducorn S.A. ** b.s.: Base seca.

Tabla 5. Producción y características de licor Kraft* y cocción de astillas de eucaliptos.**

Característica a comparar	Licor Kraft	Cocción de eucaliptos
Licor de cocción	NaOH + Na ₂ S + H ₂ O	H ₂ O
Materia prima	Astillas de pino radiata	Astillas de eucalipto
Temperatura de tratamiento [°C]	170	125
Tiempo de tratamiento [min]	220	20
Sólidos totales [%p/v]	12,3	0,2
pH	12,95	5,3

* ** Fuente: Universidad Austral de Chile.

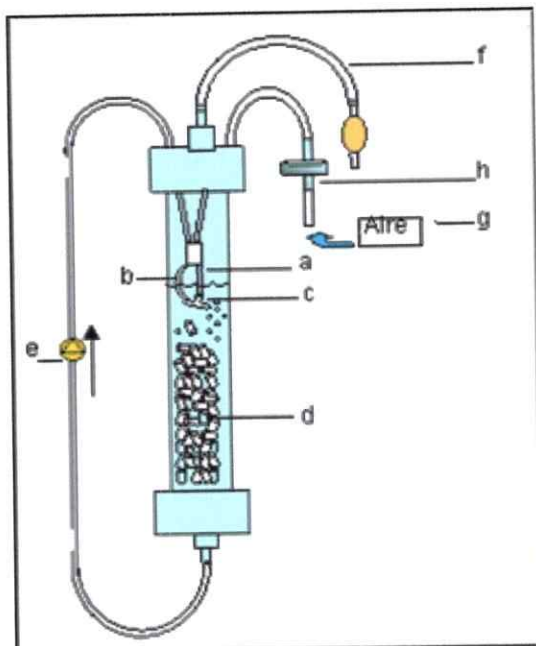


Figura 3. Diagrama del biorreactor utilizado para el estudio de la adherencia de biomasa de *Bacillus* sp. F1 y para la biosorción de cobre.

- (a) entrada de aire al inyector.
- (b) entrada de líquido al inyector.
- (c) inyector aire-líquido.
- (d) soporte.
- (e) bomba peristáltica.
- (f) salida de aire.
- (g) entrada de aire desde compresor.
- (h) filtro de aire.

el control de la temperatura, se montó el biorreactor en un baño de agua con un calefactor (termorregulador modelo DC3 de Hoocke-Fisons, Alemania) a 28°C.

2.4.1. Descripción del biorreactor

Se utilizó un biorreactor de lecho fijo (Fig. 3) de 40 mm de diámetro y 400 mm de longitud, de politetrafluoroetileno (teflón), donde crece la cepa formando una biopelícula (Cotoras *et al.*, 1993). En trabajos anteriores, se ha utilizado como material soporte 150 g de anillos Rashig para la adherencia de *Bacillus* sp. F1. El biorreactor posee una capacidad de cultivo de 360 ml aproximadamente. La tapa superior, en uno de sus empalmes, posee una salida de aire, compuesto de una manguera (manguera de silicona Masterflex[®] 6411-18, de Cole-Parmer Instrument Co., USA) con un filtro de algodón Cardé acoplado (Fig. 3f). En otro de los empalmes se ubica una manguera

(manguera de silicona Masterflex® 6411-16, de Cole-Parmer Instrument Co., USA) de inyección de aire con un filtro de aire de membrana (Fig. 3h) (unidad de filtración SLFG05000 de 0,2 µm, Millex, Millipore, USA). En un tercer empalme se coloca una manguera de silicona con un diámetro interno de 3,1 mm para la recirculación de líquido (Fig. 3e) (manguera de silicona Masterflex® 6411-16, de Cole-Parmer Instrument Co., USA). La manguera de recirculación se conecta en uno de los empalmes de la tapa inferior. Al interior del biorreactor, las mangueras de inyección de aire y de recirculación se conectan en una T de polipropileno que actúa como inyector aire-líquido (Fig. 3c), permitiendo la entrada de aire en 90° con respecto a la trayectoria del líquido.

2.4.2. Inoculación de la columna

Para la inoculación de la columna, se agregó 360 ml de medio de cultivo y 5 ml de precultivo, bajo campana de flujo laminar. A continuación, la manguera de recirculación se monta en el cabezal de la bomba peristáltica (Cabezal Masterflex® modelo 7016-20, de Cole-Parmer Instrument Co., USA), de manera que el líquido fluya desde la parte inferior de la columna hacia la superior. El cabezal se monta en una bomba peristáltica (Bomba peristáltica Masterflex®, de Cole-Parmer Instrument Co., USA).

2.4.3. Vaciado y enjuague de la columna

Luego de 24 horas, se extrajo el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con 360 ml de agua destilada, de manera de coleccionar residuos de medio de cultivo y biomasa no

adherida. Esto se realizó a un flujo de 37 ml/min, de manera de no arrastrar biomasa adherida al soporte.

2.4.4. Evaluación de biomasa adherida y no adherida

Luego de desmontar la columna del baño, se recogió en un recipiente los anillos Rashig con la biomasa adherida y se dejó en estufa a 105°C por 48 horas. Finalmente se pesó el soporte en balanza analítica. La diferencia del peso del soporte con biomasa adherida y el peso del soporte limpio y seco, resulta en la biomasa adherida obtenida en el proceso de cultivo. De las soluciones de lavado y medio de cultivo obtenidas en el vaciado y enjuague de la columna, se sacó una alícuota de 10 ml, se agregó a un tubo de centrifuga previamente pesado, y se centrifugó a 8000 rpm. por 10 minutos (Centrífuga Sorvall® tipo ss-34, Newtown Conn, USA) Se eliminó el sobrenadante, y los tubos se pusieron a secar en estufa a 105°C por 48 horas.

2.4.5. Esterilización de la columna

Las columnas se autoclavaron 20 minutos a 121°C y a una presión de 20 KPa/cm². En el caso de soportes plásticos, las columnas se sometieron a calentamiento a una temperatura de 80° C durante 30 minutos.

2.5. Materiales de soporte para el biorreactor de lecho fijo

2.5.1. Preparación de soportes

Los soportes utilizados en este estudio fueron: anillos Rashig, perlita expandida, piedras de acuario, anillos de cloruro de polivinilo (PVC), polietilentereftalato (PET), y tela Raschel (Fig. 4). Los anillos Rashig son cilindros de vidrio que se utilizan dentro de columnas de fraccionamiento para destilación. La perlita es un material de muy baja densidad, que es producto de la expansión de mineral crudo; su estructura está conformada por celdas de aire que lo convierte en un excelente aislante térmico y acústico, siendo utilizado en construcción y agricultura. Las piedras de acuario son pequeñas piedras ocupadas para ornamentación de acuarios. El PVC utilizado proviene de tubos utilizados para proteger los cables de la electricidad; fueron cortados en anillos y partidos en dos o más para aumentar su empaquetamiento. El PET es un plástico de alta calidad, muy ligero y reciclable; en este trabajo el PET utilizado proviene de botellas plásticas. La tela Raschel, comúnmente llamada malla de kiwi, está compuesta por polietileno; se utiliza para sombreo de invernaderos y como elemento de protección en la construcción, entre otros usos.

Para disminuir el efecto de fuerzas de roce sobre la biomasa y aumentar el empaquetamiento, algunos de los soportes recibieron un tratamiento especial. En el caso de los anillos Rashig, estos fueron expuestos unos segundos a una llama, para que sus extremos se fundiesen. En el caso del PVC y PET, se suavizó las superficies cortantes sumergiéndolos en agua y calentando hasta antes de la ebullición.

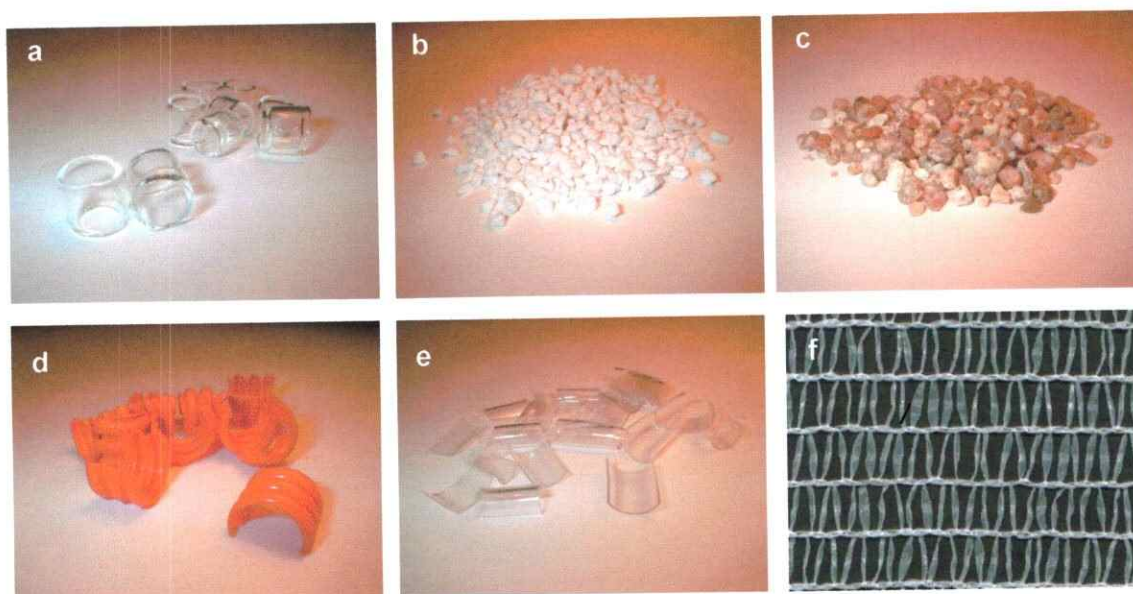


Figura 4. Soportes utilizados en los estudios de adherencia de *Bacillus* sp. F1. (a) Anillos Rashig. (b) Perlita expandida. (c) Piedras de acuario. (d) Anillos de PVC partidos en dos. (e) PET. (f) Tela Raschel.

La limpieza de los anillos Rashig se realizó agregando mezcla sulfocrómica durante 24 horas. En el caso de soportes plásticos, se añadió una solución detergente (5 ml de Tween 80 por litro de agua) durante 30 minutos. Luego para retirar los residuos del detergente se agregó HCl 0,1 N. Finalmente se lavó con abundante agua destilada.

2.5.2. Estandarización de la superficie de los diferentes soportes

Para comparar la capacidad de biosorción de las biopelículas generadas en los soportes, primeramente se estandarizó la superficie de éstos. En todos los casos, esta unidad de superficie es equivalente a la entregada por 150 gramos de anillos Rashig. Es decir, la cantidad de soporte utilizado en el crecimiento de las biopelículas depende de la

Tabla 6. Características de los soportes evaluados.

Soporte	Masa ¹ [g]	Altura de lecho ² [cm]	Utilización tradicional
Anillos Rashig	150	34	Columnas de fraccionamiento para destilación
PET	25	30	Botellas plásticas
PVC anillos partidos	44	33	Tubos electricidad
PVC anillos ³	22	30	Tubos electricidad
Piedras de acuario	177	35	Decoración
Tela Raschel ⁴	2,3	30	Sombreo invernaderos
Perlita expandida	29	35	Aislante térmico y acústico (construcción)

¹ Masa de soporte que corresponde a 1250 cm² de superficie para colonizar.

² Altura del lecho (soporte y medio de cultivo) en el biorreactor.

³ El área cubierta por este soporte es igual a 625 cm².

⁴ El lecho de tela Raschel depende de las dimensiones de malla a utilizar.

proporción área/masa de cada soporte. Las características físicas de los soportes analizados pueden ser observadas en la figura 4, y en la Tabla 6 se presentan sus dimensiones aproximadas. Debido a que éstos presentan diferencias de empaquetamiento, fue necesario adaptar el largo de las mangueras que tienen los inyectores que introducen el aire y recirculan el cultivo al interior del reactor (Fig. 3a, b, c). Esto es porque la altura del medio de cultivo varía dentro del biorreactor, debido al cambio de volumen total dado por soporte. Con esto se aseguró que el inyector de aire

quedase sumergido a la misma profundidad, y así no variar parámetros de transferencia de oxígeno.

2.5.3. Biosorción

La evaluación de los diferentes soportes se realizó evaluando la biosorción llevada a cabo por la biomasa adherida a éstos. Se cultivó *Bacillus* sp. F1 en columnas, utilizando licor de maíz y jarabe de maíz, tal como se describió anteriormente. Después de retirar el medio y realizar los lavados respectivos, se dejó secar 24 horas la biomasa adherida dentro de la columna a temperatura ambiente. Luego, se realizó la biosorción. Para ello, se hizo ingresar a la columna una solución de cobre 20 mg/l con un flujo de alimentación de 8,5 ml/min, de manera continua, desde la zona inferior hacia la superior. Para esto se utilizó una manguera de silicona (manguera de silicona Masterflex® 6411-14, de Cole-Parmer Instrument Co., USA) montada en un cabezal (Cabezal Masterflex® modelo 7016-20, de Cole-Parmer Instrument Co., USA). El cabezal se instaló en una bomba peristáltica (Bomba peristáltica Masterflex® 6-600 rpm, de Cole-Parmer Instrument Co., USA). En la zona superior, tocando el soporte, otra manguera retira la solución. Se tomó muestras de 3 ml en triplicado a los 0, 15, 30, 60, 120, 360 y 480 minutos. Ya que el flujo pudo provocar desprendimiento de biomasa, se procedió a centrifugar las muestras a 13000 rpm en microcentrífuga (microcentrífuga MSE Microcentaur, Sanyo, UK). Finalmente, por la parte inferior de la columna se vació la solución de cobre remanente.

Para la desorción, se agregó una solución de HCl pH 1, durante 1 hora. Se tomó muestras de 3 ml en triplicado a los 0, 15, 30, 60 minutos. Ya que el flujo pudiese haber provocado el desprendimiento de biomasa, se procedió a centrifugar de la misma forma descrita anteriormente. Todas las muestras colectadas se midieron en espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin-Elmer 3110).

El cálculo de la concentración de cobre total captada por la columna se llevo a cabo por integración numérica utilizando el método de los trapecios. El área bajo la curva corresponde al cobre adsorbido por la biomasa. Para evidenciar el efecto del soporte en el proceso de captación de cobre, se repitió el mismo procedimiento aplicado en la biosorción, pero utilizando el soporte limpio, sin biomasa.

2.6. Desarrollo de un inóculo industrial de *Bacillus* sp. F1

2.6.1. Análisis de esporulación en diferentes medios de cultivo

Con el objetivo de obtener un material inoculante estable en el tiempo, se estudió la producción de un inóculo industrial a base de esporas. Inicialmente, se seleccionó de un medio de cultivo que permita producir una mayor cantidad de esporas en 24 horas, en matraz. Los medios de cultivo evaluados fueron: de A.S. (Allison y Sutherland, 1987), medio TS y Medio 1 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania). La composición de cada uno de éstos se detalla en las Tablas 1, 7 y 8. Para la inoculación, se sembró una picadura desde el cultivo en TSA en 100 ml de medio de cultivo dispuesto en un matraz de 500 ml de capacidad, y se dejó en

Tabla 7. Composición de Medio 1.

Compuesto	Concentración [g/l]
Peptona	5
Extracto de carne	3
MnSO ₄	0,01

Ajustar pH 7 a 25°C.

Tabla 8. Composición Medio TS.

Compuesto	Concentración [g/l]
Bacto Triptona	15
Bacto Oxítona	5
NaCl	5

Ajustar pH 7,3 ± 0,2 a 25°C.

A este medio se agregó 0,01 g/l. MnSO₄

agitador orbital a 28°C y 150 rpm. El crecimiento en los matraces se realizó en duplicado.

Para el análisis de esporulación de los cultivos, se extrajo muestras de 1 ml. Estas fueron introducidas en tubos Eppendorf con perlas de vidrio de 3 mm de diámetro, y se agitó en vórtex durante 8 minutos, de manera de romper los flóculos. Posteriormente, se realizó tinción de esporas con verde de malaquita y se observó al microscopio. Se contó esporas y células no esporuladas en diez campos de visión.

2.6.2. Evaluación de $k_L a$ en matraces

Para la evaluación de la transferencia de oxígeno de los cultivos se utilizó el método del sulfito descrito por Cooper *et al.* (1944). Para esto se dispuso matraces con una capacidad de 250 y 500 ml con 100 ml de agua. Se agregó 6,3 g de sulfito de sodio

(Na_2SO_3), obteniendo una concentración final 0,5 M. Para comenzar la reacción de oxidación, se adicionó una solución de sulfato de cobre a una concentración final de 0,001M (16 mg). Este momento se considera como tiempo cero. Posteriormente, se colectaron muestras de 0,5 ml a tiempos determinados que se agregaron rápidamente a 10 ml de una solución de yodo previamente titulada. Enseguida se añadió 5 ml de solución 2M de ácido clorhídrico y 20 ml de agua. El exceso de yodo que no ha reaccionado, se retrotituló con una solución 0,1 N de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) usando 5 ml de una solución de almidón (2 g/l) como indicador. Esta solución se adiciona, cuando el yodo en exceso que se titula comienza a adquirir un color amarillo claro. A partir de la curva de concentración de sulfito remanente en el tiempo, se calculó el coeficiente de transferencia de masa del oxígeno ($k_{L,a}$), necesario para realizar el posterior escalamiento. Para esto, fue necesario calcular la concentración de saturación de oxígeno con la ecuación de Truesdale (Acevedo, 2002).

2.6.3. Escalamiento de transferencia de oxígeno

Para llevar a cabo el escalamiento, se estudió la relación de $k_{L,a}$ y las variables del biorreactor que afectan tal parámetro. Para esto, se utilizó la ecuación dada por Van't Riet (1983) que resume la ecuación original de Cooper (1944), la ecuación de Michel y Miller (Acevedo, 2002), y la de cálculo del número de potencia, N_p (Perry, 1999). De esta manera, se estimó las condiciones de aireación y agitación necesarias para que el posterior cultivo en el biorreactor Braun Biotech (descrito mas adelante) iguale la transferencia de oxígeno obtenida en los matraces de 500 ml (para 100 ml de cultivo).

2.6.4. Evaluación de la transferencia de oxígeno en el biorreactor Braun Biotech

Se evaluó empíricamente la transferencia de oxígeno en el biorreactor, al utilizar los valores de agitación y aireación calculados en el escalamiento. Mediante el método del sulfito, descrito anteriormente, se midió la transferencia de oxígeno en diferentes condiciones de agitación y de aireación. De esta manera, fue posible obtener condiciones apropiadas para el crecimiento del cultivo y su esporulación en el biorreactor.

2.6.5. Cultivo de *Bacillus* sp. F1 en el biorreactor Braun Biotech

A. Descripción del biorreactor

El biorreactor Braun Biotech (Braun Biotech, Alemania) fue desarrollado para cultivo en lotes y opera en conjunto con un sistema de control digital (DCU) que permite el funcionamiento de manera automática (adquisición de datos, calibración de sensores, control secuencial), pudiendo ser integrado a un computador para almacenar datos, reporte de procesos, gráficos, etc. Para las mediciones de temperatura, pH y oxígeno disuelto del cultivo se utiliza una sonda de temperatura y electrodos de pH y de oxígeno, los cuales se conectan por puertos laterales dispuestos en su región inferior. El interior del biorreactor Braun Biotech es de acero inoxidable y tiene un volumen de estanque de 20 l, siendo 15 l la capacidad para cultivo. Posee un intercambiador de calor de doble camisa, cuatro baffles y 3 agitadores de disco con 6 paletas planas de 8,5 cm de diámetro. Tiene una capacidad de aireación máxima de 25 l/min. En su parte inferior posee una salida para toma de muestras, cosecha y drenado, que es esterilizado antes y después de la toma de muestras mediante la conexión de una caldera (Fig. 5).



Figura 5. Biorreactor Braun Biotech.

B. Preparación de precultivo

La inoculación del biorreactor Braun Biotech se realizó a partir de un precultivo de *Bacillus* sp. F1 en 200 ml (para el primer cultivo en biorreactor, párrafo 3.3.3.A.) o 100 ml (para el segundo y tercer cultivo en biorreactor, párrafo 3.3.3.B. y 3.3.3.C. respectivamente) de medio A.S., tal como se mencionó anteriormente para el cultivo en el biorreactor de lecho fijo (párrafo 2.2.).

C. Preparación de medio de cultivo

El medio utilizado para el cultivo fue el A.S. Los componentes del medio fueron disueltos fuera del reactor, siendo la solución autoclavada (121°C durante 20 minutos) dentro de éste, de manera automática, manteniendo una agitación de 50 rpm. Los componentes CaCl_2 y glucosa fueron esterilizados en forma separada, en autoclave. Para la mantención de la esterilidad del medio de cultivo, el reactor permaneció encendido y con un flujo de aire de 4,5 l/min y una agitación de 124 rpm hasta el inicio del cultivo.

D. Desarrollo del cultivo

El cultivo se realizó a 28°C con una aireación variable indicada en los resultados, sin control de pH. En el caso de generación de espuma, se disminuyó el flujo de aire a 5 l/min. Se realizó ajustes para recuperar las esporas producidas en biorreactor por sedimentación de éstas en forma de flóculos. Las muestras colectadas se sometieron a análisis de biomasa, floculación y azúcar remanente. Para tomar las muestras, se acopló una autoclave que esteriliza mediante vapor la compuerta de toma de muestras. Se autoclavó 20 minutos antes de tomar la muestra, 3 minutos luego de tomar la muestra (para purgar desechos) y 20 minutos posteriores con el dispositivo que tapa la salida del líquido. Para la medición de la concentración de glucosa remanente, se utilizó el método glucose liquicolor (Human, Alemania), que consiste en una prueba enzimática colorimétrica, que permite medir concentraciones de glucosa utilizando espectrofotometría. Este método utiliza las enzimas glucosa oxidasa y glucosa peroxidasa. La calibración del electrodo de pH se realizó fuera del reactor, mientras que la del electrodo de oxígeno fue efectuada durante el proceso de autoclavado, en el cual oxígeno alcanza un valor de mínima disolución.

E. Cosecha de biomasa esporulada

Luego de finalizar el cultivo, se dejó sedimentar la biomasa durante 1 hora. Posteriormente, se colectó muestras en matraces estériles. Desde éstas, una muestra fue congelada y otra secada al vacío a 60°C. Finalmente, el cultivo restante se autoclavó, evacuándose al exterior los residuos estériles.

3. RESULTADOS

3.1. Evaluación de medios de cultivo alternativos

Anteriormente, *Bacillus* sp. F1 se ha cultivado utilizando el medio A.S. Este medio está compuesto por extracto de levadura y triptona (fuentes de nitrógeno), glucosa (fuente de carbono) y sales inorgánicas, tal como se observa en la Tabla 1 (pág. 16). Para el desarrollo del proceso a un nivel industrial es necesario utilizar compuestos de menor costo económico, tales como desechos o subproductos industriales. Por esto se evaluó la utilización de dos fuentes de nitrógeno alternativas (licor de maíz y concentrado proteico) y tres fuentes de carbono alternativas (jarabe de maíz, cocción de astillas de eucaliptos, licor Kraft) en la producción de biomasa adherida de *Bacillus* sp. F1.

3.1.1. Evaluación de crecimiento y floculación en matraces

En una primera etapa, los medios de cultivo se evaluaron (en matraces) en términos de crecimiento de biomasa y floculación. La biomasa da una evidencia de la capacidad del organismo de metabolizar los nutrientes, es decir de ocuparlos en las reacciones químicas de la célula (crecimiento, movimiento, mantenimiento, reparación y reproducción). La floculación se relaciona con la producción de SPE (necesario para la formación de biopelículas) bajo tales condiciones. La búsqueda se orientó hacia la obtención de una mayor cantidad de biomasa y floculación. Posteriormente, se utilizó

este medio de cultivo para la adherencia de biomasa en biorreactores y llevar a cabo el proceso de biosorción de metales.

A. Fuentes de nitrógeno

Las fuentes de nitrógeno alternativas analizadas para el cultivo de *Bacillus* sp. F1 fueron licor de maíz (Mazoferm[®]137100, Inducom S.A., Chile) y concentrado proteico de maíz (Mazoferm[®]137770, Inducom S.A., Chile). Para su evaluación, la elección de las concentraciones a utilizar se realizó tomando como referencia la cantidad de nitrógeno aportado por el medio A.S. (utilizado anteriormente para el estudio de esta bacteria), y se mantuvo constante la concentración de glucosa utilizada en dicho medio de cultivo, igual a 10 g/l. El cálculo de la cantidad de nitrógeno se obtuvo a partir del porcentaje de nitrógeno promedio de las proteínas, igual a un 16% (New Jersey Fedd Lab Inc., 2004), es decir utilizando el valor convencional de 6,25 g de proteína/ g de nitrógeno.

El medio A.S. posee entre sus componentes extracto de levadura y triptona (Tabla 1), los que aportan 8 y 12,8 % p/p de nitrógeno total, respectivamente (Sykita, 1983). Entonces, al sumar tales valores y teniendo en cuenta que el aporte en peso de cada uno de ellos es 1 g/l, la cantidad de nitrógeno total aportada por el medio A.S. corresponde a 0,208 gN/l.

Tabla 9. Concentraciones utilizadas para evaluación de fuente de nitrógeno, en el crecimiento y floculación de la bacteria *Bacillus* sp. F1. En cada uno de los ensayos se utilizó 10 g/l. de glucosa

Concentración [gN/l]	Licor de Maíz [ml/l]	Concentrado Proteico [g/l]
0,103	3,3	1,05
0,208	6,6	2,5
0,311	10,0	3,20
0,499	16,0	5,10
0,614	19,7	6,3

El licor de maíz contiene un 48 % de proteína en base seca y un 63 % de humedad, (Tabla 2), por lo tanto la base seca equivale al 37 %. Entonces, la cantidad de proteína total es de 17,7 %. Al dividir este número por 6,25 da como resultado la concentración de nitrógeno total, la cual es igual a 2,8 %. Es decir, hay 2,8 g de nitrógeno en 100 g de licor de maíz. Ya que 100 g tienen un volumen de 90 ml, la concentración de nitrógeno en el licor de maíz es de 31,1 g/l. El concentrado proteico (polvo) posee un 60 % de proteína (Tabla 3, pág. 18). Por lo tanto, para obtener 0,208 g/l de nitrógeno (equivalente a la concentración de nitrógeno del medio A.S.), deben disolverse 2,5 g en 1 litro de agua. La Tabla 9 resume las concentraciones utilizadas.

Para evidenciar el efecto de la utilización de licor de maíz en el crecimiento de *Bacillus* sp. F1, se cultivó la bacteria en 100 ml de medio de cultivo, en matraces de 250 ml de capacidad, a 28° C y 150 rpm de agitación. Estas condiciones son favorables para la floculación de *Bacillus* sp. F1 (Barriga, 2001). La filtración del medio de cultivo y adición de sales del medio A.S. al medio de cultivo, fueron las variables ocupadas en la

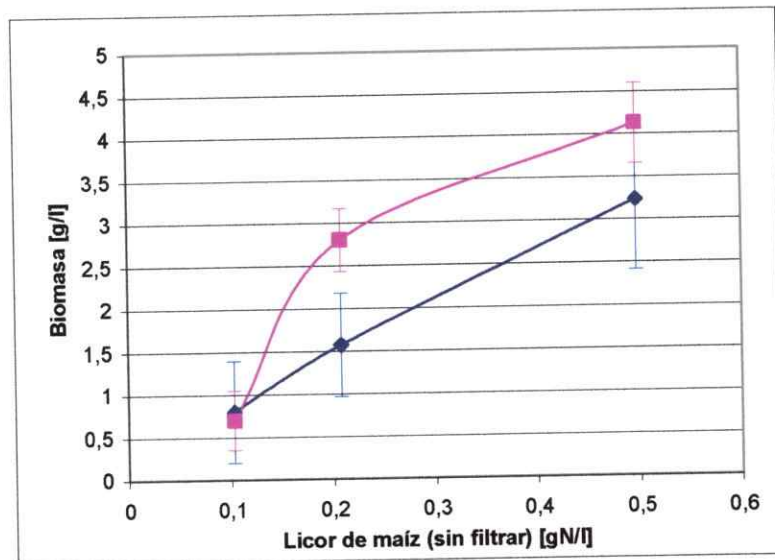
evaluación del crecimiento de la bacteria. Estos experimentos se realizaron en triplicado. La filtración del licor de maíz causó una leve disminución del crecimiento (diferencia estadísticamente significativa). A una concentración de 0,5 gN/l, se obtuvo $4,1 \pm 0,5$ g/l de biomasa, mientras que al filtrar este medio se obtuvo $2,5 \pm 0,4$ g/l. La adición de sales del medio A.S. no tuvo efectos en el crecimiento de la biomasa. Al agregar sales de A.S. al medio sin filtrar, se obtuvo $3,2 \pm 0,8$ g/l de biomasa, mientras que con el medio filtrado se obtuvo $3,8 \pm 0,2$ g/l, no encontrándose diferencias significativas (Fig. 6A, B). En cuanto a la floculación del cultivo, a medida que la concentración de nitrógeno fue mayor, el porcentaje de floculación fue aumentando (Tabla 10). Se obtuvieron porcentajes mayores al 80 % a partir de 0,208 gN/l. Al visualizar los cultivos en microscopio, se observó que en medio A.S. los flóculos no contenían esporas, mientras que los cultivos crecidos en licor de maíz poseían flóculos de mayor tamaño y algunas esporas. Esto podría evidenciar la llegada a fase estacionaria del cultivo y de una mayor producción o calidad de polisacárido.

Tabla 10. Floculación del cultivo de *Bacillus* sp. F1 en matraces, utilizando licor de maíz con y sin sales, filtrada y sin filtrar, a 28°C y 150 rpm.

C ^a [gN/L]	% F ^b L.M. ^c sin sales del medio A.S. ^d , sin filtrar	% F L.M. sin sales del medio A.S. filtrada	% F L.M. con sales del medio A.S. sin filtrar	% F L.M con Sales del medio A.S. filtrada	% F C.P. ^e
0,103	53 ± 12	68 ± 9	25 ± 15	67 ± 21	20 ± 34
0,208	90 ± 10	79 ± 18	83 ± 7	82 ± 15	45 ± 21
0,500	86 ± 7	93 ± 6	79 ± 22	93 ± 8	77 ± 5

^a Concentración. ^b Porcentaje de floculación del cultivo. ^c Licor de maíz. ^d Medio A.S.. ^e Concentrado proteico (sin filtrar).

A



B

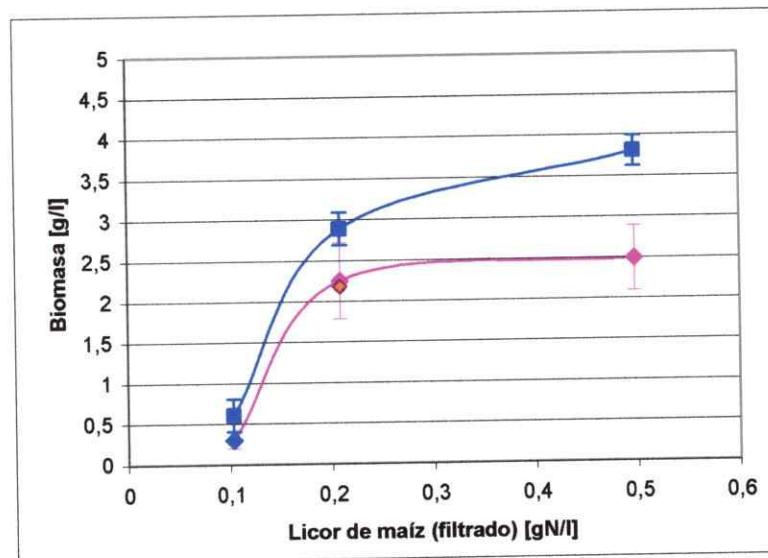


Figura 6. Crecimiento de *Bacillus* sp. F1 en matraces, utilizando licor de maíz. (A) Sin filtrar. (B) Filtrada. —◆— Cultivo con sales del medio A.S., —■— Cultivo sin sales del medio A.S. Los experimentos se realizaron en triplicado.

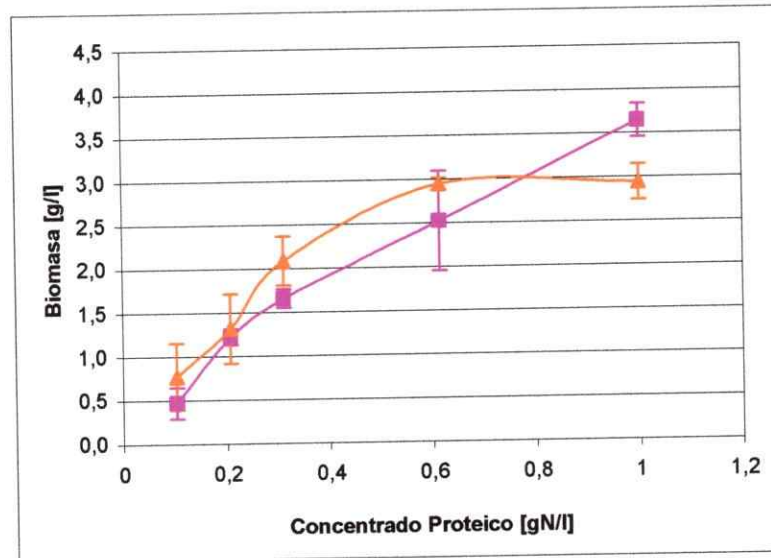


Figura 7. Crecimiento de *Bacillus* sp. F1 en matraces utilizando concentrado proteico de maíz. —■— Concentrado proteico sin filtrar. —▲— Concentrado proteico filtrado. Los experimentos se realizaron en triplicado.

Al utilizar en el medio de cultivo concentrado proteico de maíz, el crecimiento de *Bacillus* sp. F1 fue menor que con licor de maíz (Fig. 7). A una concentración de 0,208 gN/l se obtuvo $1,2 \pm 0,1$ g/l de biomasa, mientras que con licor de maíz y con el medio A.S. $2,8 \pm 0,4$ g/l y $2,2 \pm 0,3$ g/l, respectivamente. Los resultados con el concentrado proteico de maíz filtrado no mostró diferencias significativas en comparación con el no filtrado, excepto a 1 gN/l (aumentó levemente). En cuanto a la floculación del cultivo, ésta aumentó a medida que aumentó la biomasa, con un máximo de 75 % a 0,5 gN/l.

B. Fuentes de carbono

La evaluación de jarabe de maíz, cocción de astillas de eucaliptos y licor Kraft como fuentes de carbono en el crecimiento y floculación de *Bacillus* sp. F1 fue llevada a cabo

a diferentes concentraciones. Para definir la cantidad de azúcar de cada uno de estos productos, se tomó como referencia la cantidad total de azúcares contenida en cada uno de estos componentes. El jarabe de maíz posee 77% (en base seca) de azúcares totales (Tabla 4), es decir 770 g/l entre los cuales están glucosa, maltosa, y otros. La concentración de azúcares del licor Kraft y de la cocción de astillas de eucaliptos es 20 g/l (Sykita, 1983). Para dichos ensayos se utilizó licor de maíz a una concentración fija de 0,311 gN/l. Al igual que anteriormente, el experimento se realizó en un volumen total de 100 ml a pH 7, en matraces de 250 ml de capacidad.

Los resultados obtenidos, en términos de biomasa total, mostraron que se alcanzó un máximo al utilizar jarabe de maíz, a una concentración de 2 g/l. A esta concentración se obtuvo $4,9 \pm 0,4$ g/l de biomasa y un 90% de floculación. A concentraciones superiores a 2 g/l se observa que disminuyó el crecimiento, y sobre 5 g/l, una reducción progresiva de la floculación (Fig. 8). Al utilizar cocción de astillas de eucaliptos, se obtuvo una curva con pendiente negativa, siendo 1 g/l (la menor concentración analizada) la que mostró una mayor cantidad de biomasa, equivalente a 3,9 g/l (Fig. 8). Se observó una tendencia constante de altos niveles de floculación (mayor a 85 %). El licor Kraft mostró los más bajos niveles de crecimiento, alcanzando un máximo de 0,8 g/l de biomasa. En cuanto a la floculación, se obtuvo valores negativos (Fig. 8), resultado de la precipitación de la biomasa en la superficie del medio de cultivo.

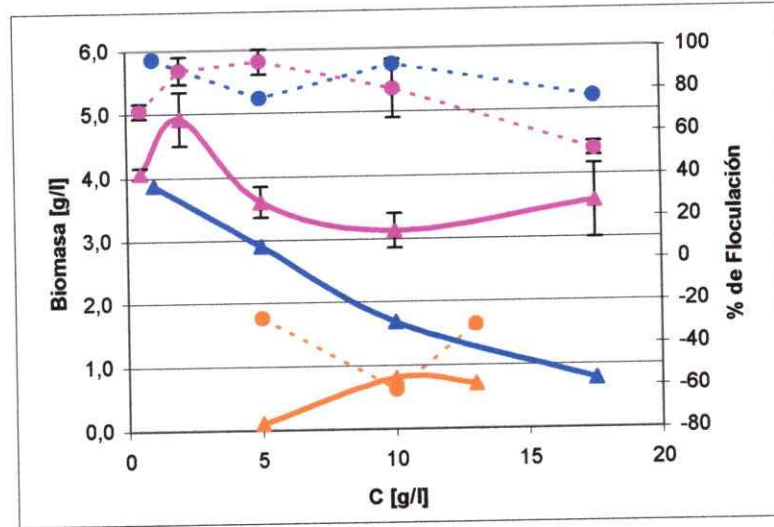


Figura 8. Efecto de la utilización de fuentes de carbono alternativas en el crecimiento y floculación de *Bacillus* sp. F1. El experimento fue llevado a cabo utilizando licor de maíz una concentración fija de 0,311 gN/l. Biomasa obtenida con: —●— jarabe de maíz, —▲— cocción de astillas de eucaliptos y —▲— licor Kraft. Porcentaje de floculación con ...●... jarabe de maíz, ...●... cocción de astillas de eucaliptos y ...●... licor Kraft.

3.1.2. Adherencia de biomasa de *Bacillus* sp. F1 con medios de cultivo alternativos

Los medios de cultivo elegidos anteriormente por rendimiento de biomasa y floculación (en matraces), en esta etapa fueron evaluados en términos de adherencia a anillos Rashig en biorreactores de 360 ml, mediante la técnica del preso seco, tal como se describe en Materiales y Métodos (Párrafo 2.4.4.).

A. Ensayo comparativo de licor de maíz y el medio A.S.

La evaluación del crecimiento utilizando licor de maíz mostró un valor de biomasa total de $0,76 \pm 0,10$ g, de los cuales la biomasa adherida a anillos Rashig correspondió a

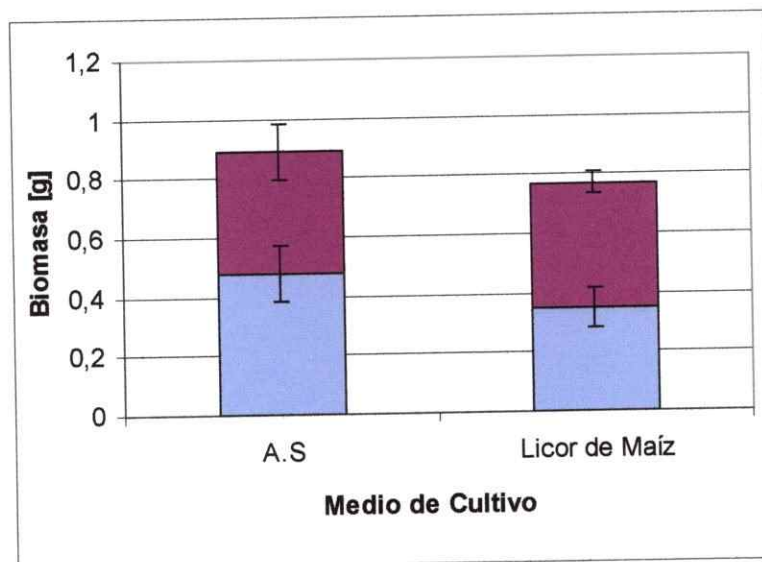


Figura 9. Crecimiento y adherencia de biomasa a anillos Rashig en biorreactor de 360 ml utilizando medio A.S. o licor de maíz. Ambos medios de cultivo se utilizaron en una concentración de 0,208 gN/l. ■ Biomasa adherida. ■ Biomasa no adherida. Los experimentos se realizaron en triplicado.

0,35 ± 0,07 g (45 % de la biomasa total). El cultivo que utilizó el medio A.S. obtuvo 0,89 ± 0,19 g de biomasa total, del los cuales 0,48 ± 0,09 g estaba adherida (54% del total) (Fig. 9). La utilización de concentrado proteico de maíz en el medio de cultivo generó alta cantidad de espuma. Por esto, sólo se pudo mantener un flujo de recirculación de 28 ml/min. Se obtuvo 0,45 g, de biomasa total, de la cual 0,06 g corresponden a biomasa adherida (14 % de la biomasa total) (resultado no mostrado).

B. Medición de adherencia utilizando licor de maíz

Al realizar los estudios de adherencia en el medio de cultivo que contenía licor de maíz, se observó un aumento de la biomasa con el aumento de concentración de

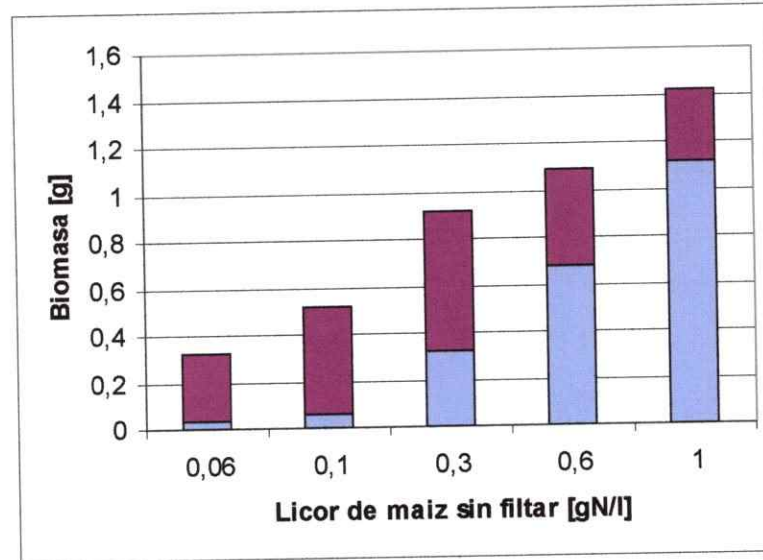
nitrógeno, en un rango 0,06 g/l a 1 g/l (Fig. 10A, B). También se observó que a medida que aumentó la cantidad de biomasa, el porcentaje de biomasa adherida también aumentó. Para 0,06; 0,103; 0,311; 0,614 y 1 gN/l los porcentajes de biomasa adherida fueron 11, 11, 36, 63 y 78 % respectivamente.

La filtración del medio de cultivo, previa a la esterilización en autoclave, tuvo un efecto en el porcentaje de biomasa adherida (Fig. 10B). Al comparar con el cultivo sin filtrar, se observó que la biomasa adherida aumenta al utilizar el medio filtrado, mientras que la biomasa total se mantiene constante. A concentraciones de 0,06; 0,103; 0,311 y 0,614 gN/l, los porcentajes de biomasa adherida fueron 15, 26, 51 y 78 % respectivamente. No se realizó un ensayo a 1 gN/l debido a dificultades para filtrar la solución a dicha concentración.

C. Medición de adherencia utilizando jarabe de maíz

En estos ensayos se obtuvo una mayor cantidad de biomasa total a medida que aumentó la concentración de jarabe en el medio de cultivo. La adherencia de biomasa en estos experimentos alcanzó un máximo a una concentración de 2,5 g/l. A partir de esta concentración, la adherencia disminuyó a medida que la concentración del jarabe de maíz aumentó (Fig. 11). El valor de adherencia máximo, de 100%, se alcanzó con 2,5 g/l de jarabe de maíz. Con 1 g/l de jarabe de maíz se obtuvo un valor de 78%. Los ensayos para evaluar la utilización de jarabe de maíz en el medio de cultivo se llevaron a cabo utilizando una concentración fija de licor de maíz, equivalente a 1 gN/l.

A



B

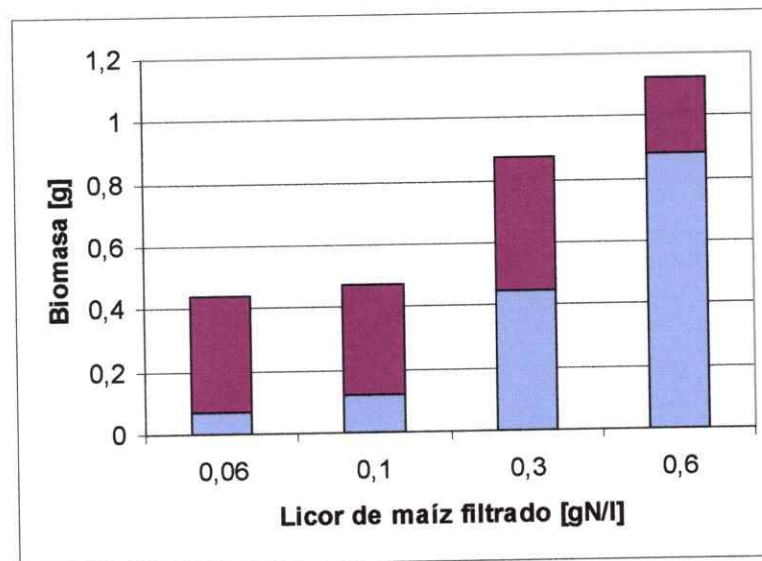


Figura 10. Crecimiento y adherencia de biomasa de *Bacillus* sp. F1 a anillos Rashig en biorreactor de 360 ml utilizando licor de maíz. (A) Sin filtrar, (B) Filtrado. Se utilizó glucosa como fuente de carbono, a una concentración de 10 g/l. ■ Biomasa adherida. ■ Biomasa no adherida. Los experimentos se realizaron en un único ensayo.

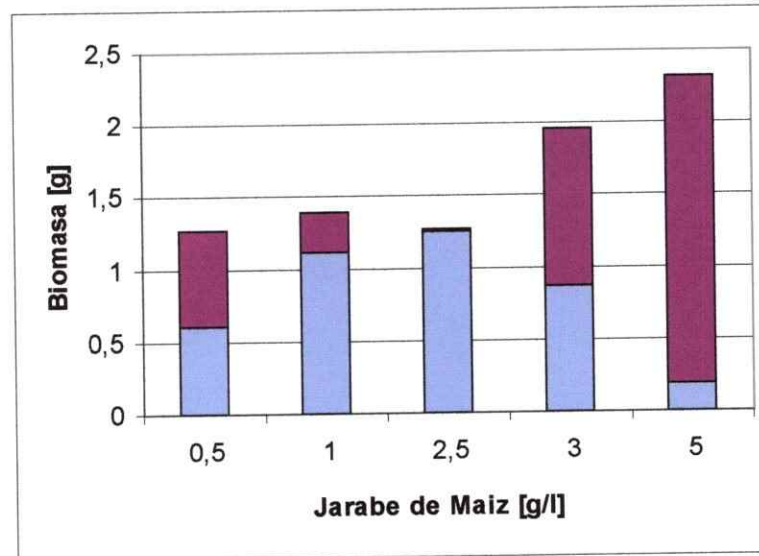


Figura 11. Crecimiento y adherencia de biomasa a anillos Rashig en biorreactor de 360 ml utilizando jarabe de maíz. En cada uno de los ensayos, se utilizó licor de maíz como fuente de nitrógeno a una concentración de fija de 1 gN/l. ■ Biomasa adherida. ■ Biomasa no adherida. Los experimentos se realizaron en un único ensayo.

D. Elección de medio de cultivo para el proceso de biosorción

Al comparar los resultados obtenidos anteriormente, se llegó a la conclusión de que la fuente de nitrógeno que produjo los mejores resultados fue el licor de maíz sin filtrar, a una concentración de 1 gN/l. La fuente de carbono elegida fue jarabe de maíz, que a una concentración de 2,5 g/l, permitió obtener 1,25 g de biomasa adherida (los ensayos con jarabe de maíz se realizaron luego de fijar una concentración de licor de maíz de 1gN/l). En resumen, el medio de cultivo a utilizar para el cultivo en el biorreactor está compuesto por 1 gN/l de licor de maíz y 2,5 g/l de jarabe de maíz.

3.2. Evaluación de soportes para la adherencia de biomasa de *Bacillus* sp. F1

3.2.1. Evaluación de adherencia de biomasa a soportes en unidad de superficie

El objetivo de este experimento fue comparar la capacidad de adherencia de la biomasa a los diferentes soportes, en biorreactor. Para hacer comparativo el experimento, se realizó los estudios empleando la misma superficie para todos los soportes (1250 cm²). La adherencia fue medida indirectamente (la técnica de peso seco es muy engorrosa por las características físicas de algunos soportes). Se evaluó la cantidad de biomasa adherida según la biosorción que ésta presentaba (a mayor cantidad de biomasa adherida, mayor biosorción). La solución de entrada tuvo una concentración de cobre C_0 de 20 mg/l. Las muestras se colectaron desde el efluente (flujo de salida) durante 4 horas. Las concentraciones de cobre obtenidas en el tiempo se muestran en la figura 12, mientras que en la Tabla 11 se resumen los resultados obtenidos. La diferencia entre la concentración de cobre de entrada y la concentración de cobre de salida da como resultado la concentración de cobre captada por la columna. Por lo tanto, el área entre la curva obtenida a partir de las muestras colectadas a la salida del biorreactor y la horizontal C_0 resulta en el cobre retenido por el biorreactor. La cantidad de biomasa total presente en el biorreactor, en el caso de los anillos Rashig medida como control fue de 0,26 g.

Las curvas obtenidas a partir de las concentraciones de cobre de las muestras colectadas mostraron diferencias tanto en los niveles de captación de cobre como en el

tiempo en el cual se alcanzó los máximos niveles de captación. Por otro lado, también se evaluó la capacidad del soporte sin bacterias para adsorber cobre (Tabla 11).

A. Piedras de acuario

La curva de biosorción obtenida al utilizar piedras de acuario presentó una forma hiperbólica. La mínima concentración de cobre del efluente ocurrió en el tiempo cero y alcanzó un valor de 2,1 mg/l de cobre (Fig.12A). La biosorción de cobre obtuvo un valor total equivalente a 25,2 mg en las 4 horas del proceso (2,04 l de volumen tratado), sin alcanzar un nivel de saturación. Por lo tanto no hubo un agotamiento de la captación de metal de parte de la columna. De hecho, a las 4 horas de proceso la concentración de cobre del efluente tiene un valor de 9,1 mg/l. También se puede apreciar que el material de relleno tiene propiedades de captación de cobre, alcanzando un valor de adsorción del metal de 9,5 mg de cobre.

B. PET

En la biosorción utilizando PET como soporte, se obtuvo curvas lineales con poca pendiente, alcanzando una concentración de 9 mg/l en la muestra tomada al cabo de tratar 2,04 litros (Fig. 12B). En cuanto a la biosorción, el valor total fue de 21,7 mg de cobre.

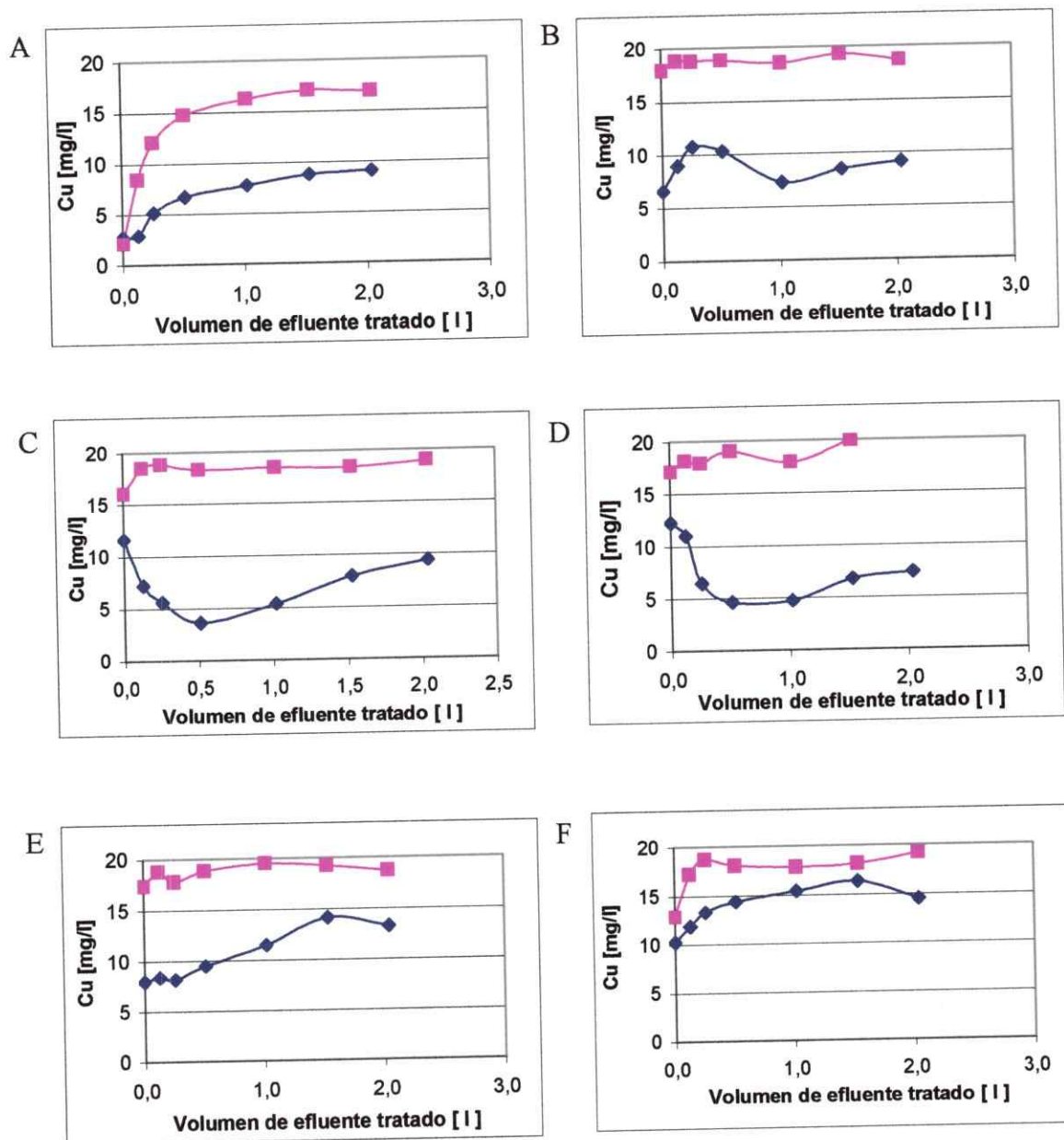


Figura 12. Adsorción de cobre obtenida una misma cantidad de superficie de soporte dentro del biorreactor, para la adherencia de biomasa. (A) Piedras de acuario, (B) PET, (C) Anillos Rashig, (D) Anillos de PVC partidos en dos, (E) Anillos de PVC y (F) Tela Raschel. La solución tratada tiene una concentración de 20 mg/l y un flujo de 8,5 ml/min. La cantidad de soporte corresponde a 1250 cm² de superficie. La biomasa se cultivó en licor de maíz 1 gN/l y 2,5 g/l de jarabe de maíz. —◆— Biosorción. —■— Adsorción del soporte. Los experimentos se realizaron en triplicado, mostrando una desviación estándar no distinguible en los gráficos.

Tabla 11. Biosorción de cobre realizada utilizando una superficie de soporte constante.

Soporte	Soporte [g]	Biosorción [mg]	Desorción [mg]	Adsorción soporte [mg]	Desorción soporte [mg]
Piedras de Acuario	177	25,2	20,1	9,5	1,3
Anillos de PVC	22	16,8	20,4	1,4	0,2
Anillos Rashig	150	26,7	10	2,3	0,3
Fragmentos de PET	25	21,7	6,4	1,6	0,7
PVC*	44	27,1	11,0	2,0	0,1
Tela Rashel	2,3	9,9	4,4	3,2	0,2
Perlita	29	nd**	nd	nd	nd

La cantidad de soporte correspondiente a 1250 cm² de superficie (igual a la entregada por 150 g de anillos Rashig). La solución a tratar tiene una concentración de 20 mg/l y la biosorción se realiza a un flujo constante de 8,5 ml/min. La desorción fue realizada con HCl 0,1M, utilizando el mismo flujo durante 1 hora. Las integrales se calcularon tomando la concentración captada de cobre en función del tiempo.

*anillos de PVC partidos en dos. ** nd: no determinado.

C. Anillos Rashig

Las curvas de biosorción utilizando anillos Rashig (Fig. 12C) como soporte mostraron un máximo de adsorción al cabo de 1 hora (0,5 l), logrando valores de 3 mg/l a la salida de la columna. Luego los valores aumentaron hasta llegar a 9,4 mg/l a las 4 horas (2,04 l), sin mostrar saturación. La cantidad total de cobre adsorbida desde un volumen de efluente de 2,04 l fue de 26,7 mg.

D. Anillos de PVC partido en dos

Un resultado similar se obtuvo para PVC partido en dos (Fig. 12D), el cual alcanzó un valor de 7,4 mg/l en 4 horas de tratamiento (2,04 litros tratados). La mínima concentración de cobre en el efluente fue de 4,6 mg/l y ocurrió al cabo de 1 hora de proceso. La cantidad total de cobre adsorbida fue de 27,1 mg, el mayor valor entre los soportes analizados, en unidad de superficie.

E. Anillos de PVC

Al utilizar anillos de PVC la curva de biosorción tuvo una forma más lineal, sin llegar a un punto de saturación, teniendo la muestra colectada al cabo de las 4 horas (2,04 litros tratados) una concentración de 13,2 mg/l (Fig. 12E). La adsorción del soporte limpio fue muy baja, manteniendo los valores de la curva cercanos a los 20 mg/l (Tabla 11).

F. Tela Raschel

La curva obtenida al utilizar tela Raschel como soporte es lineal con poca pendiente, obteniéndose un valor de 14 mg/l en la muestra colectada al cabo de 4 horas. En cuanto a la biosorción, se obtuvo valores totales de 9,9 mg (Fig. 12F).

G. Perlita

El experimento con perlita no pudo llevarse a cabo debido a que el material provocó una obstrucción del flujo de medio de cultivo dentro del biorreactor.

H. Comparación de resultados y elección de soporte apropiado.

Según los resultados obtenidos, el soporte que presentó una mayor afinidad por la biomasa fue anillos de PVC partidos. Teniendo en cuenta que se mantuvo una misma superficie de soporte, una mayor biosorción de metal al utilizar anillos de PVC partidos (Tabla 11) significa que se obtuvo una mayor cantidad de biomasa adherida, originada de una mejor interacción de la biomasa con este soporte alternativo.

3.2.2. Evaluación de adherencia de biomasa a soportes en unidad de lecho

La tasa de acumulación de biomasa no sólo depende de una mejor interacción soporte-biomasa (o soporte-película condicionante-biomasa). Una mayor cantidad de superficie para colonizar podría aumentar la cantidad de biomasa acumulada. El objetivo de este experimento fue observar el efecto en la biosorción al utilizar soportes que poseen una alta proporción superficie-volumen. Para llevar a cabo este estudio, se mantuvo constante el volumen de material soporte. Los soportes elegidos fueron PET, tela Raschel y anillos de PVC cortado en cuatro partes. Ya que se obtuvo los mayores resultados de biosorción al utilizar PVC, se evaluó el corte de estos anillos en cuatro partes, de manera de poder ingresar mayor cantidad de material, obteniendo una mayor cantidad de área colonizable por volumen de biorreactor.

Al cultivar *Bacillus* sp. F1 en presencia de estos soportes, dispuestos en cantidades que igualaban el volumen de reactor ocupado por 150 gramos de anillos Rashig, se obtuvo una mayor adsorción de cobre. La figura 13 muestra las concentraciones de cobre del efluente, luego de pasar por las columnas. Al utilizar tela Raschel, se obtuvo la mayor captación, obteniéndose un total de 34,3 mg de cobre (Tabla 12). En el caso de PVC cortado en cuatro, se obtuvo una biosorción de 20 mg, mientras que PET, 26 mg (Tabla 12).

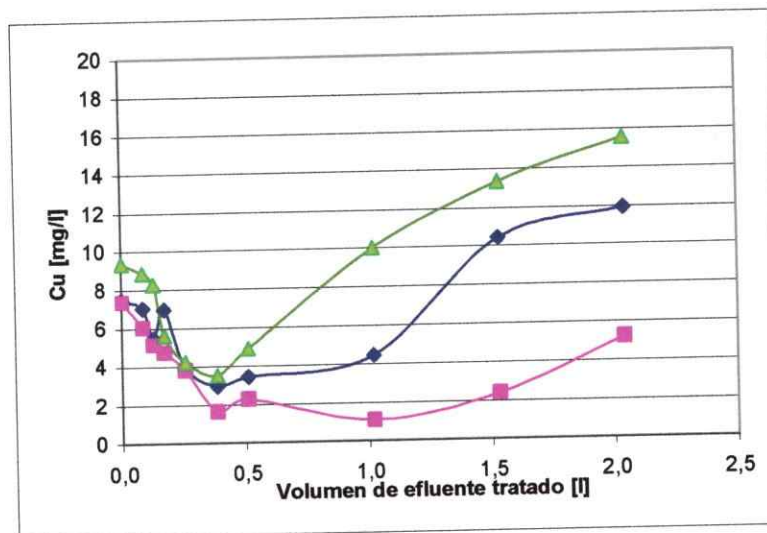


Figura 13. Adsorción de cobre obtenida utilizando un volumen constante de soporte dentro del biorreactor. La solución tratada tiene una concentración de 20 mg/l y un flujo de 8,5 ml/min. La cantidad de soporte corresponde a una unidad de lecho dada por 150 g de anillos Rashig. —■— Tela Raschel. —▲— PVC. —◆— PET. Los experimentos se realizaron en triplicado, con una desviación estándar no visible en la figura.

Tabla 12. Biosorción de cobre utilizando un volumen constante de soporte PET, tela Raschel y anillos de PVC partidos en cuatro partes.

Soporte	Cantidad [g]	Biosorción [mg]	Desorción [mg]
PET	50,0	26,0	5,5
Tela Raschel	8,2	34,3	7,8
PVC *	44,0	20,0	4,8

La cantidad utilizada corresponde al volumen de lecho dado por 150 g de anillos Rashig. La solución a tratar tiene una concentración de 20 mg/l y la biosorción se realiza a un flujo constante de 8,5 ml/min. La desorción fue realizada con HCl 0,1 M, utilizando el mismo flujo durante 1 hora.
 *anillos de PVC cortado en cuatro.

3.3. Desarrollo de un inóculo industrial de *Bacillus* sp. F1

La formulación de inóculo estándar a base de esporas de *Bacillus* sp. F1 asegurará la reproducibilidad del cultivo (obtención de biomasa adherida), y permitirá preservar la cepa en condiciones adversas. Para la elaboración de este producto (inóculo), se llevó a cabo un proceso que constituido por las siguientes etapas: elección de un medio de cultivo y producción de las esporas, escalamiento de la producción, producción de esporas en el biorreactor y evaluación del producto obtenido.

3.3.1. Evaluación de esporulación en diferentes medios de cultivo

Los porcentajes de esporulación obtenidos al cultivar la bacteria en los tres medios de cultivo evaluados, fueron diferentes. Al cabo de 24 horas a 28°C y 150 rpm, el cultivo en medio TS presentó una baja esporulación, alcanzando cerca de un 20% de esporas, en el medio 1 se obtuvo un valor cercano al 70% y con el medio de cultivo A.S. se obtuvo valores superiores al 95% (Fig. 14). Por lo tanto, debido a la alta esporulación alcanzada, el medio de cultivo elegido para el desarrollo del industrial es el medio A.S.

3.3.2 Escalamiento

Para llevar a cabo el escalamiento desde matraces a biorreactor, fue necesario estudiar la transferencia de oxígeno de los cultivos esporulados anteriormente obtenidos. Esto comprende la medición del coeficiente de transferencia de masa del oxígeno ($k_L a$)

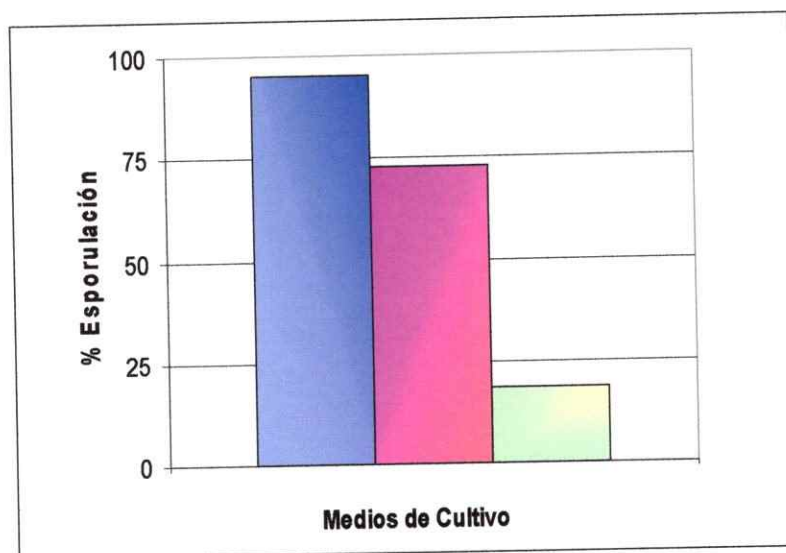


Figura 14. Esporulación de *Bacillus* sp. F1 en diferentes medios de cultivo.
 ■ Medio A.S., ■ Medio 1, ■ Medio TS.

en matraces y en biorreactor, cálculos de escalamiento y evaluación empírica de tales resultados en biorreactor.

A. Efecto de la aireación

La aireación tuvo un efecto determinante en la esporulación. Al realizar el cultivo (en 100 ml del medio A.S.) en matraces de 500 ml se obtuvo un 100 % de esporulación, mientras que en matraces de 250 ml, no se obtuvo esporulación (Fig. 15). Debido a su forma, los matraces de 500 ml, permiten que el cultivo tenga una mayor superficie de contacto con el aire para un mismo volumen de cultivo.

B. Evaluación de k_{La} en matraces

La estimación del coeficiente de transferencia de masa (k_{La}) permite relacionar variables que afectan la transferencia de oxígeno, en biorreactores y matraces. Se evaluó

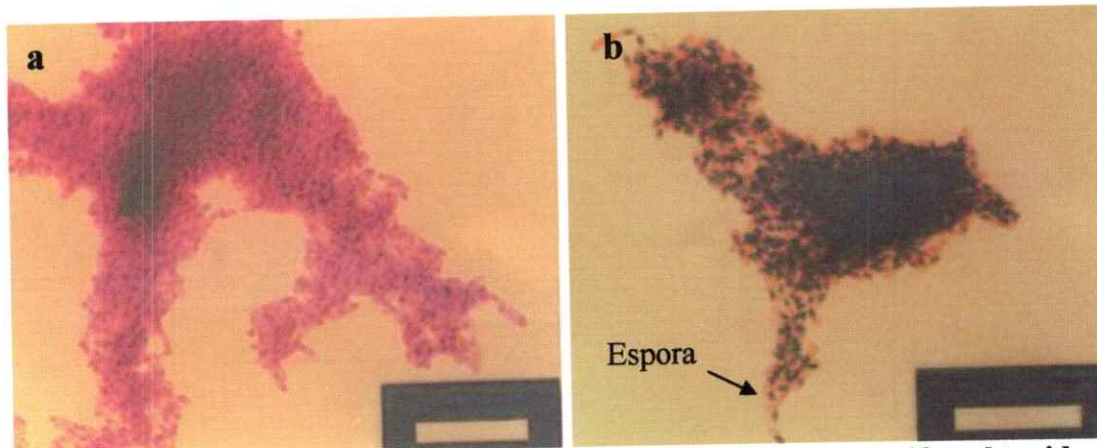


Figura 15. Flóculo de *Bacillus* sp. F1 mostrando la esporulación obtenida al realizar el cultivo en matraces con diferentes proporciones de superficie de aireación por volumen de cultivo. (a) 100 ml de cultivo en matraz de 250 ml. (b) 100 ml de cultivo en matraz de 500 ml.

el $k_{L,a}$ en matraces utilizando el método del sulfito (oxidación de sulfito a sulfato). Las curvas de transferencia de oxígeno al líquido obtenidas se muestran en la figura 16. El cálculo de $k_{L,a}$ se realizó a partir de las pendientes de consumo de sulfito obtenidas. Según el equilibrio cinético de la reacción,

$$k_{L,a} \cdot C_s = \frac{C_{i \text{ sulfito}} - C_{f \text{ sulfito}}}{2 t}$$

C_s es la concentración de saturación de oxígeno, $C_{i \text{ sulfito}}$ la concentración inicial de sulfito, $C_{f \text{ sulfito}}$ la concentración final de sulfito y t el tiempo. La concentración de saturación de oxígeno se calcula a partir de la ecuación de Truesdale (Acevedo, 2002):

$$C_s = 14,16 - 0,3943 T + 0,007714 T^2 - 6,46 \cdot 10^{-5} T^3$$

donde T es la temperatura de operación. La concentración de saturación de oxígeno se estimó en 7,75 mg/l (28°C). Este valor permitió a partir de la pendiente de la curva de

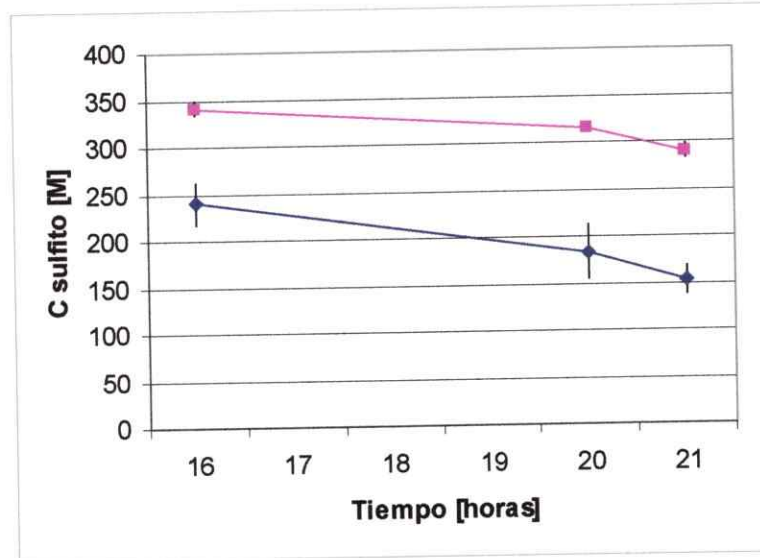


Figura 16. Evaluación de la oxidación de sulfito en el tiempo, en matraces. Se realizó en un volumen de 100 ml, en matraces de 250 y 500 ml. —■— Matraz 500 ml. —◆— Matraz 250 ml. Los experimentos se realizaron en duplicado.

Tabla 13. Coeficiente de transferencia de masa (k_{La}) para 100 ml de cultivo dispuesto en matraces de 250 y 500 ml de capacidad.

Tamaño del matraz	$k_{La} * C_s$	k_{La}	k_{La} prom [mM _{O2} /latm]
500	8,00	33,0	32,1
500	7,15	29,5	
500	8,00	33,0	
500	8,30	33,0	
250	5,41	22,3	20,0
250	3,64	15,0	
250	5,46	22,6	

desaparición del sulfito (oxidación), el cálculo del k_{La} . Para los matraces de 250 ml (con 100 ml de líquido) las pendientes obtenidas fueron -10,97 y -7,27 (R^2 igual a 0,89 para ambas), mientras que para los matraces de 500 ml (con 100 ml de líquido) las pendientes fueron -16,13 y -16,94 (R^2 igual a 0,99 y 0,93 respectivamente). En el caso de los

matraces de 250 ml, el $k_L a$ promedio fue de 20 h^{-1} , mientras que en el caso de los matraces de 500 ml, el $k_L a$ fue de 33 h^{-1} (Tabla 13).

C. Cálculos de escalamiento de transferencia de oxígeno

En esta etapa, el objetivo es reproducir en el biorreactor Braun Biotech la transferencia de oxígeno obtenida anteriormente en los matraces. Para esto, es necesario calcular la relación de $k_L a$ con las diferentes variables que determinan la transferencia de oxígeno en este biorreactor.

Los estudios clásicos que correlacionan las variables operativas del fermentador fueron desarrollados por Cooper *et al.* (1944), en donde

$$k_L a = K_1 \cdot (P_g/V_L)^\alpha \cdot V_s^\beta$$

donde, $k_L a$: coeficiente de transferencia de masa, en $\text{mM}_{\text{O}_2}/\text{l}\cdot\text{hr}/\text{atm}$; K_1 : cte de proporcionalidad, depende del diseño del reactor; V_L : volumen de reactor; P_g : potencia de gasificación por unidad de volumen, en $\text{hp}/1000 \text{ l}$; V_s : velocidad de gas superficial, en cm/min ; α , β : disminuyen con el tamaño del biorreactor.

Para el uso en términos prácticos de esta ecuación, se buscó una ecuación en donde los parámetros α y β hayan sido determinados experimentalmente en un sistema similar

al utilizado en este trabajo. Van't Riet (1983) resumió la correlación anterior para un sistema de agua pura,

$$k_{La} = 0,026 (P_g / V_L)^{0,4} V_s^{0,5}$$

donde k_{La} es el coeficiente de transferencia de masa, en s^{-1} , P_g es la potencia de gasificación, en watt, V_L el volumen de reactor, en m^3 y V_s la velocidad de gas superficial, en m/s.

En una primera aproximación, para entender la relación de k_{La} , aireación y agitación del biorreactor Braun Biotech, se realizó los cálculos de k_{La} , utilizando la ecuación de Van't Riet, suponiendo una aireación de 10 l/min y una agitación de 100 rpm. A continuación se muestran los cálculos de la relación de k_{La} y flujo de aire-agitación para el biorreactor.

i. Cálculo de la velocidad de gas superficial, V_s

La velocidad de gas superficial (V_s) es igual al flujo de aire dividido por área de reactor.

- **Cálculo de área.** Ya que el volumen total del reactor es igual a 20 litros, T (diámetro del biorreactor) es igual a 20,4 cm y H es igual a la altura H (según especificaciones técnicas del reactor).

$$A = \pi T^2/4$$

$$V = \pi T^2H/4$$

donde A es el área del reactor, V es el volumen del reactor, T es el diámetro del estanque, H la altura. Al combinar las ecuaciones de área y volumen da como resultado que el área corresponde a 326,8 cm².

- **Flujo de aire:** Se supuso un flujo de aire de 10 l/min, para evaluar la relación de $k_{L,a}$, agitación y flujo de aire.
- **Cálculo de V_s :** Ya que el área es igual a 326,8 cm² y el flujo de aire se supone 10 l/min, la velocidad de gas superficial V_s es igual a $5,1 \cdot 10^{-3}$ m/s.

ii. Cálculo de la potencia de gasificación, P_g

El cálculo de la potencia de gasificación P_g se realizó a partir de la ecuación de Michel y Miller (Acevedo, 2002)

$$P_g = k (P^2 \cdot N \cdot D^3 / F^{0,56})^{0,45}$$

donde k es igual a 0,72 (valor dado para un tamaño de reactor menor a 1000 l); N es la velocidad de agitación, en rps; D es el diámetro del agitador, en m; F es el flujo de aire, en m³/s; P es la potencia, en watt. Para esto, se calculó primeramente la potencia P, corrigiéndose según el número de turbinas y otras aproximaciones.

- **cálculo de potencia P mediante número de potencia.** El cálculo de la potencia se realiza a partir del número de potencia, el que se determinó según el gráfico del número de Reynolds, que relaciona estas variables con el tipo de turbina utilizado.

Para flujo turbulento, N_p es igual a 5 (Bates *et al*, 1963).

$$N_p = \frac{P}{N^3 T^5 \rho}$$

donde P es la potencia, N velocidad de agitación, T el diámetro interno del reactor y ρ la densidad. Resolviendo la ecuación resulta una potencia de 0,102 watt.

- **corrección del cálculo de la potencia.** Para que el cálculo anterior sea válido, debe corregirse el cálculo de P mediante la ecuación:

$$P = P_f \sqrt{[(T/D) (H_L/D)] / [(T/D)_f (H_L/D)_f]}$$

donde H_L es la altura del líquido, T el diámetro del reactor y D el diámetro de la turbina. P_f se refiere a la potencia calculada anteriormente y P la potencia corregida. Y, según parámetros encontrados según el sistema, $(H_L/T) = 1$, $(D/T) = 0,33$. Al reemplazar con los valores la potencia es igual a 0,146 watt.

- **corrección de la potencia P según el número de turbinas.** El biorreactor utilizó 3 turbinas (i). P_i es la potencia corregida.

$$P_i = i \cdot P$$

$$P_i = 0,44 \text{ watt}$$

- **cálculo potencia de gasificación P_g .** Al reemplazar estos datos en la ecuación de Michel y Miller (Acevedo, 2202) para el cálculo de la potencia de gasificación P_g y

manteniendo la suposición de una aireación de 10 l/min y agitación de 100 rpm, da como resultado una potencia de gasificación P_g de 0,138 watt.

iii. Cálculo de k_La para el biorreactor Braun Biotech

Al reemplazar los datos en la ecuación dada por Van't Riet suponiendo la potencia de gasificación obtenida al mantener una aireación de 10 l/min y agitación de 100 rpm, se obtuvo un k_La de $16,14 \text{ h}^{-1}$. Es decir, al mantener una aireación de 10 l/min y una agitación de 100 rpm en el biorreactor, se obtendría teóricamente un k_La de 16 h^{-1} . Pero este k_La es menor al necesario para obtener los niveles de esporulación encontrada en los matraces de 500 ml, el cual dio un valor de 33 h^{-1} . Por otro lado, los valores de aireación y agitación a suponer deben producir un valor de k_La mayor al obtenido en los matraces de 250 ml, igual a 20 h^{-1} .

Al afectar en mayor grado la aireación los parámetros de k_La (comparado con la agitación), se calculó mediante la ecuaciones de Van't Riet, de Michel y Miller y las otras ecuaciones mencionadas anteriormente, la agitación necesaria para obtener un k_La de 33 h^{-1} estableciendo una aireación de 10 l/min. Finalmente, según lo calculado, al aplicar una agitación de 186 rpm, el k_La da un valor de 33 h^{-1} .

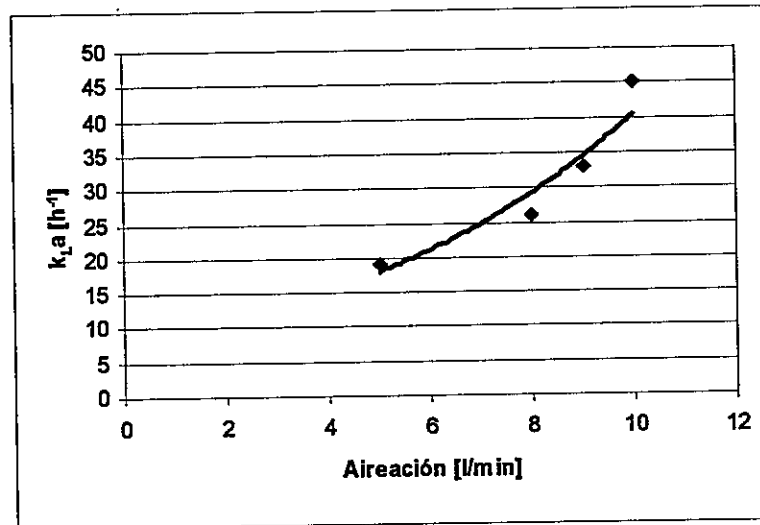


Figura 17. Medición de la transferencia de oxígeno en biorreactor Braun Biotech a diferentes niveles de aireación. Los experimentos se realizaron en un único ensayo.

D. Medición de $k_{L,a}$ en biorreactor Braun Biotech

Para evaluar los cálculos realizados anteriormente, se midió la transferencia de oxígeno al mantener una aireación en 10 l/min y una agitación de 190 rpm, mediante el método del sulfito. En la figura 17 se observa una correlación de los $k_{L,a}$ obtenidos versus la aireación suministrada, resultando una curva exponencial. Al suministrar aireaciones de 5, 8, 9 y 10 l/min se obtuvo $k_{L,a}$ iguales a 19, 26, 33 y 45 h^{-1} respectivamente. Se concluye para obtener un $k_{L,a}$ de 33 h^{-1} en el biorreactor, se necesita mantener una agitación de 190 rpm y una aireación de 9 l/min.

3.3.3. Producción de esporas de *Bacillus* sp. F1 en biorreactor

A. El primer cultivo

Se realizó igualando las condiciones de transferencia de oxígeno dadas para un 100% de esporulación en matraces. De esta manera, según las evaluaciones de $k_L a$ realizadas en el biorreactor, se trabajó primeramente con una aireación de 9 l/min y una agitación de 190 rpm. Las curvas de medición de oxígeno disuelto, pH, temperatura y agitación se observan en la figura 18. En ésta se puede observar que la presión parcial de oxígeno fue disminuyendo paulatinamente hasta llegar a un mínimo al cabo de 3 horas de cultivo. Este valor es alcanzado cuando el cultivo tiene la mayor tasa de consumo de oxígeno, lo que se traduce en la mayor tasa de crecimiento. Posteriormente, la presión parcial de oxígeno aumentó hasta alcanzar el valor de inicial. El pH disminuyó paulatinamente y, al cabo de 4 horas, alcanzó un mínimo (inmediatamente después de la fase de máximo crecimiento). Luego aumentó, para mantenerse en un pH de 6,2.

Luego de 10 minutos de cultivo se generó una gran cantidad de espuma, por lo que se debió disminuir la agitación. Se agregó glicerol estéril (50 ml) como antiespumante, con poco efecto. Luego de 35 minutos se tomó una muestra. En esta se observó flóculos, provenientes del inóculo agregado. A las cuatro horas de cultivo se observó bacterias móviles. En esta etapa, el oxígeno disuelto se mantuvo constante a 0%, indicando la entrada a la limitación por oxígeno del cultivo. El proceso se detuvo luego de 11 horas.

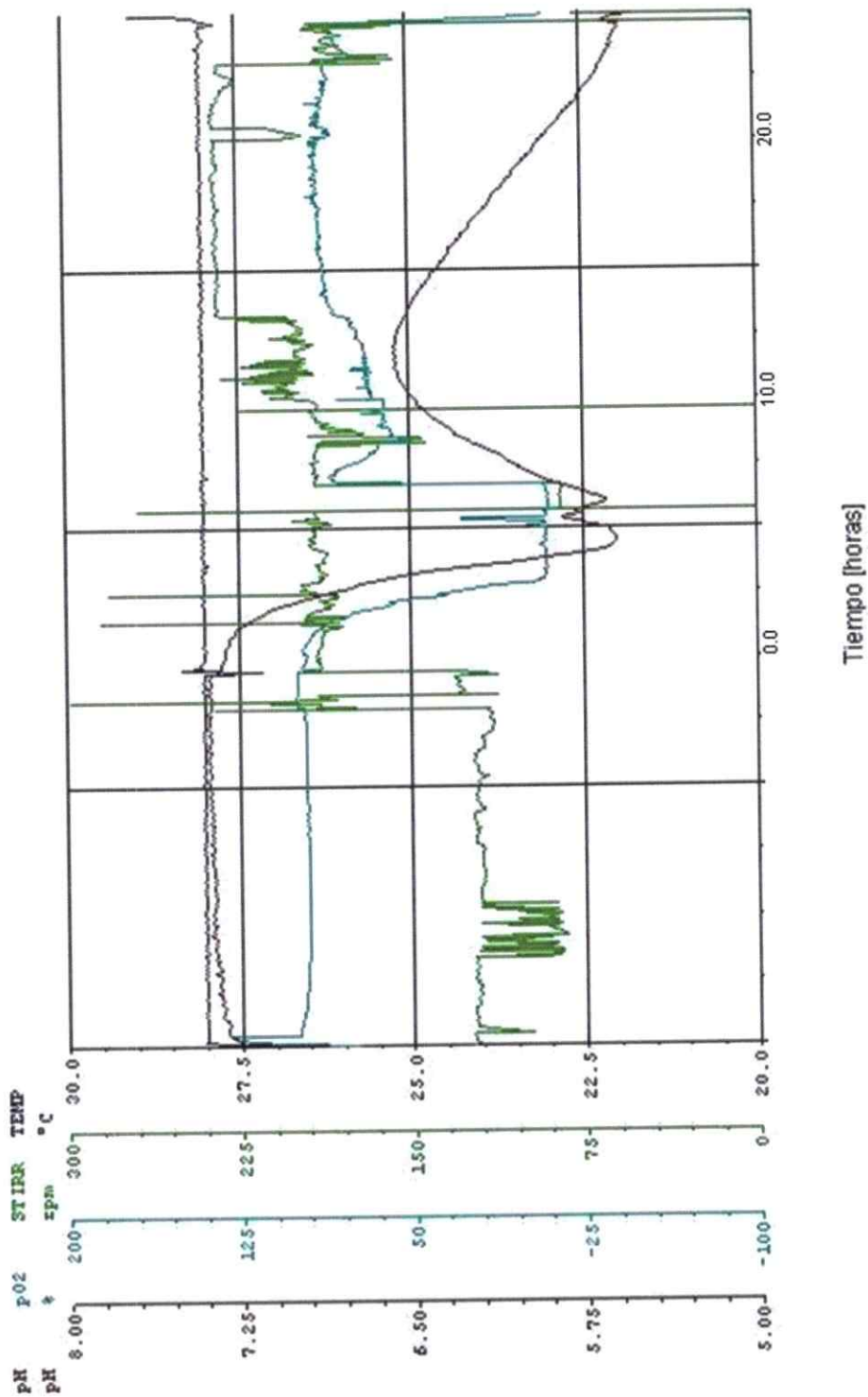


Figura 18. Cultivo de *Bacillus* sp. F1 en el biorreactor Braun Biotech a una aireación de 9 l/min y 190 rpm de agitación

La biomasa esporulada obtenida no presentó el nivel de sedimentación esperado (requerido para llevar a cabo una cosecha de ésta, sin utilizar dispositivos adicionales).

B. El segundo cultivo

Este ensayo tuvo como objetivo evaluar el comportamiento del cultivo al disminuir la agitación, de manera de evitar el rompimiento de flóculos que permiten la sedimentación de la bacteria. Para esto, se calcularon nuevos valores de aireación y agitación, para mantener la transferencia de oxígeno con una menor velocidad de agitación y una mayor aireación. Se utilizó las ecuaciones de Van't Riet y de Michel y Miller y se igualó el k_La a 33 h^{-1} . Reemplazando los valores, da una proporción de flujo de aire (F_{aire}) y de agitación (N):

$$k_La = 0.092 \cdot N^{0.72} \cdot F_{\text{aire}}^{0.4} = 1,599 \cdot 10^{-20}$$

donde N es la velocidad de agitación, en rps, F es el flujo de aire, en m^3/s . Algunos valores de agitación para diferentes aireaciones, se muestran en la Tabla 14. Finalmente, valores utilizados para mantener un k_La de 33 h^{-1} fueron de de 20 l/min y 120 rpm.

En la figura 19 se muestra el desarrollo del cultivo. La mínima presión parcial de oxígeno se alcanzó luego de 5 horas de cultivo, y luego de éstas empezó a aumentar rápidamente. El pH comenzó a disminuir luego de 3 horas, llegando a un mínimo de 5,6, a las 5 horas. El cultivo se detuvo luego de 21 horas, presentando alta esporulación y sedimentación.

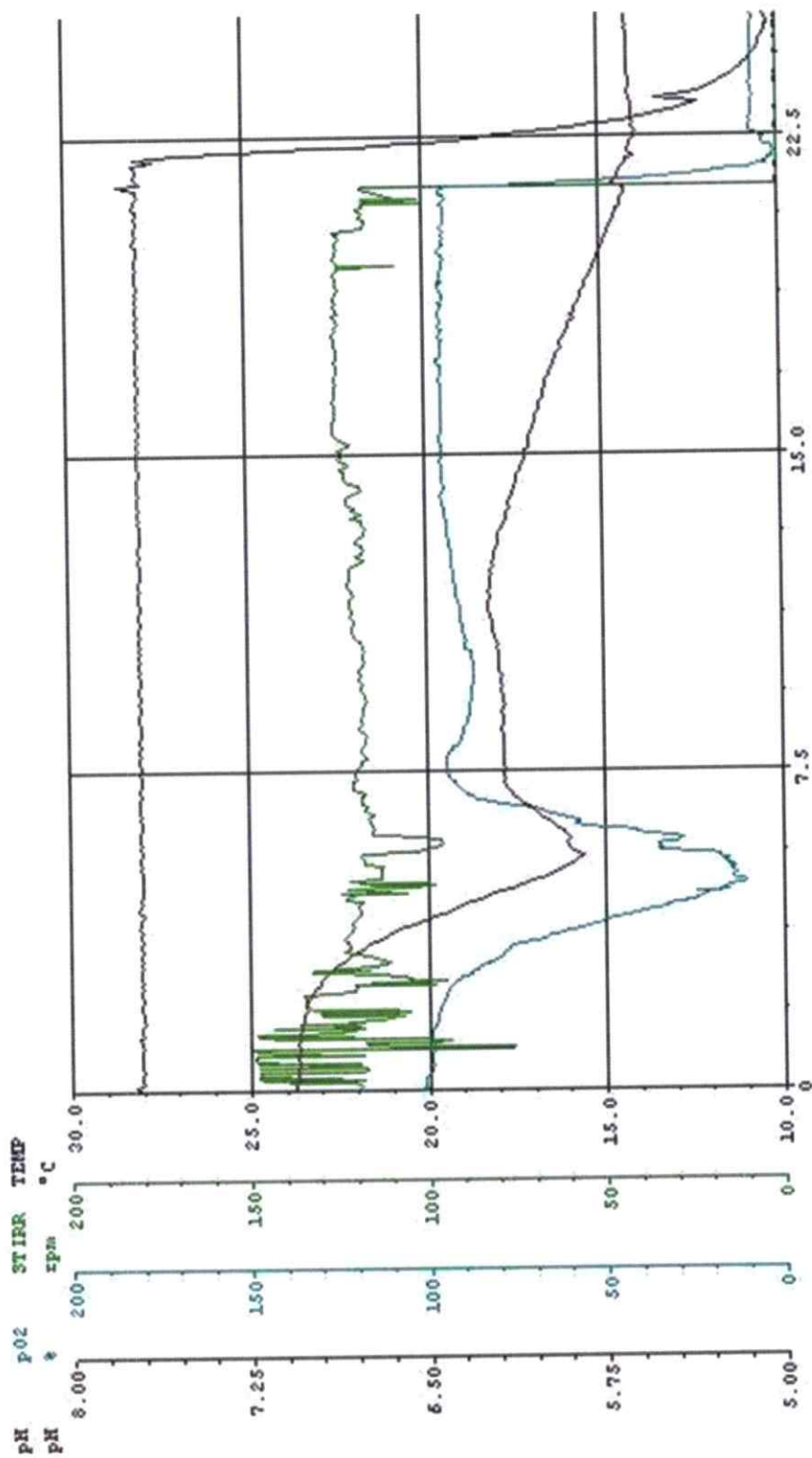


Figura 19. Cultivo de *Bacillus* sp. F1 en el biorreactor Braun Biotech a una aireación de 20 l/min y 120 rpm de agitación

Tabla 14. Valores de agitación y aireación, según estimación realizada utilizando ecuaciones de Van't Riet y de Michel y Miller, que permiten mantener el $k_L a$ en un valor de 33 h^{-1} .

Agitación [rpm]	Flujo de aire [l/min]
50	100
100	28
105	26
120	20
129	18
150	14

C. El tercer cultivo

El objetivo de este experimento fue realizar una repetición del cultivo anterior y observar el comportamiento del cultivo al ir suministrando progresivamente solo la cantidad de oxígeno necesaria para que éste no fuese limitante, a partir de 5 l/min hasta llegar a 20 l/min. Esto último se realizó para evitar una generación de espuma excesiva.

En cuanto al progreso del cultivo, por microscopia de contraste de fase se observó desde el inicio de cultivo hasta las 5 horas, una cantidad creciente de bacterias, agrupándose lentamente en el tiempo, sin esporulación. A las 7 horas, se observa una alta cantidad de flóculos, los que a las 9 horas han crecido de tamaño, pero no se observó esporas. La muestra tomada a las 11 horas muestra un resultado interesante: flóculos con un 100% de esporulación, mientras otros permanecen sin esporular (Fig. 20).

La detención del cultivo se realizó luego de 13 horas. Se obtuvo una alta cantidad de esporas y se evitó el rompimiento de flóculos. El cultivo se dejó toda la noche (17 horas)

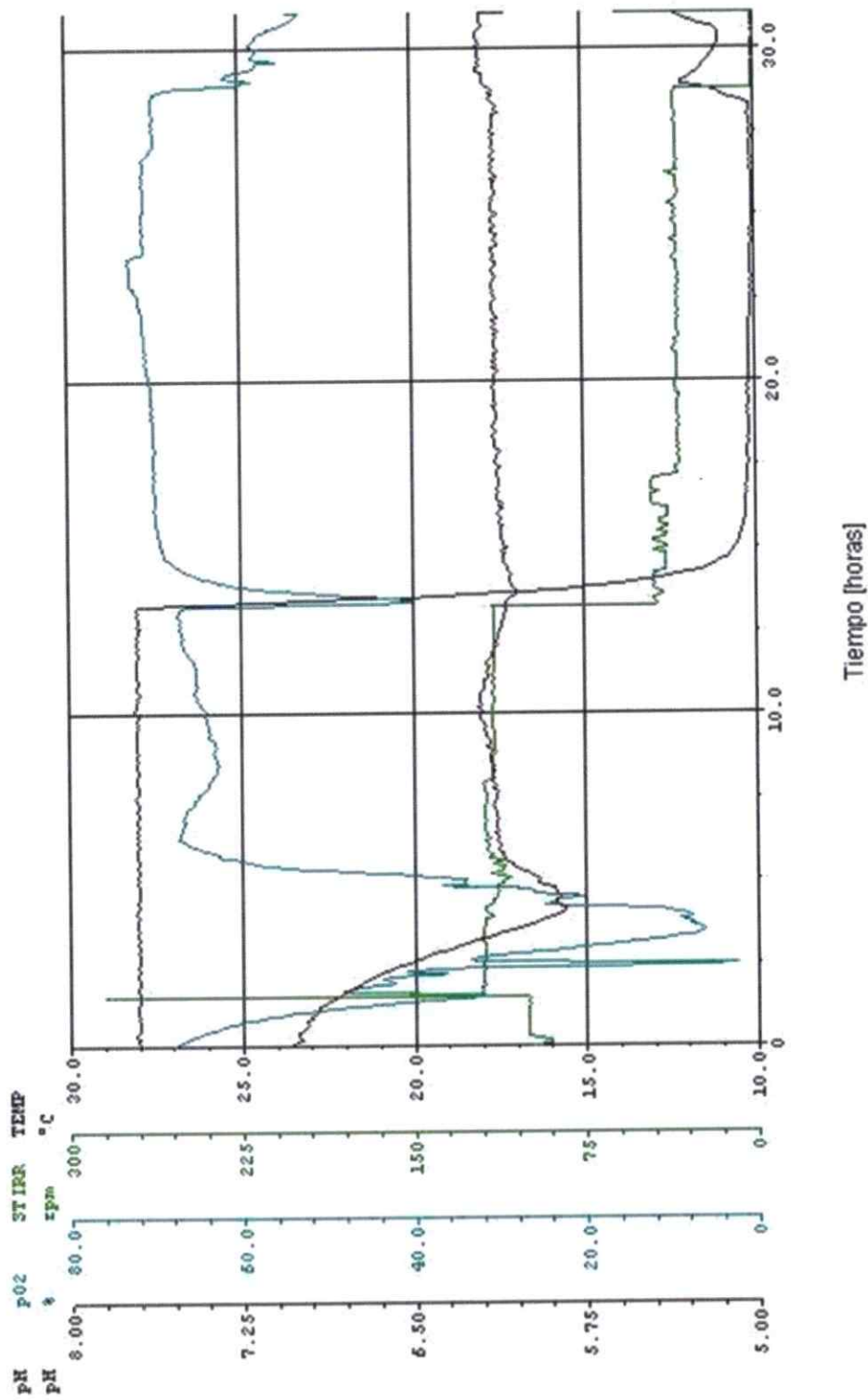


Figura 20. Cultivo de *Bacillus* sp. F1 en el biorreactor Braun Biotech a 120 rpm de agitación y un aumento progresivo de aireación de 5 l/min hasta a 20 l/min.

a 10°C y 50 rpm y 3 l/min de aireación. Luego de 30 horas desde el inicio del proceso, la bacteria permaneció con un 100 % de floculación y con un 100% de esporulación. Se obtuvieron altos niveles de floculación (100%) al cabo de 12 horas de cultivo; en cuanto a la biomasa, se obtuvo un máximo de 2,1 g/l en 13 horas de cultivo (Fig. 21). Luego de 30 horas del inicio del cultivo, la biomasa disminuye a 1,8 g/l. Finalmente, se colectó muestras para ser evaluadas en su capacidad de formar biopelículas. Una de éstas fue congelada a -20°C y la otra fue sometida a secado a 60°C en estufa al vacío.

Se realizó análisis de glucosa remanente en el cultivo. Debido a que el medio A.S. contiene niveles de glucosa en exceso, se midió el consumo en el tiempo durante el tercer cultivo realizado, con aireación de 20 l/min y agitación de 120 rpm. Se pudo observar un consumo total de 2 g/l al cabo de 13 horas (Fig. 21).

A. Evaluación de formación de biomasa adherida

Las muestras colectadas del tercer cultivo, sometidas a congelamiento o secado al vacío, fueron evaluadas en su capacidad de producir biomasa adherida al soporte. Para esto, se utilizó biorreactores de 360 ml de cultivo y anillos Rashig como soporte sólido para la evaluación de la adherencia de la biomasa. La biomasa adherida obtenida utilizando el inóculo seco fue de 0,76 g/l, con el inóculo congelado de 0,97 g/l, mientras que el control (precultivo líquido, párrafo 2.2) fue de $1,27 \pm 0,09$ g/l (Fig. 22). En la inoculación con el cultivo seco, la biomasa se encontraba adherida en el matraz en el cual se había secado al vacío, por lo cual se aplicó un tratamiento con perlas de vidrio.

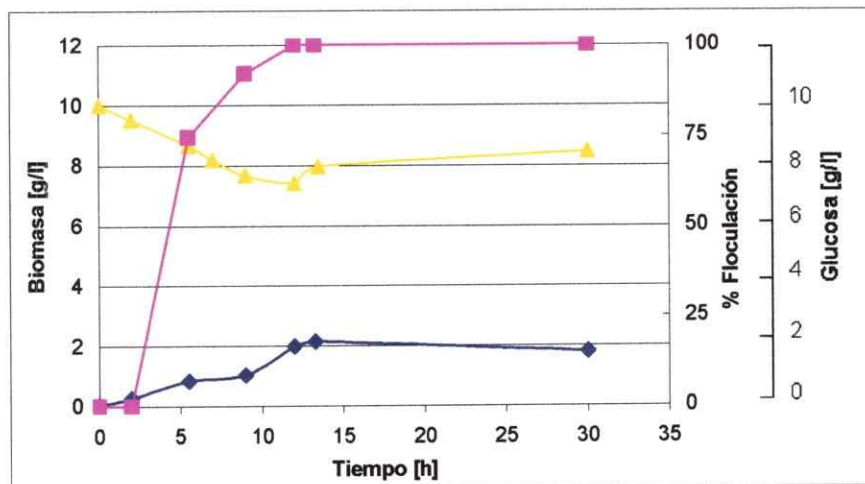


Figura 21. Biomasa, floculación y consumo de glucosa del tercer cultivo de *Bacillus* sp. F1 en biorreactor Braun Biotech. El cultivo fue realizado a 120 rpm de agitación con aumento progresivo de aireación desde 5 l/min hasta 20 l/min, siendo suministrada manteniendo el nivel mínimo suficiente para que el oxígeno no fuese limitante en el cultivo. ◆ Biomasa. ▲ Glucosa. ■ % Floculación.

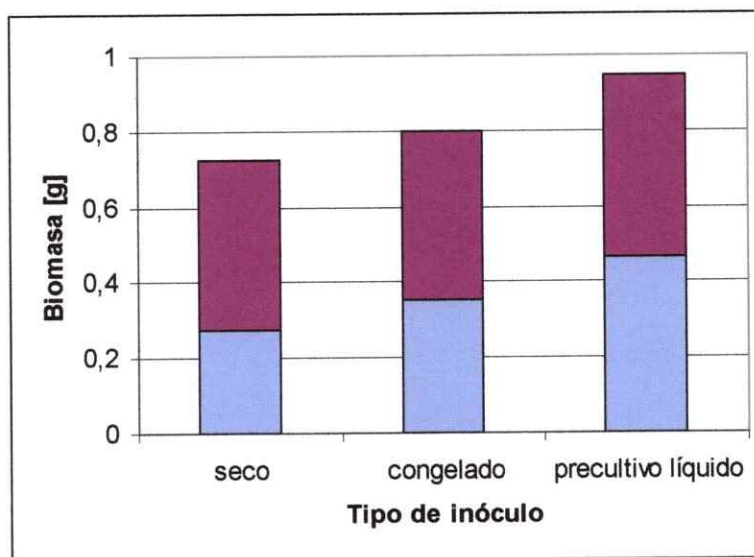


Figura 22. Cultivo de *Bacillus* sp. F1 desarrollado en biorreactor de 360 ml, utilizando como inóculo esporas producidas en el biorreactor Braun Biotech, sometidas a diferentes condiciones de almacenamiento.

■ Biomasa adherida. ■ Biomasa no adherida.

4. DISCUSION

En este trabajo se demostró la capacidad de obtener biomasa adherida de la bacteria *Bacillus* sp. F1 utilizando medios de cultivos y soportes sólidos alternativos, de bajo costo económico. Mas aún, el estudio logró aumentar la biomasa adherida (de 0,47 g de biomasa adherida obtenida con el medio A.S. anteriormente utilizado, a 1,25 g con el medio alternativo licor de maíz) en biorreactores de 360 ml. También aumentaron los niveles de biosorción de cobre (de 26,7 mg a 34 mg de cobre captado, en 2 litros de solución de cobre 20 mg/l). Además, fue posible desarrollar un método para producir un inóculo de esta bacteria, para el proceso de biosorción de metales a un nivel industrial, sin necesidad de ocupar dispositivos especiales para la recuperación de biomasa desde el biorreactor.

La evaluación de medios de cultivo alternativos se llevó a cabo estudiando diferentes fuentes de nitrógeno (licor de maíz, concentrado proteico) y fuentes de carbono (jarabe de maíz, cocción de astillas de eucaliptos, licor Kraft) de origen industrial, en términos de crecimiento, floculación en matraz y adherencia (en biorreactor) de *Bacillus* sp. F1.

El crecimiento de *Bacillus* sp. F1 en matraces y en biorreactor, utilizando licor de maíz, fue similar al obtenido con el medio A.S.. La filtración del licor de maíz disminuyó levemente el crecimiento en matraces. Sin embargo, en biorreactores, la biomasa total obtenida fue igual para licor de maíz filtrado o sin filtrar. Una posible explicación de que el filtrado del licor de maíz de un menor crecimiento de la bacteria en

matraces, es que los sólidos suspendidos pudieran ser nutrientes. Al retirar los sólidos mediante filtración, se retirarían entonces nutrientes, disminuyendo el valor nutritivo del medio. La adherencia en biorreactores fue menor con licor de maíz que con licor de maíz filtrado o el medio A.S. Una razón puede ser que los residuos producto de la esterilización del licor de maíz en la autoclave hayan tapado los inyectores, causando variaciones en aireación y recirculación y eso haya afectado la formación o mantención de biopelículas. Por otro lado, puede ser que los sólidos suspendidos presentes en el licor de maíz compitieran por la biomasa a adherir con los anillos Rashig, favoreciendo la floculación por sobre la formación de una biopelícula. Una tercera hipótesis es la diferencia en adherencia (dado por composición de SPE, pared celular, etc.) causada por diferentes medios de cultivo.

La utilización de diferentes concentraciones de fuente de nitrógeno, para un mismo medio de cultivo, afectó la cantidad de biomasa, adherencia y la floculación de *Bacillus* sp. F1. Los resultados obtenidos en este trabajo indicaron que, a mayores concentraciones de nitrógeno, los porcentajes de adherencia y floculación aumentaron. En relación a este tema, hay tres puntos que podrían estar influenciando el cultivo: el sistema de comunicación célula-célula "quórum sensing", dilución de las SPE, y presencia de iones Ca^{2+} y Mg^{2+} en el medio de cultivo. El estudio de estos factores podría permitir a futuro aumentar la cantidad de biomasa presente en la biopelícula, obtenerla en menor tiempo o utilizar una menor cantidad de nutrientes.

La comunicación celular bacteriana (“quorum sensing”), permite que éstas sean capaces de coordinar actividades tales como migración a medio ambientes mas apropiados, adoptar modos de crecimiento tales como formación de biopelículas y esporulación, entre otras. En este tipo de conducta colectiva, las bacterias se comunican a través de pequeñas moléculas llamadas autoinductores. La regulación de la conducta está determinada por la densidad de población. En las bacterias Gram negativas los inductores son N-acil homoserina lactonas, mientras que en las Gram positivas son péptidos procesados postraduccionalmente (de Kievit e Iglewsky, 2002). Hay evidencias que sugieren que el “quorum-sensing” puede jugar un rol central en la fisiología de las bacterias, ya que las vías de “quorum-sensing” convergen con vías de sensores de agotamiento de nutrientes para regular la entrada de las células a la fase estacionaria (Lazazzera, 2000).

El sistema de comunicación “quorum sensing” podría ser la razón del aumento de adherencia de biomasa al haber mayor concentración de bacterias. En el caso de un cultivo con baja cantidad de nutrientes, ya que hay una concentración menor de células, la señal que activaría la agregación estaría más diluida, ya que hay menor número de bacterias excretándola al medio. Por lo tanto, el porcentaje de floculación activado por dicha supuesta señal, sería menor. Pero, si una cantidad suficiente de bacterias está presente, la concentración de autoinductores supuestamente alcanzaría un nivel umbral, que permite a la bacteria percibir la masa crítica y responder activando o reprimiendo genes. Al utilizar diferentes medios de cultivo, la expresión podría variar dependiendo de los componentes del medio.

Se ha observado que en *Bacillus subtilis* (el organismo modelo de las bacterias Gram positivas) existen señales extracelulares relacionadas con una alta densidad de población que generan cambios en la expresión génica (Ren *et al.*, 2004). Estas señales son requeridas para llevar a cabo la transición de una bacteria desde un estado planctónico a un estado biopelícula, para luego dar paso a la formación de cuerpos fructificantes (Branda *et al.*, 2001). Los cuerpos fructificantes son estructuras aéreas que liberan esporas, en sectores localizados de estas estructuras. Se ha demostrado que, al observar las biopelículas como una comunidad multicelular asociada a una superficie, la esporulación es un fenómeno social, con un alto grado organizacional y temporal (Branda *et al.*, 2001). También existen reportes que sugieren que *Streptococcus gordonii*, una bacteria Gram positiva, formadora de placa dental, utiliza ese mecanismo para la formación de biopelículas (Loo, 2000).

Pseudomonas aureoginosa es una bacteria Gram negativa que crece tanto en suelos, pantanos, costas marinas, como en plantas y animales. Las infecciones humanas producidas por esta bacteria son contraídas principalmente por individuos con fibrosis cística, víctimas de quemaduras e individuos con cáncer. *P. aeruginosa* es una de las bacterias más comúnmente estudiadas en la formación de biopelículas. Existe relación entre “quorum sensing” y la formación de biopelículas (de Kievit and Iglewsky, 2000). Los análisis de mutantes deficientes en la producción de la molécula señal, 3-oxo-C₁₂-HSL, revelaron que la mutación impedía la producción de una biopelícula con arquitectura tridimensional, característica que se daba en la cepa parental. De esta

manera, parece que el "quorum sensing" juega un rol crítico en la formación de biopelículas maduras y diferenciadas de esta bacteria.

La dilución de los SPE formados es otro posible factor que podría incidir en la adherencia. Una mayor dilución del cultivo contribuye a solubilizar los SPE formados por las células, a causa de la tensión superficial dada por interacciones de Van der Waals y puentes de hidrógeno (Stumm, 1992). Estas fuerzas actúan entre las moléculas del líquido y las moléculas que se encuentran en la región sólido-líquido (esta superficie puede ser el SPE en el cual se encuentran embebidas las células o el substratum). Esto resulta en una atracción de las células hacia el líquido y no hacia la superficie a adherirse, lo que podría estar reprimiendo la formación de los flóculos. Entonces, a mayor dilución, menor adherencia.

La presencia de los iones de calcio y magnesio afecta la formación de biopelículas. Allison y Sutherland (1987) estudiaron la relación entre estos iones divalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} y la producción de SPE en cultivos mixtos. Ambos iones son necesarios para la formación de la biopelícula. Sin embargo, una baja presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} en el medio de cultivo causó una excesiva cantidad de polímero, generando un impedimento estérico en la interacción de las bacterias con la superficie. En relación con esto último, los resultados obtenidos con *Bacillus* sp. F1 demostraron que con licor de maíz 0,208 gN/l (0,021 mg/l de Ca^{2+} y 0,53 mg/l de Mg^{2+}) el porcentaje de adherencia obtenida a anillos Rashig fue menor a la alcanzada con el medio A.S. (7,6 mg/l de Ca^{2+} y 10,26 mg/l de Mg^{2+}). Una mayor cantidad licor proporciona cantidades más elevadas de Ca^{2+} y

Mg^{2+} . Por lo tanto, la cantidad de polímero podría disminuir a medida que aumenta la concentración de estos iones, evitando una excesiva cantidad de SPE, y el impedimento estérico que se genera entre las moléculas de SPE. Esto podría explicar el aumento de porcentaje de adherencia obtenido a mayor concentración de licor de maíz. Existen otros reportes que relacionan Ca^{2+} y adherencia. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus downei*, el Ca^{2+} estabiliza directamente las interacciones intercelulares en los biopelículas, presumiblemente por la formación de puentes salinos intercelulares (Kierek y Watnick, 2003). En cuanto a la relación directa de Ca^{2+} y SPE, la bacteria *Myxococcus xanthus* también aumenta su concentración de SPE y aglutinación en presencia de Ca^{2+} , en respuesta al agotamiento de nutrientes. La producción de exopolisacáridos fue inducida en respuesta a la entrada en fase estacionaria de crecimiento y por la adición de Ca^{2+} a las células, causando su aglutinación (Kim *et al.*, 1999).

La utilización de fuentes de carbono alternativas permitió obtener mayores cantidades de biomasa y adherencia que utilizando glucosa en exceso. En el caso de jarabe de maíz, se llegó a un máximo de $4,9 \pm 0,4$ g/l de biomasa al utilizar 2 g/l de jarabe de maíz, mientras que con 10 g/l de glucosa (utilizando igual cantidad de fuente de nitrógeno, 0,311 gN/l) fue de 3,0 g/l de biomasa. La importante diferencia de biomasa total generada en el reactor con glucosa y con jarabe de maíz, puede deberse a que este último posee en su composición otros azúcares tales como maltosa, que podrían ser mas rápidamente metabolizables que la glucosa, estimulando el crecimiento de la bacteria *Bacillus* sp. F1. En el caso de cocción de astillas de eucaliptos, se observó una

disminución del crecimiento a medida que aumentaba la concentración de la fuente de carbono. El licor Kraft produjo muy poca biomasa. Este posee alrededor de un 20 % de minerales, de entre los cuales se encuentran dióxido de sulfuro, sulfito y sulfato de calcio (Sykita, 1983). También posee metales pesados, tales como arsénico, cobre y plomo, en cantidades no definidas. Estos compuestos inhiben el crecimiento. Al aumentar la concentración de la fuente de carbono, la cantidad de biomasa disminuyó, probablemente por el aumento de concentración de componentes inhibidores del crecimiento.

Los resultados de adherencia alcanzaron un máximo al utilizar 2,5 g/l de jarabe de maíz, pero luego disminuyó a pesar de que la cantidad de biomasa total continuaba aumentando. Por lo tanto, se observó que la glucosa tiende a inhibir la formación de biopelículas en *Bacillus* sp. F1. Esto es consistente con lo mencionado por Stanley *et al.* (2003) a cerca de la necesidad de un agotamiento de la glucosa para la activación de genes, en el paso desde un estado planctónico a una biopelícula, en *Bacillus subtilis*. En aquel trabajo se usó la técnica de microarreglos de ADN para identificar aquellos genes estaban siendo diferencialmente expresados durante el paso de la bacteria desde un estado planctónico a uno sésil (biopelículas), encontrando 519 genes. A partir de éstos, identificaron tres señales: 2 factores transcripcionales (Spo0A, sigma-H, los cuales previamente se sabía que afectaban la formación de biopelículas de *B. subtilis*) y el agotamiento de glucosa. A través de ensayos cuantitativos y microscopia láser de barrido, se observó que la glucosa inhibía la formación de biopelículas a través de la proteína de control de catabolito, CcpA. En términos prácticos, observaron que con 1%

de glucosa obtenían niveles de formación de biopelículas 2 veces menores y de dos veces menos profundidad que con un 0,1%, mientras que con 1 % de fructosa, cuatro veces menores que con 0,1 % de este azúcar (Stanley *et al.*, 2003). También está el caso de la bacteria *Myxococcus xanthus*. Esta bacteria tiene la capacidad de formar cuerpos fructificantes, los cuales son agregados multicelulares llenos de esporas, formados en superficies sólidas, producidos en respuesta al agotamiento de nutrientes. Se evidenció que aumenta su concentración de SPE y aglutinación en respuesta a agotamiento de nutrientes (Kim *et al.*, 1999).

El efecto positivo del jarabe de maíz en la adherencia de *Bacillus* sp. F1 pudo deberse a cambios en las propiedades de la superficie de la célula que afectan la adherencia (pared celular, SPE). La variación de las propiedades fisicoquímicas de la superficie bacteriana con diferentes medios de cultivo ha sido estudiada en *Listeria monocytogenes* Scott A (Briandet *et al.*, 1999), una bacteria Gram positiva patógena de humano encontrada en alimentos. Mediante análisis de afinidad celular a solventes polares y no polares se observó cambios en las propiedades de la pared en términos de hidrofobicidad, propiedades ácido-base (de aceptor o dador de electrones), etc. Al cultivar la bacteria en Trypticase Soy Broth suplementada con 6 g/l de extracto de levadura, la superficie celular fue menos hidrofóbica que al ser cultivada en una infusión cerebro-corazón. Las células cultivadas en medio suplementado con glucosa o ácido láctico exhibían mayor afinidad con solventes dadores de electrones, lo que indicaba presencia de mayor cantidad de grupos aceptores de electrones en su superficie, además de aumentar su hidrofobicidad. Los resultados explicaban las interacciones ácido-base

relativas a su adherencia a acero inoxidable (dador de electrones) (Briandet *et al.*, 1999).

Por otro lado, el método utilizado para medir la biomasa, pudo ser poco exacto. Los sólidos y precipitados de licor de maíz generados por la autoclave fueron causa de poca homogeneidad del líquido, pudiendo haber generado errores en la medición mediante la técnica de peso seco. Otros tipos de medición de biomasa tampoco dan mucha exactitud, debido a la formación de flóculos. La técnica de recuento de células puede ser complejo, ya que la disgregación mecánica puede dañar las células. Técnicas alternativas tales como conteo celular en placas de Petri y densidad óptica también serían poco adecuadas. La medición de DNA y la medición de ATP pueden ser mejores para la medición del crecimiento, ya que su cantidad es aproximadamente constante para un organismo dado (Wang *et al.*, 1978).

En el presente trabajo, el objetivo final de la evaluación de los soportes fue la obtención de una mayor cantidad de metal adsorbido por la biomasa. Se evaluó la captación de cobre por la biomasa adherida, manteniendo la cantidad de superficie de soporte, o el volumen de soporte dentro del biorreactor. Según los resultados obtenidos, la biomasa mostró una mayor afinidad por los siguientes soportes (evaluación en términos de superficie): PVC, anillos Rashig y piedras de acuario. Estos substratum poseen características diferentes, siendo el PVC hidrofóbico, mientras que los anillos Rashig y piedras de acuario hidrofílicos y con carga parcial negativa. Sin embargo, al elegir un soporte, fue importante la cantidad de biomasa adherida generada, en un volumen de lecho de biorreactor. La tela Raschel fue elegida pues posee una alta

cantidad de superficie, en un volumen pequeño, ofreciendo una mayor cantidad de sitios colonizables por volumen de soporte. En términos prácticos, la cantidad de biomasa adherida generada obtuvo mejores resultados de biosorción de cobre, de lo cual se deduce una mayor cantidad de biomasa por volumen de reactor.

La adsorción bacteriana a un sólido es resultado de interacciones químicas complejas entre la célula, la superficie y la fase líquida (Briandet *et al.*, 1999). Las interacciones moleculares de la interfase sólido-agua pueden ser: reacciones químicas (hidrólisis, complejación, intercambio de ligandos, puentes de hidrógeno), interacciones eléctricas (electrostáticas, polarización) e interacciones con el solvente (expulsión hidrofóbica). Las propiedades del substratum tales como hidrofiliidad, hidrofobicidad, impedimento estérico, rugosidad y la existencia de una película condicionante en la superficie, se piensa que son importantes en el proceso de anclaje inicial (Cunliffe *et al.*, 1999). La importancia de una alta adsorción inicial es que al haber una mayor cantidad de células adsorbidas irreversiblemente, podrían producir mayor cantidad de biopelículas o mejor mantención de éstas. Se ha reportado que el desanclaje de las biopelículas es mayor al romper la interacción de las células adheridas al sustrato. Es decir, una mejor interacción bacteria-sustrato previene el desanclaje producto de estrés hidrodinámico (Busscher *et al.*, 1995). Por lo tanto, las propiedades químicas del soporte y la forma de éstos (evitar estrés hidrodinámico) son muy importantes para obtener una cantidad mayor de biopelículas. Los grupos funcionales de la pared celular son carboxilos, alcoholes, fenoles, y aminos. Además hay presencia de enzimas extracelulares ancladas a la pared. Sin embargo su cantidad y distribución estérica

depende de la cepa y del estado fisiológico del organismo (Stumm, 1992). Los polímeros extracelulares (SPE) serían producidos en las etapas de madurez de la biopelícula.

Cunliffe *et al.* (1999) estudió el efecto de la composición química de la superficie sólida en la adsorción bacteriana utilizando diversas bacterias (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*). En tal investigación se comparó la capacidad de adherencia mediante la inserción en vidrio de una cantidad homogénea y densa de grupos químicos que presentaban variaciones en propiedades como hidrofobicidad, hidrofiliidad, longitud de cadena y grupos funcionales y también la presencia de una película condicionante. Se concluyó que la adsorción inicial tiene relación con las características químicas del sustratum, pero al parecer algunas bacterias presentan mecanismos alternativos de anclaje. Por lo tanto, para algunas bacterias la composición química de la superficie no es tan determinante en la adsorción al sustratum.

Un inóculo industrial a base de esporas permite un mejor almacenamiento y mantención de las cepas. El medio de cultivo elegido para la obtención de esporas de *Bacillus* sp. F1 para el desarrollo del producto (inóculo industrial), deberá tener como característica ser fácilmente metabolizable por la bacteria. Esto permite alcanzar antes una fase de agotamiento de nutrientes que desencadenan la subsiguiente esporulación del cultivo. La esporulación de *Bacillus* sp. F1 se vio afectada en gran manera según el medio de cultivo utilizado en su crecimiento. En el caso de los medio evaluados en este estudio se constató que el medio A.S. entregó los valores de esporulación mas altos al

cabo de 24 horas (cercanos al 100%). Con el medio 1 se obtuvo valores cercanos al 70%, y con el medio TS solo se llegó a un 20%. Esto puede deberse a que la bacteria se desarrolla mas fácilmente en el medio A.S., debido a su fisiología, alcanzando en menos tiempo la fase estacionaria y por consiguiente, el agotamiento de nutrientes y acumulación de desechos o compuestos que inhiben su crecimiento. Por otro lado, la bacteria podría no haber agotado los nutrientes de los Medio 1 y TS, al cabo de 24 horas, de manera que ésta podría haber seguido creciendo, esporulando en un tiempo mayor.

En este trabajo se elaboró un método para la obtención de un inóculo industrial a base de esporas de *Bacillus* sp. F1 en biorreactor, logrando un 100 % de sedimentación de esporas, consiguiendo una recuperación de éstas sin dispositivos ni procedimientos adicionales (filtros, centrífuga, liofilizador) (Sembries y Crawford, 1997), facilitando el proceso. En una primera etapa, se estudió la transferencia de oxígeno. La utilización de las ecuaciones de Cooper y Michel y Miller permitió estimar las condiciones de aireación y agitación. Posteriormente fue necesario realizar ajustes para obtener un cultivo esporulado y totalmente floculado, para obtener una sedimentación del producto. En el primer cultivo realizado, no se obtuvo una sedimentación de las células. Por esto, en los dos cultivos posteriores, la agitación fue la menor posible (120 rpm), manteniendo la transferencia de oxígeno anterior. Esta disminución ayudó al cuidado de los flóculos formados, y permitió una eficaz sedimentación de las esporas atrapadas en las células, obteniéndose finalmente 2,14 g/l de biomasa esporulada y un 100% de floculación. Por otro lado, el primer cultivo, desde el primer momento produjo una importante cantidad de espuma, formada a causa de rompimiento de las proteínas presentes en el medio. La

espuma puede causar problemas, tales como contaminación por evacuación de medio. Para evitar este problema, en el cultivo final se experimentó el aumento progresivo de la aireación con buenos resultados, observando el consumo de oxígeno y teniendo cuidado de que la presión parcial de oxígeno no llegase a cero (para no interferir en los requerimientos de oxígeno de las bacterias). Una vez alcanzada la aireación calculada, se mantuvo ese valor. Esta acción tiene además el beneficio de eliminar el requerimiento de antiespumante, el cual puede interferir negativamente en la floculación de las bacterias, ya que afecta la tensión superficial del medio de cultivo. Un factor a optimizar en el futuro es la concentración de glucosa. El medio A.S., utilizado para la producción de esporas de *Bacillus* sp F1, posee glucosa en exceso (10 g/l). La mínima concentración alcanzada fue de 7,4, luego de 13,5 horas de cultivo. Ya que este residuo no se consume, no es necesario agregarlo. Esto reduce el costo económico del proceso.

El inoculante producido a partir del tercer cultivo fue evaluado en términos de adherencia, en biorreactor. La evaluación de dicho cultivo dio como resultado la formación de biopelículas, en cantidades ligeramente menores, en comparación con los controles (inoculante líquido). Los análisis de esporulación de cada cultivo mostraron que al utilizar inóculo seco y congelado la biomasa no adherida ya presentaba esporulación, a diferencia del control. Una cantidad menor de inóculo acelera la tasa de crecimiento de un cultivo (Pilát y Prokop, 1975). En el caso de las esporas secadas al vacío, el inóculo producido pudo haber quedado adherido a la superficie del matraz en el que se realizó dicho proceso. La remoción con perlas de vidrio pudo no haber sido eficaz, generando un inóculo con menor cantidad de células. Entonces, en el cultivo se

alcanzarían mayores tasas de crecimiento en menos tiempo, afectando la mantención de biomasa adherida a la superficie (liberación de esporas). En el futuro es necesario estudiar la cantidad exacta de inoculante a utilizar, y así optimizar la formación de la biopelículas a partir de este producto.

5. CONCLUSIONES

1. Se logró obtener una mayor cantidad de biomasa adherida utilizando como medio de cultivo, subproductos industriales de bajo costo económico.
 - El licor de maíz y el jarabe de maíz fueron efectivos al reemplazar el medio de cultivo A.S. (0,47 g de biomasa adherida), permitiendo aumentar la cantidad de biomasa adherida (1,25 g de biomasa adherida), en un biorreactor para 360 ml de cultivo.
2. Se obtuvo una mayor biosorción de cobre al utilizar para la adherencia de la biomasa, un soporte alternativo (tela Raschel), de bajo costo económico y destinado comercialmente a otras áreas industriales.
 - La tela Raschel, utilizada comúnmente para protección y sombreado en la construcción y agricultura, fue el material soporte que permitió una mayor biosorción de cobre (86 % de captación), mayor a lo obtenido con anillos Rashig, el soporte anteriormente utilizado (67 % de captación). A pesar de que no presentó la mayor cantidad de microorganismos por superficie de soporte, proporcionó una mayor superficie para colonización bacteriana en el biorreactor.

3. Se desarrolló un método eficaz para la producción de un inóculo industrial de *Bacillus* sp. F1 base de esporas, en un biorreactor de estanque agitado de 15 litros. Este método permitió una recuperación de éstas sin necesidad de dispositivos ni métodos adicionales.
- El medio de cultivo elegido para la esporulación fue el de Allison y Sutherland (A.S.). Con este medio se obtuvo en matraces, una esporulación del 100 % al cabo de 24 horas de cultivo.
 - La transferencia de oxígeno fue determinante en la esporulación de un cultivo de *Bacillus* sp. F1.
 - Los cálculos de escalamiento (mediante las ecuaciones de Cooper y Michel y Miller, entre otras) y la evaluación de la transferencia de oxígeno (mediante el método del sulfito) fueron apropiados para escalar las condiciones de esporulación desde matraces a biorreactor.
 - La disminución de la agitación y el abastecimiento progresivo de la aireación (manteniendo un nivel mínimo de presión de oxígeno) permitieron obtener flóculos esporulados de la bacteria, facilitando la recuperación de ésta por sedimentación.
 - Se demostró la obtención de biomasa adherida en cultivo en biorreactores al utilizar el inóculo industrial desarrollado en trabajo de Memoria de Título.

Referencias

1. Acevedo, F. (2002) Fundamentos de Ingeniería en bioquímica. Gentiria e Illanes editores. Ediciones universitarias de Valparaíso.
2. Allison, D. G. and Sutherland, I. W. (1987) The role of exopolysaccharides in adhesion of water bacteria. J. Gen. Microbiol. **133**:1319-1327.
3. Barriga, A. (2001) "Escalamiento de un proceso de biosorción de iones metálicos mediante bacterias adheridas". Memoria de título, Universidad de Chile.
4. Bates, R. L. Fondy, P. L. and Corpstein, R. R. (1963) Ind. Eng. Chem. Process Desing Develop., **2**:310.
5. Blais, J. F., Dufresne, S. and Mercier, G. (2000) State of the art of technologies for metal removal from industrial effluents. Rev. Sci. Eau., **4**:687-711.
6. Branda, S. S., Gonzales-Pastor, J. E., Ben-Yehuda, S. Losick, R. and Kolter, R. (2001) Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. PNAS **98**(20):11621-11626.
7. Briandet, R., Meylheuc, T., Maher, C. and Bellon-Fontaine, M. N. (1999) *Listeria monocytogenes* Scott A: Cell Surface Charge, Hydrophobicity, and Electron Donor and Acceptor Characteristics under Different Environmental Growth Conditions. Appl. Environ. Microbiol. **65**(12):5328-5333.
8. Busscher, H. J., Bos, R., and van der Mei, H. C. (1995) Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. FEMS Microbiol. Lett. **128**(3):229-34.
9. Characklis, W. G. (1990) Biofilms. Jonh Wiley & Sons, INC, a Wiley - Interscience publication, USA.
10. CODELCO. Cifras [on line]
<http://www.codelco.com/la_corporacion/fr_corporacion.html> (consulta julio 2005]
11. CODELCO Salud y cobre [on line]
<http://www.codelco.com/cu_zonacobre/fr_zona.html> [consulta julio 2005]

12. CONAMA. Norma de emisión para la regulación de contaminantes asociados a las descargas de residuos líquidos a aguas marinas y continentales superficiales [on line] < <http://www.conama.cl/portal/1255/article-27153.html>> [consulta 3 de octubre 2004]
13. Cooper, C. M., Fernstorm, G. A., and Miller, S. A. (1944) Performance of Agitated Gas-Liquid Contactors. *Ind. Eng. Chem.* **36**: 504-509.
14. Cotoras, D. Alvarez, S. Viedma, P and Rojas, O. (1995) Continuous removal of copper by attached bacteria. *Biohydrometallurgical Processing*. Ed. by Jerez, Vargas, Toledo and Wiertz. Universidad de Chile.
15. Cunliffe, D., Smart, C. A., Alexander, C. and Vulfson, E. N. (1999) Bacterial Adhesion at Synthetic Surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(11): 4995-5002.
16. Darling, D. Bacterial spores. [on line]
<www.daviddarling.info/encyclopedia/B/bacspores.html>
17. de Kievit, T. R. and Iglewski, B. H. (2000) Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationships. *Infection and Immunity.* **68** (9): 4839-4849.
18. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany. List of Media. [on line]
<<http://www.dsmz.de/media/med001.htm>>
19. Gadd, G. M. and White, C. (1993) Microbial treatment of metal pollution, a working technology? *TIBTECH.* **11**:353-359.
20. Greasham, R. L. Media for Microbial Fermentations. (1991) *En: Rehm and Reed (Eds.). Biotechnology: a multivolume comprehensive treatise.* **3**:127-139.
21. Hjortso, M. and Roos, J. W. (1994) "Cell adhesion: Fundamentals and Biotechnological applications". Ed Marcel Decker, Inc. New York, USA
22. Kierek, K. and Watnick, P I. (2003) The *Vibrio cholerae* O139 O-antigen polysaccharide is essential for Ca²⁺-dependent biofilm development in sea water. *PNAS.* **100**(24): 14357-14362.
23. Kim, S., Ramaswamy, S. and Downard, J. (1999) Regulated Exopolysaccharide Production in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **181**(5):1496-1507.

24. Kratochvil, D. and Volesky, B. (1998). Advances in the biosorption of heavy metals. *TIBTECH*. **16**:291-300.
25. Lazazzera, B. A. (2000) Quorum sensing and starvation: signals for entry into stationary phase. *Curr Opin Microbiol*. **3**(2):177-82.
26. LENNTECH. Cobre. <www.lenntech.com/espanol/tabla-peiodica/Cu.htm>
27. Lins, R. D. and Straatsma, T. P. (2001) Computer simulation of the rough lipopolysaccharide membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biophys. J.*, **81**:1037-1046.
28. Loo, C. Y., Corliss, D. A. and N. Ganeshkumar. (2000) *Streptococcus gordonii* biofilm formation: identification of genes that code for biofilm phenotypes. *J. Bacteriol*. **182**:1374-1382.
29. New Jersey Fedd Lab Inc. Protein method [on line] <http://www.njfl.com/protein_method.htm> [consulta agosto, 2004]
30. Perry, R. and Green, D. W. (1999) Perry's Chemical Engineer's Handbook. The McGraw-Hill Companies, Inc.
31. Pilat, P. and Prokop, A. (1975) Effect of methanol, Formaldehyde and Formic acid on growth of *Candida boidini*. *Bh Biotechnol Bioing*. **17**: 1717-1728.
32. Qureshi, F. M., Badar, U. and Nuzhat, A. (2001) Biosorption of Copper by a Bacterial biofilm on a flexible polivinil chloride conduit. *Appl. Environ. Microbiol*. **67**: 4349-4352.
33. Ren D., Bedzyk L. A., Setlow P., Thomas, S. M., Ye, R. W. and Wood, T. K. (2004) Gene expression in *Bacillus subtilis* surface biofilms with and without sporulation and the importance of yveR for biofilm maintenance. *Biotechnol Bioeng*. **86**(3):344-64.
34. Sembries, S. and Crawford, R. L. (1997). Production of *Clostridium bifermentans* spores as inoculum for bioremediation of nitroaromatic contaminants. *Appl. Env. Microbiol*. **63**: 2100-2104.
35. Sikyta, B. (1983) "Methods un industrial microbiology". Ed. Ellis Horwood Limited. pp 162.

36. Stanley, N. R., Britton, R.A., Grossman, A. D., and Lazazzera, B. A. (2003) Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarrays". J. Bacteriol. **185**(6):1951-7.
37. Stumm, W. (1992) Chemistry of the solid-water interface. John Wiley & Sons, Inc, USA.
38. Sutherland, I. W. (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Microbiol. **147**:3-9.
39. Vant't Riet. (1983) Mass transfer in fermentation. Trends Biotechnol. **1**(4):113-116.
40. Vieira, R. H. and Volesky, B. (2000) Biosorption: a solution to pollution? Internatl. Microbiol. **1**:17-24.
41. Wang, D., Cooney, C., Demain, A., Dunnill, A., Humphrey, A. and Malcom, D. (1978) Fermentation & Enzyme technology. Ed. Carl-Göran Hedén.