

UGA-FC
Biotecnología
6647
C. A



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS

Director de Memoria de Título

Dr. Davor Cotoras Tadić

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Universidad de Chile

**"Estudio de nuevas cepas de microorganismos capaces
de biosorber cobre desde soluciones contaminadas"**



Mariela Alejandra González Matus

SANTIAGO DE CHILE, 2006



“ESTUDIO DE NUEVAS CEPAS DE MICROORGANISMOS CAPACES DE BIOSORBER COBRE DESDE SOLUCIONES CONTAMINADAS”

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

MARIELA GONZALEZ MATUS.

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. Carlos Jerez Guevara
Presidente Comisión

Una firma manuscrita en tinta negra sobre una línea horizontal.

Dr. Marcelo Baeza Cancino
Corrector

Una firma manuscrita en tinta negra sobre una línea horizontal.



Santiago de Chile, Enero 2006

Me pidieron que hablara de mi...

Ante tal petición, citaré a Pessoa...



"Estoy cansado, claro,
Porque a esta altura uno tiene que estar cansado.
De qué estoy cansado, no lo sé;
Y de nada serviría saberlo,
Porque el cansancio seguiría igual.
La herida duele porque duele,
No en función de la causa que la ha abierto.
Sí, estoy cansado
Y un poco sonriente
De que el cansancio sea sólo esto:
Ganas de dormir en el cuerpo,
Deseo de no pensar en el alma
Y por encima de todo una transparencia lúcida
Del entendimiento retrospectivo...
¿Y la lujuria sin par de no tener ya esperanza?
Soy inteligente: esto es todo.
He visto mucho, y he entendido mucho lo que he visto,
Y hay un cierto placer, incluso, en el cansancio que eso da:
El de que, al fin, la cabeza siempre sirve para algo".

"Estoy cansado, claro"

Fernando Pessoa (1888-1935)



Gracias a todos aquellos que caminaron por la rivera de esta playa y
dejaron impresas sus huellas

Gracias por animar con sus voces los días y por respetar el susurro
de la noche

Gracias por sonreír y dejar que la luna dibujara estrellas en sus
bocas

Gracias por abrazar con tanta esperanza el sueño que nos une

Gracias por compartir tantos momentos, tantos recuerdos

Gracias por permitirme crecer a su lado, por no dejarme sola en
este gran camino que es la vida

Gracias a cada uno de ustedes, a los presentes, a los ausentes y ante
todo a Dios



INDICE DE CONTENIDOS

Índice de Figuras

Índice de Tablas

Abreviaturas

Resumen

Summary

1	Introducción.....	1
1.1	Biosorción.....	1
1.2	Hibridación "in situ".....	6
1.3	Objetivos.....	8
1.3.1	Objetivo general.....	8
1.3.2	Objetivos específicos.....	8
2	Materiales y Métodos.....	9
2.1	Materiales y Reactivos.....	9
2.1.1	Reactivos para la biosorción.....	9
2.1.2	Reactivos para Espectrofotometría de Adsorción Atómica (EAA).....	9
2.1.3	Reactivos para la hibridación "in situ".....	9
2.2	Métodos.....	10
2.2.1	Toma de muestra.....	10
2.2.2	Diseño de las columnas de lecho fijo.....	11
2.2.2.1	Columnas de 5 ml.....	11
2.2.2.2	Columnas de 60 ml.....	12
2.2.2.3	Material de relleno.....	12
2.2.3	Inoculación y formación de las biopelículas en las columnas.....	12

2.2.4 Preparación de los medios de cultivo.....	13
2.2.5 Observación microscópica de las bacterias en el efluente de las columnas de lecho fijo.....	14
2.2.6 Mantenimiento de las columnas.....	15
2.2.7 Caracterización de las biopelículas ambientales multiespecies.....	15
2.2.7.1 Tinción de Gram.....	15
2.2.7.2 Aislamiento y mantención de las cepas bacterianas.....	15
2.2.8 Biosorción y desorción.....	16
2.2.8.1 Preparación de las soluciones de CuSO ₄ y HCl.....	16
2.2.8.2 Biopelículas ambientales multiespecies.....	16
2.2.8.2.1 Columnas de 5 ml.....	16
2.2.8.2.2 Columnas de 60 ml.....	18
2.2.8.3 Biosorción y desorción de cobre utilizando una biopelícula de <i>Bacillus</i> sp. F1.....	19
2.2.8.4 Elección del material de relleno para las columnas de lecho fijo.....	19
2.2.8.5 Biosorción por las bacterias aisladas de las biopelículas ambientales multiespecies.....	20
2.2.9 Caracterización de las biopelículas ambientales multiespecies utilizando medios de cultivo diferenciales.....	21
2.2.10 Obtención de las biopelículas ambientales multiespecies para su caracterización por hibridación "in situ".....	21
2.2.11 Caracterización de las biopelículas ambientales multiespecies utilizando la técnica de hibridación "in situ".....	22
2.2.11.1 Fijación de la biopelícula adherida al portaobjeto.....	22

2.2.11.2	Sondas de oligonucleótidos.....	23
2.2.11.3	Hibridación "in situ".....	24
2.2.11.4	Recuento celular.....	26
2.2.12	Medición de la concentración de cobre en las soluciones tratadas por biosorción utilizando Espectrofotometría de Adsorción Atómica.....	26
2.2.13	Análisis estadístico.....	26
3	Resultados.....	28
3.1	Obtención de las biopelículas ambientales multiespecies.....	28
3.2	Caracterización de las biopelículas ambientales multiespecies.....	28
3.2.1	Tinción de Gram y aislamiento en medio TSA.....	28
3.2.2	Caracterización de las biopelículas ambientales utilizando medios de cultivos diferenciales.....	29
3.3	Biosorción.....	30
3.3.1	Biosorción por las biopelículas ambientales multiespecies.....	30
3.3.1.1	Biosorción en las columnas rellenas con perlas de vidrio.....	30
3.3.1.2	Elección del material de relleno.....	33
3.3.1.3	Biosorción en las columnas rellenas con piedras de acuario.....	35
3.3.2	Biosorción por <i>Bacillus</i> sp. F1.....	38
3.3.3	Biosorción por las bacterias aisladas de las biopelículas ambientales multiespecies.....	40
3.4	Caracterización molecular de las biopelículas ambientales multiespecies utilizando la técnica de hibridación "in situ".....	43
4	Discusión.....	53
5	Conclusiones.....	64
6	Bibliografía.....	66

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Columna utilizada para formar las biopelículas.....	11
Figura 2: Sistema de inoculación utilizado para formar las biopelículas en las columnas.....	13
Figura 3: Sistema de inoculación de las columnas empleadas en el proceso de biosorción.....	17
Figura 4: Proceso de biosorción.....	18
Figura 5: Sistema utilizado para obtener muestras de las biopelículas formadas en las columnas, para su posterior caracterización mediante la técnica de hibridación "in situ".....	22
Figura 6: Adsorción de cobre por las biopelículas ambientales multiespecies cultivadas con medio complejo.....	31
Figura 7: Desorción de cobre en las biopelículas ambientales multiespecies cultivadas con medio complejo.....	32
Figura 8: Adsorción y desorción de cobre por distintos materiales de relleno.....	34
Figura 9: Biosorción de cobre por las biopelículas ambientales multiespecies.....	36
Figura 10: Adsorción de cobre por <i>Bacillus</i> sp. F1	39
Figura 11: Comparación de la adsorción de cobre de las bacterias aisladas de las biopelículas ambientales multiespecies y <i>Bacillus</i> sp. F1.....	40
Figura 12: Adsorción v/s desorción de cobre por las bacterias aisladas de las biopelículas ambientales multiespecies y <i>Bacillus</i> sp. F1.....	41
Figura 13: Hibridación "in situ" de las biopelículas ambientales multiespecies presentes en las columnas de biosorción.....	45



Figura 14: Abundancia relativa de los distintos grupos filogenéticos
en las biopelículas ambientales multiespecies cultivadas
con medio complejo y medio mínimo.....46

Figura 15: Abundancia relativa de los distintos grupos filogenéticos
en las biopelículas ambientales multiespecies cultivadas
con medio complejo.....48

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Medio de cultivo. Reactivos y concentraciones utilizadas.....	14
Tabla 2: Sondas empleadas para la hibridación "in situ".....	24
Tabla 3: Concentraciones utilizadas en la solución de hibridación.....	25
Tabla 4: Concentraciones utilizadas en la solución de lavado.....	25
Tabla 5: Tipos bacterianos presentes en las biopelículas ambientales multiespecies reconocidos por medio de reacciones bioquímicas.....	30
Tabla 6: Cepas bacterianas utilizadas para controlar la especificidad de las sondas empleadas para la hibridación "in situ".....	44
Tabla 7: Porcentaje de abundancia de cada uno de los grupos filogenéticos analizados en las biopelículas ambientales multiespecies cultivadas con medio complejo y con medio mínimo.....	50

ABREVIATURAS

- ALF1b: Sonda específica para la subclase Alfa de Proteobacteria
- BET42a: Sonda específica para la subclase Beta de Proteobacteria
- CF319a: Sonda específica para el grupo Citophaga-Flavobacterium
- CY3: Indocarbocianina
- DAPI: 4'-6-Diamidino-2-fenilindol
- EDTA: Acido etilendiamino tetra acético
- EUB338: Sonda específica para el dominio Bacteria
- FITC: Fluoresceín-5-isotiocianato
- GAM42a: Sonda específica para la subclase Gama de Proteobacteria
- KIA: Agar con hierro de Kligler
- LIA: Agar con hierro y lisina
- LPS: Lipopolisacárido
- PBS: Buffer Fosfato Salino
- rRNA: Ácido ribonucleico ribosomal
- SC: Agar citrato de Simmons
- SDS: Dodecil sulfato de sodio
- SRB385: Sonda específica para la subclase Delta de Proteobacteria
- Tris: hidroximetilaminometano
- TSA: Agar Trípico de Soya
- U.A.S.B: Upflow Anaerobic Sludge Blanket (reactores anaeróbicos de flujo ascendente y manto de lodos)
- PTFE: Poli Tetra Fluoro Etileno
- EAA: Espectrofotometría de Adsorción Atómica

Resumen

La contaminación por metales pesados representa uno de los principales problemas ambientales, causando degradación y muerte de vegetación, ríos y animales, provocando incluso, daños directos en el hombre. Una de las fuentes más directas de esta contaminación es producida por la actividad industrial y minera, la cual genera residuos líquidos que son vertidos a los cursos de agua sin previo tratamiento, contribuyendo al deterioro de las masas de agua y su medio ambiente. En lo que se refiere a herramientas normativas, la CONAMA (Comisión Nacional del Medio Ambiente) ha trabajado para poner en vigencia distintas normas cuyo objetivo es regular la emisión de efluentes a cursos de aguas. Ahora los empresarios deben buscar nuevas tecnologías que les permitan cumplir con la normativa. Respondiendo a esta necesidad, distintas áreas científicas han comenzado a estudiar e implementar procesos biológicos, los que se perfilan como una alternativa factible para enfrentar la problemática ambiental. La biosorción aparece como una metodología de gran contribución. Se basa en el uso de biomasa de origen microbiano, centrándose en la propiedad inherente de grupos químicos, presentes en la envoltura celular, de interactuar con iones metálicos.

En esta memoria, con el fin estudiar nuevas cepas de microorganismos capaces de biosorber cobre, se eligieron cuatro muestras ambientales como inoculantes: agua del río Mapocho, agua de fuente pública, agua potable y lodos anaeróbicos, a partir de los cuales se seleccionaron microorganismos con la capacidad de adherirse a superficies formando una biopelícula. Como sistema de cultivo se utilizó columnas de polipropileno de 5 ml rellenas con perlas de vidrio de 3mm. Para los ensayos de biosorción se utilizaron columnas de polipropileno de 60 ml y piedras de acuario como material de relleno, las que resultaron ser menos reactivas con iones de cobre en comparación a otros materiales investigados. Además, se evaluaron dos tipos de medio de cultivo: un medio complejo, el cual contenía un suplemento rico en proteínas y vitaminas, y un medio mínimo por estar constituido básicamente de sales y glucosa como fuente de carbono. A partir de ambos medios se obtuvo biopelículas constituidas por una alta diversidad de microorganismos, de acuerdo a la caracterización bioquímica. La capacidad de biosorción de las biopelículas varió según el medio de cultivo utilizado. En promedio, las biopelículas cultivadas con medio

mínimo adsorbieron 41 μg de cobre/g de material de relleno, mientras que las biopelículas cultivadas con medio complejo adsorbieron 28 μg de cobre/g de material de relleno. La cantidad de cobre desorbido fue de 35 μg de cobre/g de material de relleno y 17 μg de cobre/g de material de relleno, respectivamente.

Con el fin de comparar la capacidad de biosorción entre biopelículas multi-específicas y mono-específicas se hizo un aislamiento de cada una de las biopelículas multi-específicas, obteniendo 4 biopelículas mono-específicas: bacteria aislada de la biopelícula 1 cultivada con medio mínimo, bacteria aislada de la biopelícula 3 cultivada con medio mínimo, bacteria aislada de la biopelícula 5, asociación bacteria y levadura aislada de la biopelícula 5. La capacidad de biosorción de estas biopelículas se comparó con una biopelícula de la cepa *Bacillus* sp. F1. Los niveles de captación de cobre alcanzados por cada una de estas biopelículas es comparable a lo observado con *Bacillus* sp. F1, la cual es reconocida por presentar elevados niveles de adsorción. La asociación levadura y bacteria mostró mejor nivel de captación que *Bacillus* sp. F1, adsorbiendo 88 μg de cobre/g de material de relleno en comparación a los 57 μg de cobre/g de material de relleno adsorbidos por *Bacillus* sp. F1.

Una vez determinado el potencial de biosorción y con el propósito de determinar los organismos implicados en el proceso de biosorción, se realizó la caracterización molecular de las biopelículas utilizando la técnica de hibridación "in situ". De cada biopelícula se obtuvo una muestra representativa sobre la superficie de un portaobjetos. Se utilizaron sondas específicas para el dominio Bacteria y los subgrupos α , β , γ , δ -proteobacteria, y el grupo Cytophaga-Flavobacterium. Los datos expresados en abundancia relativa mostraron que los grupos más representados en las biopelículas examinadas correspondían a los subgrupos α -proteobacteria, β -proteobacteria y γ -proteobacteria.

Summary

Heavy metals pollution represents one of the most serious problems for the environment, causing the degradation and death of vegetation in rivers and animals, causing even, direct damages in man. One of the most direct sources of this contamination is produced by industrial and mining activity which generates liquid drainages that are spilled to the water without previous treatment, contributing to the deterioration of the masses of water and its environment. Regarding normative tools, the CONAMA (Comisión Nacional del Medio Ambiente) worked out to put in use different norms to regulate the emission to effluents of water. Now the industry must look for new technologies that allow them to fulfill the norm. Responding to this necessity, different scientific areas have begun to study and implement biological processes, which are considered being a feasible alternative to face environmental problems. Biosorption appears as a methodology of great contribution. It is based on the use of biomass of microbial origin, being centered in the inherent property of chemical groups, present in the envelope cell, to interact with metal ions.

With the aim to study new strains of microorganisms able to biosorpt copper, four environmental samples were chosen as inoculants in this research: water of the Mapocho river, water of public source, potable water and anaerobic sludges, from which organisms were selected by the capacity to adhere to surfaces forming a biofilm. As culture system were used Polypropylene columns of 5 milliliter filled with glass beads of 3mm. For the biosorption tests polypropylene columns of 60 milliliter and aquarium stones were used as the filling material, since they turned out to be less reactive with copper ions in comparison to other investigated materials. In addition, two types of culture media were evaluated: complex medium, which contained a rich supplement in proteins and vitamins, and minimum medium basically constituted of salts and glucose as carbon source. From both media we obtained biofilms constituted by a high diversity of microorganisms, as determined by the biochemical characterization. The capacity of biosorption of biofilms varied according to the culture medium used. In the average, biofilms cultured with minimum medium adsorbed 41 μg of copper/g of filling material, whereas biofilms cultured with complex medium adsorbed 28 μg of copper/g of filling material. The amount of desorbed copper was of 35 μg of copper/g of filling material and 17 μg of copper/g of filling material, respectively.

To compare the biosorption capacity between multi-specific and mono-specific biofilms, an isolation was done from the multi-specific biofilms, obtaining 4 mono-specific biofilms: isolated bacteria from biofilm 1 cultured with minimum medium, isolated bacteria from biofilm 3 cultured with minimum medium, isolated bacteria from biofilms 5, association bacteria and yeast isolated from biofilms 5. The capacity of adsorption of these biofilms was compared with one biofilm of *Bacillus* sp. F1. The levels of biosorption reached by each one of these biofilms were comparable to that observed with *Bacillus* sp. F1, which is recognized to present high levels of adsorption. The association bacteria and yeast showed better level of biosorption than *Bacillus* sp. F1, adsorbing 88 µg of copper/g of filling material in comparison to 57 µg of copper/g of filling material adsorbed by *Bacillus* sp. F1.

Once the biosorption potential was determined and in order to identify the organisms implied in the biosorption process, the molecular characterization of biofilms was made by using "in situ" hybridization. From each prepared biofilm a representative sample was obtained over the surface of microscope slides. Specific probes for the domain Bacteria and the sub-groups α , β , γ , δ -proteobacteria, and the Cytophaga-Flavobacteria group were used. The data expressed in relative abundance showed that the dominant groups in the biofilms examined corresponded to the sub-groups α -proteobacteria, β -proteobacteria and γ -proteobacteria.

Por los sueños y esperanzas que a veces
parecen perder su esencia y convertirse en
angustias

Porque eso nunca suceda y porque siempre
mantengamos nuestra ilusión en la vida

1. INTRODUCCION

1.1 Biosorción

En la actualidad, la contaminación ambiental es un problema que genera gran preocupación a nivel mundial. De hecho durante los últimos años se ha incrementado el grado de conciencia de la población, así como el de las autoridades, quienes en conjunto han comenzado a buscar soluciones. La generación y acumulación de desechos, genera la dispersión de gran diversidad de compuestos en suelos, aguas superficiales y aire, con la consecuente filtración de los mismos hacia las aguas subterráneas, las que constituyen la reserva de agua potable (Vullo, 2003).

El agua es uno de los recursos que más se ve expuesto a focos de contaminación. Entre ellos se cuentan los desechos domiciliarios y aquellos provenientes de la industria o de la minería. En efecto, las actividades industriales generan una contaminación a gran escala con metales pesados (Cu, Zn, Pb, Cd, Cr, Ni, Hg, Co, Ag, Au) y radionúclidos (U, Th), los cuales presentan ciertas características que los hacen altamente contaminantes:

1. Son compuestos inorgánicos lo que implica que no pueden ser degradados naturalmente por lo que tienden a persistir indefinidamente en el ambiente (Cossich y col., 2002).
2. Presentan una elevada movilidad en los ecosistemas de aguas naturales.
3. Al ser persistentes tienden a acumularse y biomagnificarse por lo que pueden alcanzar concentraciones altamente tóxicas para las distintas formas de vida (Atkinson y col., 1998).

La remoción de metales pesados desde las aguas de desecho industrial se ha realizado tradicionalmente mediante métodos físico-químicos entre los que destacan:

precipitación, oxido-reducción, intercambio iónico, membranas y evaporación (Cossich y col., 2002; Eccles, 1999; Kratochvil y Volesky, 1998). Sin embargo, estos métodos han comenzado a ser cuestionados debido a que resultan caros, generan grandes cantidades de lodos y son insuficientes a la hora de remover los metales a partir de soluciones diluidas (Cossich y col., 2002).

Durante los últimos años se han planteado métodos biológicos como una tecnología alternativa para el tratamiento de los efluentes industriales y mineros (Eccles, 1999; Gadd, 2000). Entre ellos podemos mencionar la biotransformación, la biomineralización, la bioacumulación y la biosorción. De los procesos mencionados, la biosorción es uno de los fenómenos más ampliamente estudiado debido a que posee características que la harían una técnica comercialmente rentable (Vullo, 2003). Se basa en el uso de microorganismos vivos o muertos, o bien sus derivados, los cuales son capaces de captar iones metálicos presentes en solución, utilizando para ello grupos funcionales situados en su superficie celular (Atkinson y col., 1998).

Quizá uno de los dispositivos considerados como más eficientes para la remoción continua de metales desde soluciones sean las columnas de sorción, las cuales contienen las partículas de biosorbente empacadas o inmovilizadas en su interior. Las columnas de sorción operan en ciclos consistentes de carga (sorción), regeneración (desorción) y lavado. Durante el ciclo de carga, la solución a tratar se hace pasar a través de la columna donde los metales en solución son capturados y retenidos por el biosorbente. Cuando el biosorbente alcanza su capacidad máxima de sorción de metales, la columna es sacada de operación. El biosorbente es entonces regenerado utilizando soluciones ácidas o básicas, obteniéndose pequeños volúmenes de metal concentrado. Posteriormente la columna se lava para eliminar los remanentes

de las soluciones de desorción y los sólidos atrapados en la matriz (Kratochvil y Volesky, 1998).

Dentro de los mecanismos utilizados por los microorganismos para remover los metales pesados desde soluciones encontramos:

1. Precipitación / Acumulación extracelular (Schoemann y col., 2001).
2. Sorción sobre la superficie celular / Complejación (Yee y col., 2004).
3. Acumulación intracelular (Cossich y col., 2002).

Diversos tipos de biomasa microbiana han sido propuestos como posibles biosorbentes, entre los que se encuentran los hongos (Tsekova y Petrov, 2002; Muraleedharan y col., 1995; Prakasham y col., 1999), las levaduras (Breieveroá y col., 2002), las algas (da Costa y col., 2001), las bacterias (Mameri y col., 1999) e incluso plantas (Elankumaran y col., 2003). La gran mayoría de estos microorganismos presentan una capacidad de adsorción de metales tan o más eficiente que la de resinas comerciales. Así por ejemplo, las resinas comerciales adsorben alrededor de 0,35 a 5 miliequivalentes de metal por gramos de masa seca, *Sargassum* sp., un alga, entre 2 a 2,3 miliequivalentes por gramos de biomasa, *Rhizopus* arrhizus, un hongo, 1,1 miliequivalentes por gramo de biomasa seca y *Eclonia radiata*, una bacteria, 1,8 a 2,4 miliequivalentes por gramo de biomasa seca (Kratochvil y Volesky, 1998).

Dentro de los factores considerados en la elección de un biosorbente, anexo a su capacidad de unir metales, se mencionan la disponibilidad y abundancia, esto es, si se haya naturalmente presente en el ambiente o como material de desecho, lo cual tiene un impacto directo en la economía del proceso.

Con respecto a la biomasa utilizada como biosorbente en la tecnología de biosorción se ha de considerar (Atkinson y col., 1998):

1. Procedencia
2. Biomasa activa (viva) o inactiva (muerta) .
3. Inmovilización
4. Regeneración
5. Capacidad
6. Especificidad de metal
7. Cinética de reacción

Los factores antes mencionados tienen repercusiones directas tanto en la eficiencia como en los costos totales del proceso. Así por ejemplo, al utilizar biomasa inactiva no es necesario invertir en requerimientos nutritivos de la biomasa ni tampoco considerar el mantener condiciones especiales de cultivo. A la vez, se ha observado que la reversibilidad del proceso es más fácil, permitiendo la regeneración de la biomasa y su reutilización (Cañizares-Villanueva, 2000).

La inmovilización del biosorbente es otro factor relevante al momento de considerar los costos. Por un lado, queda de manifiesto que las células en suspensión no resultan adecuadas para su uso en columnas debido a su baja densidad y pequeño tamaño, lo que provoca el taponamiento del lecho, además de presentar baja resistencia mecánica y la dificultad para separar la biomasa del efluente. No obstante, a las ventajas que entrega el atrapamiento celular, los costos de los agentes de inmovilización no pueden ser ignorados (Atkinson y col., 1998).

El uso de microorganismos que en forma natural presentan la capacidad de adherirse a superficies sólidas formando una biopelícula, ha comenzado a ser utilizado en diferentes configuraciones de biorreactores (Cañizares-Villanueva, 2000). Estos sistemas presentan las ventajas antes mencionadas para las células inmovilizadas pero sin incurrir en los gastos de un agente de inmovilización.

Con respecto a la calidad del biosorbente se puede decir que ésta depende de cuanto metal es atraído y retenido por la matriz. La determinación de la captura del metal por el biosorbente se basa, en la gran mayoría de los estudios, en un balance de masas, suponiendo que el metal que desaparece de la solución se haya unido al biosorbente. El metal sorbido (q), se expresa habitualmente en unidades de: miligramos de metal biosorbido por gramo (en peso seco) del material biosorbente (Kratochvil y Volesky, 1998).

Los modelos de Langmuir y Freundlich sirven de base para describir la relación entre la captura de metal (q) y la concentración final en equilibrio del metal residual que permanece en solución. La curva resultante es lo que se conoce como isoterma de sorción, donde se pueden estudiar dos constantes fácilmente interpretables: q_{\max} , la cual corresponde a la más alta captación de metal posible (el "plateau" de la curva, esto es la saturación de la isoterma), y el coeficiente b , el cual se relaciona a la afinidad entre el biosorbente y el metal. A pesar que el modelo de Langmuir no describe los fenómenos que gobiernan el proceso de biosorción, considerado como un proceso de intercambio iónico, este ha sido ampliamente utilizado por los diversos estudios realizados en el área (Krtachvil y Volesky, 1998).

A pesar de la evidencia de efectividad y economía de la biosorción, los estudios se han desarrollado básicamente a escala de laboratorio. Aún cuando existen unos pocos sistemas desarrollados a escala industrial, su utilización no ha sido masificada (Gupta y col., 2000).

Hasta hace unos pocos años en Chile, la legislación existente sobre la descarga de efluentes industriales a cursos de agua naturales era bastante permisiva y poco respetada. A la fecha, la entrada en vigencia de la nueva normativa de RILES (*D. S. N° 90/2000 del Ministerio Secretaría General de la Presidencia*) compromete a los

industriales a evitar descargas de líquidos que contengan contaminantes en cantidades superiores a los límites que establece la norma. El límite máximo permitido para la descarga de cobre corresponde a 1 ppm para los cuerpos de aguas fluviales y 0.1 ppm para los cuerpos de aguas lacustres. A su vez, se exige a los industriales la caracterización de sus descargas líquidas y en caso que sus efluentes superen la norma, a buscar la tecnología más adecuada para el tratamiento de sus RILES (SISS, 2004).

La presente tesis se enmarca dentro de un gran proyecto de investigación que busca desarrollar un sistema a escala industrial que permita el tratamiento de efluentes mineros e industriales utilizando la técnica de biosorción.

El objetivo de esta memoria es investigar nuevas cepas de microorganismos que presenten tanto la capacidad natural de adherirse a superficies, así como la capacidad de captar iones metálicos a partir de una solución de metal diluida.

Un segundo objetivo es lograr la caracterización tanto bioquímica como molecular de los microorganismos que presenten las características antes mencionadas, utilizando para la caracterización molecular la técnica de hibridación "in situ".

1.2 Hibridación "in situ"

Actualmente, está ampliamente reconocido que las pruebas fisiológicas y bioquímicas que frecuentemente se utilizan en los laboratorios para la identificación de las bacterias son ambiguas y requieren de microorganismos capaces de crecer en medios de cultivo conocidos (Manz, 1992).

El advenimiento de la biología molecular contribuyó a desarrollar una técnica de tinción que permite la identificación de organismos individuales y su cuantificación en

comunidades, sin la necesidad del aislamiento en cultivos puros. Esta técnica se conoce como hibridación "in situ" y puede ser utilizada en combinación con diferentes métodos de detección que incluye la microscopía de epifluorescencia, microscopía de barrido confocal láser y citometría de flujo (DeLong y col., 1999).

A pesar de las ventajas de la técnica, su aplicación sobre muestras ambientales tiene ciertas limitaciones: baja intensidad de la señal, límite de detección del número de células, accesibilidad de la sonda, número de secuencias y sondas disponibles, métodos de cuantificación manuales, "background" celular y el inherente bajo contenido celular asociado a los organismos presentes naturalmente en distintas fuentes ambientales (Amann y col., 1995; DeLong y col., 1999; Ouverney y Fuhrman, 1997).

En la presente investigación se aplicó la hibridación "in situ" con el fin de obtener una aproximación a la caracterización molecular de las biopelículas empleadas en el proceso de biosorción. En esta línea, más que una caracterización de las poblaciones naturales de los diferentes inóculos utilizados, lo que se pretende es definir las poblaciones microbianas implicadas en la captación del cobre. En efecto, es de esperar que los grupos microbianos más representativos en cada una de las biopelículas tengan un mayor aporte en la biosorción de metales pesados.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Aislar, estudiar y comparar la capacidad de biosorción de diferentes microorganismos que posean la capacidad natural de adherirse a superficies formando un biopelícula, así como una elevada captación de metales y que sean más eficientes en el proceso de biosorción que una biopelícula de *Bacillus* sp. F1 previamente caracterizada.

1.3.2 Objetivos específicos

- Seleccionar diferentes tipos de fuentes microbianas que se utilizarán como inóculos para la formación de biopelículas sobre soportes sólidos.
- Establecer una relación entre las condiciones de cultivo de las biopelículas y su capacidad de biosorción. Probar distintos tipos de medio de alimentación.
- Determinar la capacidad de biosorción de cada una de las biopelículas obtenidas.
- Aislar microorganismos a partir de aquellas biopelículas multiespecies que presenten los mejores niveles de captación y determinar su capacidad de biosorción.
- Comparar la capacidad de biosorción entre las biopelículas obtenidas y una biopelícula de *Bacillus* sp. F1.
- Caracterizar las biopelículas obtenidas utilizando técnicas bioquímicas y moleculares como cultivos diferenciales e hibridación "in situ".

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales y Reactivos

2.1.1 Reactivos para la biosorción

i) Reactivos Merck, Alemania (para análisis)

Cloruro de sodio (NaCl), Fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4), Sulfato de hierro (II) ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

ii) Reactivos M&B, Alemania

Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

iii) Reactivos Inducorn, Chile

Agua colada de maíz

2.1.2 Reactivos para Espectrofotometría de Adsorción Atómica (EAA)

i) Reactivos Merck, Alemania

Patrones EAA, Titrisol. Solución estándar de cobre.

2.1.3 Reactivos para la hibridación "in situ"

i) Reactivos Winkler Ltda., E.E.U.U (para biología molecular)

SDS Sodio dodecilsulfato ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$), Cloruro de sodio (NaCl), Fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4), Tris ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$), Alcohol etílico ($\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$), Formamida desionizada (CH_3NO)

ii) Reactivos Winkler Ltda., México (para biología molecular)

EDTA sal disódica 2-hidrato ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

iii) Reactivos Merck, Alemania (para biología molecular)

Formaldehído 37% (CH_2O)

2.2 Métodos

2.2.1 Toma de muestra

Con el objetivo de contar con una diversidad de microorganismos, se recolectaron muestras de distintos ambientes acuáticos. Entre los ambientes seleccionados hay muestras que difieren, por ejemplo, en la disponibilidad de nutrientes, encontrando aguas con un alto contenido de materia orgánica (río Mapocho) así como pobres en nutrientes, es decir, oligotróficas (agua potable). Además, se seleccionaron ambientes anaeróbicos (lodos) y una muestra de biopelículas tomadas de las paredes de una fuente pública.

Las muestras ambientales se utilizaron como inóculos para la formación de biopelículas en columnas, las que luego fueron evaluadas en la remoción de metales pesados desde aguas contaminadas, en un proceso denominado como biosorción. Las muestras ambientales seleccionadas corresponden a:

- i. **Agua del río Mapocho (biopelícula B1):** recolectada a la altura del puente Pío Nono, comuna de Providencia (Chile). Se extrajo un volumen aproximado de 500 ml.
- ii. **Agua de fuente pública (biopelícula B2):** la fuente se ubica en el parque Forestal, comuna de Santiago (Chile). Incluyó un volumen de 500 ml, además de muestra de biopelícula de la fuente, para ello se utilizó una espátula estéril con la cual se raspó la pared de la fuente.
- iii. **Lodos anaerobios (biopelícula B3):** recolectada de un reactor U.A.S.B, perteneciente al laboratorio de Microbiología de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (Chile). La muestra se depositó en un recipiente estéril y se mantuvo a 4°C.

iv. *Agua potable* (biopelícula B4): obtenida de la red domiciliaria. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. Santiago (Chile).

2.2.2 Diseño de las columnas de lecho fijo

2.2.2.1 Columnas de 5 ml

Para construir las columnas, se utilizaron jeringas de polipropileno. Una columna tipo consta de dos partes: el cuerpo de la columna está formado por una jeringa de 5 ml, la cual se cortó a la altura de la graduación de 5 ml, desechando la zona superior, mientras que la tapa de la columna esta formada por una jeringa de 10 ml cortada a la altura de la graduación de 10 ml, conservando la zona superior. Ambas partes están ensambladas a presión y selladas con teflón. La columna cuenta con entrada de líquido por su zona inferior y salida en la parte superior (Figura 1).

Estas columnas se utilizaron para conservar y mantener las biopelículas ambientales multiespecies.

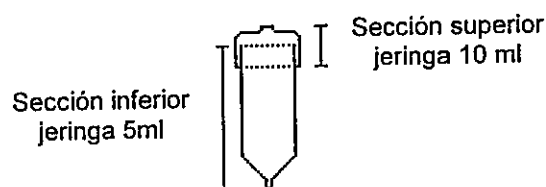


Figura 1: Columna utilizada para formar las biopelículas. La columna es de polipropileno y se haya rellena por perlas de vidrio de 3 mm de diámetro. Su volumen es de 5 ml.

2.2.2.2 Columnas de 60 ml

Se construyó de igual forma que las columnas de 5 ml cambiando sólo los volúmenes de las jeringas utilizadas. El cuerpo de la columna estuvo formado por una jeringa de 60 ml, mientras la tapa se formó con una jeringa de 20 ml. Estas columnas se utilizaron para efectuar los experimentos de biosorción.

2.2.2.3 Material de relleno:

El material de relleno se utilizó como soporte para la adherencia y formación de la biopelícula al interior de la columna. Se emplearon dos tipos de material de relleno:

- a) perlas de vidrio de 3,0 mm de diámetro, Marienfeld (Alemania), para las columnas de 5 ml. Se pesaron, aproximadamente, 5,8 g de perlas de vidrio por columna.
- b) piedras de acuario (gravilla) de 3,9 mm de diámetro promedio, para las columnas de 60 ml. Se pesaron, aproximadamente, 98,5 g de piedras de acuario por columna.

2.2.3 Inoculación y formación de las biopelículas en las columnas

Las muestras ambientales se inocularon en columnas de 5 ml, con recirculación por 24 h, considerando una tasa de dilución (D) igual o mayor a $0,5 \text{ h}^{-1}$ (Figura 2). Posteriormente, cada columna se conectó a la alimentación con el medio de cultivo, con circulación de tipo continua.

En el caso particular de la muestra de agua potable, la columna se conectó directamente a la red domiciliaria, con sistema de circulación tipo continuo por 24 h.

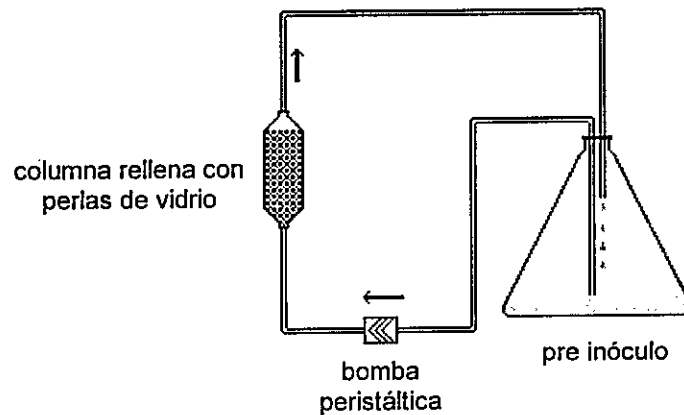


Figura 2: Sistema de inoculación utilizado para formar las biopelículas en las columnas. El pre-inóculo se hace recircular, por medio de una bomba, a través de la columna durante 24 h.

En total se inocularon 8 columnas, considerando un duplicado para cada una de las 4 muestras ambientales seleccionadas. El diseño experimental consta de dos grupos de columnas puestas en paralelo, constituyéndose cada grupo de 4 columnas, donde un grupo se alimentó con medio complejo (Tabla 1), mientras el grupo duplicado se alimentó con medio mínimo (Tabla 1).

El medio de cultivo se suministró de forma continua utilizando un flujo promedio de 3,16 ml/h y una tasa de dilución promedio de $1,26 \text{ h}^{-1}$.

Para el proceso de inoculación y cultivo se utilizó una bomba peristáltica Masterflex, 6:600 modelo 91-55 (E.E.U.U), con cartuchos para mangueras Masterflex 13. Los reactores se mantuvieron en un cuarto aislado, a temperatura ambiente.

2.2.4 Preparación de los medios de cultivo

Tanto el medio de cultivo complejo como el medio mínimo corresponden al descrito por Allison y Sutherland (1987), donde el extracto de levadura y la triptona se

reemplazaron por agua colada de maíz de acuerdo a lo descrito por Ballesteros (2005) y sulfato de amonio, respectivamente.

Tabla 1: Medio de cultivo. Reactivos y concentraciones utilizadas.

Reactivos	Medio complejo
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0998 g/l
KH_2PO_4	0,0230 g/l
K_2SO_4	0,0077 g/l
NaCl	0,0077 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0015 g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,0010 g/l
$\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,00015 g/l
agua colada de maíz	0,19 g/l
Glucosa	0,38 g/l
	pH 7,0

El medio mínimo es idéntico al medio complejo, excepto que el agua colada de maíz se reemplazó por 0,19 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

2.2.5 Observación microscópica de las bacterias en el efluente de las columnas de lecho fijo

Transcurrida una semana a partir de la inoculación de las columnas de lecho fijo, se procedió a observar al microscopio la presencia de bacterias en su efluente. Para ello, se tomaron muestras del efluente de cada columna y se analizaron al fresco mediante contraste de fases en un microscopio Carl Zeiss, modelo Standard 20 (Alemania), utilizando un aumento de 400X. Las bacterias presentes en el efluente se

desprenden desde la biopelícula formada en la columna y por lo tanto, forman parte del consorcio bacteriano ahí formado.

2.2.6 Mantenición de las columnas

Cada tres meses se procedió a inocular nuevas columnas de 5 ml, rellenas con perlas de vidrio, con el fin de reemplazar a las columnas más antiguas. Para la inoculación, la columna nueva se conectó al efluente de la columna antigua, con circulación continua, durante 24 h, utilizando un flujo aproximado de 3 ml/h.

2.2.7 Caracterización de las biopelículas ambientales multiespecies

2.2.7.1 Tinción de Gram

Este tipo de tinción se llevó a cabo sobre las biopelículas con el fin de tener una primera aproximación a su caracterización. La tinción permite diferenciar entre dos grandes grupos de bacterias: Gram positivas y Gram negativas.

Se tomó una muestra del efluente de cada una de las columnas sobre un portaobjeto y luego se secó utilizando un mechero. La tinción de la muestra se realizó según el protocolo establecido para la tinción de Gram y posteriormente se observó con microscopio Carl Zeiss, modelo Standard 20 (Alemania), a un aumento de 1000X.

2.2.7.2 Aislamiento y mantención de las cepas bacterianas

Para aislar las cepas bacterianas constituyentes de las biopelículas ambientales multiespecies formadas en las columnas de lecho fijo, se tomó una muestra de 5 ml del efluente de cada una de las ocho columnas en tubos estériles. Luego, bajo campana de flujo laminar modelo Aura H100, EHRET (Alemania), las muestras se agitaron y con un asa se sembraron en placas con medio TSA (Tryptic Soy Agar), Difco (E.E.U.U). Las placas se incubaron a 28°C por 24 h, para luego observar el crecimiento.

Para mantener las cepas bacterianas obtenidas de las biopelículas, se sembró cada una de ellas en tubos de ensayo con medio TSA. Los tubos se incubaron a 28°C por 24 h, y se guardaron a 4°C.

2.2.8 Biosorción y desorción

2.2.8.1 Preparación de las soluciones de CuSO₄ y HCl

Para el proceso de biosorción de cobre, se utilizó una solución de 20 ppm de Cu²⁺. El pH de la solución se mantuvo entre 4,6 y 5,3, considerado como lo óptimo para el desarrollo del proceso de biosorción.

Para el proceso de desorción se utilizó una solución de HCl, pH 1,0.

2.2.8.2 Biopelículas ambientales multiespecies

2.2.8.2.1 Columnas de 5 ml

Los primeros experimentos de biosorción y desorción con las biopelículas ambientales se realizaron en columnas de 5 ml rellenas con perlas de vidrio. Para la inoculación de las columnas, estas se conectaron directamente al flujo de salida de las columnas de 5 ml, que mantenían el inóculo inicial (Figura 3). La inoculación se realizó por un período de 24 h, con sistema de circulación tipo continuo. Posteriormente, las columnas se desaguaron, quedando listas para ser ocupadas en los experimentos de biosorción.

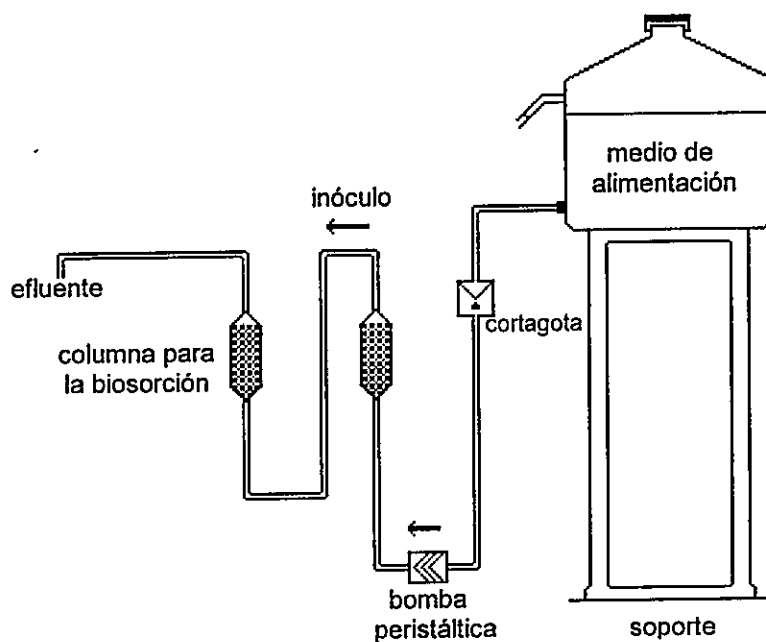


Figura 3: Sistema de inoculación de las columnas empleadas en el proceso de biosorción.

Las columnas se conectaron a un volumen inicial de una solución de 20 ppm de Cu^{2+} , con recirculación, y agitación constante (Figura 4). Transcurridos los primeros 30 min desde el inicio del experimento se tomó una muestra de 5 ml de la solución contenida en el matraz (Figura 4), se centrifugó a 13.000 rpm por 10 min en una microcentrifuga, Micro Centaur MSB010.CX2.5, Sanyo (Reino Unido), y se guardó para ser medida en el espectrofotómetro de adsorción atómica, Perkin Elmer, modelo 3110 (E.E.U.U). Inmediatamente después de tomar la muestra, se agregó sobre el volumen inicial, un segundo volumen de solución de 20 ppm de Cu^{2+} , obteniéndose un nuevo volumen final el cual permaneció recirculando durante 30 min adicionales. El proceso continuó de esta forma, aumentando en intervalos de tiempo determinados la solución recirculante de CuSO_4 . El experimento finalizó luego de haber tomado siete puntos de muestra.

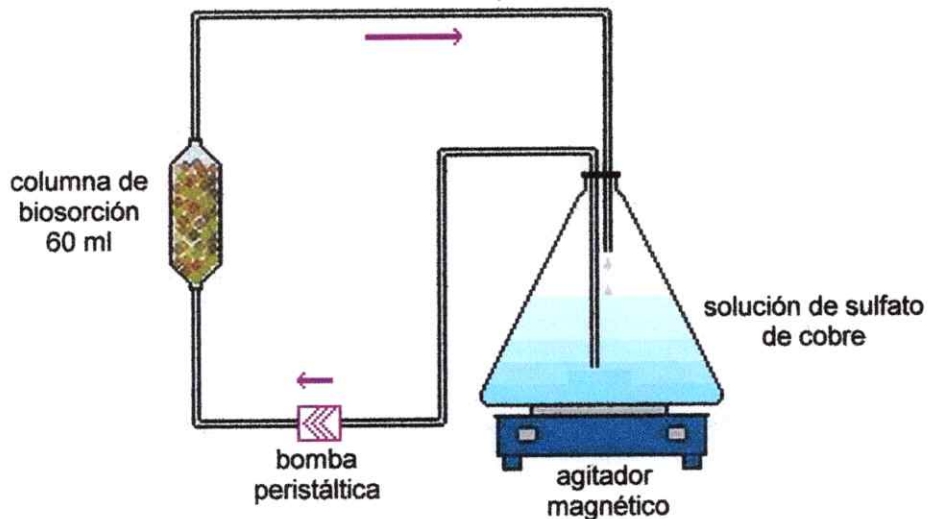


Figura 4: Proceso de biosorción. Una solución de 20 ppm de cobre se hace recircular a través de una columna de polipropileno, de 60 ml, que contiene la biopelícula formada sobre piedras de acuario. La solución de cobre se mantiene en constante agitación.

Una vez realizado el proceso de adsorción de Cu^{2+} por las biopelículas de las columnas, correspondió el proceso de desorción. Previamente las columnas se vaciaron y lavaron con agua destilada para remover el cobre no adsorbido por la biopelícula. Luego, se hizo recircular por las columnas, un volumen de una solución de HCl, pH 1,0, durante 30 min. Transcurrido este tiempo, la columna se vació y la solución remanente se agitó para tomar 5 ml de muestra de la solución.

2.2.8.2.2 Columnas de 60 ml

En estas columnas se utilizó piedras de acuario como material de relleno, variando los volúmenes de solución recirculante de CuSO_4 y HCl.

2.2.8.3 Biosorción y desorción de cobre utilizando una biopelícula de *Bacillus* sp. F1

Para los experimentos de biosorción y desorción con *Bacillus* sp. F1 se utilizaron columnas de 60 ml, rellenas con piedras de acuario. Para la obtención de la biopelícula de *Bacillus* sp. F1 se utilizó un bio-reactor tipo I (Barriga, 2001) construido de politetrafluoroetileno; teflón PTFE, con un diámetro de 40 mm y una longitud de 400 mm. Conformado, además, por un dispositivo de entrada de aire-líquido, dispositivo de salida de aire y sistema de inyección de aire, relleno con piedras de acuario. La biopelícula se creció a 28 °C. Como medio de cultivo se utilizó medio Allison y Sutherland, mantenido con recirculación. Posteriormente, las columnas de 60 ml se rellenaron con las piedras de acuario previamente colonizadas con *Bacillus* sp. F1.

Los experimentos de biosorción y desorción de cobre se realizaron siguiendo el mismo protocolo establecido para los experimentos de biosorción y desorción en columnas de 60 ml con las biopelículas ambientales multiespecies.

2.2.8.4 Elección del material de relleno para las columnas de lecho fijo

Para determinar la posible captación de los metales sólo por el material de relleno se realizaron experimentos de biosorción y desorción, los cuales se llevaron a cabo en columnas de 60 ml, sin bacterias.

Se midió la capacidad de absorber cobre de tres tipos de material de relleno, además, se consideró la columna y las mangueras sin relleno. Los materiales de relleno evaluados correspondieron a perlas de vidrio, piedras de acuario y anillos Rashig de vidrio, con un diámetro promedio de 3 mm, 3,9 mm y 9 mm, respectivamente.

2.2.8.5 Biosorción por las bacterias aisladas de las biopelículas ambientales multiespecies

Se evaluó la capacidad de adsorción de cobre de bacterias aisladas de las biopelículas ambientales multiespecies. Para ello, a partir de cada biopelícula multiespecie se realizó un aislamiento en placas con medio TSA. Para elegir las cepas bacterianas a utilizar en el proceso de biosorción, se tomó como criterio de selección el aspecto mucoso de las colonias, lo que se consideró como un indicio de la formación de exopolisacáridos.

Las colonias bacterianas seleccionadas se sembraron en estria en tubos de ensayo con medio TSA (Tryptic Soy Agar), y se incubaron por 24 h a 28°C. Posteriormente, con un asa estéril se tomó una muestra de la población bacteriana, y se inoculó en medio mínimo líquido. Este medio se conectó a la columna de 60 ml rellena con piedras de acuario y se mantuvo en recirculación durante 24 h a un flujo de 7,6 ml/h. Luego, la columna se desconectó del sistema de inoculación y se conectó al medio de cultivo mínimo con circulación continua durante 4 días a temperatura ambiente. Al término de este período, la columna se desconectó del medio de cultivo, se retiró todo el medio retenido en la columna y se secó a temperatura ambiente durante la noche. En estas condiciones la columna queda lista para ser utilizada en ensayos de biosorción.

Las cepas bacterias elegidas para los ensayos de biosorción corresponden a tres bacterias más una asociación de bacteria y levadura, las cuales se detallan a continuación: i) Bacteria aislada de biopelícula B1 (río Mapocho) cultivada con medio mínimo, ii) Bacteria aislada de biopelícula B3 (lodos) cultivada con medio mínimo, iii) Bacteria aislada de biopelícula B5 (lodos). La bacteria aislada de la biopelícula 5 se obtuvo de un estudio en paralelo (Bravo, 2005. Memoria en curso para optar al título de

Bioquímico. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile). La biopelícula B5 se formó a partir de un inóculo de lodos anaerobios, el mismo utilizado para la formación de las biopelícula B3, pero alimentada con medio Allison y Sutherland. iv) Además, se realizó la biosorción con una asociación de bacteria y levadura aislada de la biopelícula B5. La bacteria que participa de esta asociación corresponde a la misma bacteria mencionada en el punto iii, la que se aisló en cultivo puro.

2.2.9 Caracterización de las biopelículas ambientales multiespecies utilizando medios de cultivo diferenciales

Para aislar las bacterias de las biopelículas ambientales multiespecies se recolectaron 10 ml del efluente de cada una de las ocho columnas y luego con un asa estéril se sembró en placas con medio TSA. Las placas se incubaron a 28°C por 24 h. Las colonias formadas se sembraron en estría en medio TSA, se crecieron a 28°C y se mantuvieron a 4°C.

Para la caracterización bioquímica, cada una de las colonias aisladas se sembraron en estría en medios de cultivo diferencial como: agar con hierro de Kligler (KIA) Difco (E.E.U.U), agar con hierro y lisina (LIA) Difco (E.E.U.U), agar citrato de Simmons (SC) Difco (E.E.U.U) y caldo triptonado con urea, Difco (E.E.U.U), y se incubaron a 28°C por 24 h.

2.2.10 Obtención de las biopelículas ambientales multiespecies para su caracterización por hibridación "in situ"

Las biopelículas se formaron sobre portaobjetos de vidrio (Fisherbrand) dispuestos en una cámara de flujo fabricada en acrílico y diseñada en el Laboratorio de

Microbiología (Figura 5). Sus dimensiones corresponden a 13 cm de largo por 7,7 cm de ancho y un espesor de 0,8 cm. La cámara cuenta con cuatro canales a través de los cuales circula el efluente de las columnas. El portaobjeto se colocó a lo largo de un canal quedando en contacto con el efluente que contiene las bacterias. La formación de la biopelícula se llevó a cabo por un período de 1 a 2 h. Transcurrido este período de tiempo, los portaobjetos se desmontan de la cámara de flujo y se procede a la fijación de las células adheridas.

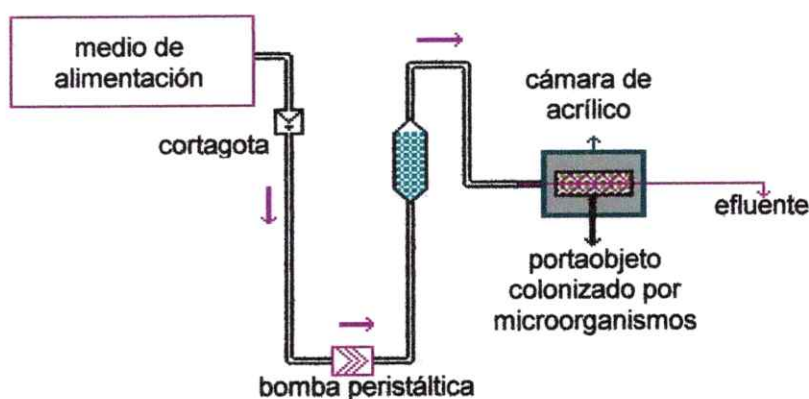


Figura 5: Sistema utilizado para obtener muestras de las biopelículas formadas en las columnas, para su posterior caracterización mediante la técnica de hibridación "in situ".

2.2.11 Caracterización de las biopelículas ambientales multiespecies utilizando la técnica de hibridación "in situ"

2.2.11.1 Fijación de la biopelícula adherida al portaobjeto

Las biopelículas formadas sobre los portaobjetos se fijaron con solución de paraformaldehído al 4% por 30 min a temperatura ambiente y el fijador se lavó por tratamiento con PBS 1X y luego con agua destilada estéril. Las biopelículas fijadas se conservaron en solución PBS 1X: Etanol a -20°C . Finalmente, la biopelícula se

deshidrató en pasos sucesivos de 3 min en etanol al 50%, 80% y 96%, quedando lista para ser hibridada con la sonda específica.

2.2.11.2 Sondas de oligonucleótidos

Para la caracterización molecular de las distintas biopelículas formadas sobre los portaobjetos se utilizaron las siguientes sondas de oligonucleótidos con marca fluorescente (Tabla 2): EUB338 para miembros del dominio Bacteria, BET42a para la subclase beta de las Proteobacterias, GAM42a para la subclase gama de las Proteobacterias, ALF1b para la subclase alfa de las Proteobacterias, SRB385 para la subclase delta de las Proteobacterias y CF319a para el grupo Cytophaga-Flavobacterium. Las sondas de oligonucleótidos utilizadas son específicas para RNA ribosomal bacteriano y contienen indocarbocianina (Cy3) como fluoróforo, el que se encuentra unido al extremo 5' de la sonda.

Para asegurar una óptima especificidad de las sondas BET42a y GAM42a, se utilizaron sondas sin marca fluorescente de GAM42a y BET42a. De tal forma, cuando se hibridó con la sonda BET42a, se colocó en la solución de hibridación una cantidad en exceso de la sonda sin marca fluorescente GAM42a, la cual actuó como competidor de BET42a, anulando de esta forma la unión no específica de la sonda BET42a a rRNA de bacterias de la subclase gama de las Proteobacterias (Manz y col., 1992).

Tabla 2: Sondas empleadas para la hibridación "in situ".

Sonda	Secuencia (5'- 3')	Posición rRNA	Especificidad	Referencia
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S, 338-355	Bacteria	Amann y col., 1990
BET42a	GCCTTCCCACATTCGTTT	23S, 1027-1043	Subclase-beta proteobacteria	Manz y col., 1992
GAM42a	GCCTTCCCACATTCGTTT	23S, 1027-1043	Subclase-gama proteobacteria	Manz y col., 1992
ALF1b	CGTTCG(C/T)TCTGAGCCAG	16S, 19-35	La mayoría de las alfa-proteobacterias	Manz y col., 1992
CF319a	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	16S (319-336)	Cytophaga-Flavobacterium del phylum Cytophaga-flavobacterium bacteroides	Manz y col., 1996
SRB385	CGGCGTCGCTGCGTCAGG	16S (385-402)	Mayoría δ de proteobacteria	Amann y col., 1990

2.2.11.3 Hibridación "in situ"

La hibridación "in situ" se efectuó adicionando a cada portaobjeto 8 μ l de solución de hibridación. Los portaobjetos se incubaron a 46°C por 90 min en cámara húmeda precalentada. Para las sondas ALF1b y EUB338 se utilizó una solución de hibridación con 20% formamida, mientras que para las sondas BET42a, GAM42a, CF319a y SRB385 la solución de hibridación contenía 35% formamida. La Tabla 3 detalla los componentes de la solución de hibridación para cada una de las sondas utilizadas.

Tabla 3: Concentraciones utilizadas en la solución de hibridación. La concentración de formamida es al 20% para las sondas EUB338 y ALF1b y de 35% para las sondas restantes.

	Solución de hibridación
Formamida	20% - 35%
NaCl	0,9 M
Tris HCl	20 mM / pH 7,2
SDS	0,01%
Sonda	50 ng

Posteriormente, el portaobjeto se sumergió en 50 ml de solución de lavado a 48°C, y se incubó a 48°C por 20 min. Para las sondas ALF1b y EUB338 se utilizó una solución de lavado con una concentración de 180 mM de NaCl, mientras que para las sondas BET42a, GAM42a, CF319a y SRB385 se utilizó una solución con 40 mM NaCl. Los componentes de la solución de lavado se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4: Concentraciones utilizadas en la solución de lavado. La concentración de NaCl es de 180 mM para las sondas EUB338 y ALF1b y de 40 mM para las sondas restantes.

	Solución de Lavado
NaCl	40 mM – 180 mM
Tris	20 mM
SDS	0,01%
EDTA	5 ml

Las biopelículas se tiñeron con 20 µl de solución DAPI (1µg/ml) y se incubaron a temperatura ambiente por 8 min en oscuridad. La reacción se detuvo mediante el lavado del portaobjeto con agua destilada y se dejó secar al aire.

2.2.11.4 Recuento celular

Las bacterias de la biopelícula que hibridan con las sondas marcadas con Cy3 se observaron en microscopio de fluorescencia Axioskop 20, Carl Zeiss (Alemania), empleando el filtro N°20 y para aquellas marcadas con DAPI, el filtro N°02. El fluoróforo Cy3 se caracteriza por emitir fluorescencia de color rojo por lo que las células correctamente hibridadas se reconocen por emitir fluorescencia de color rojo brillante, mientras que las células teñidas con el colorante DAPI (colorante utilizado para marcar todas las células), dan una coloración blanca brillante. Para el recuento de las células hibridadas se utilizó un ocular cuadrulado, y se contabilizaron 20 campos al azar. Los datos de recuento específico obtenidos con el uso de sondas, se compararon con el recuento total obtenido usando el colorante DAPI, para un mismo campo. Los datos se expresaron en porcentaje, considerando como 100% el total de las células teñidas con DAPI.

2.2.12 Medición de la concentración de cobre en soluciones tratadas por biosorción utilizando Espectrofotometría de Adsorción Atómica.

La concentración de cobre en las distintas muestras obtenidas por biosorción se midió utilizando un espectrofotómetro de adsorción atómica, Perkin Elmer, modelo 3110. El equipo se calibró utilizando soluciones patrones de 1 a 5 ppm de cobre.

2.2.13 Análisis estadístico.

A los índices de biosorción obtenidos y expresados en el balance de masas se les aplicó un análisis de varianza con el fin de determinar si las diferencias observadas eran significativas.

Para determinar si las muestras provenían de una muestra con distribución normal se aplicó el contraste de normalidad de Shapiro-Wilks. Comprobándose la normalidad de las muestras se procedió a aplicar el contraste sobre el cociente de varianzas y el contraste sobre la diferencia de medias con el fin de determinar si las diferencias observadas eran significativas al nivel del 5% (Rodríguez, 1997).

3. RESULTADOS

3.1 Obtención de las biopelículas ambientales multiespecies

Se seleccionaron cuatro tipos de muestras ambientales: agua del río Mapocho, agua de una fuente pública, muestra de lodos anaerobios, y agua potable. Cada una de estas muestras constituye el inóculo inicial para la formación de las biopelículas sobre perlas de vidrio, en columnas de polipropileno de 5 ml. La inoculación de las columnas se realizó por un período de 24 h y posteriormente se conectaron de forma permanente al medio de cultivo.

La formación de las biopelículas se evaluó mediante la observación microscópica de una muestra de el efluente. El efluente, por cierto, sólo podía contener bacterias desprendidas de la biopelícula formada durante el proceso de inoculación dado que se empleó un medio de cultivo estéril y un alto flujo de alimentación ($D=1,26 \text{ h}^{-1}$) que impide el crecimiento de las bacterias en suspensión.

En las muestras de efluente recolectadas se observaron diferentes tipos de bacterias, además de protozoos y levaduras. Por lo tanto, se evidenció la formación de las biopelículas multiespecies.

De esta forma se obtuvieron ocho tipos de biopelículas, distintas entre sí, que corresponden a las cuatro muestras ambientales alimentadas cada una con medio complejo y medio mínimo. Estas biopelículas se utilizaron para los ensayos de biosorción.

3.2 Caracterización de las biopelículas ambientales multiespecies

3.2.1 Tinción de Gram y aislamiento en medio TSA

Como primera aproximación a la caracterización de las biopelículas formadas en columnas de 5 ml, se realizó la tinción de Gram, la cual permite diferenciar entre

bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas. La tinción de Gram se realizó para muestras de efluente de cada una de las columnas de 5 ml, conteniendo las biopelículas en estudio. En todos los casos evaluados se obtuvieron sólo bacterias Gram negativas.

El aislamiento en medio TSA se realizó para caracterizar bioquímicamente cada una de las bacterias cultivables de las biopelículas ambientales y de esta forma obtener un conocimiento general de las diferentes poblaciones bacterianas.

3.2.2 Caracterización de las biopelículas ambientales multiespecies utilizando medios de cultivos diferenciales

El objetivo del experimento era obtener una aproximación bioquímica de la caracterización de las biopelículas ambientales multiespecies crecidas en las columnas de 5 ml. Este tipo de caracterización sólo considera a los microorganismos cultivables en los medios utilizados.

Para la identificación se consultaron tablas con las reacciones bioquímicas. La Tabla 5 presenta los tipos bacterianos reconocidos en cada una de las biopelículas.

Tabla 5: Tipos bacterianos presentes en las biopelículas ambientales multiespecies reconocidos por medio de reacciones bioquímicas.

		Bacterias no fermentadoras	<i>Serratia</i>	Enterobacter <i>Klebsiella</i>	<i>Shigella</i> sp	<i>Salmonella</i> sp
Medio complejo	B1: río Mapocho	+	+	-	+	+
	B2: fte. pública	+	-	+	+	+
	B3: Lodos	+	+	-	+	+
	B4: agua potable	-	+	+	+	+
Medio mínimo	B1: río Mapocho	+	-	+	-	-
	B2: fte. pública	+	-	+	-	-
	B3: Lodos	+	-	+	-	-
	B4: agua potable	+	-	+	-	-

+: indica presencia del tipo bacteriano en la biopelícula.

-: ausencia del tipo bacteriano en la biopelícula.

3.3 Biosorción

3.3.1 Biosorción por las biopelículas ambientales multiespecies

3.3.1.1 Biosorción en las columnas rellenas con perlas de vidrio.

El siguiente experimento se realizó con el fin de medir la adsorción de cobre de biopelículas ambientales crecidas en columnas de polipropileno de 5 ml utilizando perlas de vidrio de 3 mm de diámetro como material de soporte y alimentadas con medio complejo con agua colada de maíz.

Se obtuvo la formación de biopelículas en las columnas después de un cultivo continuo de 24 h. A estas columnas se les hizo recircular una solución de CuSO_4 para determinar la captación de cobre por las distintas biopelículas, en el proceso conocido como biosorción.

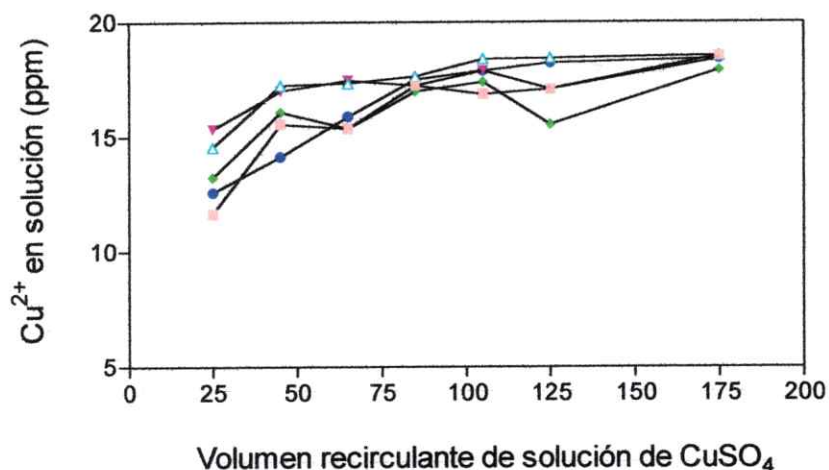


Figura 6: Adsorción de cobre por las biopelículas ambientales multiespecies cultivadas con medio complejo. La biosorción se realizó en columnas de 5ml, utilizando perlas de vidrio de 3 mm de diámetro como material de relleno. Los valores mostrados corresponden a mediciones únicas. —■— B1 (río Mapocho/MC), —▲— B2 (fte. Pública/MC), —▼— B3 (lodos/MC), —◆— B4 (agua potable/MC), —●— Columna sólo con material de relleno/sin biopelícula

En la Figura 6 se grafican los valores de cobre en equilibrio obtenidos en la biosorción de cada una de las cuatro biopelículas evaluadas. La concentración de cobre graficada representa la cantidad de metal no adsorbido por la biopelícula después de hacer recircular a través de la columna un volumen de solución de CuSO₄, equivalente a una concentración de 20 ppm de Cu²⁺. El tiempo de recirculación varió según el volumen de solución recirculante y se consideró el tiempo mínimo requerido para que todo el volumen de la solución pasara al menos tres veces a través de la columna.

Al inicio del experimento las biopelículas contienen una gran cantidad de sitios de adsorción disponibles y es de esperar que sea en este punto donde se reflejen los mayores niveles de captación de cobre. Sin embargo, se debe tener presente que los gráficos representan la cantidad de cobre no adsorbida por la biopelícula, es decir, el cobre remanente que permanece en solución una vez alcanzada su concentración de

equilibrio. Por lo tanto, el menor valor graficado corresponde al más alto nivel de captación de cobre que puede alcanzarse. Luego, la capacidad de biosorción de cobre de las biopelículas irá decreciendo paulatinamente a medida que éstas se aproximen a su nivel de saturación.

Una vez realizada la adsorción, se procede a la desorción del cobre captado por las distintas biopelículas. Para ello, se utiliza una solución ácida que libera y solubiliza el cobre que se haya unido a la matriz extracelular de los microorganismos formadores de la biopelícula.

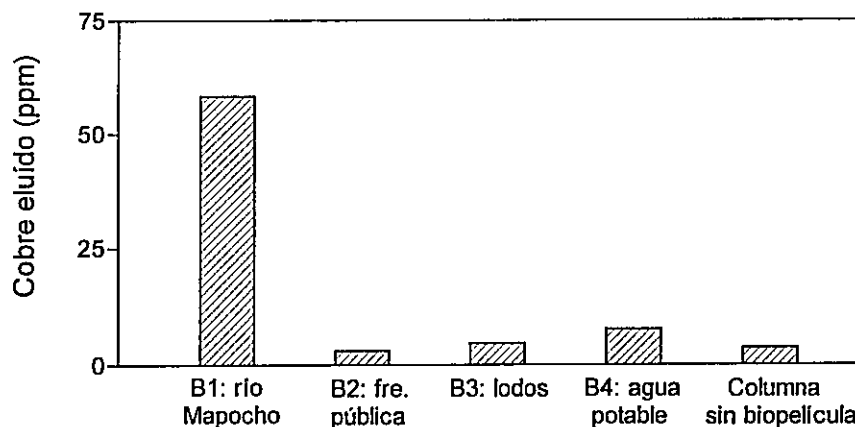


Figura 7: Desorción de cobre en las biopelículas ambientales multiespecies cultivadas con medio complejo. La biosorción se realizó en columnas de 5 ml utilizando perlas de vidrio de 3 mm de diámetro como material de relleno. Para la desorción se utilizó una solución de HCl 1N, pH 1,0, la cual se hizo recircular a través de la columna durante 30 min. Los valores obtenidos se expresan en medidas de concentración (ppm) y corresponden a mediciones únicas.
▨ cobre eluido

En la Figura 7 se observa la concentración de cobre desorbido a partir de cada una de las biopelículas en estudio. Para la desorción de cobre desde las columnas se utilizó solución de ácido clorhídrico pH 1,0. La concentración de cobre recuperado corresponde a 3, 5 y 8 ppm para la biopelícula B2, B3 y B4 respectivamente, mientras

que en la biopelícula B1 lo recuperado es mayor a 50 ppm. Por otro lado, en el control sin inóculo se recuperaron aproximadamente 4 ppm de cobre.

En los experimentos de biosorción, representados en las Figuras 6 y 7, se evaluó, un control negativo que consistía en una columna de 5 ml rellena con perlas de vidrio, la cual no se inoculó. Se observa que el control negativo presenta valores de adsorción de cobre similares a los obtenidos por las biopelículas ambientales lo que sugiere la posible adsorción de cobre por parte del material de relleno. Este resultado nos llevó a buscar un material de relleno más apropiado para estos experimentos.

3.3.1.2 Elección del material de relleno

El objetivo de este experimento es medir el nivel de adsorción de Cu^{2+} por distintos materiales de relleno. Se utilizaron tres tipos de material, que corresponden a: perlas de vidrio, piedras de acuario, anillos Rashig. Además, se dispuso de una cuarta columna, la cual no contenía relleno, con el fin de medir la adsorción por parte del material de las paredes de la columna, que en este caso corresponde a plástico. Las columnas, por lo tanto, no se inocularon con bacterias.

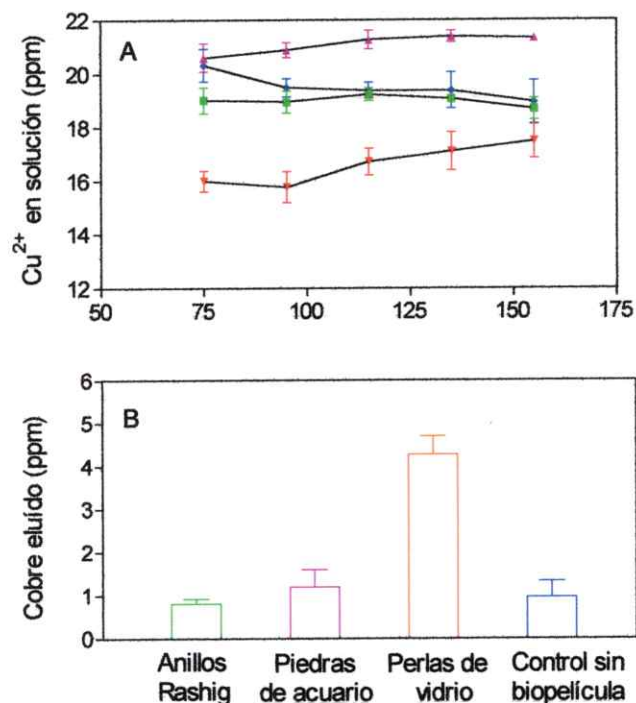


Figura 8: Adsorción y desorción de cobre por distintos materiales de relleno. La desorción se realizó mediante la adición de ácido clorhídrico, pH 1,0. La concentración de cobre se expresa en ppm y corresponde a un valor promedio. Las barras representan la desviación estándar calculada para los experimentos en triplicados. **A.** Adsorción de cobre: —■ Anillos Rashig, —■ Piedras de acuario, —■ Perlas de vidrio, —■ Columna sin relleno; **B.** Desorción de cobre para cada uno de los materiales de relleno evaluados.

En la Figura 8 se muestra la adsorción y desorción de cobre por distintos tipos de material de relleno. El objetivo del experimento es evaluar y elegir el material de relleno que presente los más bajos niveles de captación de cobre, de forma de no interferir significativamente en los valores de captación de cobre obtenidos mediante las biopelículas. En la Figura 8A se observa que de los tres tipos de material evaluados, tanto las piedras de acuario como los anillos Rashig presentan curvas que se mantienen estables alrededor de los 20 ppm, lo cual indica que prácticamente no hay adsorción de cobre. Sin embargo, los resultados obtenidos con perlas de vidrio indicaron que este tipo de material adsorbía una cantidad significativa de cobre lo cual

queda de manifiesto al observar la Figura 8B, donde la concentración de cobre recuperado es significativamente mayor a la de los otros materiales evaluados.

Por lo tanto, considerando sus bajos índices de captación, su tamaño y compactación, se eligió como material de relleno las piedras de acuario.

3.3.1.3 Biosorción en las columnas rellenas con piedras de acuario

El siguiente experimento tuvo como objetivo estudiar la capacidad de biosorción de distintas biopelículas ambientales, en columnas de polipropileno de 60 ml utilizando piedras de acuario como material de relleno. Las columnas de 5 ml se reemplazaron por columnas de 60 ml para trabajar con mayor cantidad de biomasa y tratar volúmenes de solución de cobre mayores, de modo de tener una mejor precisión en la mediciones del cobre adsorbido y eluido a partir de cada una de las biopelículas.

Además, cada una de las biopelículas en estudio se alimentó en forma paralela, ya sea, con medio complejo, el cual contenía agua colada de maíz, y medio mínimo, donde el agua colada se reemplazó por sulfato de amonio. Estos dos medio de cultivo se evaluaron y se comparó su efecto con respecto a la adsorción de Cu^{2+} por las biopelículas.

En la Figura 9 se comparan la adsorción de cobre entre las distintas biopelículas ambientales multiespecies cultivadas con medio complejo y medio mínimo.

En la Figura 9A y 9B se observa la biosorción de cobre por las biopelículas ambientales multiespecies cultivadas con medio complejo y mínimo, respectivamente.

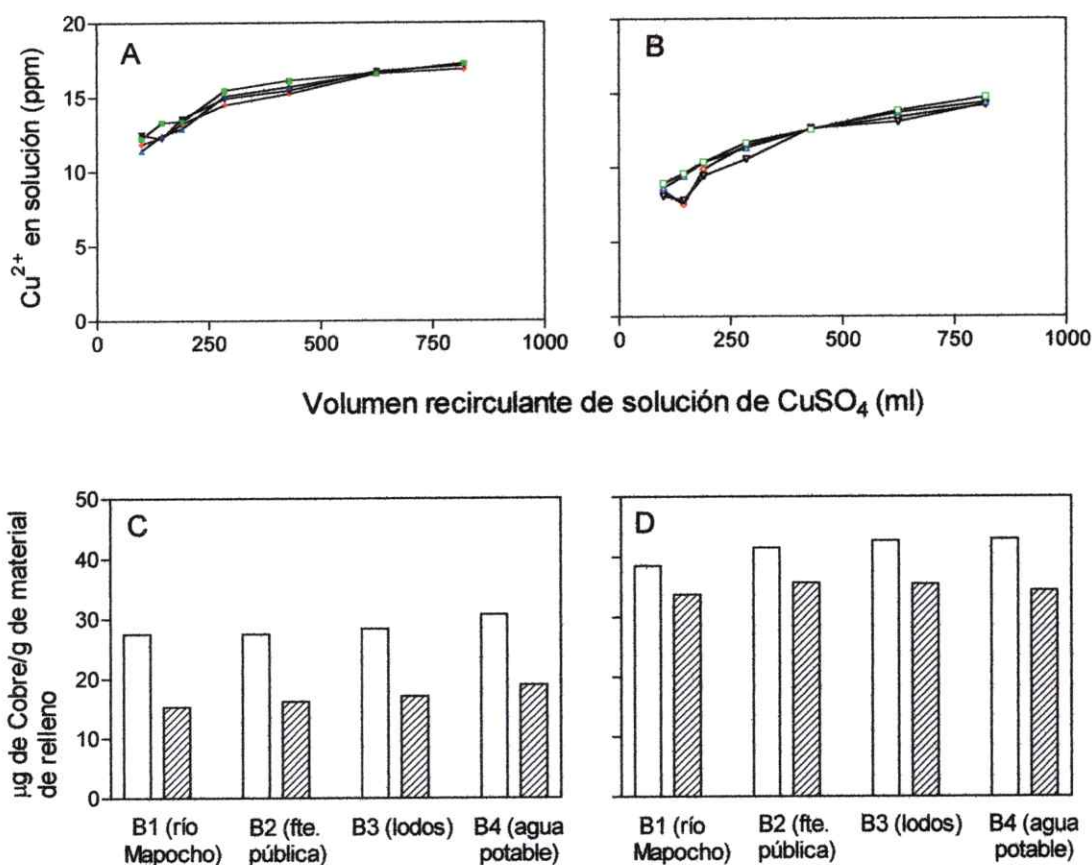


Figura 9: Biosorción de cobre por las biopelículas ambientales multispecies. La biosorción se realizó en columnas de 60 ml utilizando piedras de acuario como material de relleno. En **A** y **B** se grafican los datos de adsorción de cobre de las biopelículas cultivadas con medio complejo y medio mínimo, respectivamente. En **C** y **D** se grafican los datos del balance de masas, cobre adsorbido v/s cobre desorbido, de cada una de las biopelículas cultivadas con medio complejo y medio mínimo, respectivamente. **A4.** biopelículas ambientales multispecies cultivadas con medio complejo: —■— B1 (río Mapocho/MC), —▲— B2 (fte. pública/MC) —▼— B3 (lodos/MC), —◆— B4 (agua potable/MC). **B.** biopelículas ambientales multispecies cultivadas con medio mínimo: —□— B1 (río Mapocho/MM), —△— B2 (fte. pública/MM), —▽— B3 (lodos/MM), —◇— B4 (agua potable/MM), **C.** balance de masas de las biopelículas cultivadas con medio complejo. **D.** balance de masas de las biopelículas cultivadas con medio mínimo: □ cobre adsorbido, ▨ cobre desorbido.

En las curvas de adsorción obtenidas, Figura 9A y 9B, se puede observar que al inicio del experimento, cuando el volumen de solución recirculante es de 100 ml, se obtiene la cantidad más baja de cobre en solución y en consecuencia la cantidad más

alta de cobre adsorbido. A medida que aumenta el volumen de solución recirculante, disminuye la cantidad de cobre retenido por las biopelículas.

En la Figura 9A se observa que las biopelículas cultivadas con medio complejo presentan niveles de captación de cobre muy similares entre sí. La Figura 9B, muestra que al igual que en la Figura 9A, aquellas biopelículas cultivadas con medio mínimo prácticamente no presentan diferencias en los niveles de biosorción.

Cabe destacar que el objetivo de estos experimentos era analizar la mayor cantidad de muestras posibles bajo las mismas condiciones ambientales y al mismo tiempo, es por ello que los experimentos no se realizaron en duplicados. Un análisis en triplicado, se realizó con las bacterias aisladas de aquellas biopelículas que captaron más cobre.

En la Figura 9C y 9D se grafica la cantidad de cobre adsorbido versus la cantidad de cobre desorbido por cada una de las biopelículas cultivadas con medio complejo y medio mínimo, respectivamente. Se puede observar que para cada una de las cuatro biopelículas evaluadas, existe diferencia entre la cantidad de cobre adsorbida y desorbida, lo que indicaría que el proceso no es completamente reversible. No obstante, se debe considerar que el roce que ejerce la solución que pasa a través de la columna (fuerzas de corte) genera desprendimiento de biomasa. Esta biomasa lleva adherida partículas de cobre las cuales no se encuentran disponibles para el proceso de desorción, lo que llevaría a una subestimación de la cantidad de cobre eluído desde la biopelícula.

Si se comparan los resultados obtenidos entre las biopelículas cultivadas con medio complejo, el cual contiene agua colada de maíz (Figura 9A y 9C) y las cultivadas con medio mínimo (Figura 9B y 9D), se puede concluir que las cultivadas con medio mínimo poseen mejores niveles de biosorción. Así por ejemplo, en la Figura 9A y 9B,

se observa que lo adsorbido por la biopelícula B4 cultivada con medio complejo corresponde a un 71% de lo captado por su similar cultivada con medio mínimo.

En cuanto a los niveles de desorción, se puede apreciar que desde la biopelícula B4 cultivada con medio mínimo (Figura 9D) es posible recuperar un 81% de la cantidad de cobre adsorbido, mientras que desde la B4 cultivada con medio complejo (Figura 9C) se recupera sólo un 62%.

3.3.2 Biosorción por *Bacillus* sp. F1

Se utilizó *Bacillus* sp. F1 como un microorganismo referencial, debido a que las propiedades de biosorción de esta bacteria han sido estudiadas en trabajos previos a esta investigación. El experimento de biosorción de cobre utilizando biomasa de *Bacillus* sp. F1 se llevó a cabo con el fin de medir el nivel de captación de cobre por *Bacillus* sp. F1 bajo las mismas condiciones utilizadas para la biosorción con las biopelículas ambientales. Sin embargo, cabe destacar que la biopelícula de *Bacillus* sp. F1 se formó sobre piedras de acuario en un reactor de 360 ml, con aireación y a 28°C. Posteriormente, las piedras de acuario con la biopelícula de *Bacillus* sp. F1 fueron depositadas en una columna de 60 ml donde se llevó a cabo la biosorción. El experimento se realizó en triplicado.

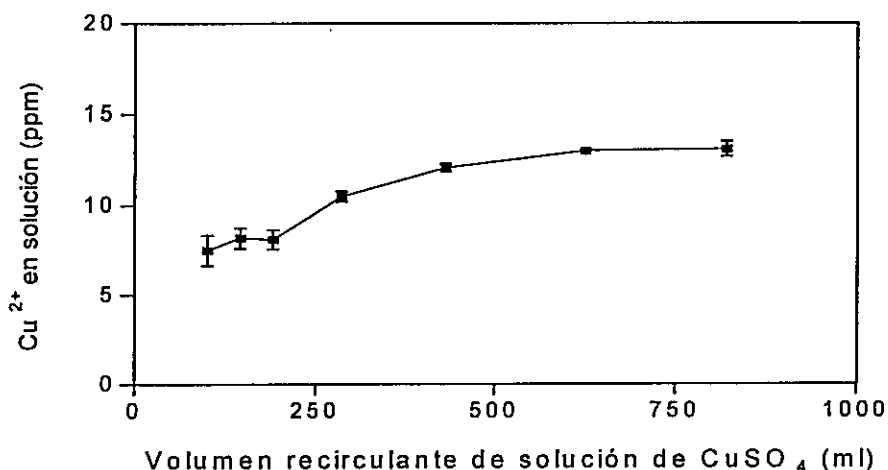


Figura 10: Adsorción de cobre por *Bacillus* sp. F1. La biopelícula de *Bacillus* sp. F1 se creció en un reactor Tipo 1, a 28°C y se utilizó piedras de acuario como material de soporte. La biosorción se realizó en columnas de 60 ml. La concentración de Cu²⁺ en equilibrio, expresada en ppm, corresponde a un valor promedio. Las barras representan la desviación estándar registrada entre los tres valores obtenidos de concentración de Cu²⁺ para cada volumen de solución de CuSO₄ utilizada.

En la Figura 10 se muestran los datos obtenidos en la biosorción de cobre por *Bacillus* sp. F1. Se observa que al inicio del experimento se tiene una capacidad máxima de captación de cobre la que disminuye a medida que aumenta el volumen de solución recirculante.

En el balance de masas (Figura 12) se puede observar que la cantidad de cobre recuperado desde la biopelícula de *Bacillus* sp. F1, es un 79% de lo captado, en consecuencia el proceso no es completamente eficiente dado que un 21% de lo adsorbido esta siendo retenido por la biopelícula (las diferencias observadas tienen un nivel de significación del 5%, según análisis de contraste de medias).

3.3.3 Biosorción por las bacterias aisladas de las biopelículas ambientales multiespecies

La biosorción de cobre utilizando bacterias aisladas a partir de las biopelículas ambientales multiespecies, se llevó a cabo con el fin de comparar la capacidad de biosorción de cobre entre las distintas cepas bacterianas y *Bacillus* sp. F1.

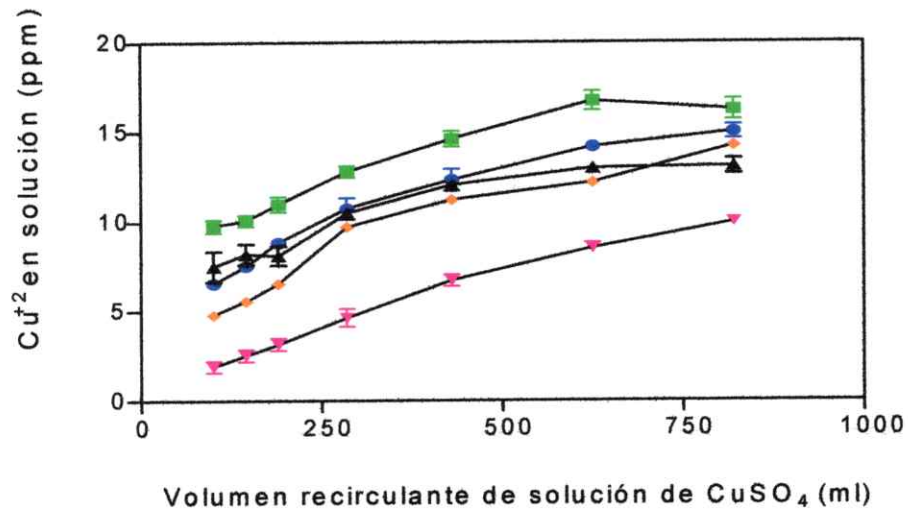


Figura 11: Comparación de la adsorción de cobre de las bacterias aisladas de las biopelículas ambientales multiespecies y *Bacillus* sp. F1. La biosorción se realizó en columnas de 60 ml utilizando piedras de acuario como material de relleno. —■— bacteria aislada de B1 (río Mapocho/MM), —▲— *Bacillus* sp. F1, —●— bacteria aislada B3 (Lodos/MM), —○— bacteria aislada de B5 (Lodos/AS), —▽— asociación bacteria y levadura aislada de B5 (Lodos/AS).

En la Figura 11 se grafica la capacidad de biosorción medida en cada una de las bacterias aisladas de las biopelículas ambientales multiespecies y se compara a la capacidad de biosorción obtenida por *Bacillus* sp. F1. De esta forma, se observa que la biopelícula B1 cultivada con medio mínimo adsorbe menos cobre que *Bacillus* sp. F1 mientras que la bacteria aislada de B3 y B5 cultivadas con medio mínimo presentan un nivel de biosorción semejante a *Bacillus* sp. F1. Si bien la bacteria aislada de B5 tiene diferencias estadísticamente significativas con *Bacillus* sp. F1, estas no se manifiestan

en el balance de masas (Figura 12).

Por otro lado, si se compara la biosorción de cobre entre la asociación de la bacteria aislada de biopelícula B5 con una levadura y *Bacillus* sp. F1, se observa que las curvas de biosorción presentan diferencias estadísticamente significativas (al nivel del 5%, por análisis de contraste de medias), donde la asociación de bacteria y levadura es la que presenta mejor rendimiento en la captación de cobre.

En la Figura 12 se muestra el balance de masas, adsorción de cobre versus desorción, para cada una de las bacterias aisladas de las biopelículas multiespecies y para *Bacillus* sp. F1.

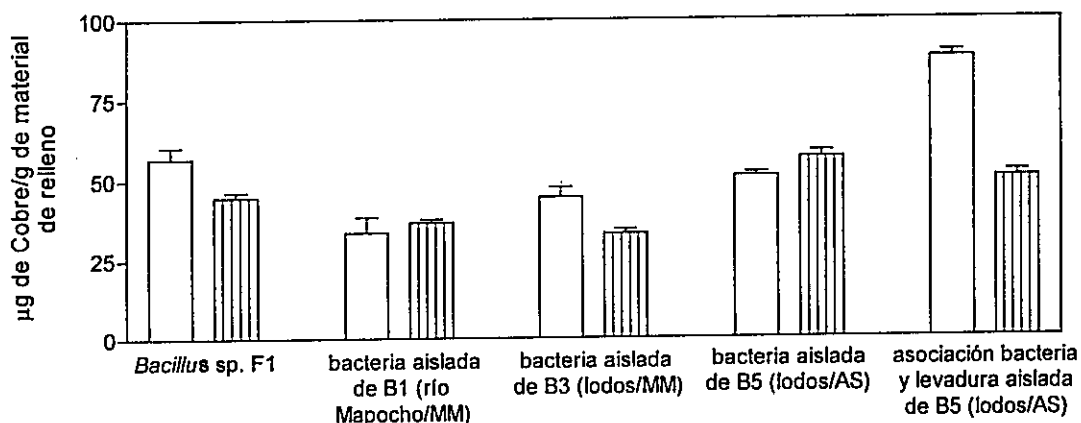




Figura 12: Adsorción v/s desorción de cobre por las bacterias aisladas de las biopelículas ambientales multiespecies y *Bacillus* sp. F1. La cantidad de cobre adsorbido y desorbido se expresa en microgramos para cada una de las biopelículas evaluadas. Los experimentos se realizaron en triplicados. Las barras representan la desviación estándar.  cobre adsorbido,  cobre desorbido.

En la Figura 12, si se compara *Bacillus* sp. F1 y la bacteria aislada de B1, se puede establecer que el porcentaje de cobre adsorbido por la biopelícula de la bacteria aislada corresponde a un 59% de lo captado por *Bacillus* sp. F1. Las diferencias

observadas son significativas y por lo tanto, *Bacillus* sp. F1 es más eficiente en la captación de cobre que la bacteria aislada.

Considerando los niveles de desorción alcanzados por *Bacillus* sp. F1 y la bacteria aislada de B1, se observa que esta última posee un 100% de desorción (al nivel del 5%, por análisis de contraste de medias) mientras que la biopelícula de *Bacillus* sp. F1 alcanza un 79%, es decir, que de la cantidad total de cobre captado sólo un 79% del cobre puede ser desorbido por tratamiento con solución de HCl.

Si se compara entre bacteria aislada de B3 y *Bacillus* sp. F1, no se observa una diferencia estadísticamente significativa en la cantidad de cobre biosorbido (al nivel del 5%, por análisis de contraste de medias). Con relación a la cantidad de cobre eluído, se observa que desde la bacteria aislada se recupera un 73% del cobre inicialmente adsorbido, por lo que existe una diferencia estadísticamente significativa con *Bacillus* sp. F1 (al nivel del 5%, por análisis de contraste de medias). No obstante, la diferencia observada es pequeña por lo que se puede sugerir que ambas biopelículas se comportan de forma similar en el proceso de desorción.

Con respecto a la bacteria aislada de B5 cultivada con medio Allison y Sutherland, no se observan diferencias estadísticamente significativas (al nivel del 5%, por análisis de contraste de medias) entre la cantidad de cobre adsorbido y eluído, por lo que es posible recuperar todo el cobre adsorbido por la biopelícula. Si se compara la cantidad de cobre adsorbido entre esta bacteria y *Bacillus* sp. F1, de igual modo, no se observan diferencias que sean estadísticamente significativas (al nivel del 5%, por análisis de contraste de medias). En cambio, la cantidad de cobre recuperado desde la bacteria aislada de B5 es aproximadamente un 20% más que lo desorbido desde *Bacillus* sp. F1.

Si se observa la captación de cobre por la asociación de la bacteria y la levadura aisladas de la biopelícula B5, esta presenta una diferencia significativa en comparación a la bacteria aislada de B5 y de *Bacillus* sp. F1 (al nivel del 5%, por análisis de contraste de medias). La cantidad de cobre captado por la asociación de la bacteria y la levadura aisladas de B5 corresponde a un 26% y 37% más que lo captado por *Bacillus* sp. F1 y por la bacteria aislada de B5, respectivamente. Por otra parte, se observa que la cantidad de cobre recuperado desde la asociación de la bacteria y la levadura aisladas de B5, es un 58% de lo captado, mientras que de la bacteria aislada de B5 se recupera un 100% del cobre captado. Estas diferencias son significativas (al nivel del 5%, por análisis de contraste de medias) y demuestran que el nivel de reversibilidad de la asociación de la bacteria y la levadura es menor que el de la bacteria aislada y *Bacillus* sp. F1.

3.4 Caracterización molecular de las biopelículas ambientales multiespecies utilizando la técnica de hibridación "in situ"

Para la caracterización molecular de las biopelículas ambientales utilizadas en la biosorción, se diseñó un sistema que permitió obtener sobre la superficie de un portaobjeto, una muestra de los microorganismos constituyentes de la biopelícula generada en la columna. El sistema estaba conformado por una cámara de acrílico dispuesta horizontalmente, sobre la cual se colocó un portaobjeto. Entre la cámara y el vidrio se hizo circular el efluente de la columna. Luego, por medio de hibridación "in situ", empleando oligonucleótidos con marca fluorescente, se determinó el porcentaje de los distintos grupos filogenéticos de las bacterias presentes en las biopelículas. La técnica de hibridación se aplicó según lo propuesto por González (2003).

La efectividad de las sondas y su especificidad se controlaron por estudios previos, utilizando cultivos de laboratorio con cepas debidamente identificadas y catalogadas (González, 2003). Las cepas bacterianas usadas para la estandarización del proceso se describen en la Tabla 6.

Tabla 6: Cepas bacterianas utilizadas para controlar la especificidad de las sondas empleadas para la hibridación "in situ". Recuadro extraído de "Utilización de la hibridación "in situ" en la identificación y recuento específico de la flora bacteriana adherente a vidrio del Salar de Coposa (I región)". González, 2003.

Especie	Código	Grupo
<i>Azospirillum brasilense</i>	NRRL B-14647	Alfa
<i>Zooglea ramigera</i>	NRRL B-3033	Beta
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NRRL B-23	Gama
<i>Escherichia coli</i>	NRRL B-766	Gama
<i>Cytophaga johnsonae</i>	NRRL B-14733	Cytophaga-Flavobacterium
<i>Bacillus subtilis</i>	NRL-NRS-744	Gram(+) (control negativo)

La Figura 13 muestra las imágenes de las biopelículas ambientales utilizadas en este estudio, captadas mediante microscopía de epifluorescencia. Las biopelículas se visualizaron por medio de la tinción DAPI y por las sondas unidas al fluoróforo Cy3, específicas para los diferentes grupos bacterianos.

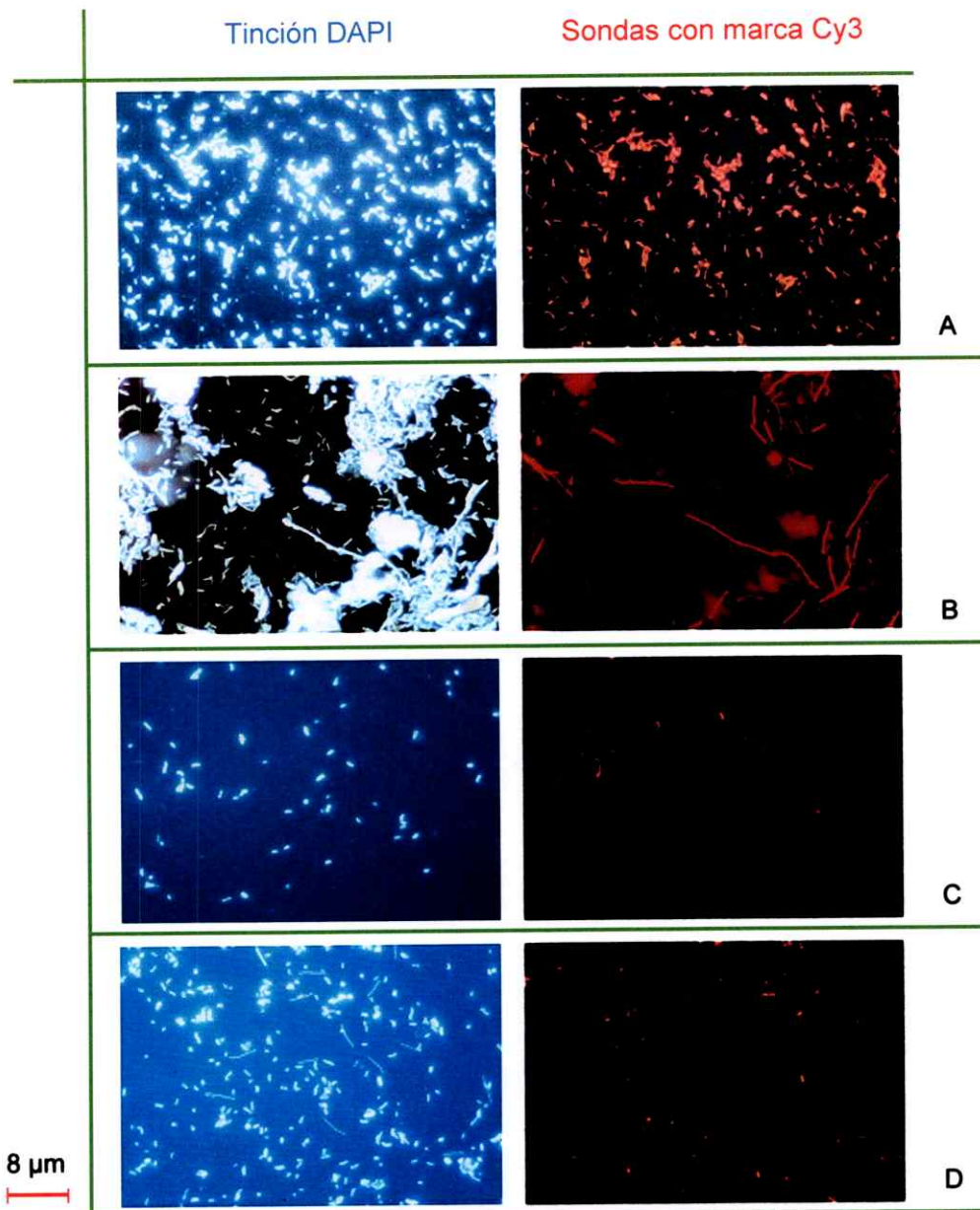


Figura 13: Hibridación "in situ" de las biopelículas ambientales multiespecies presentes en las columnas de biosorción. Comparación del mismo campo microscópico utilizando filtro Carl Zeiss N° 02 para tinción DAPI (en blanco) y N° 20 para sondas de oligonucleótidos marcadas con Cy3 (en rojo). Para la hibridación, las biopelículas se fijaron sobre portaobjetos de vidrio. **A.** biopelícula B4 (agua potable) teñida con DAPI e hibridada con prueba específica para el dominio Bacteria (EUB338). **B.** biopelícula B1 (río Mapocho) teñida con DAPI e hibridada con prueba específica grupo de las α -Proteobacterias (ALF1b). **C.** biopelícula B4 (agua potable) teñida con DAPI e hibridada con prueba específica grupo β -Proteobacteria (BET42a). **D.** biopelícula B1 (río Mapocho) teñida con DAPI e hibridada con prueba específica para el grupo γ -Proteobacteria. Las imágenes captadas corresponden a las biopelículas alimentadas con medio complejo.

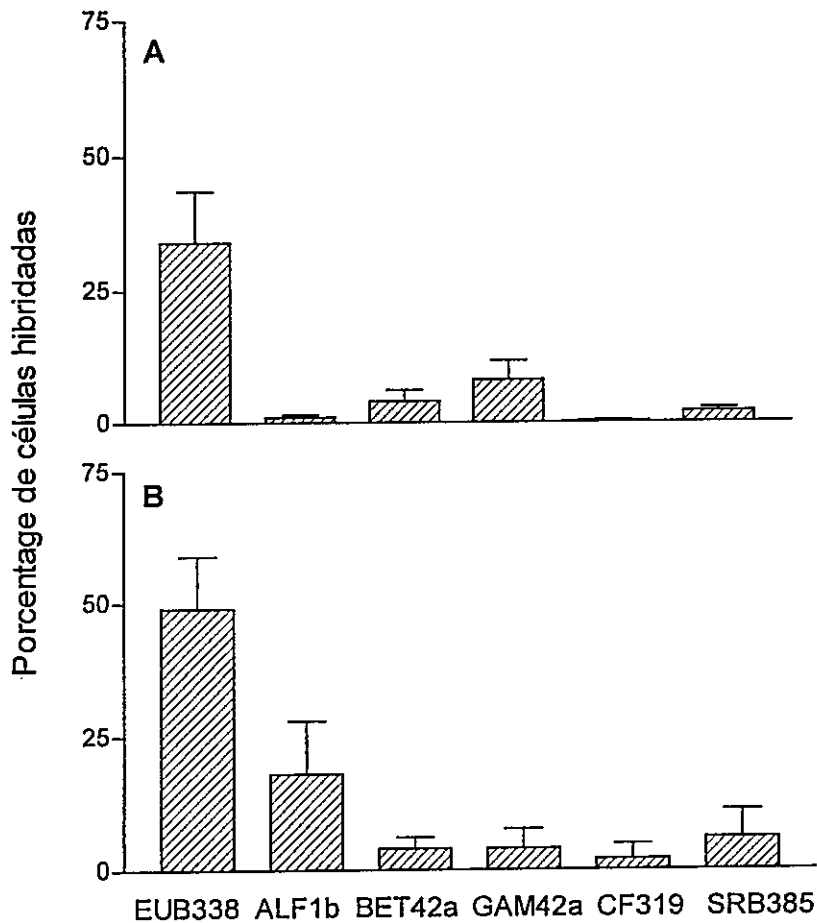


Figura 14: Abundancia relativa de los distintos grupos filogenéticos en las biopelículas ambientales multiespecies cultivadas con medio complejo y medio mínimo. (A) Recuento celular por hibridación "in situ" de la biopelícula B1 (río Mapocho) cultivada con medio complejo y (B) biopelícula B1 (río Mapocho) cultivada con medio mínimo.

En la Figura 14 se grafican los porcentajes del recuento de las células hibridadas con las distintas sondas en las biopelículas multiespecies B1 cultivada con medio complejo y B1 cultivadas con medio mínimo, es decir, se comparan biopelículas formadas a partir de un mismo inóculo inicial pero cultivadas con medios distintos. Cada una de ellas, presentan un perfil de abundancia único, lo que implica que el medio de cultivo influye en la composición de la comunidad bacteriana. Así por

ejemplo, se observa que en la Figura 14A, existe un 34% del total de las células que hibrida con la sonda EUB338, un 8% con la sonda GAM42a, representando a el grupo más abundante en esta biopelícula, mientras que con la sonda CF319a sólo se identificó un 0,2% del total. Por otro lado, en la Figura 14B, se observa que en la biopelícula B1 cultivada con medio mínimo hay un 49% del total de las células que hibrida con la sonda EUB338, un 18% con la sonda ALF1b, que corresponde al grupo más abundante, mientras que con la sonda CF319a sólo se identificó un 2% del total.

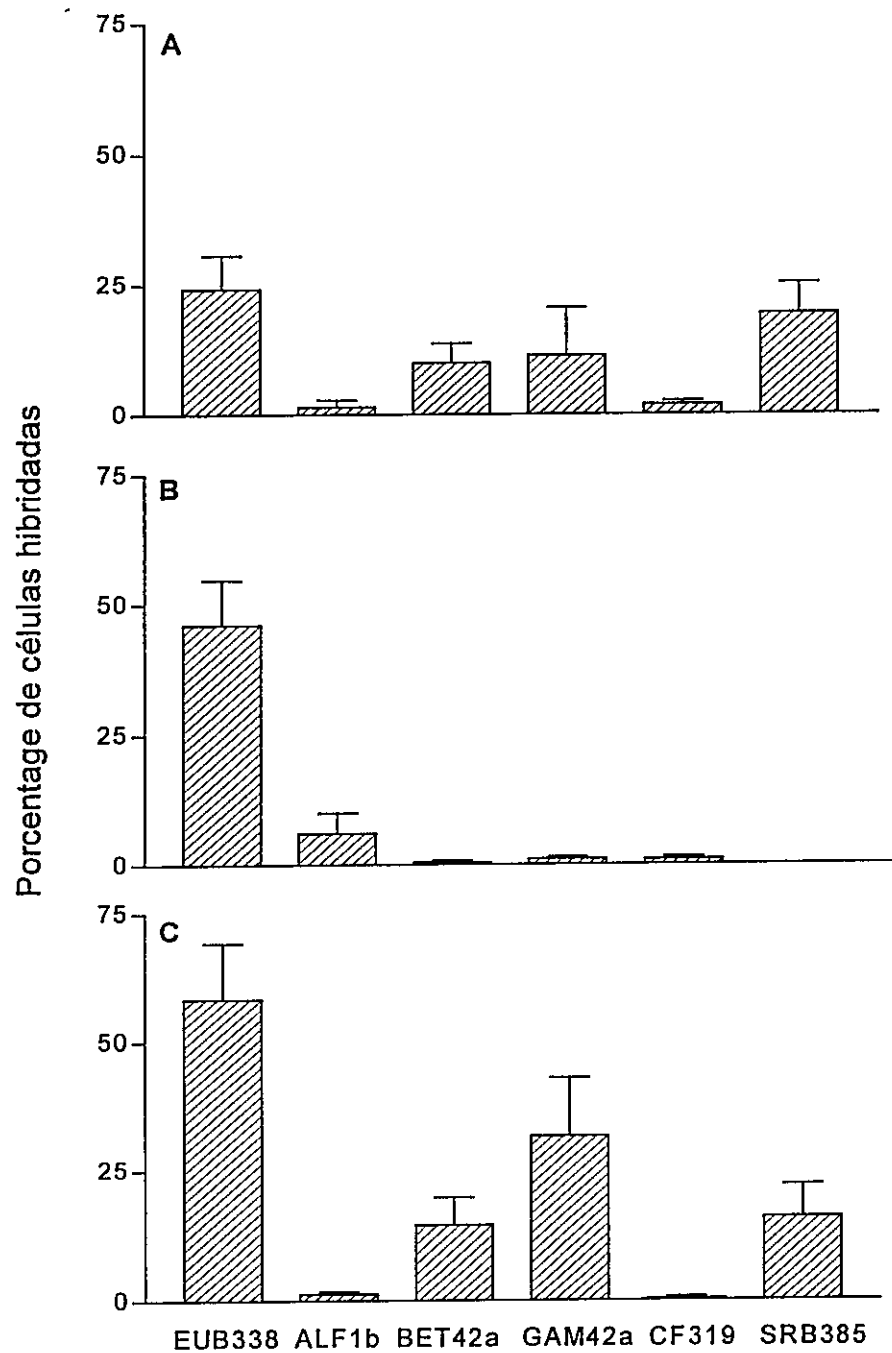


Figura 15: Abundancia relativa de los distintos grupos filogenéticos en las biopelículas ambientales multiespecies cultivadas con medio complejo. (A) Recuento celular por hibridación "in situ" de la biopelícula B2 (fte. pública), (B) biopelícula B3 (lodos) y (C) biopelícula B4 (agua potable) cultivadas con medio complejo.

En la Figura 15 se observa el recuento celular obtenidos para la biopelícula B2, B3 y B4, cultivadas con medio complejo. En la Figura 15A se grafica el porcentaje de células hibridadas con cada una de las sondas en la biopelícula B2 cultivada con medio complejo. La sonda EUB338 hibrida con un 24% del total de las células, la sonda SRB385 con un 19%, que corresponde al grupo más abundante, y la sonda ALF1b con un 1%, siendo el porcentaje más bajo obtenido. En la Figura 15B se observa el recuento de las células hibridadas en la biopelícula B3 cultivada con medio complejo. La sonda EUB338 hibrida con un 46% del total de las células presentes en la biopelícula, la sonda ALF1b con un 6% de células, que corresponde al porcentaje más alto para B3, y la sonda CF319a con un 1%, siendo el porcentaje más bajo. No se observaron células que hibridaran con la sonda SRB385. En la Figura 15C, para la biopelícula B4 se observa que la sonda EUB338 reconoce un 58% de las células, GAM42a presenta el porcentaje más alto, con un 32% de células hibridadas, mientras el porcentaje menor corresponde a la sonda CF319a, con un 0,4%.

Las biopelículas analizadas, corresponden a aquellas cultivadas con medio complejo. Como se puede observar, el porcentaje de células hibridadas con una sonda específica varía de una biopelícula a otra, por lo que son diferentes en cuanto a la composición de microorganismos.

En las biopelículas alimentadas con medio mínimo se observó menor adherencia a la superficie del portaobjeto en comparación a las biopelículas alimentadas con medio complejo, considerando que se utilizó el mismo tiempo de exposición, e igual velocidad de flujo para la formación de la biopelícula sobre la superficie del portaobjeto.

A continuación se muestra una tabla comparativa donde se pueden observar los porcentajes obtenidos para cada grupo filogenético correspondiente a las biopelículas alimentadas con medio complejo y con medio mínimo.

Tabla 7: Porcentaje de abundancia de cada uno de los grupos filogenéticos analizados en las biopelículas ambientales multiespecies cultivadas con medio complejo y con medio mínimo.

		EUB338	ALF1B	BET42a	GAM42a	CF319a	SRB385
Medio complejo	B1: río Mapocho	34 %	1 %	4 %	8 %	0.2 %	2 %
	B2: fte. pública	24 %	1 %	10 %	11 %	2 %	19 %
	B3: lodos	46 %	6 %	0.5 %	1 %	1 %	-
	B4: agua potable	58 %	1 %	14 %	32 %	0.4 %	16 %
Medio mínimo	B1: río Mapocho	49 %	18 %	4 %	4 %	2 %	6 %
	B2: fte. pública	30 %	-	15 %	15 %	-	-
	B3: lodos	15 %	-	5 %	15 %	-	-
	B4: agua potable	14 %	7 %	12 %	7 %	-	-

En la Tabla 7 se observa que el porcentaje de organismos pertenecientes al grupo Bacteria, identificado por la sonda EUB338, varía entre un 14% y un 58% para la biopelícula B4, cultivada con medio complejo y medio mínimo respectivamente. El porcentaje más alto encontrado para la sonda EUB338 representa aproximadamente a dos tercios de la población, lo que implica que un tercio no se puede identificar como bacteria. Estos resultados podrían indicar la presencia de organismos del grupo Archaea. Sin embargo, en este estudio no se contaba con una sonda específica para este grupo.

Cabe destacar, además, que los porcentajes más bajos para el grupo bacteria se concentran en las biopelículas cultivadas con medio mínimo, lo cual a su vez podría tener relación con la sensibilidad de detección de la técnica. Posiblemente, dado las

condiciones del medio de cultivo, los microorganismos cultivados con el medio mínimo presenten una tasa de crecimiento menor al de las biopelículas cultivadas con medio complejo y que, por lo tanto su contenido ribosomal sea menor (Christensen y col., 1999). Lo anterior, podría generar una señal de fluorescencia débil lo que disminuiría la sensibilidad del método. Por otra parte, también se puede pensar que el alto porcentaje de organismos no identificados tenga relación con el conjunto de sondas empleadas, las cuales pueden no ser suficientes para dar cuenta de la complejidad de estas biopelículas.

En lo que respecta a las subclases analizadas, la mayor densidad de organismos identificados se concentran dentro de la clase de las Proteobacteria, lo que es esperable si consideramos que todas las Proteobacterias son bacterias Gram negativas y que en las biopelículas analizadas en esta investigación sólo se encontraron bacterias Gram negativas. Ahora bien, dentro de las Proteobacterias, las subclases más representativas corresponden a las β y γ de proteobacteria, mientras que la menor población identificada corresponde a organismos del grupo Cytophaga-Flavobacterium y a la subclase δ de proteobacteria. Dado que la mayoría de los inóculos se obtuvieron a partir de fuentes de aguas urbanas, lo más probable era encontrar organismos del grupo Enterobacteriaceae los cuales a su vez, se agrupan dentro de la subclase de las γ -proteobacteria. Con respecto a la clase de las β proteobacteria, éstas bacterias han sido identificadas en varios hábitat acuáticos (Brümmer y col., 2003), por lo que tampoco sorprende que sean de los grupos más representativos en nuestras muestras.

En lo que respecta a las biopelículas cultivadas con medio mínimo se observó una menor diversidad de grupos filogenéticos y en general, sólo se advirtió un grupo

mayoritario. Esto puede tener relación con una baja representatividad de miembros de los otros grupos filogenéticos dentro de la biopelícula y que, en consecuencia, queden bajo el nivel de detección de la técnica.

4. DISCUSIÓN

En este estudio, los microorganismos evaluados presentaron tanto la capacidad natural de adherirse a superficies, formando una biopelícula, como la propiedad de unir iones metálicos, particularmente cobre, a partir de soluciones diluidas.

Si bien se ha comprobado el alto potencial de biosorción de distintos organismos presentes en la naturaleza, existe una serie de parámetros que deben considerarse a la hora de establecer un proceso de biosorción con fines comerciales.

Entre estos parámetros el medio de cultivo puede llegar a ser relevante al momento de determinar costos de operación. Los diferentes estudios realizados en esta materia utilizan preferentemente medios de cultivo enriquecidos de modo de asegurar un óptimo crecimiento del microorganismo lo que se traduce a su vez en una gran cantidad de biomasa. No obstante, en este estudio se probaron dos tipos de medio de cultivo: uno enriquecido, denominado medio complejo el cual corresponde a un medio Allison y Sutherland modificado por Ballesteros (2005) y un medio mínimo constituido principalmente por sales. Contrario a lo que se podía esperar, los mejores niveles de captación de cobre se obtuvieron al crecer las biopelículas con el medio de cultivo mínimo, siendo estas diferencias independientes de la composición de los microorganismos en las biopelículas.

Es importante considerar y recordar que los medios de cultivo utilizados en este estudio se diferencian principalmente en el aporte de carbono y en la fuente de nitrógeno utilizada. La influencia de la limitación de nutrientes sobre la adherencia bacteriana a superficies a sido ampliamente estudiada (Allan y col., 2002; Brown y col., 1977; Cowell y col., 1999; Meier y col., 1989), observándose que tanto la composición de las bacterias en la biopelícula así como su habilidad para adherirse a superficies se

ve afectada según la relación carbono/nitrógeno utilizada en el medio de cultivo. En general, se ha observado que condiciones limitantes de carbono promueven la adhesión a superficies, mientras que la razón carbono/nitrógeno del medio puede afectar la composición de especies y la razón polisacáridos/proteínas de la biopelícula. En este estudio, si bien se utilizó igual concentración de glucosa en ambos tipos de medios, el aporte de carbono en el medio complejo es mayor que en el medio mínimo dado que existe un aporte adicional de carbono dado por las proteínas presentes en el agua colada de maíz. Considerando lo anterior se puede sugerir que la limitación de carbono presente en el medio mínimo promovería una mayor adherencia de bacterias a la superficie de las piedras de acuario, y que, por consiguiente, existiría una mayor cantidad de biomasa comprometida.

Al mismo tiempo y dado que los polisacáridos de la pared celular están directamente relacionados a la captación de iones metálicos en solución (Kotrba y col., 1999), las modificaciones en la pared celular pueden alterar el potencial de biosorción (Gadd, 2000; Gupta y col., 2000; Lins y col., 2001; Breierová y col., 2002). Según un estudio realizado por Meer y Tempest (1970), la pared de las bacterias analizadas, *Bacillus subtilis* var. *niger* y *Aerobacter aerogenes*, cambiaba marcadamente en respuesta a cambios en el ambiente en el cual ellas eran crecidas y que en particular, el incremento de la afinidad por ión magnesio se correlacionaba con un aumento en el contenido de ácido teicoico en la pared celular. De igual forma, en un estudio realizado por Emtiazi y col. (2004), se observó que la producción de exopolisacáridos de distintas cepas de *Azotobacter* variaba según la concentración de glucosa utilizada. En consecuencia se puede sugerir una correlación entre el medio de cultivo utilizado en este estudio y la producción de determinados componentes de la pared los cuales aporten a su vez con una mayor presencia de grupos reactivos al ión cobre o bien, que

el medio sea el óptimo para obtener un máximo de producción de exopolisacáridos (Cotoras y col., 1992).

En nuestro estudio, ambas relaciones pueden considerarse y complementarse, es decir, que factores como la adhesión, la cantidad de biomasa comprometida y la afinidad de los sitios de unión pueden explicar las diferencias observadas entre los distintos medios de cultivo utilizados.

Un segundo factor que influye en la factibilidad comercial del proceso de biosorción es el tipo de biosorbente que se ha de utilizar (Atkinson y col., 1998). Dentro de los distintos aspectos considerados en este estudio, podemos mencionar el tipo de biosorbente, la fuente de obtención del biosorbente y sus requerimientos nutricionales.

Dentro de los biosorbentes, distintos tipos de biomasa microbiana han sido investigados durante los últimos años, entre los que podemos mencionar bacterias (Hussein y col., 2004; Ilhan y col., 2004; da Costa y Pereira, 2001; Kotrba y col., 1999), levaduras (Breierová y col., 2002); hongos (Tsekova y Petrov, 2002; Kogej y Pavko, 2001; Filipović-Kovačević y col., 2000; Mameri y col., 1999; Prakasham y col., 1999) y flora algal marina y de agua fresca (Antunes y col., 2003; Cossich y col., 2002). También han sido reportados estudios de poblaciones microbianas heterogéneas usando lodos activados (Atkinson y col., 1998). En general, la captación está relacionada con la composición de exopolisacáridos de cada organismo particular, y es altamente variable entre distintos géneros y entre cepas de una misma especie (da Costa y col., 2001). Por lo tanto, la elección de la biomasa dependerá finalmente del metal que se desee captar y del proceso que se implemente para la biosorción.

Particularmente, a través de la caracterización bioquímica y molecular de las biopelículas se constató que éstas estaban constituidas por bacterias y levaduras. Es

por ello que los estudios de biosorción se centraron en estos organismos, principalmente bacterias.

Entre las bacterias se ha observado que, en general, las bacterias Gram positivas acumulan una mayor cantidad de metales pesados que las bacterias Gram negativas, entre ellas *Bacillus* sp. ha sido reconocido por tener un alto potencial de biosorción (Hussein y col., 2004; Ilhan y col., 2004; da Costa y Pereira, 2001). La diferencia radicaría fundamentalmente en la composición de la pared celular dado que las bacterias Gram negativas poseen una pared celular más delgada que la de las bacterias Gram positivas conteniendo en consecuencia menos peptidoglican, el cual es reconocido como uno de los principales responsables implicados en la captación de metales (Gupta y col., 2000; Langley y Beveridge, 1999). No obstante, existen otros componentes en la pared celular, como el ácido teicoico, en bacterias Gram positivas y LPS en bacterias Gram negativas, junto con componentes extracelulares, como los polímeros extracelulares, que también actúan como sitios de unión de metales (Langley y Beveridge, 1999; Cotoras y col., 1992). Además la capacidad de biosorción de un organismo varía según el metal que se esté captando e incluso se ha observado que organismos Gram negativos han presentado mejores niveles de biosorción, para un determinado metal, que organismos Gram positivos (Hussein y col., 2004).

En lo que respecta a este estudio, las biopelículas analizadas como biosorbentes, estaban constituidas únicamente por bacterias Gram negativas y según observamos, sólo algunas de las biopelículas investigadas tenían un nivel de captación de cobre notoriamente por debajo de lo captado por una biopelícula de *Bacillus* sp. F1, probada bajo las mismas condiciones experimentales, mientras que la gran mayoría captaba cobre tan eficientemente como *Bacillus* sp. F1. Esto nos lleva a pensar que al menos en nuestra investigación las diferencias celulares estructurales entre grupos

bacterianos no determinan la eficiencia de biosorción y que existen otros factores, mas bien factores ambientales (pH, temperatura, medio de cultivo, etc.), que de cierta forma gobiernan el proceso.

Además, cabe destacar que las condiciones establecidas para la formación de las biopelículas ambientales en las columnas de biosorción no eran las mismas que para la biopelícula de *Bacillus* sp. F1. La diferencia fundamental entre las biopelículas ambientales analizadas y la biopelícula de *Bacillus* sp. F1 es la temperatura utilizada para su crecimiento. Mientras que la temperatura óptima para obtener un máximo de biomasa de *Bacillus* sp. F1 es conocida y corresponde a temperatura constante de 28°C, las biopelículas ambientales se crecieron a temperatura ambiente. Es por ello que podemos pensar que las biopelículas ambientales al contar con un medio óptimo de crecimiento puedan ser capaces de captar más cobre e incluso llegar a superar a *Bacillus* sp. F1.

Sólo con una de las biopelículas investigadas, una asociación de bacteria con levadura, denominada biopelícula 5, se obtuvo un nivel de adsorción de cobre significativamente superior que el observado para *Bacillus* sp. F1. La bacteria por sí sola no era capaz de biosorber la misma cantidad de cobre que la biopelícula 5, mientras que de la levadura no podemos especular ya que no se pudo aislar en cultivo puro. Al parecer, la levadura sería la responsable del alto nivel de adsorción obtenido, no obstante, también influiría en el bajo nivel de reversibilidad observado para la asociación, dado que todo lo adsorbido por la levadura quedaría retenido en la matriz, siendo imposible de recuperar por tratamiento con solución ácida.

Quizás el bajo nivel de desorción esté asociado con un bajo nivel de reversibilidad de la matriz extracelular de la levadura, muy similar a lo observado para ciertos metales pesados en estudios de intercambio iónico con zeolitas naturales

(Rodríguez y Rodríguez, 1998). No obstante este resultado resulta de gran interés dado que la gran mayoría de los estudios realizados con levaduras, específicamente con *Saccharomyces cerevisiae*, sólo reportan niveles moderados de biosorción (Vieira y Volesky, 2000).

Dentro de los distintos tipos investigados, queda de manifiesto que existe una gran cantidad de materiales biológicos disponibles en la naturaleza que pueden ser ocupados en procesos de biorremediación, de hecho en todos los estudios citados existe un elevado nivel de biosorción y prácticamente en todos los casos la captación de metales supera lo observado para las resinas comerciales (Kratochvil y Volesky, 1998). Es por ello que no es sorprendente que todas las bacterias investigadas en este trabajo hayan presentado captación de metal. No obstante, se observan diferencias entre las distintas cepas bacterianas, siendo algunas más eficientes que otras. Lo interesante de nuestros resultados es haber obtenido bacterias eficientes en la captación de cobre, semejante o superior a lo observado con *Bacillus* sp. F1, y que, complementariamente, sean capaces de crecer bajo requerimientos de cultivo mínimos y de adherirse a superficies formando una biopelícula, lo que ciertamente genera una ventaja comparativa en cuanto a costos de operación.

Dentro de los aspectos considerados en la elección del biosorbente, la inmovilización es otro factor importante si se desea la aplicación industrial del proceso. La inmovilización del biosorbente permite la separación sólido/líquido (Beolchini y col., 2003). Se estima que el atrapamiento celular es necesario dado que imparte fuerza mecánica y resistencia frente a la degradación. Por otra parte, las células libres no son apropiadas para su uso en columnas debido a su baja densidad y tamaño pequeño lo que produce taponamiento del lecho generando grandes caídas de presión (Atkinson y col., 1998). En otro ámbito se han investigado diferentes soportes sólidos para la

inmovilización de la biomasa, ellos incluyen alginato, poliacrilamida, polisulfona, silica gel, celulosa y gluteraldehído. Todos estos materiales tienen un costo asociado y en algunos casos puede existir cierta reactividad con los metales, lo que debe ser evaluado previo a su utilización como soportes de la biomasa microbiana. Es por ello que en la presente investigación se destacan aspectos como:

i) La adherencia natural del biosorbente. Estudios realizados sobre la adherencia bacteriana de *Bacillus* sp. F1 (Castro, 1998) ya advertían de lo eficiente de contar con una cepa bacteriana que además de captar iones metálicos presentara la capacidad natural de adherirse a superficies formando una biopelícula. Es por ello, que la selección de microorganismos en este estudio consideró sólo aquellos organismos con la capacidad de formar una biopelícula.

ii) Material de inmovilización del biosorbente. También se hizo mención sobre el costo de los soportes sólidos y de la captación de metales por alguno de ellos. Aquí se evaluaron tres tipos de soportes los cuales incluían material de vidrio y piedras de acuario. Las piedras de acuario presentan la ventaja de tener menor costo que el vidrio (el vidrio tiene un costo aproximado 36 veces mayor que las piedras de acuario). Los estudios preliminares de biosorción utilizando sólo el soporte, es decir sin biomasa, mostraron que las piedras de acuario eran el material más inerte en cuanto a captación de metales. Estos datos son relevantes dado que se cuenta con un soporte barato, inerte y sobre el cual se desarrolla muy bien la biopelícula, todo esto pensado en su posible aplicación comercial.

Hasta aquí nos hemos centrado en discutir el potencial de biosorción de los microorganismos seleccionados por esta investigación, sin embargo, el objetivo de este estudio también comprometía la caracterización molecular de las biopelículas obtenidas. La técnica de hibridación "in situ" se utilizó con el fin de analizar la

composición de microorganismos de las biopelículas empleadas en el proceso de biosorción. Si bien es posible una caracterización parcial de las biopelículas, existen varios factores que deben considerarse antes de establecer una conclusión final.

En primera instancia debemos destacar el bajo porcentaje de células detectadas por la sonda EUB338 (dominio bacteria), el cual corresponde a alrededor de un 60% para las biopelículas alimentadas con medio complejo y aproximadamente un 40% para las biopelículas alimentadas con medio mínimo. En relación a lo anterior, existe la posibilidad de que organismos del dominio Archaea puedan estar implicados, en cuanto no se utilizó una sonda específica para evaluar a este dominio y dado que su presencia ha sido ratificada en diferentes ambientes sin estar restringida necesariamente a ambientes extremos como comúnmente se pensaba (Battin y col., 2001).

Otro factor que puede estar influyendo en la baja detección por parte de las sondas utilizadas en este estudio, es el número de ribosomas presentes en la célula al momento de llevar a cabo la hibridación, lo cual tiene directa relación con la sensibilidad de la técnica. Dado que la sonda se une directamente al RNA ribosomal, mientras más ribosomas hayan en las células, mayor será la intensidad de fluorescencia emitida por la sonda. El contenido de rRNA se asocia comúnmente con la actividad metabólica y fisiológica de la célula (Kenzaka y col., 2001) y se ha observado que el estrés nutritivo o ambiental (pH, temperatura, etc) merma el contenido ribosomal (Christensen y col., 1999). Por consiguiente, el alto porcentaje de células no detectadas por la sonda EUB338 puede estar relacionado al bajo contenido ribosomal de los microorganismos de nuestras biopelículas, debido principalmente a que las biopelículas estaban sometidas a constantes cambios de temperatura ambiental y posiblemente del pH del medio. Lo anterior queda de manifiesto si consideramos que

las biopelículas alimentadas con el medio mínimo, pobre en nutrientes, son las que presentaron los porcentajes más bajos de detección con la sonda EUB338.

Por otra parte, es necesario considerar que la técnica posee un límite de detección de $2,8 \times 10^5$ células/ml (Bruns y Berthe-Corti, 1998). De este modo, se puede establecer una relación entre el número de bacterias presentes en el efluente de las columnas y el número de células que se adhieren a la superficie del portaobjeto, considerando que el límite de detección por área examinada corresponde a 1×10^4 células/cm². Si el número de bacterias en el efluente es bajo, lo que sería particularmente cierto para las bacterias cultivadas con medio mínimo, es posible que el número de bacterias por superficie quede bajo el rango de detección de la técnica y que, por lo tanto, algunos de los grupos filogenéticos investigados no se encuentren representados en la población.

El tamaño celular es otro factor que puede estar influyendo en el bajo porcentaje de células detectadas. Al respecto, en nuestras tinciones se observaron células muy pequeñas y delgadas las cuales presentaban una débil fluorescencia con la tinción DAPI. Considerando que la fluorescencia emitida por DAPI es más intensa que la emitida por la marca Cy3, es probable que de existir hibridación de estas células, su fluorescencia haya quedado bajo el rango de detección del ojo humano o bien se haya perdido en el "background". Además se debe considerar en este punto el fenómeno ampliamente observado de apagamiento de la fluorescencia o "bleaching" (Pernthaler y col., 2002) el cual claramente se hace crítico para células con baja fluorescencia y utilizando métodos manuales de cuantificación.

Otro factor a considerar y no menos importante es la universalidad de la sonda EUB338. Actualmente está demostrado que el término no es del todo adecuado dado que se ha encontrado que la sonda no es capaz de reconocer a todos los miembros del

dominio bacteria. Nos referimos específicamente a miembros del orden de los *Planctomicetes* (Neef y col., 1998). Esta limitación no es exclusiva de la sonda EUB338 (Dang y Lovell, 2002; Yeates y col., 2003) y el problema esta en concordancia con la información de secuencias disponibles. Esto constituye sin duda una restricción y evidencia la necesidad de contar con un gran número de sondas específicas si se desea realizar una caracterización más detallada (Ravenschlag y col., 2001).

Una limitante a la hora de implementar la técnica y sin duda una gran dificultad para el análisis de las muestras es la alta heterogeneidad encontrada en la distribución de las bacterias sobre la superficie del portaobjeto lo que derivó necesariamente en altas desviaciones estándares aún cuando se utilizó un número muestral razonable (n=20). No obstante las desviaciones obtenidas en esta investigación se asemejan a las desviaciones típicas observadas en muestras ambientales de superficies sumergidas (Dang y Lovell, 2002) y biopelículas no intervenidas (Manz y col., 1992).

Considerando los resultados obtenidos con la técnica de hibridación "in situ" es posible establecer algunas relaciones con los datos de biosorción recopilados en esta investigación, específicamente para dos de las biopelículas analizadas, biopelícula B1: río Mapocho y biopelícula B3: lodos, cultivadas con medio mínimo.

En primer lugar y de acuerdo a la caracterización molecular se estableció que el grupo bacteriano mayoritario de la biopelícula B3: lodos corresponde al grupo de las γ -proteobacterias, mientras que en la biopelícula B1: río Mapocho corresponde a las α -proteobacterias. En relación al potencial de biosorción, la biopelícula B3 posee mayor captación de cobre que la biopelícula B1.

En segundo lugar, en lo que se refiere a la adherencia natural a superficies de ciertos microorganismos, las γ -proteobacterias son reconocidas como colonizadores

primarios y dentro de las α -proteobacterias también es posible encontrar miembros con esta cualidad. Complementariamente, la formación de biopelículas sobre superficies sólidas esta mediada por exopolisacáridos presentes en la pared celular de las bacterias. A su vez, la biosorción es mediada por grupos químicos presentes en los polímeros extracelulares de la pared de las bacterias.

En tercer lugar, podemos mencionar que dentro del grupo de las γ -proteobacterias se encuentran bacterias previamente caracterizadas en estudios de biosorción, entre las que podemos mencionar *Pseudomonas* y *E. coli*.

Sobre la base de estos antecedentes, podemos decir que en cuanto a las condiciones experimentales establecidas en esta investigación la alta presencia del grupo γ -proteobacterias en la biopelícula B3: lodos se correlaciona con altos niveles de biosorción y que podría explicar las diferencias observadas con la biopelícula B1: río Mapocho.

También es importante destacar que si bien las biopelículas presentaron diferencias en cuanto a la composición bacteriana, los niveles de captación de cobre resultaron ser muy similares entre sí. Esto indicaría que la gran mayoría de los organismos examinados poseen la capacidad de ser potenciales biosorbentes y que optimizando tanto las condiciones de cultivo así como las condiciones en las cuales se desarrolla el proceso de biosorción es posible implementar un eficiente sistema de biorremediación.

5. CONCLUSIONES

- En cada una de las muestras ambientales seleccionadas en este estudio fue posible encontrar microorganismos formadores de biopelículas y que presentaron a su vez, la capacidad de biosorber cobre.
- El medio de cultivo utilizado para formar las biopelículas influye en su capacidad de biosorción.
- Aquellas biopelículas cultivadas con un medio mínimo, compuesto básicamente por sales, tuvieron niveles de adsorción marcadamente superiores a los obtenidos en las mismas biopelículas pero cultivadas con medio complejo.
- Los niveles de biosorción obtenidos con las bacterias aisladas de las biopelículas ambientales multiespecies cultivadas con medio mínimo son comparables e incluso, en uno de los casos investigados, mejor que lo obtenido con la biopelícula de *Bacillus* sp. F1, usada como biosorbente referencial.
- Los niveles de desorción para todas las biopelículas investigadas estuvieron dentro de los límites esperados, indicando entre un 90% y 100% de reversibilidad.
- La técnica de hibridación "in situ" permitió establecer diferencias en cuanto a la población bacteriana total entre las distintas biopelículas pero no pudo ser empleada para una caracterización detallada. Es necesario establecer un mejor modelo para la formación de la biopelícula sobre los portaobjetos de modo de obtener una muestra más homogénea cuyo recuento sea más factible.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Allan V., Callow M., Macaskie L., Paterson-Beedle M. 2002. Effect of nutrient limitation on biofilm formation and phosphatase activity of a *Citrobacter* sp. *Microbiology* 148: 277-288.
- Amann R., Ludwig W., Schleifer Karl-Heinz. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59 (1): 143-169.
- Antunes W., Luna A., Henriques C., daCosta A. 2003. An evaluation of copper biosorption by a brown seaweed under optimized conditions. *Electronic Journal of Biotechnology* 6 (3): 174-184.
- Atkinson B. W., Bux F., Kusan HC. 1998. Considerations for application of biosorption technology to remediate metal-contaminated industrial effluents. *Water SA* 24 (2): 129-135.
- Ballesteros C. 2005. Memoria para optar al título de Ingeniería en Biotecnología Molecular. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias. Laboratorio de Microbiología.
- Basso M. C., Cerrella E. G., Cukierman A. L. 2002. Empleo de algas marinas para la biosorción de metales pesados de aguas contaminadas. *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente* 6 (1): 69-74.
- Battin T., Wille A., Sattler B., Psenner R. 2001. Phylogenetic and functional heterogeneity of sediment biofilms along environmental gradients in a glacial stream. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (2): 799-807.
- Beolchini F., Pagnanelli F., Toro L., Vegliò F. 2003. Biosorption of copper by *Sphaerotilus natans* immobilised in polysulfone matrix: equilibrium and kinetic analysis. *Hydrometallurgy* 70: 101-112.
- Bravo B. 2005. Aislamiento y caracterización de bacterias reductoras de molibdeno. Memoria para optar al título de Bioquímico. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Laboratorio de Microbiología.
- Breierová E., Vajcziková I., Sasinková V., Stratilová E., Fišera M., Gregor T., Šajbidor J. 2002. Biosorption of cadmium ions different yeast species. *Zeitschrift für Naturforschung C-A Journal of Biosciences* 57c: 634-639.
- Brown M., Ellwood D., Hunter J. 1977. Growth of bacteria at surfaces: Influences of nutrient limitation. *FEMS Microbiology Letters* 1: 163-166.
- Brümmer I., Felske A., Wagner-Döbler I. 2003. Diversity and seasonal variability of β -proteobacteria in biofilms of polluted rivers: analysis by temperature gradient gel electrophoresis and cloning. *Applied Environmental Microbiology* 69: 4463-4473.

- Brown M., Ellwood D. C., Hunter J. R. 1977. Growth of bacteria at surfaces: Influence of nutrient limitation. *FEMS Microbiology Letters* 1: 163-166.
- Bruns A., Berthe-Corti L. 1998. In situ detection of bacteria in continuous-flow cultures of seawater sediment suspensions with fluorescently labeled rRNA-directed oligonucleotide probes. *Microbiology* 144: 2783-2790.
- Cañizares-Villanueva R. O. 2000. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 42: 131-143.
- Castro M. 1998. Adherencia bacteriana de *Bacillus* sp. F1. Memoria para optar al título de Bioquímico. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Laboratorio de Microbiología. 50 p.
- Cossich E., Granhen C., Kakuta T. 2002. Biosorption of chromium (III) by *Sargassum* sp. biomass. *Electronic Journal of Biotechnology* 5(2): 135-140.
- Cotoras D., Millar M., Viedma P., Pimentel J., Mestre A. 1992. Biosorption of metal ions by *Azotobacter vinelandii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 8: 319-323.
- Cowell B., Willcox M., Herbert B., Schneider R. 1999. Effect of nutrient limitation on adhesion characteristics of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology* 86: 944-954.
- Christensen H., Hansen M., Sørensen J. 1999. Counting and size classification of active soil bacteria by fluorescence in situ hybridization with an rRNA oligonucleotide probe. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (4): 1753-1761.
- da Costa A., Pereira F. 2001. Bioaccumulation of copper, zinc, cadmium and lead by *Bacillus* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus subtilis*. *Brazilian Journal of Microbiology* 32: 1-5.
- da Costa A., Tavares A., de França F. 2001. The release of light metals from a brown seaweed (*Sargassum* sp.) during zinc biosorption in a continuous system. *Electronic Journal of Biotechnology* 4 (3): 125-129.
- Dang H., Lovell C. 2002. Numerical dominance and phylotype diversity of marine Rhodobacter species during early colonization of submerged surfaces in coastal marine waters as determined by 16S ribosomal DNA sequence analysis and fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (2): 496-504.
- DeLong E., Taylor L., Marsh T., Preston C. 1999. Visualization and enumeration of marine planktonic archaea and bacteria by polyribonucleotide probes and fluorescent in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (12): 5554-5563.
- Eccles H. 1999. Treatment of metal-contaminated wastes: why select a biological process?. *Trends in Biotechnology* 17: 462-465.

- Elankumaran R., Raj Mohan B., Madhyastha M. N. 2003. Biosorption of Copper from Contaminated Water by *Hydrilla verticillata* Casp. and *Salvinia* sp. [en línea]. Green Pages. Disponible: www.eco-web.com/cgi-local/sfc?a=/editorial/index.html&b=/editorial/030717 [2005, Agosto 17].
- Emtiazi G., Ethemadifar Z., Habibi M. 2004. Production of extra-cellular polymer in *Azotobacter* and biosorption of metal by exopolymer. *African Journal of Biotechnology* 3 (6): 330-333.
- Filipović-Kovačević Ž., Sipos L., Briški F. 2000. Biosorption of chromium, Koper, nickel and zinc ions onto fungal pellets of *Aspergillus niger* 405 from aqueous solutions. *Food Technology and Biotechnology* 38 (3): 211-216.
- Gadd Michael Geoffrey. 1998. Bioremedial potencial of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Water SA* 24 (2): 271-279.
- González C. 2003. Utilización de la hibridación in situ en la identificación y recuento específico de la flora bacteriana adherente a vidrio del Salar de Coposa (I región). Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Laboratorio de Microbiología.
- Gupta R., Ahuja P., Khan S., Saxena R., Mohapatra H. 2000. Microbial biosorbents: Meeting challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Current Science*, 78 (8): 967-973.
- Hussein H., Ibrahim S., Kandeel K., Moawad H. 2004. Biosorption of heavy metals from waste water using *Pseudomonas* sp. *Electronic Journal of Biotechnology* 7 (1): 38-46.
- Ilhan S., Nourbakhsh M., Kiliçarslan S., Ozdag H. 2004. Removal of chromium, lead and copper ions from industrial waste water by *Staphylococcus saprophyticus*. *Turkish Electronic Journal of Biotechnology* 2: 50-57.
- Kenzaka T., Yamaguchi N., Prapagdee B., Mikami E., Nasu M. 2001. Bacterial community composition and activity in urban rivers in Thailand and Malaysia. *Journal of Health Science* 47 (4): 353-361.
- Kogej A., Pavko A. 2001. Laboratory experiments of lead biosorption by self-immobilized *Rhizopus nigricans* pellets in the batch stirred tank reactor and the packed bed column. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 15 (2): 75-79.
- Kotrba P., Dolečková L., Lorenzo V., Ruml T. 1999. Enhanced bioaccumulation of heavy metal ions by bacterial cells due to surface display of short metal binding peptides. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (3): 1092-1098.
- Kratochvil D., Voľský B. 1998. Advances in the biosorption of heavy metals. *Trends in Biotechnology* 16: 291-300.

Langley S., Beveridge T. J. 1999. Effect of O-side-chain-lipopolysaccharide chemistry on metal binding. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (2): 489-498.

Lins R., Straatsma T. P. 2001. Computer simulation of the rough lipopolysaccharide membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biophysical Journal* 81: 1037-1046.

Mameri N., Boudries N., Addour L., Belhocine D., Lounici H., Grib H., Pauss A. 1999. Batch zinc biosorption by a bacterial nonliving *Streptomyces rimosus* biomass. *Water Research* 33 (6): 1347-1354.

Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M., Schleiffer K. H. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology* 15: 593-600.

Manz W., Wendt-Potthoff K., Neu T. R., Szewzyk U., Lawrence J. R. 1999. Phylogenetic composition, spatial structure, and dynamics of lotic bacterial biofilms investigated by fluorescent in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *Microbial Ecology* 37: 225-237.

Meers J. L. y Tempest D. W. 1970. The influence of growth-limiting substrate and medium NaCl concentration on the synthesis of magnesium-binding sites in the walls of *Bacillus subtilis* var. *niger*. *Journal of General Microbiology* 63: 325-331.

Meier M., Diekert G., Bettmann H., Blenke H., Knackmuss H. 1989. Influence of environmental factors on initial attachment of selected biofilm isolates. *Dechema Biochemistry Conferences* 3: 917-920.

Muraleedharan T. R., Iyengar L., Venkobachar C. 1995. Screening of tropical wood-rotting mushrooms for copper biosorption. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (9): 3507-3508.

Neef A., Amann R., Schlesner H., Schleifer Karl-Heinz. 1998. Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of *planctomyces* with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiology* 144: 3257-3266.

Ouverney C. y Fuhrman J. 1997. Increase in fluorescence intensity of 16S rRNA in situ hybridization in natural samples treated with chloramphenicol. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (7): 2735-2740.

Pernthaler A., Preston C., Pernthaler J., DeLong E., Amann R. 2002. Comparison of fluorescently labeled Oligonucleotide and polynucleotide probes for the detection of pelagic marine bacteria and archaea. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (2): 661-667.

Prakasham R., Sheno Merrie J., Sheela R., Saswathi N., Ramakrishna S. V. 1999. Biosorption of chromium VI by free and immobilized *Rhizopus arrhizus*. *Environmental Pollution* 104: 421-427.

Ravenschlag K., Sahn K., Amann R. 2001. Quantitative molecular analysis of the microbial community in marine arctic sediments (Svalbard). *Applied and Environmental Microbiology* 67 (1): 387-395.

Rodríguez G. y Rodríguez I. 1998. Eliminación de metales tóxicos mediante zeolitas naturales. (Catalizadores y Adsorbentes para la Protección Ambiental en la Región Iberoamericana) [en línea]. Ciencia y Tecnología para el Desarrollo CYTED. Disponible: www.icp.csic.es/cyted/Monografias/Monografias1998/B1-225.pdf [2004, Noviembre 17].

Rodríguez M. 1997. Biomates.net [en línea]. Estadística. Análisis Normal. Disponible: <http://es.geocities.com/riotorto/index.html> [2004, Septiembre 4]

Schoemann V., Wollast R., Chou L., Lancelot C. 2001. Effects of photosynthesis on the accumulation of Mn and Fe by *Phaeocystis* colonies. *Limnology and Oceanography*: 46 (5) 1065-1076.

Tsekova K. y Petrov G. 2002. Removal of heavy metals from aqueous solution using *Rhizopus delemar* mycelia in free and polyurethane-bound form. *Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences* 57c: 629-633.

Vieira R. y Volesky B. 2000. Biosorption: a solution to pollution?. *International Microbiology* 3: 17-24.

Vullo D. 2003. Microorganismos y metales pesados: Una interacción en beneficio del medio ambiente. *Revista Química Viva* [en línea] Volumen 2, Número 3. Versión Electrónica SIN 1666-7948. Disponible: <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar> [2004, Abril 7]

Yeates C., Saunders A., Crocetti G., Blackall L. 2003. Limitations of the widely used GAM42a and BET42a probes targeting bacteria in the *Gammaproteobacteria* radiation. *Microbiology* 149: 1239-1247.

Yee N., Benning L., Phoenix V., Grant F. 2004. Characterization of metal-cyanobacteria sorption reactions: a combined macroscopic and infrared spectroscopic investigation. *Environmental Science and Technology* 38: 775-782.

Superintendencia de Servicios Sanitarios (SISS). Residuos Líquidos. Norma D. S. N°90/2000 [en línea]. Disponible: http://www.siss.cl/RepositorioSiss/Archivos/websiss/documentos/RILES/SEGPRES_902000/Res.%201442-00.pdf [2004, Marzo 10]