

## DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

---

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).  
*Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

---

*Biotratamiento de efluentes industriales que contengan metales*

---

Trabajo de tesis para optar por el título de Doctor en Ciencia y Tecnología de la Universidad  
Nacional de General Sarmiento

Autora: **María Alejandra Daniel**

Directora: Dra. Diana Lía Vullo

Fecha: Abril 2018

## DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).  
*Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

### FORMULARIO "E" TESIS DE POSGRADO

Niveles de acceso al documento autorizados por el autor

**El autor de la tesis puede elegir entre las siguientes posibilidades para autorizar a la UNGS a difundir el contenido de la tesis:  a**

- a) *Liberar el contenido de la tesis para acceso público.*
- b) *Liberar el contenido de la tesis solamente a la comunidad universitaria de la UNGS:*
- c) *Retener el contenido de la tesis por motivos de patentes, publicación y/o derechos de autor por un lapso de cinco años.*

- a. Título completo del trabajo de Tesis: Biotratamiento de efluentes industriales que contengan metales
- b. Presentado por (Apellido/s y Nombres completos de la autora): Daniel, María Alejandra
- c. E-mail de la autora: mdaniel@ungs.edu.ar; mdaniel@campus.ungs.edu.ar
- d. Estudiante del Posgrado (consignar el nombre completo del Posgrado): Doctorado en Ciencia y Tecnología
- e. Institución o Instituciones que dictaron el Posgrado (consignar los nombres desarrollados y completos): Universidad Nacional de General Sarmiento
- f. Para recibir el título de (consignar completo):
  - a) Grado académico que se obtiene: Doctor
  - b) Nombre del grado académico: Doctora en Ciencia y Tecnología
- g. Fecha de la defensa:        /        /  
   día    mes    año
- h. Directora de la Tesis (Apellidos y Nombres): Dra. Vullo, Diana Lía
- i. Tutora de la Tesis (Apellidos y Nombres): Dra. Ceretti, Helena Margarita
- j. Colaboradores con el trabajo de Tesis: ---
- k. Descripción física del trabajo de Tesis (cantidad total de páginas, imágenes, planos, videos, archivos digitales, etc.): 211 páginas (incluyendo el formulario E), 79 imágenes, 19 tablas
- l. Alcance geográfico y/o temporal de la Tesis: ---

## DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).  
*Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

m. Temas tratados en la Tesis (palabras claves): *Pseudomonas veronii* 2E, biopelículas, biorreactores, biosorción, Cd, Zn

n. Resumen en español (hasta 1000 caracteres):

*Pseudomonas veronii* 2E es una cepa bacteriana autóctona capaz de crecer en forma de biopelículas sobre diferentes superficies y biosorber metales.

Se plantearon como objetivos generales estudiar la cinética de colonización del vidrio y desarrollar biorreactores con la cepa inmovilizada sobre espuma de poliuretano.

Se estudiaron los efectos sobre la colonización de cubreobjetos (a corto tiempo) que producen diferentes factores y condiciones de cultivo, se analizó la estructura y cuantificación de la biopelícula.

Se desarrollaron dos biorreactores de operación en lote, C50 y C200, rellenos con cubos de espuma como soporte de inmovilización. Funcionaron en esterilidad por un período de 3 meses para la inmovilización y 48 h para la biosorción de Cd y de Zn de efluentes acuosos.

La estructura de las biopelículas de *P. veronii* 2E depende de la calidad y concentración de los nutrientes, como de la temperatura de incubación y se han desarrollado reactores capaces de biorremediar metales.

o. Resumen en portugués (hasta 1000 caracteres):

*Pseudomonas veronii* 2E é uma linhagem bacteriana autóctone capaz de crescer como biofilmes em diferentes superfícies e biosorver metais.

Os objetivos gerais foram estudar a cinética da colonização do vidro e desenvolver biorreatores com a linhagem bacteriana imobilizada em espuma de poliuretano.

Estudaram-se os efeitos na colonização de lamínulas (curto período de tempo) que produzem diferentes fatores e condições de cultivo, foi analisada a estrutura e a quantificação do biofilme.

Foram desenvolvidos dois biorreatores de operação em lote, C50 e C200, preenchidos com cubos de espuma como suporte de imobilização. Trabalharam em esterilidade por um período de 3 meses para a imobilização e 48 h para a biosorção de Cd e de Zn de efluentes aquosos.

A estrutura dos biofilmes de *P. veronii* 2E depende da qualidade e concentração dos nutrientes, como também da temperatura de incubação e foram desenvolvidos reatores com capacidade de bioremediar metais.

p. Resumen en inglés (hasta 1000 caracteres):

*Pseudomonas veronii* 2E is an autochthonous bacterial strain able of to grow forming biofilms on different surfaces and to biosorb metals.

The general objectives were to study the colonization kinetics on glass and to develop bioreactors with the immobilized strain on polyurethane foam.

The effects of different factors and culture conditions on the coverslip colonization (at short time) were analyzed by the evaluation of the structure and quantification of the biofilm.

Two bioreactors in batch-operation were developed, C50 and C200, filled with foam cubes as an immobilization matrix. They worked in an immobilization period of 3 months and 48 h for the Cd and Zn biosorption from aqueous effluents.

The *P. veronii* 2E biofilm structure depends on the quality and concentration of the nutrients, as well as on the incubation temperature. Reactors able to remove metals have been developed.

## DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

---

Evaluable y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).  
*Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

q. Aprobado por (Apellidos y Nombres del Jurado):

Dra. López, Nancy

Dra. Ruzal, Sandra Mónica

Dr. Yantorno, Osvaldo Miguel

Firma y aclaración de la firma del Presidente del Jurado:

Firma de la autora de la tesis:

Prof. Daniel, María Alejandra



## DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).  
*Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

---

### *Biotratamiento de efluentes industriales que contengan metales*

---

#### Publicaciones:

##### – Trabajos en libros:

41- Zinc biosorption by microbial species for biotreatment processes

G. Sosa, M.A. Daniel, M.R. Barrionuevo, I.C. Lazzarini Behrmann, M.L. Ferreira, A. Zalts, S.A. Ramírez, y D.L. Vullo; en *Handbook of Metal-Microbe Interactions and Bioremediation*, editado por Surajit Das y HIRAK Ranjan Dash, CRC Press, Taylor and Francis Group, USA, Capítulo 41 (ISBN 978-1-49876-242-7), pág. 657-669

Knowing more about metals, microbes and environment interactions: how to improve wastewater biotreatments.

M. Barrionuevo, M.A. Daniel, L. Garavaglia, N. López, N. Méndez, G. Sosa, R. Candal, S. Cerdeira, H. Ceretti, S. Ramírez, E. Reciulschi, A. Zalts y D.L. Vullo; en *Bioremediation: Biotechnology, Engineering and Environmental Management*. Nova Science Publishers, Inc.

(Web:

[https://www.novapublishers.com/catalog/product\\_info.php?products\\_id=15498](https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=15498))

##### – Trabajos en revistas con referato:

Kinetics of *Pseudomonas veronii* 2E biofilm development under different nutritional conditions for a proper bioreactor design

M.A. Daniel, M.R. Barrionuevo, S.R. Doyle, D.L. Vullo (2016); en *Biochemical Engineering Journal*; Elsevier Science, Vol. 105, pág. 150–158

(<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2015.09.001>)

Tratamiento biológico de efluentes industriales con contenido en metales: factores a tener en cuenta para un diseño eficiente

M. Barrionuevo, M.A. Daniel, L. Garavaglia, N. Méndez, G. Sosa, R. Candal, S. Cerdeira, H. Ceretti, S. Ramírez, E. Reciulschi, A. Zalts y D.L. Vullo (2009); en *Química Viva*; Núm. 2, año 8, agosto 2009

([quimicaviva@qb.fcen.uba.ar](mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar))

## DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).  
*Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

– Trabajos presentados en Congresos y reuniones científicas:

Biotratamiento de efluentes industriales que contengan metales

M.A. Daniel; trabajo presentado como comunicación oral en *Jornadas de Investigación Área de Química*; organizado por: el Área de Química del Instituto de Ciencias de la UNGS, Los Polvorines, Bs. As., 1 de marzo de 2017

Automated Image Analysis Program for the Study of *Pseudomonas veronii* 2E Biofilms on Glass under Different Nutritional Conditions

M.A. Daniel, S. Doyle, D. Vullo; trabajo presentado como comunicación oral por M.A. Daniel en *Imaging Techniques for Biotechnology and Biomedical Applications Workshop*, organizado en el marco de un proyecto de colaboración entre grupos de investigación de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP y de la École Polytechnique de Lausanne, Suiza; La Plata, Bs. As., 30 de noviembre y 1 de diciembre de 2016

Modelos matemáticos como herramientas para el estudio de biopelículas bacterianas sobre vidrio

M.A. Daniel, S. Doyle, D. Vullo; trabajo presentado como comunicación oral por M.A. Daniel en *IV Workshop en Ecuaciones de la Física Matemática*, organizado por la UNGS, Los Polvorines, Bs. As., 3 de noviembre de 2015

Efluente Industrial + Metales + Reactor + Bacterias = ¿Biotratamiento?

M.A. Daniel, D. Vullo; trabajo presentado en forma de póster en *Argentina y Ambiente 2012 (AA2012) "Una mirada transversal e integral a los problemas ambientales"*, 1<sup>er</sup> Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología Ambiental y 1<sup>er</sup> Congreso Nacional de la Sociedad Argentina de Ciencia y Tecnología Ambiental, Mar del Plata, Bs. As., del 28 de mayo al 1 de junio de 2012

Desarrollo de sistemas de biotratamiento de efluentes con contenido en metales

M. Alessandrello, M. Barrionuevo, M.A. Daniel, M.L. Ferreira, G. Sosa, S.A. Ramírez, A. Zalts, D.L. Vullo; trabajo presentado en forma de póster en *2<sup>do</sup> Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos (SAProBio 2012)*; La Plata, Bs. As., 10 y 11 de mayo de 2012

Characterization of *Pseudomonas veronii* 2E biofilm establishment for fixed-bed bioreactors to be applied in metal loaded wastewater treatments

M.A. Daniel, S. Doyle, D.L. Vullo; trabajo presentado como comunicación oral por M.A. Daniel en *VII Congreso Argentino de Microbiología "SAMIGE del Bicentenario"*, organizado por la Sociedad Argentina de Microbiología General (SAMIGE); San Miguel de Tucumán, Tucumán, del 18 al 20 de mayo de 2011

*Pseudomonas veronii* 2E biofilm development for a proper packed-bed bioreactor design

M.A. Daniel, S. Doyle y D.L. Vullo; trabajo presentado en forma de póster en *13th International Symposium on Microbial Ecology: Stewards of a changing planet*,

## DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).  
*Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

organizado por la International Society for Microbial Ecology; Seattle, EE.UU, del 22 al 27 de agosto de 2010

Biofilm development of *Pseudomonas veronii* 2E for a proper bioreactor design

M.A. Daniel, S. Doyle y D.L. Vullo; trabajo presentado en forma de póster en *II Argentine Workshop on Current Topics in Pseudomonas and Burkholderia Research* organizado como una actividad acoplada y adicional al VI Congreso de SAMIGE, organizado por SAMIGE; Villa Carlos Paz, Córdoba, 21 de Octubre de 2009

Bacterial adherence on polymeric matrices for fixed or fluidized bed reactor development

M.A. Daniel, M.G. Casabona, D. Bernik, D.L. Vullo; trabajo presentado en forma de póster en *18th. International Biohydrometallurgy Symposium*, organizado por el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales-CONICET-UNLaPlata; Bariloche, Río Negro, del 13 al 16 de setiembre de 2009

Industrial wastewater containing cadmium and zinc: biological treatment of model systems

M.A. Daniel, H.M. Ceretti, S.A. Ramírez, A. Zalts y D.L. Vullo; trabajo presentado en forma de póster en *12th Internacional Symposium on Microbial Ecology (ISME 12): Microbial Diversity-Sustaining the Blue Planet*, organizado por la International Society for Microbial Ecology; Cairns, Australia, del 17 al 22 de agosto de 2008

Diseño e implementación de sistemas de biorremediación de metales pesados mediante la utilización de microorganismos autóctonos

M.A.Daniel, H.Ceretti, S.Ramírez, A.Zalts y D.L.Vullo; trabajo presentado como comunicación oral por M.A. Daniel en el *Taller integrativo de "Biofilms"*, organizado por la Asociación Argentina de Microbiología (AAM); Fundación Instituto Leloir, ciudad de Buenos Aires, 28 de marzo de 2008

### Aportes Originales:

*(Especificar cuales son los aportes originales o innovadores conseguidos en la realización de esta tesis. Indicar donde se encuentran. Máximo una carilla)*

Las "biopelículas" son comunidades de microorganismos que suelen crecer adheridos a una superficie abiótica o biótica y que están embebidos en una matriz extracelular que ellos mismos sintetizan. *Pseudomonas veronii* 2E es una cepa bacteriana autóctona, aislada del Río Reconquista, capaz de crecer en estado planctónico o formando biopelículas sobre diferentes superficies y es capaz de biosorber metales de soluciones acuosas. Ambas características pueden ser empleadas para desarrollar técnicas de biorremediación de efluentes contaminados.

En el Capítulo I del presente trabajo, se estudió la cinética de colonización superficial a corto tiempo de las células bacterianas sobre vidrio (cubreobjetos). Se analizó la estructura de la colonización desde microscopía de campo claro (microestructura) y por escaneo de los cubreobjetos expuestos a la colonización (macroestructura). Se desarrolló en MATLAB® un programa automatizado para analizar digitalmente las imágenes escaneadas de los

## DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

---

Evaluable y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU).  
*Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

cubreobjetos, adquiriendo por un lado una superficie en 3D de la cobertura y obteniendo la dimensión fractal para describir a la rugosidad de la biopelícula colonizadora. Por otro lado, se cuantificó la biopelícula por espectrofotometría. Se evaluó, a partir de las tres técnicas de análisis, el impacto sobre el desarrollo de la biopelícula de *P. veronii* 2E sobre vidrio de diferentes perturbaciones como el tipo de medio de cultivo, la calidad y concentración de los nutrientes, presencia de Fe(II) y la temperatura de incubación.

En el Capítulo II, se desarrollaron dos biorreactores, C50 y C200, con la cepa *P. veronii* 2E inmovilizada sobre cubos de espuma de poliuretano para remediar efluentes acuosos artificiales contaminados con metales. Se optimizaron los reactores para operar en forma de lote en dos etapas de trabajo bajo condiciones de esterilidad permanente. En la Etapa de Inmovilización Celular se optimizaron las condiciones para aumentar el desarrollo de la biopelícula bacteriana sobre la matriz de inmovilización. En la Etapa de Biosorción se llevó a cabo la remediación del Efluente Modelo artificial contaminado con 0,5 mM de Cd(II) o Zn(II) (a pH controlado). Se realizaron dos ciclos de biosorción de metal de 24 h cada uno y de manera consecutiva. Se analizó electroquímicamente la cantidad de metal en el efluente al inicio y final de cada ciclo de biotratamiento contrastando con la cantidad de metal en el Efluente Modelo.

# ÍNDICE

|                     |          |
|---------------------|----------|
| <b>ÍNDICE .....</b> | <b>I</b> |
|---------------------|----------|

|                              |          |
|------------------------------|----------|
| <b>AGRADECIMIENTOS .....</b> | <b>V</b> |
|------------------------------|----------|

|                          |          |
|--------------------------|----------|
| <b>INTRODUCCIÓN.....</b> | <b>1</b> |
|--------------------------|----------|

|   |           |
|---|-----------|
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>1- BIOPELÍCULAS MICROBIANAS .....</b>  | <b>3</b>  |
| 1.1- Definición de Biopelícula .....  | 3         |
| 1.2- Formación de la biopelícula: Modelo de sucesión en la colonización de superficies .....    | 5         |
| 1.3- Adhesión bacteriana.....   | 8         |
| 1.4- Estructura de la biopelícula.....  | 9         |
| 1.5- Matriz extracelular .....  | 11        |
| 1.6- Ambientes donde se desarrollan las biopelículas.....                                       | 11        |
| 1.7- Técnicas comunes para el análisis de biopelículas.....                                     | 12        |
| 1.8- Aspectos positivos de las biopelículas .....   | 13        |
| 1.9- Aspectos negativos de las biopelículas .....   | 15        |
| <b>2- PROCESOS DE REMEDIACIÓN DE METALES.....</b>   | <b>16</b> |
| 2.1- Contaminación por metales.....   | 16        |
| 2.1.a- Zn .....   | 18        |
| 2.1.b- Cd.....  | 20        |
| 2.2- Marco normativo vigente en Argentina que establece los límites de descarga para Zn y Cd .. | 21        |
| 2.3- Tratamiento de efluentes con contenido de metales.....                                     | 23        |
| 2.3.a- Tratamientos convencionales .....  | 23        |
| 2.3.b- Biorremediación y biosorción.....  | 24        |
| 2.3.c- Biorreactores .....  | 26        |
| <b>3- SELECCIÓN DEL MICROORGANISMO: <i>Pseudomonas veronii</i> 2E .....</b>                     | <b>28</b> |

|                       |           |
|-----------------------|-----------|
| <b>OBJETIVOS.....</b> | <b>33</b> |
|-----------------------|-----------|

|                        |           |
|------------------------|-----------|
| <b>OBJETIVOS .....</b> | <b>35</b> |
|------------------------|-----------|

|   |           |
|---|-----------|
| <b>CAPÍTULO I: DESARROLLO DE BIOPELÍCULAS SOBRE VIDRIO.....</b> | <b>37</b> |
|---|-----------|

|   |           |
|---|-----------|
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>   | <b>39</b> |
| <b>METODOLOGÍA .....</b>  | <b>40</b> |
| <b>1- COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.....</b>   | <b>40</b> |
| <b>2- PREPARACIÓN DE LOS CULTIVOS ACOSTUMBRAMIENTO E INÓCULO.....</b>   | <b>41</b> |
| <b>3- SUPERFICIE DE INMOVILIZACIÓN.....</b>   | <b>41</b> |
| <b>4- ESTUDIOS PRELIMINARES EN EL ESTUDIO DE BIOPELÍCULAS .....</b>   | <b>42</b> |
| 4.1- ¿Las células bacterianas de <i>P. veronii</i> 2E se inmovilizan sobre el vidrio? Utilización de microscopía de fluorescencia ..... | 42        |
| 4.2- ¿Será cuantificable la biomasa inmovilizada por peso seco?.....  | 42        |
| <b>5- CINÉTICA DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS BACTERIANAS SOBRE VIDRIO .....</b>  | <b>43</b> |
| <b>6- PERTURBACIONES EN EL DESARROLLO DE LAS BIOPELÍCULAS .....</b>   | <b>43</b> |
| <b>7- TRATAMIENTO DE MUESTRAS Y CRECIMIENTO PLANCTÓNICO .....</b>   | <b>44</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>8- TRATAMIENTO DE MUESTRAS Y DESARROLLO DE BIOPELÍCULAS.....</b>   | <b>44</b>  |
| 8.1- Preparación de las muestras de las biopelículas.....   | 44         |
| 8.2- Análisis estructural de la biopelícula .....   | 45         |
| 8.2.a- Adquisición de imágenes por escaneo.....   | 45         |
| 8.2.b- Análisis digital de las imágenes escaneadas .....  | 46         |
| 8.2.c- Adquisición de imágenes por microscopía de campo claro .....   | 47         |
| 8.3- Cuantificación de la biopelícula desarrollada sobre vidrio .....   | 48         |
| 8.3.a- Curva de calibrado .....   | 48         |
| 8.3.b- Concentración de CV en las muestras.....   | 50         |
| Resumen de la metodología empleada para el tratamiento de las muestras .....  | 51         |
| <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>   | <b>52</b>  |
| <b>1- ESTUDIOS PRELIMINARES EN EL ESTUDIO DE BIOPELÍCULAS .....</b>   | <b>52</b>  |
| 1.1- ¿Las células bacterianas de <i>P. veronii</i> 2E se inmovilizan sobre el vidrio? Utilización de microscopía de fluorescencia ..... | 52         |
| 1.2- ¿Será cuantificable la biomasa inmovilizada por peso seco?.....  | 53         |
| <b>2- PERTURBACIONES EN EL DESARROLLO DE LAS BIOPELÍCULAS .....</b>   | <b>55</b>  |
| 2.1- Efecto de Siembra del Inóculo: Siembra Directa o Siembra de Suspensión Bacteriana.....   | 55         |
| 2.1.a- Consideraciones metodológicas .....  | 55         |
| 2.1.b- Cinética de colonización y Siembra Directa .....   | 57         |
| 2.1.c- Cinética de colonización y Siembra por Suspensión.....   | 60         |
| 2.2- Efecto de la Naturaleza de la Fuente de Carbono .....  | 66         |
| 2.2.a- Consideraciones metodológicas .....  | 67         |
| 2.2.b- Medio mínimo salino (M9, 32 °C).....   | 68         |
| 2.2.c- Medio complejo basado en peptona de caseína (PcY, 32 °C) .....   | 71         |
| 2.3- Efecto de la Concentración de la Fuente de Carbono .....   | 75         |
| 2.3.a- Medio mínimo (M9, 32 °C).....  | 76         |
| 2.3.b- Medio complejo basado en peptona de caseína (PcY, a 32 °C) .....   | 78         |
| 2.4- Efecto de la Naturaleza de la Fuente de Nitrógeno en el Medio de Cultivo Complejo.....   | 80         |
| 2.4.a- Naturaleza de la fuente de nitrógeno en los medios de cultivo complejos.....   | 80         |
| 2.4.b- Medio complejo basado en peptona de carne (PY-N <sub>Amino</sub> y PY-N <sub>Total</sub> , a 32 °C) .....                        | 81         |
| 2.5- Efecto de la Presencia de Fe(II) en el Medio de Cultivo.....   | 84         |
| 2.5.a- Medio mínimo (M9, 0,5%Fuente de carbono, 32 °C) .....  | 84         |
| 2.5.b- Medios complejos con glucosa (PY y PcY, 0,05%Glucosa, a 32 °C).....  | 87         |
| 2.6- Efecto de la Temperatura de Incubación.....  | 89         |
| 2.6.a- Medio mínimo (M9, a 28 °C).....  | 89         |
| 2.6.b- Medio complejo en base a peptona de caseína y diluciones (PcY-0,05%Glucosa, PcY-1/2 y PcY-1/4).....                              | 92         |
| 2.6.c- Medios estimulados con Fe(II): M9-0,5%Glucosa-Fe y PcY-0,05%Glucosa-Fe .....   | 93         |
| 2.7- Efecto de la Composición del Medio de Cultivo: Medio Mínimo vs Medio Complejo.....   | 95         |
| <b>INTEGRACIÓN FINAL .....</b>  | <b>98</b>  |
| <b>1- EFECTO DE SIEMBRA DEL INÓCULO: ¿SIEMBRA DIRECTA O SIEMBRA POR SUSPENSIÓN?.....</b>  | <b>98</b>  |
| <b>2- ¿CUÁL ES LA FUENTE DE CARBONO QUE FAVORECE LA COLONIZACIÓN DE <i>P. veronii</i> 2E EN EL VIDRIO A 32 °C? .....</b>                | <b>100</b> |
| <b>3- ¿LA DIFERENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE LA FUENTE DE CARBONO PUEDE AFECTAR EN EL DESARROLLO DE LA BIOPELÍCULA? .....</b>            | <b>104</b> |
| <b>4- ¿LA NATURALEZA DE LA FUENTE DE NITRÓGENO PUEDE INFLUIR EN LA COLONIZACIÓN BACTERIANA?.....</b>                                    | <b>106</b> |
| <b>5- ¿LA ADICIÓN DEL CATIÓN FERROSO A LOS MEDIOS DE CULTIVO PUEDE INFLUIR EN EL DESARROLLO DE LA BIOPELÍCULA? .....</b>                | <b>108</b> |
| <b>6- ¿INFLUYE LA TEMPERATURA DE INCUBACIÓN EN LA COLONIZACIÓN SUPERFICIAL DEL VIDRIO? EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO PLANCTÓNICO.....</b>  | <b>111</b> |
| <b>7- ¿INFLUYE EL TIPO DE MEDIO DE CULTIVO EN LA COLONIZACIÓN SUPERFICIAL DEL CUBREOBJETO? .....</b>                                    | <b>116</b> |
| <b>8- ¿SE PUEDE UTILIZAR UNA TÉCNICA AISLADA PARA ESTUDIAR BIOPELÍCULAS SOBRE VIDRIO? .....</b>   | <b>116</b> |
| <b>9- EN RESUMEN, ¿DE QUÉ FACTORES DEPENDE EL DESARROLLO DE LAS BIOPELÍCULAS FORMADAS?.....</b>   | <b>117</b> |

**CAPÍTULO II: DISEÑO DE BIORREACTORES PARA EL TRATAMIENTO DE EFLUENTES CON Cd Y Zn ..... 121**

|   |     |
|---|-----|
| INTRODUCCIÓN .....  | 123 |
| METODOLOGÍA .....   | 124 |
| 1- MEDIOS DE CULTIVO E INÓCULO.....   | 124 |
| 2- SOPORTE DE INMOVILIZACIÓN BACTERIANA .....   | 124 |
| 3- DISEÑO DE LOS BIORREACTORES .....  | 125 |
| 3.1- Características generales de los biorreactores.....  | 125 |
| 3.2- ¿Operación con Flujo Continuo o Sistema en Lote?.....  | 126 |
| 4- TEMPERATURA (32 °C).....   | 127 |
| 5- AIREACIÓN.....   | 128 |
| 6- HOMOGENEIZACIÓN .....  | 128 |
| 7- ETAPAS DE TRABAJO BAJO OPERACIÓN EN LOTE.....  | 129 |
| 7.1- Etapa de Inmovilización Celular.....   | 129 |
| 7.1.a- Crecimiento de la biopelícula.....   | 129 |
| 7.1.b- Lavado de la matriz.....   | 130 |
| 7.2- Etapa de Biosorción.....   | 130 |
| 7.2.a- Efluente Modelo.....   | 130 |
| 7.2.b- Extracción de muestras del efluente a remediar.....  | 131 |
| 7.2.c- Ciclos de Biosorción .....   | 131 |
| 8- TRATAMIENTO DE MUESTRAS.....   | 132 |
| 8.1- Biomasa inmovilizada en los reactores .....  | 132 |
| 8.2- Biomasa en suspensión en los ciclo de biosorción.....  | 133 |
| 8.3- Metal biosorbido .....   | 133 |
| 8.3.a- Parámetros electroquímicos para la determinación de metal total .....                                | 133 |
| 8.3.b- Concentración del Efluente Modelo .....  | 134 |
| 8.3.c- Concentración de metal total en las columnas de tratamiento (C50 y C200).....                        | 136 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....  | 138 |
| 1- PRIMEROS PASOS EN EL DESARROLLO DE BIORREACTORES .....   | 138 |
| 1.1- ¿Operación con Flujo Continuo o Sistema en Lote?.....  | 138 |
| 1.2- Optimización de los Sistemas en Lote .....   | 140 |
| 1.2.a- Experiencias piloto C50 .....  | 140 |
| 1.2.c- Exp_Preliminares-C200 .....  | 141 |
| 2- FUNCIONAMIENTO DE LOS BIORREACTORES C50 Y C200.....  | 142 |
| 2.1- Consideraciones metodológicas: Disposición final de los componentes .....                              | 142 |
| 2.2- Etapa de Inmovilización Celular.....   | 143 |
| 2.2.a- Renovación del medio de cultivo .....  | 143 |
| 2.2.b- Lavado del sistema.....  | 146 |
| 2.2.c- Biomasa inmovilizada sobre la matriz soporte.....  | 146 |
| 2.3- Etapa de Biosorción .....  | 149 |
| 2.3.a- Concentración de metal en el Efluente Modelo .....   | 149 |
| 2.3.c- Biomasa en suspensión .....  | 155 |
| INTEGRACIÓN FINAL .....   | 158 |
| 1- LA DURA TAREA DE DESARROLLAR BIORREACTORES: OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS .....                             | 158 |
| 2- FUNCIONAMIENTO DE LOS BIORREACTORES.....   | 160 |
| 3- ¿LA POROSIDAD DE LA MATRIZ DE INMOVILIZACIÓN INFLUYE EN LA BIOMASA INMOVILIZADA? .....                   | 161 |
| 4- ¿EL TIPO DE MEDIO DE CULTIVO IMPACTA EN EL TIPO DE BIOPELÍCULA FORMADA SOBRE ESPUMA DE POLIURETANO?..... | 161 |
| 5- ¿FUERON EFICIENTES LOS REACTORES DESARROLLADOS? .....  | 162 |
| 6- ¿LA CONCENTRACIÓN DE LOS EFLUENTES TRATADOS CUMPLE CON LA NORMATIVA VIGENTE PARA SU DESCARGA?.....       | 163 |
| CONCLUSIONES.....   | 165 |

|   |            |
|---|------------|
| CONCLUSIONES .....  | 167        |
| 1- DESARROLLO DE BIOPELÍCULAS SOBRE VIDRIO .....  | 167        |
| 2- DISEÑO DE BIORREACTORES PARA EL TRATAMIENTO DE EFLUENTES CON Cd Y Zn<br>.....              | 168        |
| <b><u>PERSPECTIVAS A FUTURO.....</u></b>  | <b>171</b> |
| PERSPECTIVAS A FUTURO .....   | 173        |
| <b><u>ANEXOS .....</u></b>  | <b>175</b> |
| A. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE “2E” .....   | 177        |
| B. VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE <i>Pseudomonas veronii</i> 2E.....                             | 178        |
| C. MACROESTRUCTURA DE LAS BIOPELÍCULAS - ANÁLISIS DIGITAL DE LAS IMÁGENES<br>ESCANeadas ..... | 179        |
| 1- DESCRIPCIÓN DEL PROGRAMA .....   | 179        |
| 2- CÓDIGO DEL PROGRAMA .....  | 181        |
| D. CURVA DE CALIBRADO DE CRISTAL VIOLETA.....   | 186        |
| E. RELACIÓN C/N EN M9 .....   | 189        |
| <b><u>BIBLIOGRAFÍA.....</u></b>   | <b>191</b> |
| BIBLIOGRAFÍA.....   | 193        |



# AGRADECIMIENTOS

*Caminante, son tus huellas,  
el camino y nada más.  
Caminante, no hay camino,  
se hace camino al andar*

*Antonio Machado*

¿A quién le agradezco? Qué buena pregunta... Tantas personas que no me alcanzaría el espacio y sería muy tedioso.

Si pensamos en lo académico... Las responsables directas de haber transitado por estos caminos de la vida sin lugar a dudas son Diana y Anita, que allá por el año 2002 me convencieron de iniciar mi trayectoria académica volcada a esos bichitos buenos del ambiente: las bacterias. ¡Gracias por la confianza cuando aún era estudiante de grado y por la paciencia de todos estos años! Gracias Diana por haberme dado la fuerza necesaria para concluir esta etapa. Le agradezco a Santiago por la introducción al mundo de las imágenes y convencerme de registrar todo digitalmente, gracias por ayudarme a procesar y, digitalmente, analizar las imágenes.

Y si pensamos en las amistades... A Henry por ser un guía, no solo en lo académico, sino en la vida misma. ¡Sin lugar a dudas, es como un padre que me ha dado la vida! A mis amigos y compañeros del laboratorio, quienes han estado a mi lado no sólo en los buenos momentos, sino también en los más difíciles. Gracias Belén, Griselda, Helena, Irene, Javier, María F., María L., Pía, Silvana B., Silvana R. y Silvia. ¡Grandes personas que la vida me ha cruzado!

Y como no podía faltar... ¡Gracias a mi familia por el apoyo incondicional, seguramente no han entendido demasiado cada vez les trataba de explicar lo que hacía en el laboratorio o cuando me han escuchado ensayar alguna presentación, pero que han estado al lado mío en todo momento! En especial a mi hermana Ayelén, hoy ya toda una mujer, que me acompañaba al labo siendo apenas una niña.

Finalmente gracias a mi marido Pablo, uno de los que más me ha insitado en dar estos últimos pasos y cerrar esta etapa. ¡Te amo con todo mi corazón!



# INTRODUCCIÓN





# INTRODUCCIÓN

## 1- Biopelículas microbianas

### 1.1- Definición de Biopelícula

En la mayor parte de los ambientes naturales, los microorganismos comúnmente desarrollan asociaciones entre las superficies y la interfase en forma de agregados celulares mediante la secreción de diferentes compuestos viscosos que ellos mismos producen (Vlamakis, 2011; Singh, 2006). En ambientes acuáticos, las poblaciones bacterianas se caracterizan por desarrollarse en comunidades adheridas sobre diversas superficies expresando una forma de vida sedentaria (estado sésil) antes que un crecimiento planctónico (crecimiento como células libres), ver Figura 1.



**Figura 1. Biopelícula natural desarrollada sobre rocas.**

([http://3.bp.blogspot.com/\\_HPLC8fE2xnA/Rh8u44bq\\_MI/AAAAAAAAAJw/uAbzhIspzuU/s400/VER.jpg](http://3.bp.blogspot.com/_HPLC8fE2xnA/Rh8u44bq_MI/AAAAAAAAAJw/uAbzhIspzuU/s400/VER.jpg)).

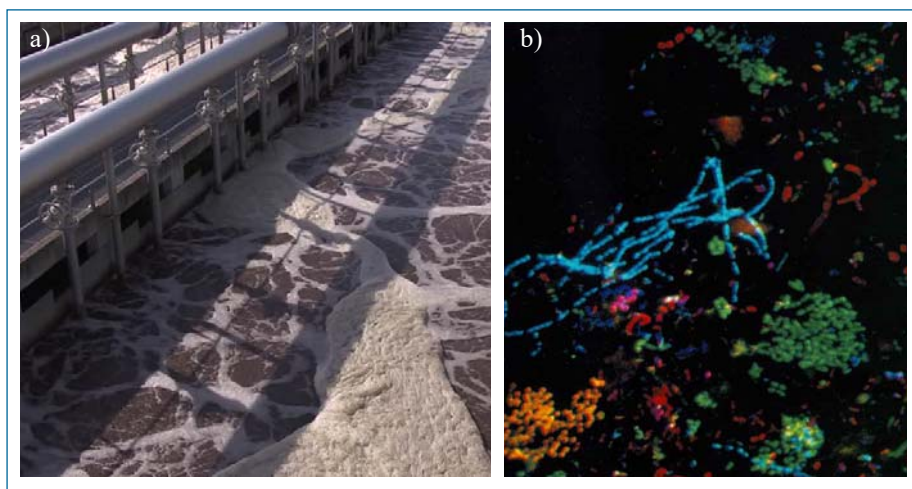
Las “biopelículas” (*biofilms*) son comunidades de microorganismos que suelen crecer adheridos a una superficie abiótica o biótica y que están embebidos en una matriz extracelular que ellos mismos sintetizan<sup>1</sup> (De Beer, 2006; Singh, 2006; Qureshi 2005; Parsek, 2004; Madigan, 2003; Dunne, 2002; Peyton, 1996).

En términos cooperativos, una biopelícula es como un consorcio funcional de microorganismos organizados dentro de una extensa matriz de exopolímeros (comúnmente llamados *EPS*). Son como celdas (*clusters*) formadas por microorganismos que se encuentran adheridos a la superficie. Siendo los componentes básicos los microorganismos, la matriz extracelular y la superficie de fijación, sin uno de estos componentes, la biopelícula no se desarrolla. El proceso de

<sup>1</sup> Definición extraída de la tapa del libro de resúmenes del Taller Integrativo de Biofilms desarrollado el día 28 de marzo de 2008 en la Fundación Instituto Leloir.

formación es complejo, interviene la comunicación célula a célula (*quorum sensing*) e influyen el tipo de microorganismo del consorcio, la composición de la superficie y los factores medioambientales circundantes (Dunne, 2002). La ventaja del crecimiento en estado sésil es que “las biopelículas atrapan nutrientes para el crecimiento de las poblaciones microbianas y ayudan a prevenir el desprendimiento de las células que crecen sobre las superficies expuestas a corrientes de líquido” (Madigan, 2003). La comunicación célula a célula es esencial en el proceso de desarrollo y mantenimiento de una biopelícula en el que la señal de adherencia a una superficie se encuentra expresada en genes específicos. Estos genes “codifican proteínas que sintetizan moléculas que actúan como señales de unión célula a célula y el inicio de síntesis de un polisacárido dado” (Madigan, 2003).

Las biopelículas pueden estar formadas por poblaciones de una única cepa bacteriana o bien pueden ser varias cepas asociadas, formando consorcios (Singh, 2006; De Beer, 2006). Pueden estar formados también por especies de microorganismos diferentes, tales como bacterias, hongos, algas y protozoos (Singh, 2006), como puede observarse en la diversidad microbiana desarrollada sobre los barros activados de una planta de tratamiento de aguas residuales en la Figura 2.



**Figura 2. Diversidad microbiana sobre barros activados de una planta de tratamiento de aguas residuales.**  
a) Planta de tratamiento de aguas servidas (<http://footage.framepool.com/shotimg/qf/170970640-brida-tuberias-klaeranlage-gut-grosslappen-tanque-septico-tratamiento-de-aguas.jpg>).  
b) Imagen obtenida por microscopía confocal (CLSM) de barros activados de una planta de tratamiento de Munich (Alemania). Los diferentes colores observados representan diferentes microorganismos adheridos a la muestra estudiada tras la tinción con diferentes colorantes específicos (Amann, 1996).

En particular, el estudio de las biopelículas microbianas ha recibido mayor atención en las últimas décadas debido a su importancia tanto en lo ambiental, como en los contextos industriales y clínicos (Parsek, 2004). Para la mayoría de los microorganismos, las biopelículas son el hábitat primario para su desarrollo (Bajpai, 2015; Goeres, 2009; De Beer, 2006) y constituye una evolución en respuesta a las

continuas fluctuaciones de las condiciones ambientales (Dunne, 2002). Gracias a los avances en la microscopía, se pudieron realizar observaciones directas de una amplia variedad de hábitats naturales y se ha permitido establecer que la mayoría de los microorganismos persisten unidos a las superficies dentro de un estructurado ecosistema –biopelícula– y no como organismos aislados libremente (Herrera Mendoza, 2004). El 99% de los microorganismos vive en forma de biopelículas (Yang, S., 2013).

Varios factores distinguen al crecimiento en estado sésil frente al crecimiento de las células libres de una determinada población bacteriana: la asociación a una superficie, una alta densidad bacteriana, una matriz viscosa formada por polímeros extracelulares y un rango de heterogeneidad química, física y metabólica. La matriz de exopolímeros determina las propiedades físicas de la biopelícula, mientras que las propiedades fisiológicas son determinadas por las células bacterianas que conforman la biopelícula en sí misma (De Beer, 2006).

## 1.2- Formación de la biopelícula: Modelo de sucesión en la colonización de superficies

“La biopelícula se forma cuando la bacteria capta ciertos parámetros ambientales (disminución o aumento de la disponibilidad de nutrientes, [...], el pH, la temperatura, [...]) que disparan la transición de la forma planctónica a un crecimiento sobre una superficie” (Herrera Mendoza, 2004). Toda superficie está expuesta a ser colonizada por bacterias con la consecuente formación de una biopelícula. De la misma manera, ninguna especie bacteriana ha sido observada sólo en crecimiento planctónico (Dunne, 2002).

Los procesos biológicos involucrados en la formación de una biopelícula en la naturaleza se representan en la Figura 3, (Atlas, 2001). Durante el primer minuto se lleva a cabo el acondicionamiento físico del soporte producido por la deposición de sustancias que atraen a las bacterias y facilitan su adhesión y permanencia en la superficie en cuestión. Luego, se lleva a cabo la invasión de las poblaciones

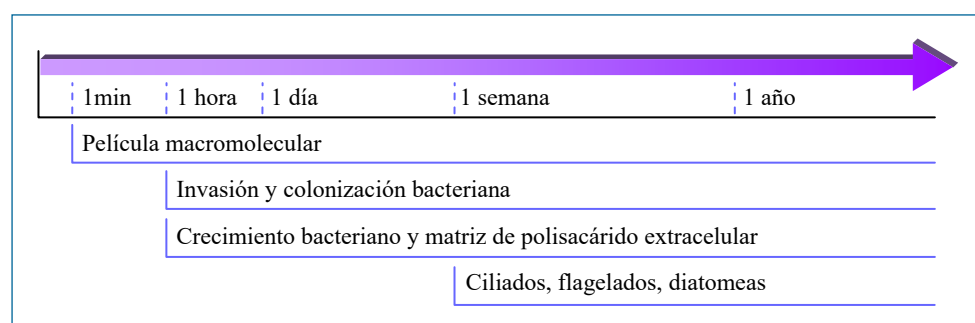


Figura 3. Procesos biológicos involucrados en la formación de una biopelícula (adaptado de Atlas, 2001).

bacterianas circundantes adhiriéndose y colonizando las superficies formando, en un primer momento, una monocapa celular. A medida que aumenta el crecimiento bacteriano, aumenta la densidad celular incrementando el espesor de la biopelícula. Al mismo tiempo se van incorporando nuevas células invasoras estableciendo de esta forma comunidades complejas con múltiples poblaciones. La colonización bacteriana es significativa ya a las 24 h de iniciada la invasión de la superficie. Durante el crecimiento, las poblaciones bacterianas van liberando exopolímeros que forman una matriz a la que se adhieren las células, conformando una interfase entre la célula y el medio exterior que influye en el intercambio químico y disponibilidad de nutrientes.

Mientras continúa la adhesión por adsorción de las células bacterianas a las superficies expuestas, microorganismos eucariotas colonizan la superficie por períodos variables. Encontrándose que las eucariotas depredadores y diatomeas permanecen unos días, mientras que las larvas y esporas permanecen durante unas semanas colonizando las biopelículas. Las asociaciones alga-bacteria son muy frecuentes, debido a que las algas ayudan a mantener la unión y proveen nutrientes a los microorganismos. Este modelo de sucesión en la colonización de superficies continúa hasta formar una comunidad compleja extremadamente resistente a las perturbaciones externas. Estas comunidades se caracterizan por cambios continuos y pronunciados en sus gradientes fisicoquímicos debido a la heterogeneidad fisiológica.

En la Figura 4 puede observarse un esquema del ciclo de vida de una biopelícula formado por la cepa bacteriana *Pseudomonas aeruginosa* (como también puede

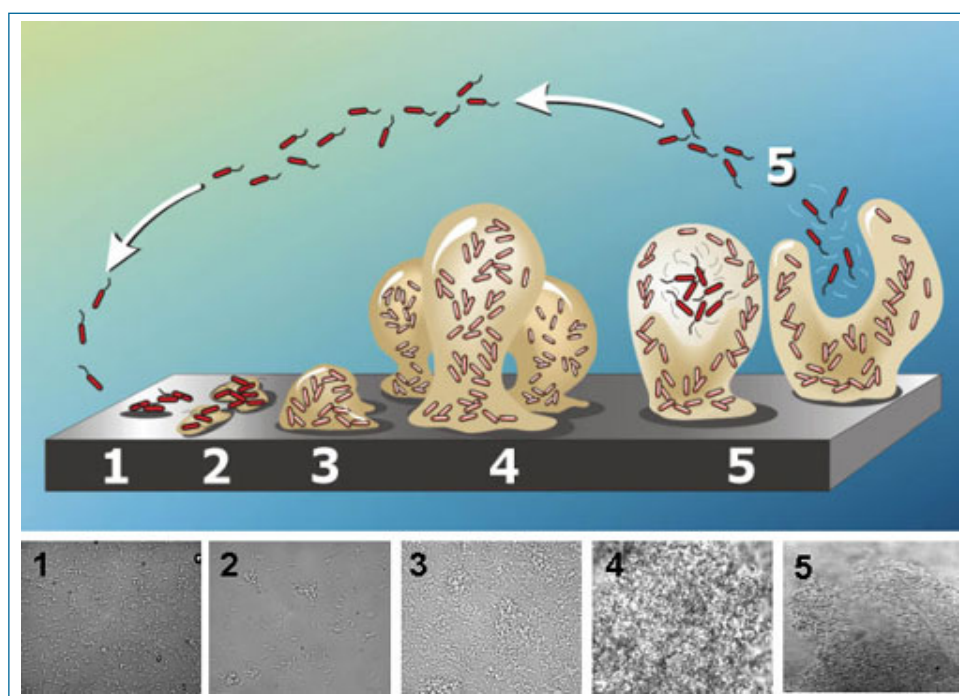


Figura 4. Ciclo de vida de una biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa*. (<http://centrobioenergetica.squarespace.com/biofilm/>).



registrarse en Ma, 2009). En el paso 1, células individuales colonizan la superficie, con la consecuente producción de exopolímeros e iniciando la adherencia irreversible (paso 2). Se desarrolla la arquitectura de la biopelícula (en 3 y 4) y la maduración de la misma en 5 cuando se liberan y dispersan células simples para colonizar nuevas superficies (autodispersión de células). Debajo de la imagen se encuentran microfotografías de la biopelícula desarrollada en cada una de estas etapas.

El transporte de los solutos ocurre por difusión desde la fase acuosa circundante hacia el interior de la biopelícula (ver Figura 5). “Los nutrientes fluyen sobre el medio inerte diluidos en la corriente líquida y se difunden a través de una capa pseudo-estacionaria de fluido que rodea a los microorganismos hacia las colonias (capa límite)” (Civit, 2000). El coeficiente de difusión se encuentra influenciado por la microestructura que adquieren los EPS debido a la resistencia que imponen al movimiento de las moléculas. Siendo el coeficiente de difusión de las moléculas pequeñas (como oxígeno, glucosa, amonio, nitrato) mayor que el coeficiente para macromoléculas (tales como ADN o proteínas) (De Beer, 2006), aparece un gradiente en la composición química de sustratos y de productos en el interior de la biopelícula que difiere del medio líquido en el que se encuentra. La región externa de la biopelícula se halla en contacto con el medio exterior, por lo que hay una alta disponibilidad de oxígeno y de nutrientes (zona aerobia). La región intermedia se caracteriza por la presencia de nutrientes pero ausencia de oxígeno, generando una región anóxica por el agotamiento de oxígeno metabólico. Y en la región interna de la biopelícula, la base, las células se encuentran sometidas a condiciones de estrés debido a la no disponibilidad de oxígeno y de nutrientes, por lo que se encuentran en un estado de latencia (zona anaerobia).

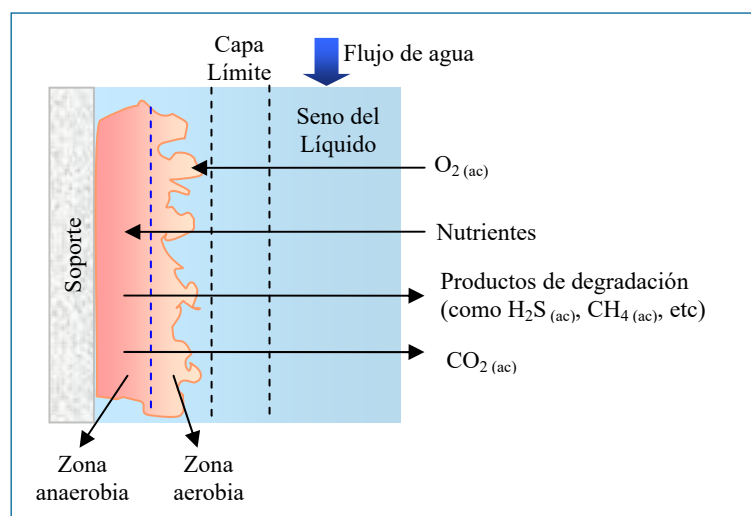


Figura 5. Esquema de la biopelícula y flujo de nutrientes (adaptado de Civit, 2000).

### 1.3- Adhesión bacteriana

La habilidad bacteriana para persistir en la biosfera se debe tanto a su versatilidad metabólica y a su plasticidad fenotípica. Un elemento para su adaptabilidad es su capacidad para posicionarse en lugares donde puede propagarse. Numerosos mecanismos de posicionamiento han sido descritos en las bacterias. El más comúnmente observado es el movimiento flagelar y los diferentes métodos de traslocación superficial incluyendo contracción, deslizamiento y precipitación. Para adherirse a las superficies, las bacterias utilizan sus flagelos y *pili* (pelos). Se han estudiado genéticamente varias especies bacterianas en el desarrollo de estos flagelos y *pili* utilizados para el anclaje a las superficies, entre ellas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae*. Se ha encontrado que la interacción inicial con la superficie es acelerada por la generación forzada de estructuras semejantes al *pili* tipo IV y los flagelos, los cuales son utilizados por la bacteria para moverse a lo largo de la superficie en dos dimensiones hasta que son encontradas con otras bacterias formando microcolonias, sobre las cuales se desarrolla el crecimiento (Herrera Mendoza, 2004).

La evidencia indica que la expresión génica en las células en crecimiento planctónico o en biopelícula es diferente, de acuerdo a las necesidades fenotípicas microbianas en cada caso. Se han hallado la represión flagelar y la hiperexpresión de genes responsables de la adhesión y formación de proteínas en varios estadios de formación de una biopelícula (Singh, 2006). Por ejemplo, en *Pseudomonas aeruginosa*, una vez que se transcribe el gen *alg* (gen responsable de la producción de alginato, un exopolisacárido que cimienta la estructura de la biopelícula), la síntesis del flagelo es reprimida debido a que su presencia podría desestabilizar dicha estructura (Herrera Mendoza, 2004).

Por otra parte, algunos genes pueden expresarse en respuesta específica a la superficie que la bacteria ha escogido para establecerse y los genes que se expresan para adherirse a las superficies abióticas son diferentes dependiendo si son “nutritivas” o no.

Otros mecanismos bacterianos de fijación a una superficie son (Herrera Mendoza, 2004):

- ☞ la síntesis de celulosa, beneficiando la unión a superficies de plantas
- ☞ la modulación de la densidad celular para definir la posición sobre sí mismas, formando diferentes niveles de columnas las cuales se sumergen en el agua mediante la producción de vesículas de gas, síntesis de carbohidratos o formar agregados

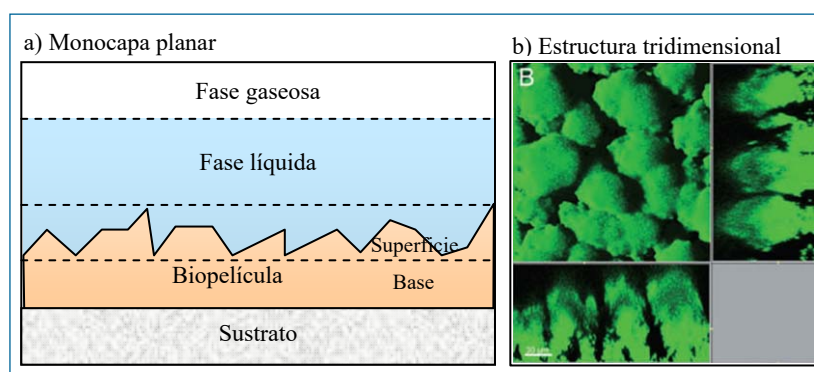
- ☞ los magnetosomas, son estructuras intracelulares consideradas de cristal o de mineral magnético rodeado por una membrana que causa el alineamiento pasivo de las células
- ☞ la congregación, la cual incrementa la interacción célula a célula así como la sedimentación celular; esta agrupación no solo favorece la unión a la superficie sino que brinda beneficios adicionales como la versatilidad fenotípica de las células hijas
- ☞ las adhesinas, las cuales les permite adherirse no solo a superficies sino interactuar con otras bacterias

La unión a la superficie es acompañada por la formación de microcolonias y, finalmente, se da la maduración de éstas dentro una matriz extracelular. Así se da inicio al ciclo de vida interdependiente de la comunidad de la biopelícula, en la cual cada una de las células actúa como parte integral de una población.

#### 1.4- Estructura de la biopelícula

En un modelo simple, Dahlem en 1988 propuso un modelo de monocapa planar en el cual el sistema de la biopelícula microbiana se divide en los compartimientos específicos: el sustrato, la biopelícula (subdividido en la base y la superficie de la biopelícula), la fase líquida y una posible fase gaseosa (De Beer, 2006); ver Figura 6.a.

Con el avance en las observaciones por microscopía, se evidenciaron estructuras de mayor complejidad en la cual la distribución de los microorganismos no es uniforme. Se pueden observar huecos, canales, cavidades y poros, pudiendo adherirse las células al sustrato formando varias capas, como puede observarse en la Figura 6.b. Los huecos y canales sirven de conexión entre el interior de la biopelícula y el medio líquido que lo rodea, aumentando la superficie de contacto y la efectiva transferencia de masa. A través de los canales, el líquido puede fluir, permitiendo el intercambio de sustratos y productos entre la fase acuosa y la superficie de la biopelícula en contacto.

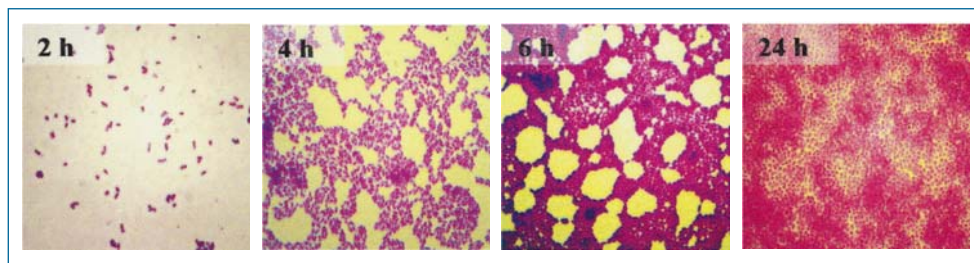


**Figura 6. Estructura de la biopelícula.**

a) Monocapa planar. Estructura de monocapa planar propuesta por Dahlem (adaptado de De Beer, 2006), corte transversal de la biopelícula.

b) Estructura tridimensional. Estructura tridimensional de una biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa*, por microscopía de barrido láser (MCL), vista superior y vista a partir de cortes laterales (Barkem, 2008).

En la Figura 7 puede observarse un ejemplo de una cinética de colonización de *Escherichia coli* sobre vidrio (cubreobjetos). Las células fueron teñidas con el colorante Cristal Violeta (CV) y cada muestra fue analizada por microscopía de campo claro. Puede apreciarse a corto tiempo una baja densidad bacteriana adherida a la superficie de manera difusa (2 h), incrementándose a mayor tiempo de exposición. Se van generando microcolonias (agregados celulares) en forma de pilares verticales y presentando una apariencia de una biopelícula madura hacia las 24 h (Sheikh, 2001). Se evidencia una colonización superficial heterogénea y regiones densamente colonizadas intercaladas con regiones poco colonizadas a las 6 h, e incluso la presencia de canales (valles poco colonizados entre las microcolonias en forma de pilares) a las 24 h.



**Figura 7. Biopelículas desarrolladas por *Escherichia coli* sobre cubreobjetos (adaptado de Sheikh, 2001).**

Las imágenes se corresponden a una cinética de colonización de una cepa de *E. coli* sobre vidrio utilizando un medio de cultivo mínimo con 0,4 %m/V glucosa como fuente de carbono a 37 °C. Las células fueron teñidas con Cristal Violeta (CV) y las imágenes se adquirieron por microscopía de campo claro.

Las propiedades físicas de la biopelícula son determinadas por la composición de la matriz extracelular, mientras que las propiedades fisiológicas son determinadas por el tipo de microorganismos.

En cuanto a las propiedades físicas, los EPS están vinculados desde el anclaje de las células al soporte, en el desprendimiento de los microorganismos de la matriz, en la fuerza mecánica de la película frente al flujo del medio líquido, en la resistencia a los antimicrobianos hasta en la actividad de degradación de los nutrientes por exoenzimas liberadas. Las propiedades superficiales e intersuperficiales, los nutrientes disponibles, el tipo de bacterias que conforman la comunidad microbiana y la hidrodinámica hacen parte de las numerosas condiciones que pueden afectar al desarrollo de la biopelícula. La forma de la biopelícula puede diferir dependiendo de las condiciones ambientales bajo las cuales se formó (Harsem, 2010; Goeres, 2009).

La biología microbiana afecta estructuralmente a la biopelícula: la población de células presenta diferentes tasas de crecimiento reflejándose en la heterogeneidad de los micronichos. El manejo de la disponibilidad de nutrientes es diferente de acuerdo a la ubicación que tengan las células dentro de la comunidad.

En las biopelículas que están formadas por múltiples especies, puede existir una asociación entre organismos metabólicamente cooperativos, dado que la proximidad interespecies facilita el cambio de sustratos y la distribución de productos metabólicos. La cercanía entre las células facilita la transferencia horizontal de genes, plásmidos o bacteriófagos lo cual es importante para la diversidad genética de las comunidades microbianas naturales. Los virus pueden causar la lisis bacteriana, de ahí que los fagos contribuyen a estructurar y reestructurar las comunidades bacterianas (Herrera Mendoza, 2004).

### **1.5- Matriz extracelular**

La matriz de exopolímeros conforma la interfase entre la célula y el medio exterior influyendo en el intercambio químico y disponibilidad de nutrientes necesarios para el metabolismo microbiano. La composición de la matriz es compleja, está formada por polímeros secretados por las células, nutrientes y metabolitos adsorbidos, productos de lisis celular y material particulado del ambiente circundante. Se pueden encontrar peptidoglicanos, lípidos, fosfolípidos, proteínas, polisacáridos, ADN, ARN, entre otros (Singh, 2006; Dunne, 2002; Sutherland, 2001). La proporción puede variar entre un 50% y 80% de material orgánico. Las proteínas constituyen el componente más abundante de la matriz, cerca del 50% de la misma, mientras que los polisacáridos oscilan entre 5% y 20%. Contiene metales, aniones, cationes y toxinas, los cuales pueden ser la clave para la transferencia genética. Actúa como una barrera protectora frente a una gran variedad de condiciones de estrés ambiental (como radiación ultravioleta, cambios de pH, shock osmótico o desecación).

La composición y función de la matriz extracelular está vinculada con los procesos y propiedades integrales de la biopelícula: la adhesión, el desprendimiento celular, la fuerza mecánica, la resistencia a antibióticos y las actividades de degradación exoenzimática.

Entre los beneficios atribuidos a los exopolímeros como parte integral de la estructura organizacional se destaca el que actúan como un mecanismo de concentración de nutrientes, aún se desconoce el mecanismo por el cual desarrollan esta actividad (Herrera Mendoza, 2004).

### **1.6- Ambientes donde se desarrollan las biopelículas**

Las biopelículas pueden desarrollarse en una gran diversidad de ambientes y condiciones y son responsables de la mayoría de las conversiones microbianas en muchos ecosistemas acuáticos. Hay que destacar que las “esteras o tapices” (*mats*) microbianos están formados sobre la superficie de sedimentos, especialmente, de

| Ambiente   | Ejemplos de biopelícula  | Espesor (m)         | Comunidades  |
|------------|--|---------------------|--|
| Natural    | Esteras microbianas fotosintéticas, en aguas termales o lagos hipersalinos | $10^{-3} - 1$       | Comunidades mixtas de algas y bacterias                                      |
|            | Estromatolitos   | 1                   | Bacterias  |
|            | Bentónicas, en sedimentos de ríos  | $10^{-6} - 10^{-3}$ | Comunidades mixtas de bacterias, algas y protozoos                           |
| Clínico    | Placa dental   | $10^{-6} - 10^{-4}$ | Comunidades mixtas de bacterias  |
|            | Infecciones  | $10^{-6} - 10^{-3}$ | Monocultivos de bacterias o de hongos  |
| Industrial | En conductos de intercambio de calor                                       | $10^{-6} - 10^{-3}$ | Comunidades mixtas de bacterias y hongos                                     |
|            | En cañerías de conducción de agua potable                                  | $10^{-6} - 10^{-2}$ | Comunidades mixtas de bacterias y hongos                                     |
|            | Tratamientos de efluentes  | $10^{-4} - 10^{-2}$ | Comunidades mixtas de bacterias y hongos, biopelículas, agregados y flóculos |
|            | En equipos de filtración   | $10^{-5} - 10^{-4}$ | Comunidades mixtas de bacterias y hongos                                     |
|            | Sobre los casco de barcos  | $10^{-4} - 10^{-2}$ | Comunidades mixtas de bacterias y algas y macroorganismos marinos            |

**Tabla 1. Ejemplos de biopelículas y comunidades de microorganismos que lo componen (adaptado de De Beer, 2006).**

ambientes de condiciones extremas (en cuanto a temperatura y salinidad). Mientras que los flóculos (*flocs*) son estructuras más frágiles suspendidas en el agua (ya sea en agua continental como en agua marina). Según el ambiente en el que se desarrolla, la biopelícula puede ser natural, clínica o industrial (De Beer, 2006). En la Tabla 1 podrán encontrarse diferentes ejemplos de biopelículas y las comunidades que las conforman habitualmente.

La flexibilidad natural de la expresión genética bacteriana permite la supervivencia de las bacterias en diversos ambientes donde las condiciones van cambiando rápidamente y deben adaptarse al ritmo de los cambios (Singh, 2006).

La transformación, la transducción y la conjugación en las biopelículas bacterianas son las vías de transferencia de genes entre los microorganismos. Se ha observado que la frecuencia de transferencia genética dentro de una biopelícula es alta y se encuentra automáticamente promovida por la densidad de población y por la estructura empaquetada de la biopelícula (Singh, 2006). Esta propiedad puede ser explorada para mejorar la eficiencia de biorreactores en los que la degradación de los compuestos está limitada por la densidad bacteriana y la expresión de los genes degradativos correspondientes.

### 1.7- Técnicas comunes para el análisis de biopelículas

El estudio de las biopelículas involucra diferentes técnicas de estudio y análisis, siendo las técnicas más comunes (Singh, 2006):

- ☞ observación directa: como puede ser microscopía de campo claro, de fluorescencia; de escaneado láser, es utilizada para un análisis de la morfología y cuantificación
- ☞ métodos moleculares: como hibridación *in situ* o el análisis de secuencia comparativa, se utiliza para analizar las comunidades
- ☞ marcación fluorescente: fluorescencia combinada con microautoradiografías y microsensores, se utiliza para la caracterización de comunidades de la biopelícula
- ☞ detección de expresión genética: ensayos de proteínas, tecnologías de expresión *in vivo* (IVET), recombinación basada en IVET (RIVET), investigación de actividad genética PCR, PCR *in situ*, caracterización de propiedades filogenéticas y genéticas

En cuanto a las técnicas por microscopía, en la Tabla 2 se encuentran detalladas las técnicas más comunes utilizadas para el estudio de las biopelículas señalando las ventajas y limitaciones de cada una (Rajarao, 2016). Combinando diferentes técnicas entre sí, se puede describir la biopelícula de manera más precisa.

Es común analizar las biopelículas a partir de la microscopía por escaneo láser confocal (CLSM) acoplada al análisis de las imágenes. Si bien se trabaja con la biopelícula intacta (sin alterarla) es un análisis de la microescala (Pavissich, 2014).

### **1.8- Aspectos positivos de las biopelículas**

Las biopelículas pueden presentar funciones benéficas como ocurre en la fijación de nitrógeno en el suelo, intervienen en la producción de compuestos químicos de interés a escala industrial o bien se utilizan en procesos de biorremediación (es decir, degradación biológica de compuestos contaminantes que han sido vertidos con conocimiento o accidentalmente al medio ambiente) (Vullo, 2006).

Industrialmente, las biopelículas de especies simples (una única especie) son importantes debido al mayor control de las condiciones y la maximización del producto de interés (Qureshi, 2005). Las biopelículas de una única especie bacteriana son utilizadas industrialmente para producir compuestos químicos, como la producción de etanol, butanol, 2-3 butanodiol, ácido acético, ácido láctico, ácido succínico o ácido fumárico.

Las biopelículas de multiespecies bacterianas (biopelículas mixtas) son utilizadas industrialmente para llevar a cabo varios objetivos, como en las plantas de tratamiento de aguas residuales, o incluso en la remoción de compuestos orgánicos o de metales contaminantes. La biorremediación mediada por biopelículas presenta una alternativa prometedora y segura frente al crecimiento planctónico debido a la adaptabilidad frente a los cambios y a la supervivencia (en especial durante períodos de estrés).



| Técnica  | Ventajas   | Limitaciones   |
|--|--|--|
| <b>Microscopía por Escaneo Láser (LSM)</b>                       | <p>Analizar la muestra <i>in situ</i></p> <p>Permite usar muestras hidratadas</p> <p>Análisis dependiente, permite la visualización específica de células/característica</p> <p>Análisis 3D de macromoléculas, células y comunidades</p> <p>Análisis multicanal (múltiples pruebas en simultáneo)</p> <p>Flexibilidad en tinciones y montaje</p> | <p>Requiere penetración del láser</p> <p>Limitado a pruebas que deben realizarse en el momento</p> <p>Limitado a compuestos marcados para poder ser detectados</p>   |
| <b>Imagen por Resonancia Magnética (MRI)</b>                     | <p>Analizar la muestra <i>in situ</i></p> <p>Permite usar muestras hidratadas</p> <p>Análisis independiente</p> <p>Permite analizar especies químicas</p> <p>Adecuado para estudiar estructura, flujo y transporte dentro de la biopelícula</p>  | <p>Lento con muestras ferromagnéticas, incluso imposibilitando el estudio</p> <p>Requiere experiencia en mediciones biológicas</p> <p>Requiere muestreo y análisis de datos</p>  |
| <b>Microscopía por Escaneo de Transmisión de Rayos-X (STXM)</b>  | <p>Analizar químicamente la muestra <i>in situ</i></p> <p>Permite usar muestras hidratadas</p> <p>Análisis independiente, no requiere ni fijación ni tinción</p> <p>Análisis de sustancias orgánicas e inorgánicas</p> <p>Especiación de estructuras moleculares</p> <p>Imagen topográfica</p> <p>Resolución menor a 50 nm</p>                   | <p>Daño de la muestra debido a la radiación</p> <p>Adecuado para muestras muy delgadas (&lt;200 nm)</p>  |
| <b>Microscopía por Fuerza Atómica (AFM)</b>                      | <p>Permite el análisis en condiciones casi fisiológicas</p> <p>Preparación simple de las muestras</p> <p>Información de la nanoestructura y nanomecanismos de la muestra celular</p> <p>Provee información topológica</p> <p>Adecuado para el análisis de la adhesión celular y la elasticidad</p>   | <p>Se escanea un área pequeña y lenta velocidad de escaneo</p> <p>Imágenes con distorsiones (artefactos) si no se optimizó el proceso</p> <p>Difícil escanear bordes empinados o presencia de “aleros” en la biopelícula</p> |
| <b>Microscopía Raman (RM)</b>                                    | <p>Análisis no destructivo de la muestra</p> <p>“Huella dactilar” de la composición química de la bacteria</p> <p>Datos de la información bioquímica</p> <p>Simple preparación de la muestra</p>   | <p>El efecto Raman es muy débil, la aproximación debe ser altamente optimizada</p> <p>Fluorescencia de impurezas</p> <p>Puede destruir la muestra por efecto del calentamiento por radiación</p>                             |
| <b>Espectroscopía de Raman para Mejorar la Superficie (SERS)</b> | <p>Mejora por escaneo de Raman</p> <p>Provee un espectro químico (composición) de las células vivas</p>  | <p>El efecto Raman es muy débil, la aproximación debe ser altamente optimizada</p> <p>Fluorescencia de impurezas</p> <p>Fotodegradación de la muestra</p>  |
| <b>Microscopía Electrónica de Escaneo Ambiental (ESEM)</b>       | <p>Utilizada para analizar muestras biológicas hidrolizadas</p> <p>Resolución espacial 10 nm o menor</p> <p>Tiempo de análisis mínimo</p>  | <p>Información de un pequeña área</p>  |
| <b>Microscopía por Escaneo Acústico (SAM)</b>                    | <p>Puede ser utilizado para cuantificar muestras espesas y propiedades mecanoelásticas</p>   | <p>Procesamiento lento de la muestra</p> <p>Requiere agentes de contrastes ligados a un ligante marcado</p>  |

Tabla 2. Ventajas y limitaciones de algunos métodos microscópicos (adaptado de Rajarao, 2016).



### 1.9- Aspectos negativos de las biopelículas

Las biopelículas mixtas son importantes tanto industrial como clínicamente debido a problemas que pueden causar. Su control requiere un gran esfuerzo y son pocas las herramientas desarrolladas, hasta el momento, en contra de estas comunidades resistentes. Se tratan de desarrollar “antibióticos capaces de penetrar en las biopelículas y fármacos que interfieran en la comunicación intracelular y en la consecuente formación de biopelícula” (Madigan, 2003).

En la industria, el desarrollo de biopelículas puede reducir el flujo de un líquido (como agua o aceite) conducido a través de una tubería y puede acelerar la corrosión de las mismas cañerías. Son responsables de iniciar la corrosión de todos los objetos sumergidos, como los componentes estructurales de las plataformas marítimas de petróleo, los barcos e instalaciones petroleras. El proceso se inicia como producto de las bacterias anaeróbicas sobre la base de la biopelícula. Algunas de estas bacterias son capaces de metabolizar el carbono presente en tuberías de acero; algunas otras producen ácidos como subproductos de su metabolismo, los cuales aceleran el proceso de corrosión. Se producen elevadas pérdidas económicas debido a la corrosión de los diversos materiales, como así también la calidad del agua se ve afectada por la formación de las biopelículas desarrolladas en interior de los caños de distribución (Bajpai, 2015).

Clínicamente, las biopelículas constituyen una fuente de infecciones persistentes. Están vinculadas con fibrosis quística, en diversas alteraciones dentales (como periodonitis o caries), intervienen en la formación de cálculos en el riñón, en la tuberculosis, en infecciones por *Staphylococcus*, en implantes médicos (como catéteres urinarios o implantes a largo plazo). En una biopelícula madura, los microorganismos presentan mayor resistencia a los agentes antimicrobianos al estar protegidos por la matriz de exopolímeros. Esta matriz actúa como una biobarrera que protege a las células del ataque del sistema inmunológico y de la acción de antimicrobianos.

Los mecanismos por los cuales se hacen más resistentes aún no se conocen con precisión, pero se ha considerado la inactivación de antibióticos por polímeros extracelulares o modificaciones enzimáticas. Así como la baja disponibilidad de nutrientes contribuye a una baja tasa de crecimiento, los cambios fenotípicos que adquiere la población bacteriana dentro de la biopelícula ayudan a la persistencia bacteriana. La heterogeneidad en la estructura de la biopelícula formando huecos y canales en las microcolonias, restringe la difusión de los mismos antimicrobianos.

La disminución de la tasa de crecimiento es otro factor considerado como responsable de la resistencia de la biopelícula. Dado que los antibióticos son efectivos

en el ataque rápido de las células en la fase de crecimiento, condición que es absolutamente requerida por algunos antibióticos como la penicilina o la ampicilina (cuyas tasas de ataque son proporcionales a la tasa de crecimiento). Algunos de los antibióticos más avanzados (como cefalosporinas, aminoglicósidos y fluoroquinolonas) pueden atacar a células en la fase estacionaria, pero, sin embargo, son más efectivos en el ataque a células en proceso de división celular.

Otro mecanismo por el cual la disminución del crecimiento contribuye a la resistencia de la biopelícula es el gradiente químico que se establece dentro de la misma: el oxígeno es conocido por modular la acción de los aminoglicósidos y los gradientes de pH pueden impactar negativamente en la eficiencia de los antibióticos.

Otro factor a considerar es que en respuesta a las fluctuaciones ambientales (cambios de temperatura, potencial redox, baja disponibilidad de oxígeno, pH, condiciones hidrodinámicas o daños en el ADN) (Bajpai, 2015), las bacterias expresan genes de resistencia. Estos se transfieren entre bacterias por mecanismos tales como la conjugación, logrando una estrategia de supervivencia específica, como las bombas de flujo dando multiresistencia a los medicamentos, expresada por *E. coli* en respuesta al cloramfenicol. Muchas de estas respuestas han sido bien caracterizadas molecular y genéticamente para cada caso en particular. La sensibilidad de la bacteria es usualmente restablecida cuando la célula bacteriana es separada de la biopelícula. Esta reversión rápida sugiere un mecanismo adaptativo de resistencia más que una alteración genética.

El último factor considerado recientemente es la persistencia y la tolerancia a los desinfectantes. Las bacterias de la biopelícula no solo evaden el ataque de los antibióticos, también resisten a los desinfectantes químicos como el hipoclorito y el glutaraldehído. La persistencia de una subpoblación de células puede considerarse como la razón de esta resistencia.

Para evitar este problema se ha propuesto el desarrollo de medicamentos que eviten la adherencia o inhiban la persistencia de los microorganismos, teniendo como blanco a los genes responsables del desarrollo de las biopelículas para los microorganismos de relevancia clínica.

## **2- Procesos de remediación de metales**

### **2.1- Contaminación por metales**

El incremento de la actividad industrial en las últimas décadas ha incrementado considerablemente los problemas de contaminación ambiental con el consecuente deterioro de diversos ecosistemas debido a la acumulación de diferentes

contaminantes, tales como metales tóxicos o compuestos recalcitrantes. En particular, la contaminación por metales es un serio problema a nivel mundial y muy difícil de resolver debido a su creciente acumulación en la cadena alimentaria y continua persistencia en los ecosistemas (Liu, 2017; Chen, 2005; Zouboulis, 2004).

El término *metal pesado* es un término controvertido e impreciso, usado por mucho tiempo para referirse al elemento o incluso a los compuestos derivados del mismo (Hodson, 2004; Duffus, 2002). Desde un punto de vista fisiológico, los metales pueden clasificarse en tres grupos teniendo en cuenta sus propiedades de acidez de Lewis:

- a) esencial y básicamente no tóxico
- b) esencial pero perjudicial a altas concentraciones
- c) tóxicos.

Dicha clasificación se basa en la tendencia general en formar complejos y en la preferencia de los ligandos con los cuales los iones metálicos se complejaran (Hodson, 2004; Duffus, 2002). El primer grupo lo constituyen los metales que tienen funciones de ser macronutrientes de los microorganismos, plantas y animales, como por ejemplo litio (Li), sodio (Na), magnesio (Mg), hierro(III) (Fe(III)), etc. (metales Tipo A). En el segundo grupo se encuentran los metales que actúan como micronutrientes de los organismos (en bajas concentraciones) tales son los casos de manganeso (Mn), cobre (Cu) o cinc (Zn) (metales frontera *-border-*). Y en el último grupo se encuentran aquellos metales que forman complejos más estables que los metales anteriores, como por ejemplo cadmio (Cd), mercurio (Hg), plomo (II) (Pb(II)) (metales Tipo B).

Los ácidos blandos (metales Tipo B, menos  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  y  $Bi^{3+}$ ) son cationes que prefieren ligandos con azufre o nitrógeno en sus estructuras. Mientras que metales Tipo A preferentemente forman complejos con ligandos que presenten átomos de oxígeno en sus estructuras (Fomina, 2014).

“El impacto ambiental que producen contaminantes metálicos en suelos y sedimentos es estrictamente dependiente de la capacidad de complejamiento de éstos con componentes del medio ambiente y su respuesta a las condiciones fisicoquímicas y biológicas de su entorno. Los metales son especies químicas no degradables. Por tal motivo, una vez volcados al medio ambiente, sólo pueden distribuirse entre los entornos aire-agua-suelo, a veces cambiando su estado de oxidación, o incorporarse a los seres vivos” (Vullo, 2003). En los entornos naturales, la incorporación de los metales en los sedimentos es la resultante de la competencia entre los procesos de adsorción sobre los sedimentos frente a la formación de complejos con los ligandos presentes en las aguas. Dependiendo de las fuerzas de los ligandos en las aguas superficiales, la concentración de un metal dado en las aguas puede incrementarse considerablemente debido al complejamiento de los cationes adsorbidos en los

sedimentos. Al mismo tiempo, a mayor concentración de iones metálicos en las aguas superficiales como producto del vertido de efluentes contaminados, se incrementa la concentración del metal en los sedimentos debido a los diferentes procesos de adsorción. No obstante, las mayores concentraciones de metal se encuentran en los sedimentos, siguiendo en las aguas intersticiales (debido al contacto directo con los mismos) y, por último, en las aguas superficiales.

Para resolver el problema de la contaminación se deben llevar a cabo procesos de remediación, es decir, “uso intencional de procesos de degradación [o de remoción] químicos/[as] o biológicos/[as] para eliminar sustancias contaminantes ambientales que han sido vertidos con conocimiento o accidentalmente en el medio ambiente” (Vullo, 2003). Estos procesos de remediación pueden desarrollarse en el mismo lugar contaminado (*in situ*) o bien separando una fracción de muestra contaminada y trasladándola a un reactor para su tratamiento (*ex situ*), como, por ejemplo, son tratados los efluentes industriales o domiciliarios.

Respecto de los metales, estos mismos se encuentran en el ambiente debido al aporte de dos fuentes diferentes, las naturales y las antropogénicas (Hodson, 2004). Las fuentes naturales son producto del lixiviado geológico, la actividad volcánica o la excreción animal. Mientras que las fuentes antropogénicas principales de contaminación por metales son las industrias relacionadas con procesos metalúrgicos, las galvanoplastias, la manufactura del plástico, la producción y el uso de fertilizantes y pigmentos, entre otros (Vullo, 2003).

Los cationes de los metales de transición son reconocidos como problemáticos desde el punto de vista ambiental y muchos cursos de agua se encuentran contaminados por Cd, Zn, Cu, Pb, Hg, Ni o Co, provocando graves problemas a la salud (Hodson, 2004; Diels, 2003). La imposición de regulaciones estrictas incrementa la demanda para desarrollar tecnologías de tratamiento innovadoras para remover los metales de los efluentes contaminados (Zouboulis, 2004).

### **2.1.a- Zn**

El cinc es uno de los elementos más comunes en la corteza terrestre, se encuentra en el aire, el suelo y el agua, y está presente en todos los alimentos. El Zn puro es un metal brillante blanco-azulado.

Posee muchos usos comerciales, como revestimiento para prevenir la corrosión de materiales ferrosos, en compartimientos de baterías secas y, mezclado con otros metales, para fabricar aleaciones como el latón y el bronce. Cierta cantidad de zinc es liberada al ambiente por procesos naturales, pero la mayor parte proviene de actividades antropogénicas. Tales como la minería, producción de acero, combustión

de petróleo e incineración de residuos, siendo la fuente principal de contaminación los efluentes industriales. Constituye uno de los componentes mayoritarios de los barros de las aguas residuales, limitando la disposición de los mismos (Le Cloirec, 2005). Se adhiere al suelo, sedimentos y a partículas de polvo en el aire. La lluvia y la nieve remueven las partículas de polvo con zinc del aire, arrastrándolas al suelo. La mayor parte del Zn en el suelo permanece adherido a partículas del mismo y no se disuelve en agua. Dependiendo del tipo de suelo, algunos compuestos de zinc pueden movilizarse a las aguas subterráneas o superficiales (lagos, arroyos y ríos).

Desde el punto de vista biológico, es un oligoelemento esencial (Majumder, 2016) que es crucial para la supervivencia y el mantenimiento de la salud, así como el crecimiento, desarrollo y maduración de los organismos de todas las especies animales, siendo los alimentos la principal fuente de incorporación. La ingesta diaria recomendada de zinc es de 7 mg/día según el Código Alimentario Argentino (CAA)<sup>2</sup>. Es esencial para la función de más de 300 enzimas (incluyendo fosfatasa alcalina, alcohol deshidrogenasa o superóxido dismutasa). Interviene en el buen funcionamiento del sistema inmunitario, como también en el funcionamiento de los sentidos del gusto, del olfato y de la vista, incluso en el buen desarrollo de los órganos sexuales y del crecimiento en general, el desarrollo de los huesos y en la cicatrización de heridas. No hay información adecuada para evaluar el potencial carcinogénico del Zn, ya que los estudios de las personas ocupacionalmente expuestas al mismo son insuficientes o no concluyentes. No están disponibles los bioensayos en animales adecuados sobre la posible carcinogenicidad del Zn, y los resultados de las pruebas de genotoxicidad han sido contradictorios según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2006)<sup>3</sup>. La exposición a grandes cantidades de Zn puede ser perjudicial, puede conducir a trastornos neurosensoriales y neuropsiquiátricos, puede causar calambres estomacales y anemia, como también alterar los niveles de colesterol (Pani, 2017). Está reportado que en cantidades superiores a 80 mg/día de Zn<sup>2+</sup> puede generar mal funcionamiento en los riñones (Majumder, 2016).

El Zn puede hallarse tanto en aguas superficiales como en aguas subterráneas en concentraciones inferiores a 0,01 y 0,05 mg/L, respectivamente, de acuerdo a la OMS. La Agencia de Protección Ambiental de EE.UU. (US-EPA) recomienda que el agua potable contenga menos de 5 mg/L<sup>4</sup> de acuerdo a la Agencia para Sustancias Tóxicas

---

<sup>2</sup> Ver Anexo A del Código Alimentario Argentino ([http://www.msal.gob.ar/argentina-saludable/pdf/CAPITULO\\_V.pdf](http://www.msal.gob.ar/argentina-saludable/pdf/CAPITULO_V.pdf)).

<sup>3</sup> Ver guía recomendada para el agua potable de la OMS ([http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/gdwq3\\_es\\_full\\_lowres.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_full_lowres.pdf)).

<sup>4</sup> Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades del Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU ([http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es\\_toxfaqs\\_index.html](http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_toxfaqs_index.html)).

y el Registro de Enfermedades del Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU (ATRSDR).

### **2.1.b- Cd**

El cadmio es un metal relativamente poco abundante en la naturaleza. No se encuentra en estado puro sino que asociado a metales como Zn, Pb y Cu. Se puede hallar tanto en la atmósfera, el agua o el suelo.

De forma natural, la incorporación de Cd al agua superficial se lleva a cabo a partir del lixiviado de las rocas (acrecentado por las actividades mineras) y una baja cantidad es liberada a la atmósfera a través de los incendios forestales o la actividad volcánica. Desde el punto de vista de las actividades antropogénicas, el Cd es utilizado en las pilas recargables de níquel-cadmio, en pigmentos, en estabilizadores, en revestimientos y en compuestos electrónicos específicos (como el telurio de cadmio) o mezclas. En la mayoría de los productos, se encuentra como impureza en los metales no ferrosos -Zn, Pb y Cu-, en el hierro y en el acero, en combustibles fósiles, en cemento y en fertilizantes fosforados. En cuanto a fuentes de contaminación ambiental más importantes por este metal lo constituyen las descargas industriales, los residuos mineros y las actividades de electrodeposición metálicas (Le Cloirec, 2005).

Desde el punto de vista biológico, es un elemento no esencial para los organismos y es altamente tóxico por lo que su eliminación del medio ambiente es prioritaria (US-EPA, ATRS DR, 1979). Es uno de los metales tóxicos emitidos al ambiente que más se acumula en los alimentos y es tóxico para la biota acuática (Le Cloirec, 2005). La principal fuente de exposición diaria al cadmio son los alimentos, el consumo de tabaco es una fuente adicional significativa de exposición al metal. La adsorción de Cd depende de la solubilidad de cada compuesto al que esté asociado, siendo las vías más importantes de ingreso al organismo la oral y por inhalación. El Cd reemplaza al Zn en las actividades metabólicas (Le Cloirec, 2005). La mayor parte se deposita en los riñones y parte en el hígado, se elimina lentamente principalmente por la vía renal, aunque también puede eliminarse por la vía intestinal y las faneras. Tiene una vida media larga en el organismo, de unos 15 años aproximadamente. Una vez que ingresa al torrente sanguíneo, entre el 90 y el 95%, se fija a la hemoglobina y a la metalotioneína. Puede causar diarreas y vómitos severos, incluso debilitamiento óseo. Es carcinogénico, embriotóxico, teratogénico y mutagénico, puede causar hiperglicemia, reducir el sistema inmunológico y anemia, debido a que interfiere con el metabolismo del hierro (Acosta, 2007). Según la OMS, hay pruebas de que es cancerígeno por inhalación, no obstante no hay pruebas de que sea cancerígeno por vía oral ni pruebas concluyentes de su genotoxicidad.

De acuerdo a la OMS, el valor de referencia en el agua de consumo debe ser de 0,003 mg/L, según la US-EPA, el nivel máximo aceptado en aguas para uso doméstico es 0,005 mg/L (Green-Ruiz, 2007). La presencia de Cd como impureza en las tuberías galvanizadas, soldaduras y accesorios metálicos de plomería puede contaminar el agua de consumo con dicho metal.

## 2.2- Marco normativo vigente en Argentina que establece los límites de descarga para Zn y Cd

La Ley Nacional 24.051 (sancionada en el año 1992) establece en el Art. 2: “Será considerado peligroso, a los efectos de esta ley, todo residuo que pueda causar daño, directa o indirectamente, a seres vivos o contaminar el suelo, el agua, la atmósfera o el ambiente en general”. En el Anexo I de dicha ley, se detallan las categorías sometidas a control y establece que los desechos que tengan Cd o Zn son residuos peligrosos (designando con el código Y23 e Y26, respectivamente), debiendo ser tratados todo residuo previamente a su disposición final.

En el Anexo A de la Disposición 79179/90 de alcance nacional se regula el límite permisible de vertido de Cd en 0,1 mg/L (ver Tabla 3.a). Siendo los mismos valores límites regulados en el Anexo B “Límites transitoriamente tolerados” y en el Anexo C “Límites permisibles en pozos absorbentes”. La técnica analítica para determinar la cantidad de Cd debe ser “Método por espectrometría de absorción atómica de acuerdo a *Standard methods for the examination of water and wastewater* -16<sup>o</sup> edición- (Anexo D de dicha disposición). La Resolución 242/93 de la Nación, en la que se encuentran las “Normas para los vertidos de establecimientos industriales o especiales alcanzados por el Decreto 674/89”, fija el límite para el Cd en el mismo valor (0,1 mg/L), no hallándose un valor límite para el Zn en dicha normativa<sup>5</sup>.

| Metal | Límite de descarga (mg/L) a: |                  |               |
|-------|------------------------------|------------------|---------------|
|       | Colectora Cloacal            | Conducto Pluvial | Curso de agua |
| Cd    | 0,1                          | 0,1              | 0,1           |

Tabla 3.a. Límites de descarga impuesta por la normativa vigente de la República Argentina.

La Ley 26.221<sup>6</sup> (sancionada en el año 2007, convenio tripartito entre el Ministerio de Planificación Federal, Inversión Pública y Servicios, la Provincia de Buenos Aires y el

<sup>5</sup> La Normativa Nacional fue consultada vía web en el Marco Legal de la Jefatura de Gabinete de Ministros del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Presidencia de la Nación: [http://www2.medioambiente.gov.ar/mlegal/marco/menu\\_marco.asp](http://www2.medioambiente.gov.ar/mlegal/marco/menu_marco.asp) (como así también, se utilizó el buscador de dicha página para buscar límites puntuales, como en [http://www2.medioambiente.gov.ar/mlegal/residuos/menu\\_residuos.asp](http://www2.medioambiente.gov.ar/mlegal/residuos/menu_residuos.asp))

<sup>6</sup> Ver <http://infoleg.mecon.gov.ar/infolegInternet/anexos/125000-129999/125875/norma.htm>.



Gobierno de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires) conforma el “Marco regulatorio para la concesión de los servicios de agua potable y desagües cloacales”. El Art. 17 se refiere a “los efluentes industriales serán obligatoriamente vertidos a la red cloacal operada por la Concesionaria cuando cumplan con las normas establecidas en el presente Marco Regulatorio, [...] deberán ajustarse a las normas aplicables relativas a la calidad, concentración de sustancias y volumen de acuerdo a lo indicado en el Anexo B [...]. Está prohibido arrojar o verter residuos peligrosos, especiales y/o patogénicos así como también barros u otros residuos contaminantes en el sistema de desagües cloacales operados por la Concesionaria como método de disposición”. En el Art. 122, referido a contaminación hídrica, se encuentran las “normas mínimas de calidad del agua producida y distribuida”, siendo 5 mg/L el límite para Zn y 0,005 mg/L para Cd (como los valores de referencia de US-EPA). Y en el Anexo B del mismo, se detallan las normas para desagües cloacales siendo para Cd 0,1 mg/L el límite de volcado (tanto para desagües a cuenca o descarga a cuerpo receptor sea sin tratamiento, con tratamiento primario o con tratamiento secundario).

De acuerdo a la normativa vigente de la Provincia de Buenos Aires, el Anexo II de la Resolución N° 389/1998<sup>7</sup> se regulan los límites de descarga tanto para la descarga de Cd como para la de Zn, ver Tabla 3.b. Siendo la concesionaria encargada del tratamiento de las aguas residuales la responsable de ajustar los parámetros para la disposición final tanto de los barros como de los efluentes líquidos tratados.

| Metal | Límite de descarga (mg/L) a: |   |                            |             |
|-------|------------------------------|---|----------------------------|-------------|
|       | Colectora Cloacal            | Conducto Pluvial o cuerpo de agua superficial | Absorción por el suelo (*) | Mar Abierto |
| Zn    | ≤ 5,0                        | ≤ 2,0   | ≤ 1,0                      | ≤ 5,0       |
| Cd    | ≤ 0,5                        | ≤ 0,1   | Ausente                    | ≤ 0,1       |

**Tabla 3.b. Límites de descarga impuesta por la normativa vigente de la Provincia de Buenos Aires.**

(\*) En “Absorción por el suelo” deben comprenderse solamente a las lagunas facultativas y riego por aspersión. Queda expresamente prohibida la inyección a presión en el suelo o en la napa en forma directa o indirecta de los efluentes líquidos tratados o no tratados de ningún tipo de establecimiento. En la descarga a conducto superficial, absorción por el suelo o vuelco a mar abierto el líquido residual tratado debe tener satisfecha la demanda de cloro.

<sup>7</sup> Ver <http://www.estrucplan.com.ar/Legislacion/Buenos%20Aires/Resoluciones/Agosba/1998/Res00389-98-Anexo2.asp>  
<http://normasambientales.com/ver-norma-resolucin-3362003-modificacin-de-la-resolucin-3891998-sobre-normas-de-calidad-de-agua-874.html>



| Método                            | Ventajas   | Desventajas  |
|-----------------------------------|--|--|
| <b>Precipitación Química</b>      | Simple<br>Bajo costo (relativamente)                 | Dificultad en la separación<br>Disposición de los barros tóxicos producidos  |
| <b>Tratamiento electroquímico</b> | Recuperación del metal                               | Aplicable a altas concentraciones del metal<br>Sensible a condiciones de trabajo específicas, tales como presencia de compuestos que interfieren |
| <b>Ósmosis inversa</b>            | Efluente puro y residuo disponible para su reciclado | Aplicación de altas presiones<br>Escalado y calidad de las membranas<br>Alto costo   |
| <b>Intercambio iónico</b>         | Efectivo<br>Posibilidad de recuperar el metal        | Sensible a la presencia de partículas<br>Elevados costos de las resinas  |
| <b>Adsorción</b>                  | Sorbentes convencionales                             | No es muy efectivo para ciertos metales  |

Tabla 4. Tratamientos convencionales de remoción de metales.

## 2.3- Tratamiento de efluentes con contenido de metales

### 2.3.a- Tratamientos convencionales

Una aplicación efectiva de un método de remediación *in situ* “depende del conocimiento de los factores hidrológicos y geológicos del sitio, la solubilidad y especiación de los metales, los procesos de atenuación e inmovilización y la medida en que los metales puedan dispersarse tanto horizontal como verticalmente a medida que migran por el suelo” (Vullo, 2003). Particularmente, para el caso de efluentes con metales es conveniente desarrollar técnicas *ex situ* para su remediación. Las técnicas tradicionales de remediación de metales de efluentes acuosos se resumen en la Tabla 4, en la misma se destacan las ventajas y desventajas de cada tratamiento. Una de las técnicas más efectiva para el tratamiento de metales es la adsorción (Liu, 2017)

La aplicación de los procesos tradicionales de remediación está restringida tanto por el desarrollo tecnológico como por el capital económico invertido. Uno de los aspectos a considerar en la selección es la especificidad del metal en particular a tratar y otro aspecto es evaluar la posible competencia por la presencia de otros metales en el efluente.

Particularmente, los tratamientos convencionales para potabilizar las aguas para consumo humano no están preparados para remover trazas de metales del agua, exponiendo de ésta forma a toda la población (Malik, 2004). Esto es debido a que las técnicas convencionales son efectivas cuando la cantidad de metal se encuentra en

torno (o supera) a los 100 mg/L (las técnicas de intercambio iónico, precipitación y procesos electroquímicos no son demasiado efectivas en torno a los 100 mg/L). Es por tal que deben desarrollarse técnicas que puedan remover metales de las aguas cuando la concentración de los mismos esté por debajo de dicho límite (o incluso, estén en cantidades de trazas).

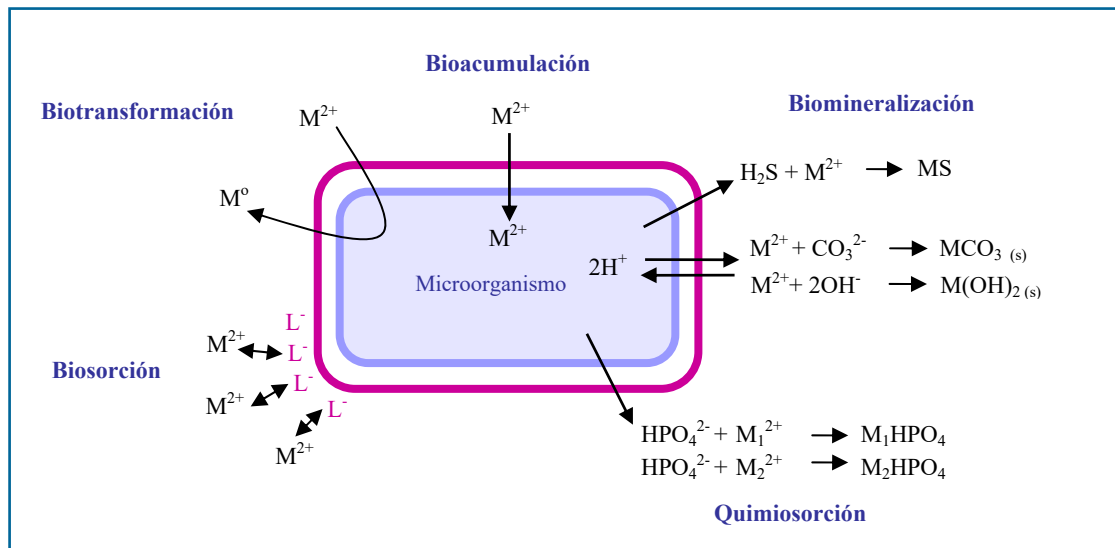
### 2.3.b- Biorremediación y biosorción

En los últimos tiempos, la búsqueda de nuevas tecnologías ha sido dirigida a la aplicación de métodos biológicos de remediación (tanto para la remoción como recolección efectiva de metales) dado que constituyen una atractiva alternativa a los métodos tradicionales de remediación (Zouboulis, 2004). A los métodos de remediación en los que se utilizan técnicas biológicas para remediar un ambiente contaminado se lo denomina biorremediación (Majumder, 2016). El interés en la biorremediación radica en la alta especificidad en la remoción del metal de interés con flexibilidad operacional, tanto en sistemas *in situ* como *ex situ* (Malik, 2004; Vullo, 2003). Una de las características más importantes del proceso biológico de remediación de metales es que no produce daño alguno al entorno.

En las técnicas de biorremediación se pueden utilizar organismos tales como plantas, hongos o bacterias, estén o no con vida, como así también, productos producidos por dichos organismos, con objeto de degradar, detoxificar o secuestrar compuestos químicos tóxicos presentes en las aguas o en los suelos biotratados.

Particularmente para la remoción y recolección de metales como el Cd, Zn y Cu de efluentes industriales se han utilizado métodos basados en biomasa bacteriana, hongos, levaduras y algas, las cuales tienen diferente composición química, con porcentajes de captación de los iones metálicos relativamente altos. Estos procesos son dependientes del grado de afinidad entre las especies metálicas -o sus formas iónicas- con los sitios de unión presentes en la biomasa (Acosta, 2007; Zouboulis, 2004). Los metales (*sorbatos*) pueden sorberse en el material biológico (*sorbente*), sea por *absorción* (por incorporación al biomaterial) o bien sea por *adsorción* (se adhiere al biomaterial por interacciones físico-químicas con los componentes superficiales del mismo).

La biosorción puede definirse simplemente como la remoción de sustancias de una solución por un material biológico (Liu, 2017; Gadd, 2009), es un concepto multidimensional e introducido en las últimas décadas. Depende del biosorbente utilizado, de factores ambientales y de la presencia o ausencia de metabolitos celulares en el caso de organismos vivos. Ha sido definido como un proceso pasivo y



**Figura 8. Mecanismos bacterianos de tolerancia y/o resistencia a metales que son útiles para la eliminación de metales (adaptado de Vullo, 2003).**

metabólicamente independiente (Fomina, 2014) dado por interacciones fisicoquímicas entre el metal y los ligandos estructurales (Le Cloirec, 2005).

Los microorganismos bacterianos presentan un gran interés en el desarrollo de los procesos de biorremediación debido a que pueden adaptarse a las condiciones medioambientales adversas. Y, en presencia de metales, pueden desarrollar diversos mecanismos de tolerancia y/o resistencia, pudiendo ser utilizados como captadores de metales. “Los [microorganismos] resistentes se caracterizan por poseer mecanismos de detoxificación codificados genéticamente, inducidos por la presencia del metal. En cambio, los tolerantes son indiferentes a la presencia o ausencia de metal. [...] La resistencia o tolerancia experimentada por microorganismos es posible gracias a la acción de diferentes mecanismos” (ver Figura 8) (Vullo, 2003). Las respuestas bacterianas al estrés inducido por el metal pueden ser: bioacumulación, biomineralización, biotransformación, quimiosorción o la biosorción mediada por el microorganismo (Malik, 2004).

En los diferentes mecanismos de tolerancia y/o resistencia, el organismo debe invertir energía para disminuir el estrés causado por la presencia del metal ya sea para sintetizar compuestos (como en la biotransformación, biomineralización o quimiosorción) o para transportar sustancias a través de la membrana celular (bioacumulación). Mientras que el mecanismo de biosorción no necesita de un metabolismo biológicamente activo, además, es un mecanismo de cinética relativamente rápida.

La biosorción es un fenómeno ampliamente estudiado en la biorremediación de diversos metales como el Cd, Pb, Ni, Zn y Cu, para el desarrollo de técnicas de bajo costo. El uso de microorganismos para tal fin radica en la alta relación de superficie

por unidad de volumen celular. Además, al basarse este mecanismo estrictamente en interacciones físicas entre el metal y la superficie celular, se posibilita una alta capacidad de retención por adsorción de metales en solución (Quereshi, 2001; Mullen, 1989). La biomasa capaz de participar en estos procesos es fácilmente extraíble de sistemas acuosos como cursos de aguas o efluentes de diversos orígenes, por lo que el proceso global de biorremediación sería rentable.

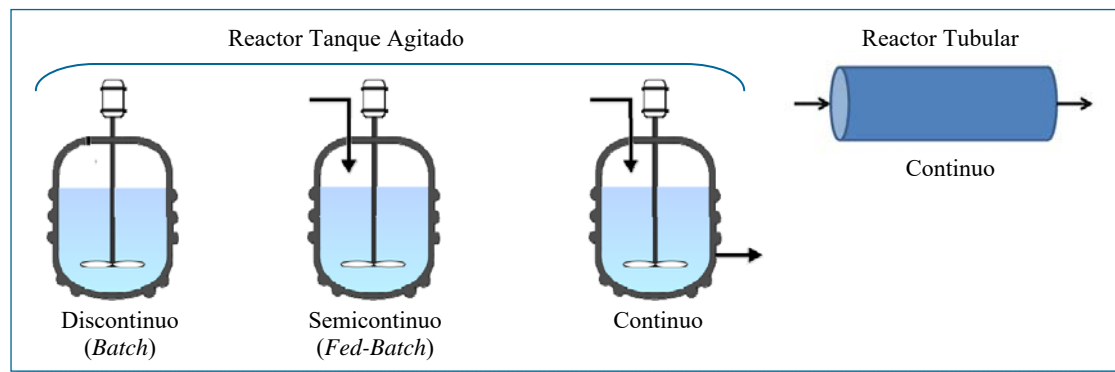
La búsqueda de biomasa bacteriana capaz de bioadsorber metales se encuentra en crecimiento constante, junto con el estudio de combinación de sistemas biosorbentes. Como, por ejemplo, la utilización de cultivos mixtos o sistemas formados por microorganismos y macromoléculas sorbentes, que incrementarían los rendimientos en la captación de mezclas de metales. La biosorción de metales de soluciones acuosas es sensible a las condiciones medioambientales en el que se desarrolla el biotratamiento. Depende de la concentración inicial del metal en la solución, de la carga del ión en particular, del pH, de la temperatura y de la presencia de ligandos orgánicos o inorgánicos (Green-Ruiz, 2007). Por lo general, en los biotratamientos de efluentes industriales, el rango de concentraciones de metal se encuentra entre 1,0 y 20 mg/L (Malik, 2004), dependiendo del proceso desarrollado. Implementando tratamientos biológicos se puede, por tanto, remediar aquellos efluentes para los cuales los tratamientos tradicionales no pueden dar una respuesta favorable. La utilización de estos nuevos procesos de remoción de metal de efluentes contaminados resulta prometedora (Green-Ruiz, 2007).

### 2.3.c- Biorreactores

En los últimos tiempos, se han implementado nuevas tecnologías de forma eficiente en la remoción de metales de efluentes industriales utilizando procesos de biosorción de metales. Las células pueden estar *ocuidas* o *adheridas* a un soporte (por ejemplo por la formación de biopelículas) conformando un dispositivo para el biotratamiento de efluentes que se conoce como *biorreactor*.

Los biorreactores presentan una gran variabilidad de diseños, formas y tamaños dependiendo de las características de los microorganismos y el contaminante a tratar. Varios parámetros hay que tener en cuenta al desarrollar un biorreactor, como la provisión de oxígeno en la fase de crecimiento celular, la acumulación y disposición de los desechos, el control a realizar a lo largo del proceso de remediación y la sensibilidad específica del microorganismo seleccionado.

Al considerar las condiciones de los cultivos, pueden ser cerrados (cultivos en lote, *batch*) o abiertos (o en continuo). En un cultivo en lote no hay intercambios con el exterior, por lo que las células presentan estadios fisiológicos diferentes en cada



**Figura 9. Clasificación de biorreactores de acuerdo a la forma y funcionamiento.**

momento del cultivo. Mientras que en un sistema abierto se lleva a cabo la alimentación (medio de cultivo fresco) y la eliminación (de desechos) continua, por lo que el estadio fisiológico celular se mantiene constante (Vullo, 2000).

De acuerdo a la forma del biorreactor (ver Figura 9), éste puede ser un “reactor tanque” o “reactor tubular”; mientras que según sea el modo de funcionamiento, puede ser discontinuo (*batch*), semicontinuo (*fed-batch*) o continuo.

Los soportes utilizados para encapsular físicamente a las células pueden ser geles porosos, resinas o polímeros. Mientras que la gama de materiales usados como soportes de inmovilización pueden ser rocas, arena, plásticos, látex, papel o acero, entre otros (Qureshi, 2001). La clasificación de los biorreactores en cuanto a la disposición de las células en su interior del reactor para remediar efluentes se detalla en la Tabla 5, se destacan las ventajas y desventajas generales de cada sistema.

| Tipo de reactor                            |  | Ventajas   | Desventajas  |
|--|--|--|--|
| <b>Reactores de membrana</b>               |  | Alta productividad, se puede trabajar con una alta concentración celular en el interior del reactor, permite fácil separación  | Elevados costos de las membranas (no se usan para producción a gran escala)  |
| <b>Reactores con células inmovilizadas</b> | <b>Formación de uniones covalentes</b> | Se puede empezar con una alta concentración celular, alta productividad  | Crecimiento celular en el interior de la matriz puede ser restringido, hay desprendimientos celulares, puede ser necesario separar células desprendidas por centrifugación, la unión química puede afectar a las células |
|  | <b>Secuestro (oclusión)</b>            | Puede trabajarse con una alta concentración celular  | La matriz puede desintegrarse a lo largo del tiempo, las células se van desprendiendo, puede ser necesario centrifugar el efluente   |
|  | <b>Biopelícula</b>                     | Comparativamente presentan una alta productividad y puede trabajarse con una alta concentración celular, pueden operarse por períodos de tiempo largos y son operativamente económicos | Se requiere centrifugar el efluente  |

**Tabla 5. Comparación de diferentes tipos de biorreactores según la disposición de las células, destacando las ventajas y desventajas de cada sistema (adaptado de Qureshi, 2001).**

Una aplicación prometedora de las biopelículas es en la biorremediación de metales y radionucleidos. Por ejemplo, bacterias sulfato-reductoras pueden acumular metal por precipitación de los sulfuros (ZnS, CuS, etc.). “Costley y Wallis reportaron cerca del 84% de remoción de Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup> en efluentes sintéticos utilizando un contactor biológico de rotación y alternando ciclos de adsorción y desorción” (Singh, 2006). Este tipo de biorreactores es comúnmente utilizado para el tratamiento de grandes volúmenes de soluciones acuosas diluidas ya sea proveniente de efluentes industriales o de origen municipal -como las aguas residuales-.

En la Tabla 6 se encuentran listados reactores a base de biopelículas utilizados para biorremediar metales destacando el mecanismo celular utilizado. Los procesos que contribuyen al biotratamiento son la difusión, la adsorción, el complejamiento o incluso procesos de microprecipitación, dependiendo intrínsecamente del sustrato específico que se utiliza (Zouboulis, 2004).

| Reactores de biopelículas<br>Condiciones experimentales      | Método de<br>remediación        | Metal remediado                      |
|--|---------------------------------|--------------------------------------|
| Procesos Anaerobio-anóxico-óxico (A20)                       | Biosorción                      | Zn, Cd, Ni                           |
| Lechos en movimiento y filtrados                             | Biosorción,<br>bioprecipitación | Cu, Zn, Ni, Co                       |
| Reactores rotacionales para inmovilización de<br>algas       | Inmovilización                  | Co                                   |
| Biopelículas desarrollados sobre carbón<br>activado granular | Adsorción                       | Cd, Cu, Zn, Ni                       |
| Reactores de membrana con bacterias<br>inmovilizadas         | Bioprecipitación                | Cd, Zn, Cu, Pb, Y, Co,<br>Ni, Pd, Ge |

Tabla 6. Biorremediación de metales utilizando reactores de biopelículas (adaptado de Zouboulis, 2004).

### 3- Selección del microorganismo: *Pseudomonas veronii* 2E

En el Laboratorio de Microbiología de la UNGS se han aislado microorganismos autóctonos resistentes y/o tolerantes a metales (Cd(II), Zn(II) y Cu(II)) a partir de muestras contaminadas. En la Tabla 7 se detallan los microorganismos aislados en trabajos anteriores, como el origen de la muestra de la cual han sido aislados los mismos. Fueron identificados por la técnica secuenciación de 500 o 1.500 pares de bases del gen que codifica al 16S rRNA.

Con objeto de seleccionar un microorganismo adecuado para el desarrollo de biorreactores con biopelículas para remediar efluentes contaminados con metales, se realizaron diferentes estudios para caracterizar las cepas bacterianas aisladas. Se seleccionó la cepa *Pseudomonas veronii* 2E ( $\gamma$ -Proteobacteria, 0,10% de diferencia en su secuencia con el banco de datos de “Midi Labs”, ver Anexo A) debido a los altos

| Cepa aislada                         | Origen   |
|--------------------------------------|--|
| <i>Pseudomonas veronii</i> 2E        | Aguas superficiales y sedimentos de Río Reconquista, intersección de Av. Liniers y E. Mitre. |
| <i>Ralstonia taiwanensis</i> M2      | Suelos contaminados con metales pesados e hidrocarburos                                      |
| <i>Delftia acidovorans</i> AR        | Agua superficiales de Arroyo Areco cercana a descarga de efluente de una curtiembre          |
| <i>Klebsiella ornithinolytica</i> 1P | Aguas superficiales y sedimentos de Río Reconquista, Estación Fluvial Tigre                  |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> P2         | Suelos contaminados con metales e hidrocarburos  |

**Tabla 7. Microorganismos resistentes y/o tolerantes a metales aisladas en el laboratorio, todas las cepas aisladas son Gram-negativas.**

valores de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) y altos %Metal Bioadsorbido hallados (ver Tabla 8) (Vullo, 2008). Como también una gran capacidad de desarrollar biopelículas sobre diferentes superficies poliméricas como espumas de poliuretano, mangueras de silicona o membranas de teflón (ver Figura 10.a) (Vullo, 2003). Siendo la velocidad de crecimiento de  $0,428 \text{ h}^{-1}$  (ver Anexo B).

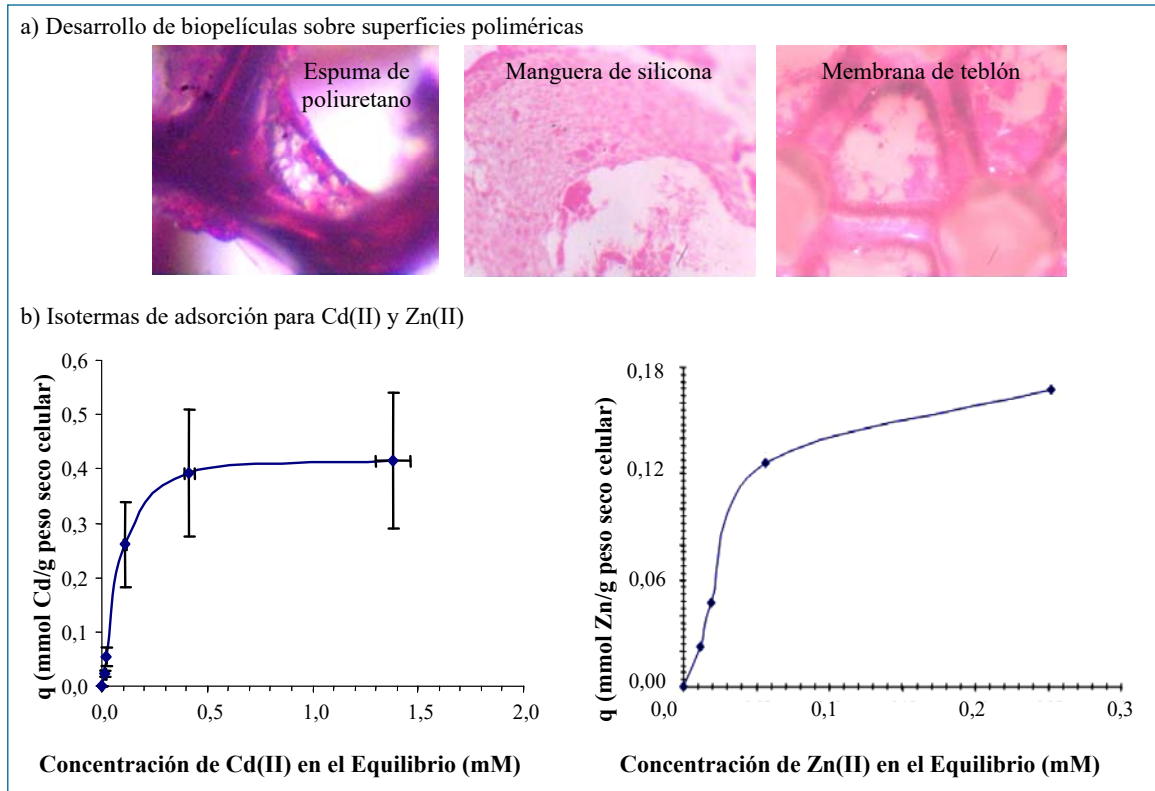
A partir de las isothermas de adsorción (ver Figura 10.b) se halló que la cantidad de Cd(II) adsorbido llega a un valor máximo (saturando la cantidad de sitios activos) mientras que para el Zn(II) no se logra saturar la capacidad bacteriana de adsorber el metal.

| Cepa bacteriana               | CIM (mM) |     |    | %Metal bioadsorbido<br>(24 h de exposición, $[M^{2+}]_i = 0,5 \text{ mM}$ ) |     |     |                  |    |    |                      |    |
|-------------------------------|----------|-----|----|---|-----|-----|------------------|----|----|----------------------|----|
|                               |          |     |    | pH = 5,5 (MES)  |     |     | pH = 6,2 (PIPES) |    |    | pH = 7,5 (HEPES) (*) |    |
|                               | Cu       | Cd  | Zn | Cu  | Cd  | Zn  | Cu               | Cd | Zn | Cd                   | Zn |
| <i>Pseudomonas veronii</i> 2E | 2,0      | 0,5 | 10 | 43  | 5,0 | 7,0 | 40               | 0  | 0  | 50                   | 53 |

**Tabla 8. Resistencia y/o tolerancia a metales de la cepa *Pseudomonas veronii* 2E (Vullo, 2008).**

La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) se realizó en medio de cultivo complejo (PcY-0,05%Glucosa). EL %Metal Biosorbido se halló tras 24 h de exposición de células lavadas en efluentes artificiales 0,5 mM de concentración inicial de metal a pH constante. Los buffers utilizados fueron MES (2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid, pKa = 6,1), PIPES (piperazine-N, N'-bis[2-ethanesulfonic acid], pKa = 6,8) y HEPES (N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic] acid, pKa = 7,5).  
(\*) En el pH = 7,5 se presentaron compuestos insolubles de Cu, por lo que no se determinó el metal biosorbido con dicho metal.

Para Cd(II), se pudo modelizar la adsorción del metal por la cepa bacteriana a partir del Modelo de Langmuir (supone que el metal se adsorbe sobre la superficie formando una monocapa, que los sitios activos son idénticos entre sí y no hay cambio en la energía libre luego de la adsorción). El modelo de Langmuir considera que la cantidad de metal adsorbido  $q$  se expresa como:



**Figura 10. Estudios preliminares sobre *Pseudomonas veronii* 2E.**

a) Desarrollo de biopelículas sobre superficies poliméricas. Las células fueron teñidas con Rojo de Safranina. Las imágenes fueron adquiridas desde el ocular de un microscopio de campo claro (objetivo 10x) (publicado en Vullo, 2003).  
 b) Isotermas de adsorción para Cd(II) y Zn(II). (La isoterma para Cd publicado en Vullo, 2008; y la isoterma para Zn, en Méndez, 2011).

$$q = \frac{q_{\max} \cdot C_{eq}}{K_d + C_{eq}}$$

Siendo  $K_d$  la constante de disociación y  $q_{\max}$  la cantidad máxima de Cd(II) adsorbido por unidad de masa bacteriana. Los parámetros característicos luego de la linealización resultaron (con  $R^2 = 0,9698$ ; Vullo, 2008):

☞  $K_d = (0,17 \pm 0,06)$  mM;  $K_{\text{aff}} = 5,88 \text{ mM}^{-1}$  ( $K_d$  es la inversa de la constante de afinidad  $K_{\text{aff}}$ )

☞  $q_{\max} = (0,48 \pm 0,09)$  mmol/g peso seco celular

Para el caso del Zn(II), la adsorción del metal se modelizó con el Modelo de Freundlich (supone que son heterogéneos los sitios de adsorción de metal, no considera la formación de una monocapa por lo que no se registra la saturación de los sitios activos). En el modelo de Freundlich, se obtiene experimentalmente la relación:

$$q = K_F \cdot C_{eq}^{1/n}$$

Los parámetros característicos  $K_F$  y  $n$  son indicadores de la capacidad e intensidad en adsorción del metal por la biomasa (no tienen sentido físico como en el modelo



anterior). Luego de la linealización, dichos parámetros resultaron (con  $R^2 = 0,9488$ ; Méndez, 2011):

∞  $K_F = 0,714$

∞  $n = 1,3$

Los diferentes comportamientos hallados al describir la adsorción de Cd(II) y de Zn(II) por la cepa *P. veronii* 2E sugieren que los sitios activos involucrados en el proceso de adsorción de cada catión son diferentes.



# OBJETIVOS





## OBJETIVOS

Los objetivos generales del trabajo de tesis son:

- ☞ Estudiar el desarrollo de biopelículas bacterianas sobre soportes inertes bajo diferentes condiciones de cultivo
- ☞ Estudiar el potencial uso de microorganismos inmovilizados sobre soportes inertes a la remediación de efluentes acuosos con contenido en metales en reactores a escala laboratorio

Siendo los objetivos específicos:

- ☞ Estudiar la inmovilización de microorganismos tolerantes/resistentes a metales (Cd y Zn) en diversos soportes inertes de bajo costo, material de relleno de los reactores a utilizar.
- ☞ Efectuar el seguimiento del desarrollo y características de las biopelículas formadas sobre diferentes matrices.
- ☞ Simular procesos de remediación de aguas empleando los microorganismos inmovilizados, selección de las condiciones óptimas a través del uso de efluentes artificiales.
- ☞ Evaluar el funcionamiento del biorreactor mediante el cálculo de la eficiencia de retención de metales en efluentes artificiales.



# Capítulo I: Desarrollo de biopelículas sobre vidrio







## INTRODUCCIÓN

Se estudió la cinética de colonización de la superficie de vidrio (cubreobjetos de 18 mm x 18 mm) por la cepa bacteriana *Pseudomonas veronii* 2E durante la fase exponencial de crecimiento. Se propuso una experiencia con la cual se puede estudiar de forma rápida el efecto de variaciones en las condiciones de cultivo sobre la formación de la biopelícula bacteriana.

Las actividades desarrolladas incluidas en este capítulo se enmarcan dentro de los objetivos específicos:

- ☞ Estudiar la inmovilización de microorganismos tolerantes/resistentes a metales (Cd y Zn) en diversos soportes inertes de bajo costo, material de relleno de los reactores a utilizar.
- ☞ Efectuar el seguimiento del desarrollo y características de las biopelículas formadas sobre diferentes matrices.

# METODOLOGÍA

## 1- Composición de los medios de cultivo

Para estudiar el desarrollo de las biopelículas en función del tiempo se utilizaron dos tipos de medio de cultivo, un medio mínimo salino (utilizando como base el medio M9) y tres medios complejos (variaciones sobre el medio PY, en el cual la fuente de nitrógeno es un digerido proteico denominado peptona (P) y se agrega extracto de levadura (Y) como fuente de vitaminas y aminoácidos esenciales). Los medios de cultivo base (sin la fuente de carbono) se esterilizaron en autoclave.

La composición base del medio salino M9 utilizado fue:

- en g/L:  $K_2HPO_4$  7,3;  $KH_2PO_4$  3,0;  $NH_4Cl$  1,0; NaCl 0,5;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,246;  $CaCl_2$  0,01.

La composición base de los medios complejos de cultivos ensayados fue:

- PcY en g/L: peptona de caseína (Pc) 2,5; extracto de levadura 1,25.
- PY-N<sub>Amino</sub> en g/L: peptona de carne (P) 2,27; extracto de levadura 1,25.
- PY-N<sub>Total</sub> en g/L: peptona de carne 2,5; extracto de levadura 1,25.

Las fuentes de carbono utilizadas en el estudio fueron glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ), glutamato de sodio ( $NaC_5H_8NO_4$ ), citrato de sodio ( $NaH_2(C_3H_5O(COO)_3)$ ) y succinato de sodio ( $Na_2C_4H_4O_4$ ). Se prepararon soluciones madres de cada una que se esterilizaron por filtración debido a problemas de inestabilidad de los compuestos elegidos en el proceso de esterilización en autoclave (121 °C y 1,5 atm), salvo el caso del medio PcY-0,05%Glucosa que fue esterilizado el medio completo. Las concentraciones de las soluciones madres (expresadas en %m/v) fueron 45% glucosa, 25% citrato, 25% glutamato y 10% succinato, almacenándose en heladera hasta su utilización. Se diluyeron en el medio de cultivo de forma tal de obtener concentraciones -en %m/v- igual a 0,5% o 1,0% en el medio salino y 0,05% o 0,5% en los diferentes medios complejos.

Además, se realizaron dos diluciones del medio de cultivo PcY-0,05%Glucosa al medio y al cuarto, denominadas PcYG-1/2 y PcYG-1/4 respectivamente.

Para los medios que requirieron del agregado de Fe(II), se preparó una solución madre 10 mM a partir de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  en agua bidestilada (18 mΩ/cm, Millipore®), se filtró y fraccionó en esterilidad, se almacenó en freezer para disminuir la oxidación del Fe(II) a Fe(III). Al momento de utilizarla, se preparó una dilución 1:10 de la solución

almacenada y se agregó el volumen adecuado para obtener una concentración final  $3,00 \mu\text{M}$  ( $8,34 \cdot 10^{-5} \% \text{m/v}$ ) en el medio de cultivo fresco preparado.

## 2- Preparación de los cultivos acostumbramiento e inóculo

A partir de un cultivo acostumbramiento de la cepa *P. veronii* 2E (en erlenmeyer con 10,0 mL del medio de cultivo, incubando a  $32 \text{ }^\circ\text{C}$  y 120 rpm en agitador orbital durante 72 h) se preparó 20,0 mL de cultivo inóculo por siembra de 2,00 mL del cultivo en medio fresco (respetando la base del medio de cultivo y la concentración de fuente de carbono). El cultivo inóculo se incubó en las mismas condiciones de temperatura y agitación por 24 h.

## 3- Superficie de inmovilización

El estudio el desarrollo de biopelículas bacterianas se realizó sobre vidrio seleccionando cubreobjetos de vidrio de 18,0 mm de arista (Marienfield®) como matriz de inmovilización (en el trabajo de Sheikh, 2001 se utilizaron cubreobjetos de vidrio circulares de 22,0 mm de diámetro). Los cubreobjetos fueron lavados con agua y detergente (detergente de uso domiciliario o detergente alcalino durante 2 h) y enjuagados con agua destilada. Se esterilizaron en autoclave utilizando cajas plásticas de modo que los cubreobjetos quedaron de forma vertical apoyados sobre papel aluminio y evitando que se superpongan unos sobre otros.

Las matrices de inmovilización se introdujeron en microplacas de poliestireno de 6 cavidades estériles (Costar® o Falcon®) -1 cubreobjeto en cada cavidad- bajo condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar (cabina de bioseguridad de tipo II) (se adaptaron los procedimientos de Walker, 2012; Guiton, 2009).

Las microplacas se inocularon a partir de dos metodologías diferentes: por siembra directa o por siembra de suspensión bacteriana. En ambos casos se respetó la relación 1:10 entre el volumen de cultivo inóculo sembrado y el volumen de medio de cultivo final en cada cavidad de la microplaca.

Para los casos de *Siembra Directa*, en cada cavidad de la microplaca con la matriz de inmovilización, se introdujeron 2,7 mL de medio de cultivo fresco y 0,3 mL de cultivo inóculo. Mientras que para los casos de *Siembra por Suspensión*, se inoculó en cada cavidad 3,0 mL de una suspensión bacteriana (preparada previamente con 45,0 mL de medio fresco y 5,0 mL de cultivo inóculo, homogeneizando en agitador tipo *vortex*). Las microplacas se incubaron sin agitación (cultivos estáticos) en estufa de cultivo a  $32 \text{ }^\circ\text{C}$  o en ambiente termostizado a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 4- Estudios preliminares en el estudio de biopelículas

##### 4.1- ¿Las células bacterianas de *P. veronii* 2E se inmovilizan sobre el vidrio?

###### Utilización de microscopía de fluorescencia

En colaboración con Dr. Gustavo Curutchet y Dr. Martín Radrizzani, se analizaron las biopelículas desarrolladas sobre el vidrio en microscopio de epi-fluorescencia perteneciente a los laboratorios de la Escuela de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de San Martín (UNSAM).

En una microplaca, se inocularon 4 cubreobjetos a partir de un inóculo preparado por suspensión bacteriana en medio PcYG-0,05%Glucosa a 32 °C, dejando 2 controles libres de bacterias. Se incubaron por un período de 4 días en estufa de cultivo y se realizó un único lavado y renovación del medio de cultivo al segundo día de incubación con objeto de favorecer el desarrollo de la biopelícula sobre la matriz en estudio.

Se extrajo uno de los cubreobjetos y se enjuagó con agua destilada para arrastrar las células libres. Se tiñó la biomasa inmovilizada con el fluorocromo DAPI [2-(4-amidinofenil)-1H-indol-6-carboxamida] que posee afinidad por los ácidos nucleicos y emite fluorescencia de color azul (máximo de emisión en  $\lambda = 461$  nm) al ser excitado con láser (el máximo de excitación se encuentra en  $\lambda = 358$  nm). Se analizó la superficie iluminando la muestra tanto con luz blanca (microscopía de campo claro) como con la radiación adecuada para excitar al fluorocromo utilizado en la tinción y pueda emitir su fluorescencia azul característica. Se adquirieron las imágenes digitales utilizando el objetivo de 20x (magnificación final de la imagen de 200 veces).

##### 4.2- ¿Será cuantificable la biomasa inmovilizada por peso seco?

Se esterilizaron 6 cubreobjetos en empaques individuales de papel aluminio previamente pesados en balanza analítica ( $\pm 0,0001$  g). Bajo condiciones de esterilidad, se les quitó el envoltorio y se introdujeron en las cavidades de la microplaca. Se inocularon con 3,0 mL de suspensión bacteriana a partir de cultivos realizados con los medios PcY-0,05%Glucosa y PcYG-1/2. Se incubaron a 32 °C durante 55 h, a dos de los triplicados se le realizó un lavado y renovación del medio de cultivo a las 30 h de iniciada la incubación (ver siguiente apartado descripción de la cinética de colonización bacteriana).

Se extrajeron las matrices, se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar en cajas de petri plásticas chicas durante 24 h en estufa a 32 °C. Se pesaron en balanza analítica utilizando como tara una tapa de caja de petri plástica ( $3,9308$  g  $\pm 0,0001$  g). Se registró el pH y la densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) de los sobrenadantes correspondientes de cada celda de cultivo.

## 5- Cinética de formación de biopelículas bacterianas sobre vidrio

Las microplacas se incubaron a la temperatura de trabajo seleccionada hasta el momento de la extracción de la matriz con las células inmovilizadas sobre la superficie. Los tiempos de estudio fueron: 0 h ( $t_0$ , para analizar la adhesión inicial), 7 h ( $t_1$ ), 31 h ( $t_2$ ) y 55 h ( $t_3$ ). Se trabajó por triplicado para cada tiempo y condición ensayada. Durante el transcurso de la experiencia, se realizó un único control libre de microorganismos a tiempo inicial ( $t_{0\text{ Control}}$ ).

A las 30 h de iniciada la inmovilización, a las muestras correspondientes al tiempo  $t_3$  se les renovó el medio de cultivo con un previo lavado con medio fresco para arrastrar las células libres y favorecer de esa forma el desarrollo de la biopelícula bacteriana sobre la superficie del cubreobjeto (manteniendo las condiciones de esterilidad en todo momento) (se adaptó el procedimiento de Guiton, 2009).

En el esquema de la Figura I-1 podrá encontrarse el diagrama de las experiencias realizadas en función del tiempo.

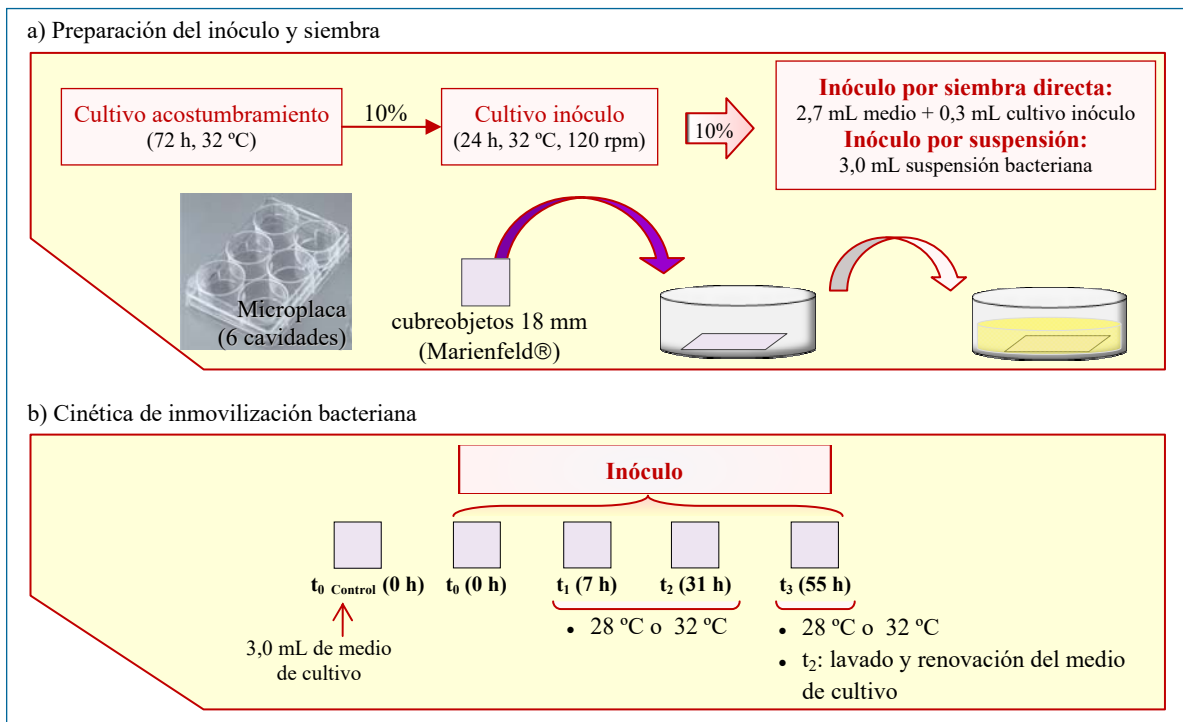


Figura I-1. Esquema del desarrollo experimental para el estudio de la cinética de desarrollo de la biopelícula sobre vidrio.

- a) Preparación del cultivo inóculo y siembra. Se realizó por triplicado para cada condición ensayada.  
 b) Cinética de inmovilización bacteriana. Condiciones de cultivo y tiempos de muestreo.

## 6- Perturbaciones en el desarrollo de las biopelículas

Se estudiaron los siguientes efectos sobre el desarrollo de la biopelícula en el transcurso de la cinética de colonización:

- Efecto de Siembra del Inóculo: siembra directa del cultivo inóculo o siembra de suspensión bacteriana
- Efecto de la Naturaleza de la Fuente de Carbono: glucosa, glutamato, citrato o succinato
- Efecto de la Concentración de la Fuente de Carbono (%m/v):
  - ⇒ 0,05% o 0,5% en el caso de los medios complejos de cultivo
  - ⇒ 0,5% o 1,0% en el caso del medio mínimo M9
- Efecto de la Naturaleza de la Fuente de Nitrógeno en los Medios Complejos de Cultivo (para ello se utilizaron dos tipos de digeridos proteicos): peptona de caseína (Pc) o peptona de carne (P)
- Efecto del Fe(II): presencia o ausencia de Fe(II) (3,0  $\mu$ M)
- Efecto de la Temperatura de Incubación: durante la colonización superficial, 28 °C o 32 °C
- Efecto de la Composición del Medio de Cultivo: medio complejo o medio mínimo de crecimiento

## 7- Tratamiento de muestras y crecimiento planctónico

En las experiencias de Siembra por Suspensión, se analizó el crecimiento de células libres a partir de la medición espectrofotométrica de la densidad óptica del cultivo a 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) y del pH del cultivo a cada tiempo de muestreo. Para medir la  $DO_{600nm}$  se midió la absorbancia a 600 nm en espectrofotómetro de doble haz (UV-Visible Perkin-Elmer®) o, bien, en espectrofotómetro de simple haz (Turner®), alternando las mediciones entre los equipos de acuerdo a la disponibilidad de uso de los mismos en el transcurso de cada set experimental de inmovilización. Las mediciones se realizaron contra agua destilada como blanco de medición.

El seguimiento del pH se realizó con cintas indicadoras de pH.

## 8- Tratamiento de muestras y desarrollo de biopelículas

### 8.1- Preparación de las muestras de las biopelículas

Se extrajo el cubreobjeto con las células inmovilizadas de cada cavidad, se enjuagó con agua destilada para arrastrar las células libres. Se cubrió la superficie con una solución de formaldehído 7,2 %m/v (dilución 1:5 en agua destilada) durante 30 min bajo campana para fijar las células que han desarrollado la biopelícula sobre el vidrio. Se extrajo el formol y se enjuagó con 5,0 mL de agua destilada, se tiñó con Cristal Violeta (1,0 %m/v CV) durante 10 min (se adecuaron los procedimientos Ruhál, 2015; Walker, 2012; Guiton, 2009; Sheikh, 2001; O'Toole, 1998). Se extrajo el remanente del colorante y se realizaron dos enjuagues sucesivos con 3,0 mL de agua destilada para

arrastrar el colorante en exceso. Un último enjuague se realizó sumergiendo el cubreobjeto en agua destilada sujetando al mismo con una pinza y se dejó secar en estufa a 32 °C.

## 8.2- Análisis estructural de la biopelícula

A partir del  $t_3$  de la Experiencia de Siembra Directa se inició el estudio de la estructura de la biopelícula bacteriana inmovilizada sobre el vidrio por análisis de imágenes, considerando dos metodologías diferentes en la adquisición de las imágenes. Para el estudio de la cobertura de la matriz en su totalidad y estudiar la macroestructura, se escanearon las superficies de los triplicados de cada tiempo y condición. Para un estudio más detallado de la estructura de la biopelícula y estudiar la microestructura, se seleccionó uno de los triplicados de cada tiempo y condición y se analizó por microscopía de campo claro seleccionando alguna región particular de interés de la matriz colonizada.

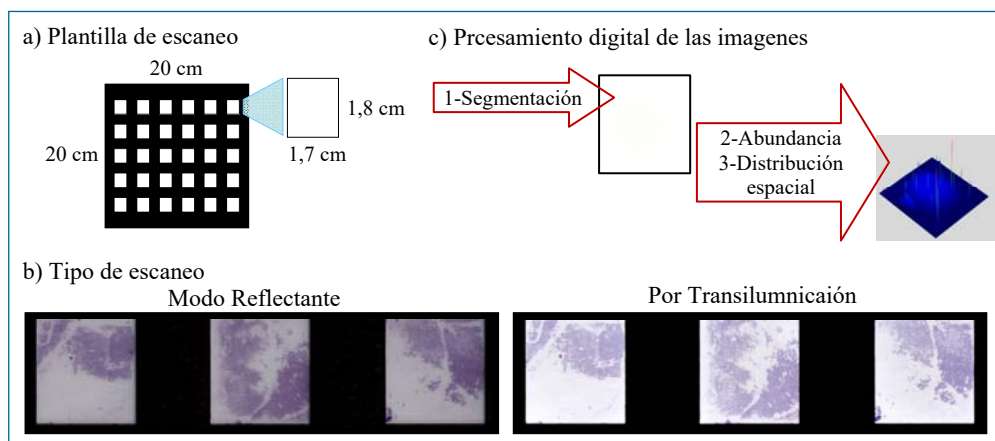
Es frecuente hallar en la bibliografía que se llama análisis de la macroestructura al análisis de las biopelículas a partir de la microscopía de campo claro y análisis de la microestructura al análisis a partir de microscopía de láser confocal, mientras que el estudio de las películas a escala de los centímetros daría una idea de la mesoescala (Li, C., 2016). No obstante, en este trabajo se entenderá como análisis de la macroestructura al estudio de la superficie completa del cubreobjeto por escaneo de la superficie y microestructura al análisis provisto de la microscopía de campo claro.

### 8.2.a- Adquisición de imágenes por escaneo

La captura de imagen por escaneo se realizó con dos formatos diferentes, modo reflectante (*source plate*) y por transiluminación (*source film color positivo*).

En primer lugar, se adquirieron las imágenes con escaner Epson Evolution V100 (3.200 ppp). Se utilizó una plantilla de vidrio cuadrada de 20 cm de lado recubierta de papel adhesivo de color negro. Se distribuyen 30 aberturas de 1,7 cm x 1,8 cm (para que los cubreobjetos no se apoyen directamente sobre el vidrio y evitar interferencias en las imágenes por el pasaje de la luz entre las diferentes superficies de vidrio) distribuidas en 5 filas y 6 columnas (Figura I-2.a). Las imágenes se adquieren con escaneo de imagen de 48 bit, tipo de exposición foto y tipo de documento reflectante.

En segundo lugar, se utilizó Scanner Canon CanonScan 5.600F. Se utilizó la misma plantilla de escaneo pero siendo sólo utilizable una única columna de 5 filas en la parte central de la placa (cuadrícula). El formato de adquisición de imagen seleccionado fue escaneo de película en color (transiluminación). Las imágenes fueron adquiridas en color, anulando todo tipo de ajuste automático de la imagen (como brillo, color, etc.),



**Figura I-2. Plantilla de escaneo y diferencia en el tipo de adquisición de la imagen.**

a) Plantilla de escaneo.

b) Tipo de escaneo. Comparación en el tipo escaneo, modo reflectante o por transiluminación, para los triplicados correspondientes a  $t_3$  - M9-0,5%Glucosa a 28°C.

c) Procesamiento digital de las imágenes. Esquema de los módulos de trabajo al procesar digitalmente las imágenes considerando los dos módulos de trabajo, la segmentación y el mapa de heterogeneidad de la superficie (en la figura se presentó el recorte de la plantilla sin cubreobjeto).

con una resolución de 4.800 dpi (siendo aproximadamente una resolución de 2.400dpi equivalente a 10,6  $\mu\text{m}$ ) y en formato *tiff* (sin compresión de la imagen).

La diferencia entre ambas metodologías de escaneo se encuentra en la forma de iluminación durante el proceso de adquisición de la imagen (ver Figura I-2.b). En el caso de “documento reflectante”, la iluminación y lectura de la imagen se realiza desde la parte inferior del objeto a escanear (escaneo normal en el que se ilumina y se lee la imagen por debajo de la muestra, realizando la lectura de la luz reflejada). Mientras que en el segundo caso, se realiza la lectura de la luz que atraviesa la muestra (se ilumina por arriba del objeto y la lectura se realiza por debajo del mismo).

### 8.2.b- Análisis digital de las imágenes escaneadas

El procesamiento de las imágenes digitales se realizó con un programa automatizado utilizando el programa MATLAB® (MATLAB r2009b, The Mathworks Inc.) desarrollado por el doctorando Lic. Santiago Doyle<sup>8</sup>.

El programa consta de tres módulos diferentes (Figura I-2.c)<sup>9</sup>:

- ✓ Segmentación (localización de cada cubreobjeto sobre la cuadrícula escaneada -plantilla-)
- ✓ Estimación de la abundancia de la biopelícula en cada pixel
- ✓ Distribución espacial y heterogeneidad de la biopelícula

En primer lugar, durante el proceso de segmentación, se ingresó la lista de las imágenes escaneadas que debían analizarse a partir de una planilla Excel®. Dicha planilla compilaba la información necesaria de cada muestra de cubreobjeto (nombre

<sup>8</sup> Investigador-docente del Área de Biología y Bioinformática del ICI-UNGS

<sup>9</sup> Ver Anexo C para mayor detalle del programa de análisis de imágenes desarrollado.



del archivo de imagen, localización de la muestra de cubreobjeto -fila y columna de la cuadrícula-, número de triplicado y condiciones de cultivo). El programa localiza cada muestra en la plantilla y genera un recorte de cada cubreobjeto. Se transfiere la imagen a escala de grises y, a partir de las imágenes en binario (considerando la intensidad de color de los controles) se halla el área cubierta.

En el segundo módulo de trabajo, considerando que la cantidad de colorante en cada pixel es constante y por la ley de Lambert-Beer, se estima la cantidad de colorante que hay en cada muestra.

Para analizar la distribución espacial de la biopelícula desarrollada sobre el cubreobjeto se consideró la dimensión fractal (DF). Se consideró la biopelícula como una superficie tridimensional considerando la cantidad de colorante en cada pixel en el eje z (noción de la cantidad de colorante). El valor de DF tomó valores entre 2 y 3, obteniéndose valores bajos de DF en los casos de biopelículas lisas, mientras que se obtienen valores altos para los casos de mayor rugosidad en la colonización. El método para hallar la DF utilizado fue el de conteo de caja (*box-counting method*).

El concepto de fractal se introdujo hacia 1970 por el matemático Benoit Mandelbrot, son funciones que no admiten derivadas en ningún punto. La dimensión fractal da una idea de la rugosidad del objeto, está vinculada con aspectos geométricos del mismo. Desde la geometría Euclidiana, un punto tiene dimensión 0, una línea dimensión 1, un plano dimensión 2 y un volumen dimensión 3 (Civit, 2000). Considerando la geometría fractal, si una línea trata de ocupar un área, el valor de esta nueva línea estaría entre 1 y 2; y si un área tiende a ocupar un volumen, el valor de esta área estaría entre 2 y 3. Es posible utilizar la definición de dimensión fractal para caracterizar la textura de superficies, y ésta se expresaría como una medida de la rugosidad o irregularidad de la superficie de una imagen. A mayor rugosidad de la superficie, mayor será el valor de la dimensión fractal asociada al objeto, mientras que a menor rugosidad -películas más lisas- el valor será más bajo.

### **8.2.c- Adquisición de imágenes por microscopía de campo claro**

Para estudiar con mayor detalle el desarrollo de las biopelículas, se analizaron las muestras por microscopía de campo claro. Se seleccionó uno de los triplicados de cada condición y tiempo en estudio y se observó en microscopio Nikon Eclipse E200®. Las imágenes se adquirieron mediante una cámara digital (Canon Power Shot G9®, 12,1 mega pixeles) acoplada al ocular del microscopio bajo condiciones de luz transmitida utilizando los objetivos 4x, 10x y 40x, magnificando la imagen 40, 100 y 400 veces considerando al ocular, respectivamente (a partir de este momento, se llamarán a las magnificaciones finales como 40x, 100x y 400x cada vez que se

mencione a una imagen adquirida por microscopía). Los parámetros seleccionados en la cámara digital durante la captura de las imágenes fueron:

- Modo de disparo: prioridad de valor de apertura AE
- Velocidad de obturación (Tv): 1/1600
- Valor de apertura (Av): 2,8
- Compensación de exposición: +1 (para las imágenes con aumento final de 40x y 100x) o +1/3 (para 400x)
- Velocidad ISO: 80
- Distancia focal: 7,4 mm
- Balance de blancos: fluorescente
- Modo de medición: evaluativa

Las imágenes insertas en la presente tesis han sido ajustadas el máximo y el mínimo del brillo y contraste con el programa ImageJ® para mejorar la calidad de presentación de las mismas.

### **8.3- Cuantificación de la biopelícula desarrollada sobre vidrio**

La cuantificación de la biopelícula bacteriana desarrollada sobre el cubreobjeto se realizó espectrofotométricamente, adecuando el protocolo desarrollado para el análisis de la biopelícula para placas de 96 cavidades desarrollado en O'Toole, 1998. Se disolvió el CV en 2,00 mL de etanol (pipeta volumétrica) durante 30 min a 150 rpm y 26 °C, aprox., en agitador orbital Ferca® (Ruhel, 2015; Walker, 2012; Guiton, 2009; Sheikh, 2001). Hasta las muestras  $t_2$  correspondientes al set experimental de Experiencia por Siembra Directa (primer set experimental), los cubreobjetos fueron introducidos en tubos Falcon® de 50,0 mL con el alcohol y, con ayuda de una varilla de vidrio, se fraccionó el vidrio para sumergirlo completamente en el volumen de solvente de extracción. Posteriormente, se utilizaron frascos de boca ancha de color caramelo de 30,0 mL de capacidad en los cuales los cubreobjetos se pudieron introducir enteros (sin fraccionar) conservando la cara de la matriz con la biomasa inmovilizada hacia arriba.

#### **8.3.a- Curva de calibrado**

La selección de la longitud de onda de medición se realizó a partir del espectro de absorción del CV en alcohol tras un barrido realizado entre 400 nm y 700 nm en espectrofotómetro UV-Visible Perkin-Elmer® de doble haz (Figura I-3). Se seleccionó el máximo de absorción,  $\lambda = 590$  nm, para obtener la mayor sensibilidad en la señal registrada instrumentalmente.

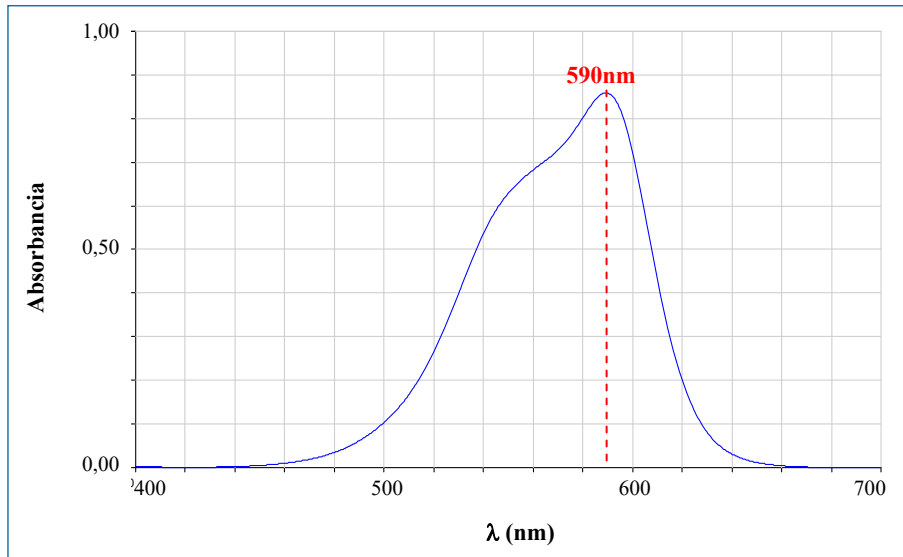


Figura I-4. Espectro de absorción de CV en etanol (concentración de la solución  $9,6 \cdot 10^{-6}$  M).

De acuerdo a la Ley de Lambert-Beer, la absorbancia es lineal respecto de la concentración de la solución a cada longitud de onda seleccionada en el rango de absorción:

Siendo  $\epsilon_\lambda$  la absortividad molar (característico de cada sustancia),  $b$  el camino óptico (cubetas plásticas de base cuadrada de 1,0 cm de ancho) y  $[CV]$  la concentración molar del CV en etanol. La curva de calibración se basó con 9 soluciones realizadas por duplicado y se midió la absorbancia en la longitud de onda de máxima absorción ( $Abs_{590nm}$ ). En la Figura I-4 se graficó la  $Abs_{590nm}$  en función de la concentración molar de CV con la regresión lineal correspondiente a la curva de calibrado realizada (ver en el Anexo D la serie de soluciones preparadas). El rango lineal de la curva realizada fue

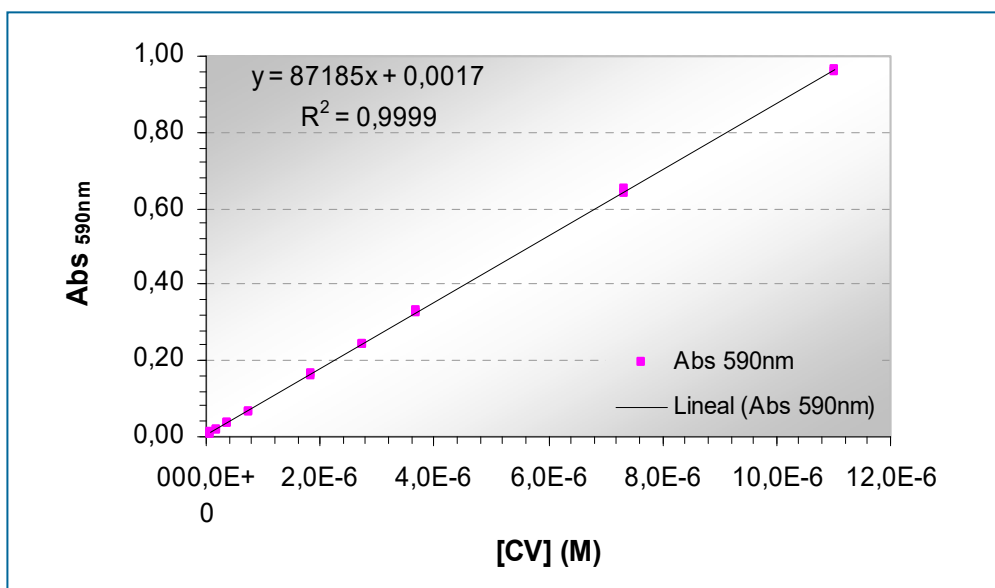


Figura I-3. Curva de calibrado de CV en etanol.

Absorbancia registrada a 590 nm para las soluciones preparadas con la regresión lineal correspondiente a la serie de puntos medidos.

entre  $9,2 \cdot 10^{-8}$  M y  $1,10 \cdot 10^{-5}$  M (siendo las incertidumbres asociadas a cada concentración de solución preparada  $\pm 0,2 \cdot 10^{-8}$  M y  $\pm 0,02 \cdot 10^{-5}$  M, respectivamente).

La sensibilidad de la técnica espectrofotométrica aplicada se determinó considerando:

$$Sensibilidad_{\lambda} = \frac{dSeñal}{dConcentración}$$

Resultando ser la sensibilidad de la metodología, la pendiente de la regresión lineal y la incertidumbre dada por el análisis estadístico de los datos (Microsoft Excel®):

$$Sensibilidad_{590nm} = Pend \pm Inc = (8,72 \cdot 10^4 \pm 0,02 \cdot 10^4) M^{-1}$$

A partir de la regresión lineal para la serie de datos registrada, se obtuvo la relación siguiente considerando una confianza al 95%:

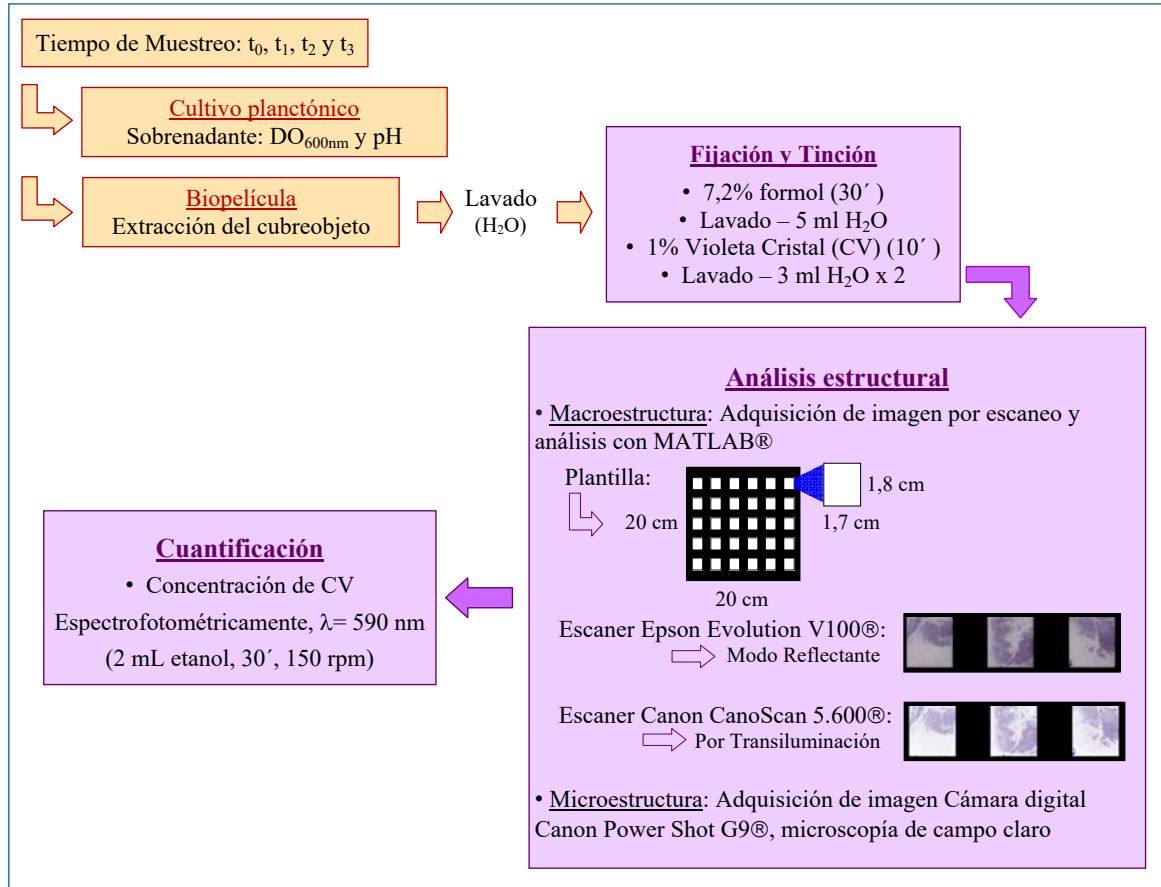
$$Abs_{590nm} = (8,72 \cdot 10^4 \pm 0,04 \cdot 10^4) M^{-1} \cdot [CV] + (2 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-3})$$

### 8.3.b- Concentración de CV en las muestras

En cuanto a la cinética de desarrollo de biopelícula sobre los cubreobjetos a cada condición de estudio, se midió la  $Abs_{590nm}$ . Se determinó la concentración de CV por interpolación en la curva de calibrado de CV en etanol, analíticamente, se despejó la concentración del colorante de la expresión lineal hallada en la curva detallada en la ecuación anterior. Se informó el promedio de los triplicados de inmovilización a cada tiempo y condición estudiada.

### Resumen de la metodología empleada para el tratamiento de las muestras

En la Figura I-5 se puede encontrar el esquema que resume el procesamiento de las muestras de cubreobjetos obtenidas para describir la cinética de colonización.



**Figura I-5. Esquema del tratamiento de las muestras para cada tiempo de muestreo.**

Seguimiento del crecimiento de las células libres (crecimiento planctónico) y estudio de la cinética de desarrollo del biopelícula en función del tiempo analizando la estructura de la película sobre el vidrio y cuantificando a partir de la concentración de CV en etanol

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para *P. veronii* 2E, la estructura de la biopelícula desarrollada sobre el vidrio depende de la composición del medio de cultivo y de la calidad de los nutrientes que lo componen, como así también, de la temperatura de incubación. Estos parámetros influyen en la diferenciación celular requerida para establecer la adhesión de las células a la superficie y formar una biopelícula densa y resistente necesaria para la optimización de los biorreactores basados en biopelículas bacterianas.

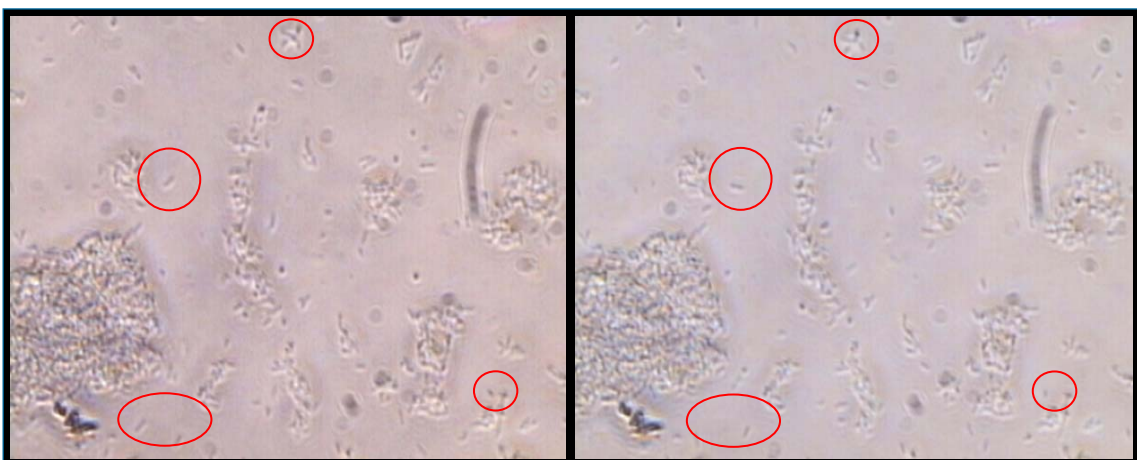
### 1- Estudios preliminares en el estudio de biopelículas

#### 1.1- ¿Las células bacterianas de *P. veronii* 2E se inmovilizan sobre el vidrio?

##### Utilización de microscopía de fluorescencia

DAPI es un colorante para ácidos nucleicos ampliamente utilizado en microscopía de fluorescencia, es un fluorocromo de amplio espectro. Este colorante no es visible si se ilumina la muestra con luz blanca convencional (microscopía de campo claro), pero al excitarse con luz ultravioleta, emite una fluorescencia azul al estar unido el fluoróforo al ADN en las regiones de alta repetición A=T de los cromosomas. Puede ser utilizado para teñir tanto células vivas o bien células fijadas con glutaraldehído o formol.

Para evaluar la inmovilización bacteriana sobre la superficie de vidrio del cubreobjeto por desarrollo de biopelículas celulares, se decidió analizar la superficie sin fijar las células (ni con glutaraldehído ni con formol), sólo se enjuagó la superficie de interés con agua destilada y se agregó el colorante en cuestión. En la Figura I-6 se pueden

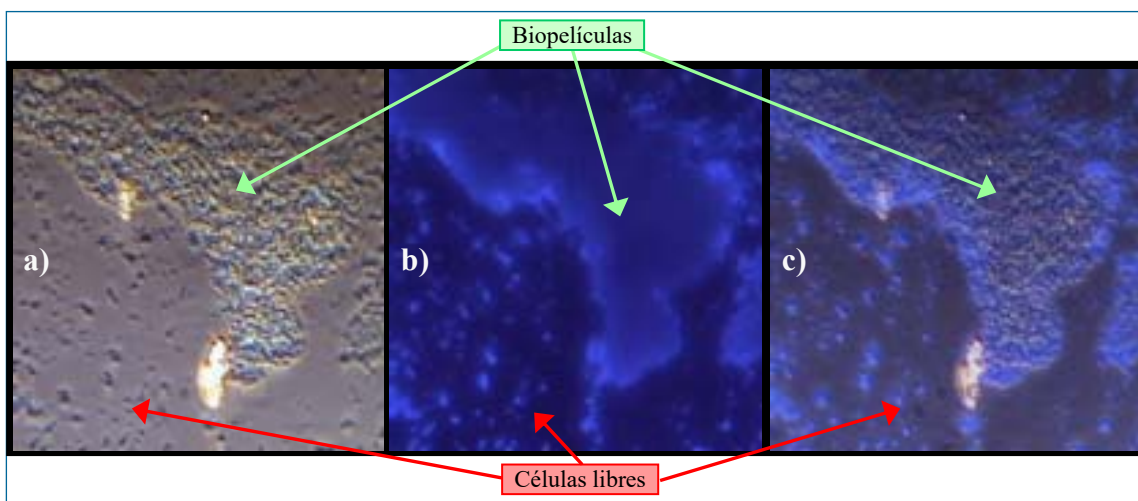


**Figura I-6. Imágenes digitales adquiridas por microscopía de epi-fluorescencia iluminando a la muestra sólo con luz blanca (aumento final 200x).**

En las zonas marcadas con rojo se resaltaron células bacterianas en estado libre (no inmovilizadas).

observar dos imágenes consecutivas adquiridas con iluminación por luz blanca en el microscopio de epi-fluorescencia en colaboración con Dr. Curutchet y Dr. Radrizzani de la UNSAM. Comparando ambas imágenes entre sí, se evidencian zonas (marcadas en rojo) en las que las células bacterianas pueden moverse al estar libres y su posición ha variado, mientras que hay otras zonas en las que no hay alteración de los agregados celulares. Además, se puede observar que el colorante DAPI no es excitado con la luz blanca y no interfiere en la imagen.

En la Figura I-7 se puede observar una secuencia de 3 imágenes de otra región del mismo cubreobjeto en los que se ha variado la iluminación de la muestra, se puede ver la superficie iluminada con luz blanca, con luz UV para excitar al fluorocromo unido al ADN celular y con ambos sistemas de iluminación. Se evidencia que las células bacterianas pueden adherirse a la superficie de la matriz en estudio al desarrollar una biopelícula que lo recubre. La superficie se encuentra colonizada de forma heterogénea. La cepa bacteriana es capaz de desarrollar agregados celulares en forma de pilares, los cuales pueden ser de gran tamaño. Como así también, puede adherirse a la superficie generando pequeños agregados celulares e incluso desarrollar una monocapa celular.



**Figura I-7. Imágenes digitales adquiridas en microscopio de epi-fluorescencia de una muestra de cubreobjeto tras 4 días de inmovilización (aumento final 200x).**

- a) Iluminación con luz blanca.
- b) Iluminación con luz UV, excitación de DAPI.
- c) Iluminación con luz blanca y UV.

## 1.2- ¿Será cuantificable la biomasa inmovilizada por peso seco?

Al realizar el lavado y renovación del medio de cultivo, se midió la  $DO_{600nm}$  y el pH alcanzado a las 30 h de iniciada la inmovilización bacteriana ( $DO_{600nm-t_2}$ , ver observaciones de la Tabla I-1). Si bien se registró un valor de  $DO_{600nm}$  bajo con ambos medios de cultivos analizados, el pH había alcanzado el valor de 8 (valor esperado para los medios complejos utilizados de acuerdo a los resultados previos de la cepa

bacteriana en estos medios). Luego de la renovación del medio de cultivo, se pudo observar un aumento en el crecimiento planctónico en  $t_3$  (comparando  $DO_{600nm-t_2}$  (31 h) contra  $DO_{600nm-t_3}$  tan sólo 24 h después de  $t_2$ ).

| $m_{Cubre}$ (g) | Referencia         | $DO_{600nm-t_3}$ | pH | $m_{Total}$ (g) | $m_{Biomasa}$ (g) | Observaciones                                     |
|-----------------|--------------------|------------------|----|-----------------|-------------------|---|
| 0,1217          | PcY-0,05%Glucosa_1 | 0,3402           | 8  | 0,1222          | <b>0,0005</b>     | $DO_{600nm-t_2} = 0,1744$ ; pH = 8                |
| 0,1193          | PcY-0,05%Glucosa_2 | 0,4233           | 8  | 0,1197          | <b>0,0004</b>     | -   |
| 0,1252          | PcY-0,05%Glucosa_3 | 0,5513           | 8  | 0,1256          | <b>0,0004</b>     | Sin renovación del medio de cultivo, muy amarillo |
| 0,1175          | PcYG-1/2_1         | 0,4545           | 8  | 0,1175          | (*)               | $DO_{600nm-t_2} = 0,1873$ ; pH = 8                |
| 0,1232          | PcYG-1/2_2         | 0,4453           | 8  | 0,1232          | (*)               | -   |

**Tabla I-1. Cuantificación de la biomasa inmovilizada sobre el cubreobjeto por peso seco bacteriano.**

(\*) La biomasa inmovilizada no fue detectable con la metodología implementada.

En el único caso en que no se renovó el medio de cultivo, se halló un mayor desarrollo de crecimiento planctónico (mayor valor de  $DO_{600nm-t_3}$ ) respecto de los casos en los que si se realizó la renovación por medio fresco. No obstante, el valor de pH fue igual que en los otros casos y presentó una coloración del medio más intenso (mayor concentración de los productos de degradación). Si bien no se ha medido el volumen final, se ha registrado una reducción del volumen del medio por efecto de evaporación (comparación simple del volumen alcanzado en las cubetas plásticas del cultivo extraído de cada cavidad al medir la  $DO_{600nm}$  espectrofotométricamente).

Si se considera que la masa total se compone por:

$$m_{Total} (g) = m_{Tara} (g) + m_{Cubre} (g) + m_{Biomasa} (g)$$

Se puede hallar que la masa bacteriana inmovilizada como:

$$m_{Biomasa} (g) = m_{Total} (g) - (m_{Tara} (g) + m_{Cubre} (g))$$

siendo  $m_{Tara} = 3,9308 \text{ g} \pm 0,0001 \text{ g}$ .

La selección de la tara (tapa de caja de petri chica de plástico) se había fundado en que la biomasa inmovilizada era viable, al no fijarse con formol, no se produjo la muerte celular y con el objeto de reducir posibles fuentes de contaminación microbiológica, se seleccionó dicho soporte de fácil limpieza y desinfección. La elección de la tara no fue adecuada, la incertidumbre en la biomasa inmovilizada generada por la metodología implementada fue de  $\pm 0,0003 \text{ g}$ , por lo que las masas halladas resultaron ser ligeramente distinguibles de la incertidumbre de pesada.

Por lo analizado, la experiencia preliminar realizada para sondear si era posible cuantificar la biomasa inmovilizada no fue satisfactoria, siendo no cuantificable por peso seco la biomasa inmovilizada sobre el vidrio con la metodología implementada.



## 2- Perturbaciones en el desarrollo de las biopelículas

### 2.1- Efecto de Siembra del Inóculo: Siembra Directa o Siembra de Suspensión Bacteriana

#### 2.1.a- Consideraciones metodológicas

Los cultivos inóculo de *P. veronii* 2E presentaron gran número de aglomeraciones celulares suspendidos al crecer en medios de cultivo complejos, por lo que la  $DO_{600nm}$  que llegase a medirse resultaba ser solamente una densidad óptica aparente. Con el medio salino M9-0,5%Glucosa se han registrado numerosos grumos en suspensión, pero de menor tamaño y de mayor facilidad para disgregarse (en comparación con los grumos desarrollados con PcY-0,05%Glucosa y las diluciones PcYG-1/2 y PcYG-1/4) generando una lectura de  $DO_{600nm}$  más estable.

Los medios de cultivo registraron una baja absorción de radiación dado que se registraron valores bajos de densidad óptica ( $DO_{600nm-Control}$  realizado a  $t_0$ ). Siendo las absorbancias registradas menores a 0,025 en los medios complejos y menores a 0,040 para el medio salino.

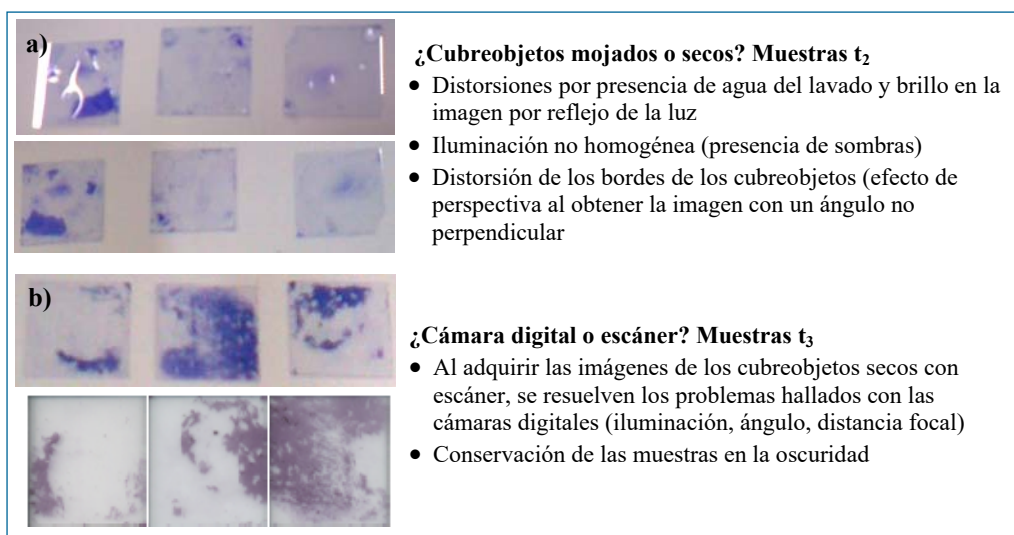
En cuanto a la  $DO_{600nm}$  de los cultivos inóculo, se hallaron mayores valores para la experiencia de Siembra Directa, siendo consecuencia de dos factores. En primer lugar, la presencia de las aglomeraciones celulares en los medios complejos provocó una señal inestable de  $DO_{600nm}$  en el transcurso de la medición debido al movimiento aleatorio de los mismos. Frente a las oscilaciones en la absorbancia, se registró la mayor señal alcanzada al colocar la celda de medición (cubeta) con previa agitación manual con objeto de mantener en suspensión los agregados celulares. Este problema de inestabilidad en la señal se minimizó al realizar las suspensiones bacterianas de los inóculos. De esta manera se mejoró la disgregación de las aglomeraciones celulares en los medios complejos aumentando así el número de células libres al momento de inicio de la colonización superficial del vidrio y obteniendo lecturas más estables de  $DO_{600nm}$ .

Por otro lado, el tiempo de demora en la lectura de la densidad óptica influyó en hallar los altos valores registrados en la experiencia por Siembra Directa. En el transcurso de la primera experiencia, la medición de la  $DO_{600nm}$  del cultivo inóculo se realizó una vez finalizada la tinción de los cubreobjetos, habiendo transcurrido 1,30 h del inicio de la colonización superficial y extracción de las muestras a  $t_0$ . Mientras que en la primer experiencia de Siembra por Suspensión, la  $DO_{600nm}$  se midió en simultáneo a la etapa de fijación celular con formol describiendo más eficientemente la situación inicial.

Considerando los resultados registrados en la experiencia de Siembra Directa en cuanto a la inmovilización bacteriana, se implementó el registro de la  $DO_{600nm}$  en cada tiempo de muestreo y cada réplica con objeto de registrar la evolución en el crecimiento de las células libres (crecimiento planctónico). A partir de ese momento, quedó sin efecto la medición de la densidad óptica de los cultivos inóculo, registrando directamente  $DO_{600nm-t_0}$  Control y  $DO_{600nm-t_0}$  de cada experiencia.

Para los primeros tiempos de la experiencia de Siembra Directa, no se ha realizado el análisis de la estructura de las biopelículas, en estos casos, sólo con fines cualitativos, se han registrado las imágenes con cámara digital al finalizar los lavados del colorante (imágenes de baja resolución). Si bien dichos registros no se utilizaron para analizar la estructura de la cobertura de la matriz, han puesto de manifiesto ciertas consideraciones metodológicas durante el transcurso de la adquisición de las imágenes para su posterior estudio. Siendo los aspectos a considerar para la adquisición de imágenes para el estudio digital de la estructura de las biopelículas:

- ✓ la superficie debe estar seca, las fotografías tomadas luego del lavado de los cubreobjetos distorsionan la imagen en las partes donde queda agua y reflejan la luz generando zonas blancas en la imagen e incluso (dependiendo del ángulo de captura de la imagen) se refleja la cámara digital (ver Figura I-8.a)
- ✓ se debería contar con un recinto de fotografía (o cabina de fotografía) en la cual se fije la distancia entre las matrices de inmovilización y la cámara digital, el ángulo en que se adquiere la imagen y la iluminación constante y homogénea en toda la extensión de la imagen (ver Figura I-8.b).



**Figura I-8. Mejoras metodológicas en la adquisición de las imágenes de los desarrollos de las biopelículas sobre cubreobjetos con el medio PcYG-0,05%Glucosa de Siembra Directa (32 °C).**

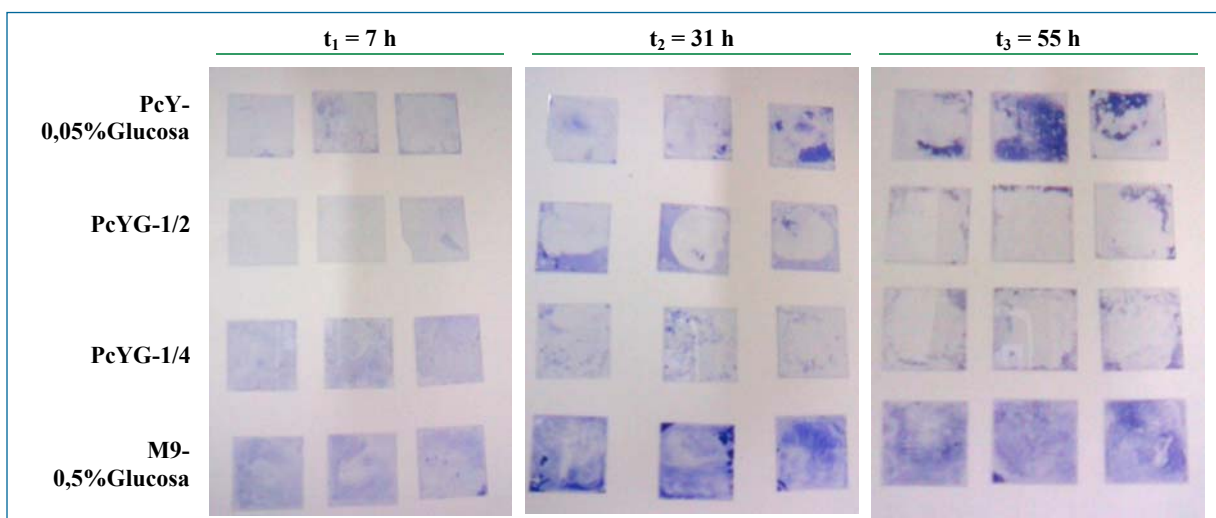
- a) ¿Cubreobjetos mojados o secos? Muestras  $t_2$ . Triplicados correspondientes a  $t_2$  para comparar la superficie de matriz mojada o seca.
- b) ¿Cámara digital o escáner? Muestras  $t_3$ . Triplicados correspondientes a  $t_3$ , diferencias en el instrumento de adquisición de imágenes.

La serie de cubreobjetos correspondientes a  $t_3$  de Siembra Directa se utilizó como muestra para optimizar la metodología de adquisición de imágenes (con escáner y por microscopía de campo claro) para el posterior análisis digital de las imágenes y el estudio de la estructura de la biopelícula. En el transcurso del proceso de optimización, la serie de muestra se conservó en la mesada de trabajo sin resguardo de la luz ambiente (ni de la luz artificial ni de la luz solar). Como puede observarse en la Figura I-8.b, el color del colorante en los triplicados escaneados se ha degradado parcialmente por efecto de la luz ambiente notándose un color rojo borroso. La cuantificación espectrofotométrica de la biopelícula desarrollada se realizó posteriormente a la adquisición de la imagen por escaneo siendo no confiable el valor hallado para la serie muestral.

### 2.1.b- Cinética de colonización y Siembra Directa

En la Figura I-9 se encuentran las imágenes de baja resolución correspondientes a los tiempos de muestreo  $t_1$ ,  $t_2$  y  $t_3$  halladas con Siembra Directa para una discusión cualitativa de la cinética de colonización superficial. En cada columna se encuentran los triplicados a cada tiempo de muestreo distribuidos en 4 filas de acuerdo al medio de cultivo testado, PcY-0,05%Glucosa, PcYG-1/2, PcYG-1/4 y M9-0,5%Glucosa.

Una simple inspección por la secuencia de imágenes, puso de manifiesto que el desarrollo de las biopelículas adheridas sobre vidrio dependió estrictamente del tipo de medio de cultivo y de la concentración de los nutrientes que lo componían. En cuanto a la estructura de las biopelículas desarrolladas sobre los cubreobjetos al comparar entre los mismos triplicados, se han encontrado comportamientos similares en los casos estudiados.



**Figura I-9. Evolución de la biopelícula desarrollada sobre vidrio en función del tiempo y en función del medio de cultivo utilizado para la experiencia de Siembra Directa a 32 °C.**

Los triplicados de inmovilización se agruparon en columnas de acuerdo al tiempo de muestreo y en filas según el medio de cultivo utilizado (PcY-0,05%Glucosa, PcYG-1/2, PcYG-1/4 y M9-0,5%Glucosa).

En el caso del medio de cultivo salino M9-0,5%Glucosa, se obtuvo un tapiz de característica más homogénea en el cubrimiento superficial del cubreobjeto para todos los triplicados a cada tiempo de muestreo. Se produjo un aumento del desarrollo de la biopelícula de  $t_1$  a  $t_2$ , encontrándose también en estos últimos triplicados algunas regiones colonizadas por mayores densidades bacterianas (aumento de la heterogeneidad de la colonización). Luego del lavado y renovación del medio de cultivo realizado a las 30 h, se ha observado una disminución de la biopelícula sobre vidrio en  $t_3$ , en otras palabras, se produjo una dispersión de células bacterianas de la biopelícula adherida al cubreobjeto. Dos efectos pudieron estar vinculados en la disminución de la película bacteriana en estas condiciones de estudio. Por un lado, una adhesión bacteriana débil sobre la matriz soporte pudo provocar un desprendimiento celular durante el proceso de lavado disminuyendo así la densidad bacteriana adherida al vidrio. Por otro lado, la renovación del medio de cultivo por medio fresco pudo introducir una presión externa para la maduración de la biopelícula, con la consecuente liberación de bacterias de la matriz de exopolímeros -responsable de la adhesión al cubreobjeto-. Las células desprendidas pasaron al medio líquido donde abundaba la disponibilidad de nutrientes con una baja competencia por los mismos tras la renovación del medio de cultivo.

Con un medio complejo de cultivo se ha logrado colonizar la superficie de forma más heterogénea, en la que se contrastan regiones densamente colonizadas con zonas pobremente colonizadas o sin colonización bacteriana a simple vista. Así mismo, entre los triplicados de un mismo tiempo de muestreo, se han hallado diferencias en la cobertura del cubreobjeto. Si bien no se puede analizar el porcentaje de cobertura que reflejaría esta observación, los triplicados pertenecientes a  $t_2$  o a  $t_3$  del medio concentrado presentaron diferencias significativas entre sí mismos en referencia a área colonizada. No obstante, la estructura de la biopelícula desarrollada fue similar entre los mismos triplicados. Se halló un aumento del desarrollo de la biopelícula sobre el vidrio en función del tiempo a lo largo de la cinética de colonización. Mientras que un cambio en la concentración de nutrientes, como ocurrió al diluir el medio (PcYG-1/2 y PcYG-1/4), ha impactado negativamente en la colonización superficial bacteriana sobre el vidrio. Con ambos medios diluidos se ha observado el ciclo completo de una biopelícula: adhesión inicial, aumento de la colonización superficial como consecuencia del crecimiento de la biopelícula y la maduración dada por la dispersión bacteriana con la consecuente disminución del área colonizada tras al lavado de la matriz.

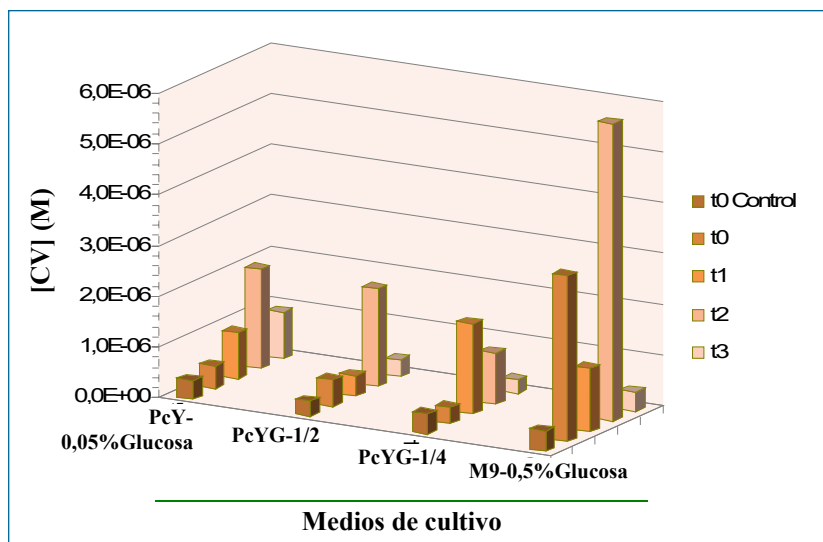
El medio PcYG-1/4, de menor disponibilidad de nutrientes, favoreció el desarrollo de la biopelícula a corto plazo encontrándose que a las 7 h, la colonización superficial fue

mayor que los desarrollos alcanzados con los medios más concentrados. Por otro lado, el desarrollo de la biopelícula presentó características similares al hallado con el medio M9-0,5%Glucosa; una colonización casi total de la superficie del cubreobjeto, de aspecto homogéneo en toda la superficie y apariencia de ser una fina capa bacteriana colonizando la superficie. Para los siguientes tiempos, se evidenció una disminución del cubrimiento bacteriano con un aumento en la heterogeneidad de la biopelícula, siendo incluso menor el desarrollo de la biopelícula que el hallado en el medio M9.

Si se observan los triplicados de PcYG-1/4 correspondientes a  $t_2$  y  $t_3$  de la Figura I-9, pueden apreciarse pequeñas zonas densamente colonizadas como si fueran pequeños grumos densos adheridos dispersos en una superficie poco colonizada (colonizada por un fino tapiz celular). Al pasar las 7 h de crecimiento en cada celda de cultivo, continúa aumentando el número de células en el sistema consumiendo los nutrientes del medio a expensas de la liberación de los productos de degradación. El consumo de nutrientes provoca una disminución en su disponibilidad y las células bacterianas adheridas a la biopelícula pueden desprenderse de la matriz de exopolímeros para pasar al estado planctónico y poder utilizar así los nutrientes que se encuentran en el seno del líquido. Hacia las 31 h de iniciada la colonización, la biopelícula ha madurado y las células se han desprendido de la matriz. Las células que han quedado adheridas a la superficie en estudio, han podido aumentar su densidad bacteriana en las inmediaciones generando las estructuras en forma de “grumos” (microcolonias), mencionados anteriormente.

Para la dilución PcYG-1/2, se observó una situación intermedia a los casos ya descritos de los medios complejos. Se halló el máximo de la colonización superficial a las 31 h de iniciada la misma con una maduración de la biopelícula hacia las 55 h. A las 7 h de muestreo, se halló una pobre colonización superficial que fue en aumento hacia las 31 h de estudio en el cual predominó la colonización bacteriana a partir de uno de los laterales del cubreobjeto. Luego la biopelícula maduró y una parte de la población bacteriana inmovilizada sobre el vidrio se desprendió provocando una disminución de la biomasa inmovilizada. El lavado y renovación del medio de cultivo con medio fresco pudo haber generado el desprendimiento de células durante el lavado y una migración de células desde la matriz inmovilizada al seno del líquido donde había una gran disponibilidad de nutrientes y con baja competencia para su utilización.

En cuanto a la cuantificación de la biopelícula, en la Figura I-10, se graficó la concentración de Cristal Violeta ([CV]) en función del tiempo para cada medio de



**Figura I-10. Cuantificación espectrofotométrica del desarrollo de la biopelícula de *P. veronii* 2E sobre los cubreobjetos en la experiencia de Siembra Directa (32 °C).**

Evolución temporal de la concentración de CV ([CV]) para la experiencia de Siembra Directa del inóculo.

cultivo utilizado. Como puede observarse en el gráfico, los controles a  $t_0$  (Control  $t_0$ ) fueron despreciables para todos los medios ensayados en la experiencia.

Se registraron las mayores [CV] para la inmovilización bacteriana con el medio de cultivo M9-0,5%Glucosa a tiempo inicial y a las 31 h de iniciada la experiencia, llegando al valor  $5,86 \cdot 10^{-6}$  M en  $t_2$  (siendo mayor al triple de la concentración con cualquiera de los restantes medios de cultivo analizados). Concordante con la descripción de la colonización a partir del análisis de las imágenes, tras la renovación del medio de cultivo, las células se desprendieron de la biopelícula disminuyendo la colonización y disminuyendo la concentración del CV.

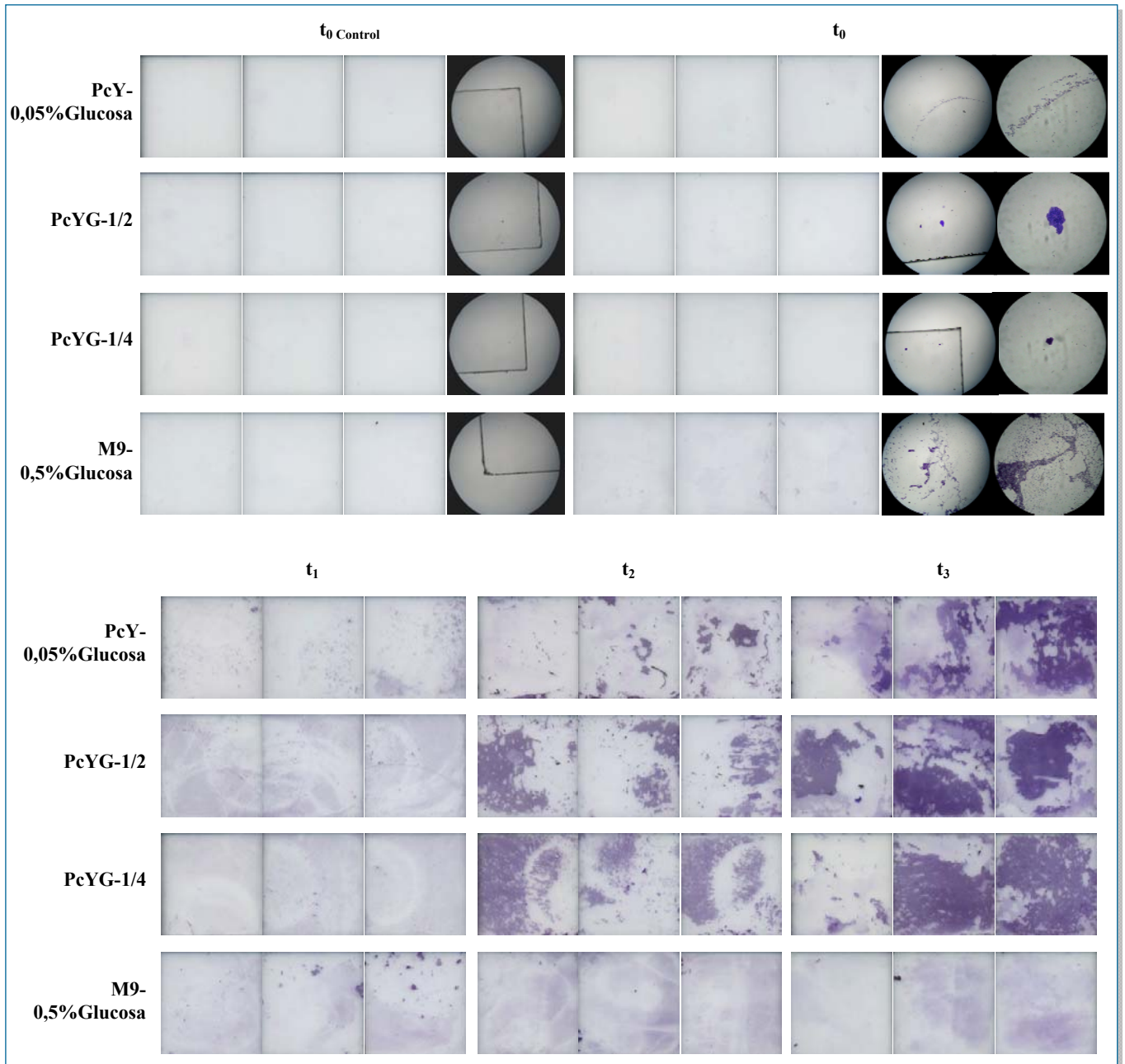
Mientras que para los medios basados en peptona de caseína, se observó un aumento en la [CV] hasta  $t_2$  para las condiciones más concentradas (PcY-0,05%Glucosa y PcYG-1/2) llegando a  $2,00 \cdot 10^{-6}$  M, aproximadamente. Mientras que para el medio PcYG-1/4 la concentración máxima se alcanzó a las 7 h con un valor  $1,80 \cdot 10^{-6}$  M (con el medio salino se llegó a la concentración de  $1,24 \cdot 10^{-6}$  M al igual tiempo de incubación).

En todos los casos, la adhesión celular al cubreobjeto disminuyó fuertemente tras la renovación del medio de cultivo, en particular para el medio salino, como se ha analizado anteriormente a partir de las imágenes.

### 2.1.c- Cinética de colonización y Siembra por Suspensión

En la Figura I-11 se encuentran las series de triplicados de desarrollo de biopelículas obtenidos en la Experiencia por Suspensión a 32 °C con los medios de cultivo PcY-0,05%Glucosa, las diluciones PcYG-1/2 y PcYG-1/4 y el medio salino M9-0,5%Glucosa para cada tiempo de muestreo. Para esta serie de imágenes no se ha





**Figura I-11. Evolución temporal de la biopelícula desarrollado sobre vidrio para la experiencia de Siembra por Suspensión a 32 °C.** En cada columna se especifica el tiempo de muestreo para cada set de triplicados distribuidos por filas de acuerdo al medio de cultivo utilizado (PcY-0,05%Glucosa, PcYG-1/2, PcYG-1/4 y M9-0,5%Glucosa). A tiempo inicial, se agregaron las imágenes por microscopía de campo claro (siendo las magnificaciones finales  $t_{0\text{ Control}}-100x$ ,  $t_0-100x$  a la izquierda y  $t_0-400x$  a la derecha).

analizado el perfil de heterogeneidad por tratarse de imágenes adquiridas en formato de documento reflectante. Para las muestras a tiempo inicial ( $t_{0\text{ Control}}$  y  $t_0$ ) se agregaron las imágenes adquiridas por microscopía de campo claro (observadas a 100x ambas muestras y con el aumento de 400x la muestra correspondiente a la adhesión inicial).

El primer paso para el desarrollo de una biopelícula bacteriana sobre un soporte inerte dado lo conforma la adhesión celular inicial. Esto se da cuando las primeras células bacterianas tienen la capacidad de adherirse a la superficie durante los primeros segundos de la exposición. Por el análisis por microscopía de campo claro,

se pudo confirmar que las regiones teñidas con CV correspondieron a la presencia de microcolonias bacterianas sobre la superficie del cubreobjeto. Si se comparan las imágenes por microscopía de la Figura I-11 correspondientes a  $t_{0\text{ Control}}$  y  $t_0^{10}$ , se pudo confirmar que los controles libres de células no presentaron aglomeraciones adheridas ni coloración inespecífica significativa como consecuencia del procedimiento de fijación y tinción.

Tras comparar las adhesiones celulares iniciales halladas con los diferentes medios de cultivo, se hallaron mayores adhesiones con el medio salino M9-0,5%Glucosa.

Una vez dada la adhesión inicial celular, comenzó a desarrollarse una monocapa celular sobre la superficie del cubreobjeto en el transcurso de las primeras horas. Durante esta etapa del ciclo de vida de una biopelícula bacteriana, las células comienzan a producir exopolímeros que son liberados al entorno y que son utilizados para adherirse al soporte de manera irreversible.

Para el medio salino M9, se han hallado los mejores crecimientos de la biopelícula a corto tiempo, como se observa en la cinética de colonización de la Figura I-11, como lo hallado anteriormente en la experiencia de Siembra Directa. El aspecto de la biopelícula bacteriana desarrollada en  $t_1$  fue de un fino y homogéneo tapiz que recubrió la superficie de la matriz de inmovilización. Para los tiempos posteriores, los cubrimientos se caracterizaron por delgados tapices bacterianos con pequeñas aglomeraciones celulares dispersas por la superficie del cubreobjeto. La película desarrollada sobre el vidrio fue estable en el tiempo, hallándose similares cubrimientos en los triplicados tanto en  $t_2$  como en  $t_3$  (31 h y 55 h, respectivamente). No se hallaron microcolonias densas dispersas por la superficie del cubreobjeto como las halladas en  $t_1$ . En la Figura I-12.a, se detallan las imágenes que describen la cinética de colonización sobre la superficie del cubreobjeto con las ampliaciones obtenidas por microscopía de campo claro para una mejor visualización de la biopelícula desarrollada con el medio M9-0,5%Glucosa. A partir de  $t_2$ , se halló una biopelícula madura.

Contrariamente, las biopelículas desarrolladas con los medios complejos (PcY-0,05%Glucosa, PcYG-1/2 y PcYG-1/4) se encontraron en un activo desarrollo registrando un aumento en la superficie colonizada en función del tiempo. La biopelícula comenzó a expandirse en torno a cada una de las zonas de anclaje inicial, aumentando la superficie de colonización y reduciendo la distancia de separación entre las diferentes aglomeraciones celulares adheridas. Analizando la arquitectura

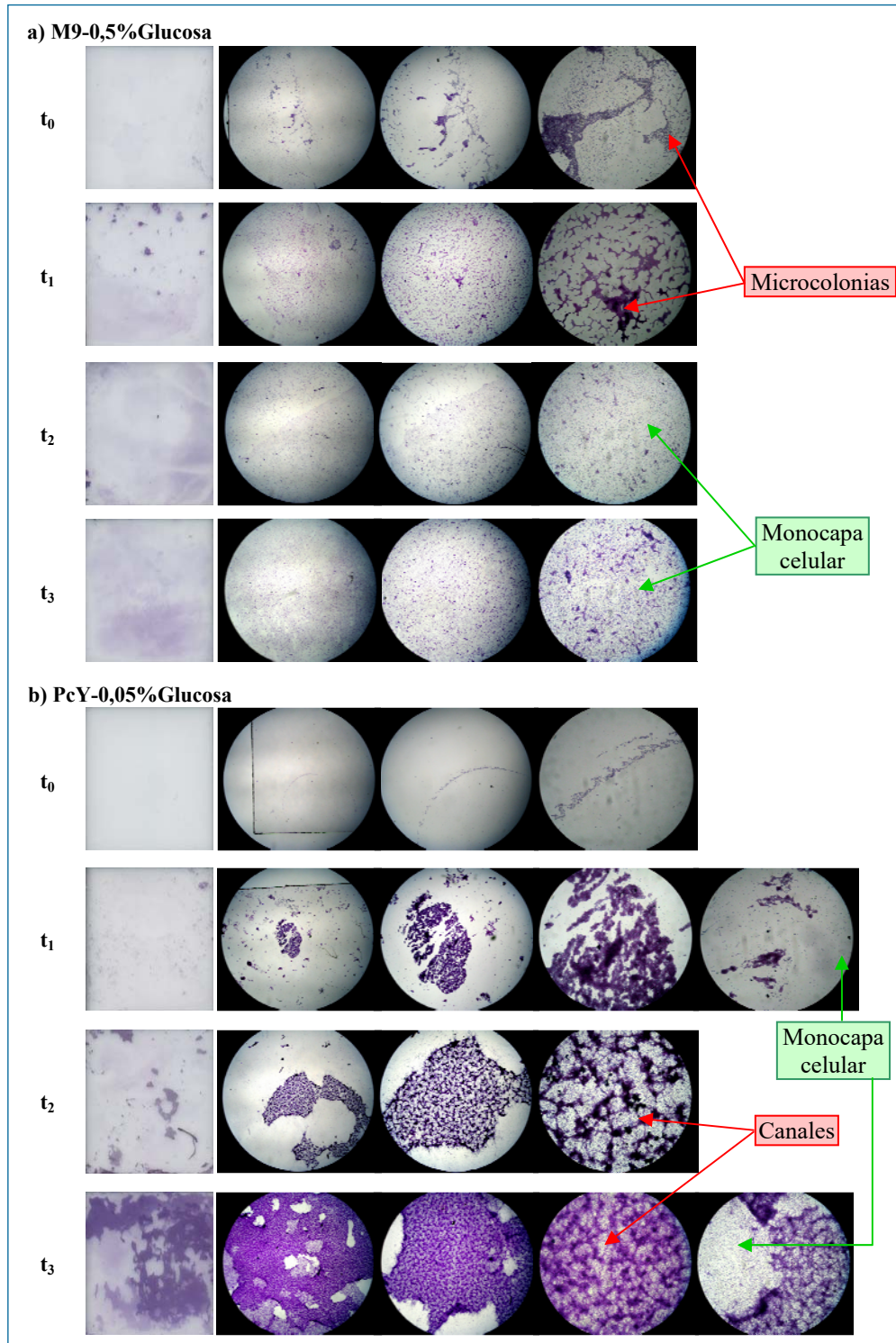
---

<sup>10</sup> Cabe destacar que en la experiencia de Siembra Directa del inóculo no se analizó este hecho -apartado anterior- por carecer de las imágenes correspondientes a los controles a tiempo inicial del set experimental en cuestión.



adquirida, las biopelículas desarrolladas fueron adquiriendo una estructura y distribución de biomasa de mayor complejidad a lo largo del tiempo, aumentando la heterogeneidad en la colonización superficial.

A tiempo inicial, la superficie fue colonizada por una monocapa celular, seguida por



**Figura I-12. Desarrollo de la biopelícula bacteriana inmovilizada a 32 °C y Siembra por Suspensión con los medios de cultivo.**

a) M9-0,5%Glucosa.

b) PcY-0,05%Glucosa.

Para cada tiempo de muestreo, se detalla el cubreobjeto escaneado junto con las imágenes adquiridas por microscopía (en orden, de izquierda a derecha, los aumentos finales de 40x, 100x y 400x).

grandes microcolonias adheridas al vidrio. Las aglomeraciones celulares presentaron forma de pilares (*mushroom*) como consecuencia de la expansión tanto longitudinal (área colonizada) como en altura (aumento en el volumen de cada microcolonia o espesor de la biopelícula).

Desde el punto de vista del soporte, se halló una mayor cobertura a menor concentración de nutrientes -medio PcYG-1/4- (como se observa en  $t_2$  y  $t_3$  de la Figura I-11 al comparar los medios complejos entre sí). Mientras que, en referencia al espesor de la biopelícula, se halló mayor densidad con el medio concentrado -PcY-0,05%Glucosa-. La mayor concentración de nutrientes del medio complejo favoreció que las nuevas células desarrolladas se mantengan adheridas a la matriz de exopolímeros permitiendo el crecimiento de la biopelícula. En base a dichas observaciones, en la Figura I-12.b, se encuentra la cinética de colonización con el medio PcYG-0,05%Glucosa por microscopía de campo claro. En función del tiempo de inmovilización, aumentó el área colonizada y la densidad de los pilares bacterianos con una reducción del tamaño de los canales de separación entre medio de los agregados celulares. Para  $t_1$  y  $t_3$  se pueden observar dos imágenes a 400x de diferentes regiones del soporte que destacan la presencia de microcolonias interconectadas y separadas por canales colonizados por monocapas celulares.

Si se analiza la cuantificación de la biopelícula a partir de la redisolución del colorante (Figura I-13), se puede observar un incremento en la [CV] en función del tiempo para los medios de cultivo ensayados, como la tendencia ya observada en la Figura I-11. Para las 7 h de iniciada la inmovilización ( $t_1$ ), las [CV] fueron similares para los medios de cultivos ensayados, no así para los tiempos subsiguientes.

Para el caso del medio mínimo, se registró la máxima [CV] a las 31 h ( $t_2$ ) llegando a  $1,23 \cdot 10^{-6}$  M. Tras la renovación del medio de cultivo, se registró una ligera disminución

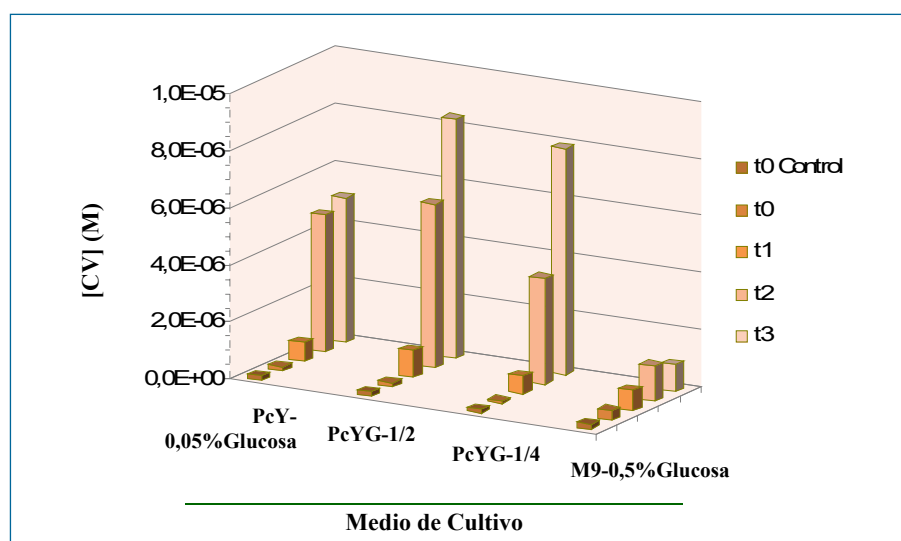


Figura I-13. Evolución temporal de la [CV] para la experiencia de Siembra por Suspensión (32 °C).

de la concentración ( $0,93 \cdot 10^{-6}$  M) 24 h más tarde ( $t_3$ ) como posible consecuencia de la maduración de la biopelícula y el desprendimiento de células. Por el contrario, para los medios complejos, a partir del tiempo  $t_1$ , se observaron incrementos muy notables en la [CV], hallándose mejores resultados para los medios PcYG-1/2 y PcYG-1/4. En cuanto a la metodología implementada para la cuantificación espectrofotométrica de la biopelícula inmovilizada, no fue suficiente el tiempo utilizado para disolver el colorante en los casos donde la biopelícula era muy densa y compacta. Las biopelículas quedaron teñidas luego de 30 min en contacto con el etanol, efecto muy marcado en los cubreobjetos correspondientes a los medios complejos más concentrados.

El seguimiento del crecimiento del cultivo planctónico registró un aumento del valor de pH del medio de cultivo en función del tiempo, varió de 7 (salvo el medio PcYG-1/4 cuyo pH inicial fue 6) hasta llegar al valor de 8 a las 55 h de iniciada la colonización superficial. El aumento del pH fue consecuencia de los productos de degradación tras el crecimiento bacteriano, dada la composición de los mismos (principalmente, la utilización de la peptona como fuente de nitrógeno en el medio complejo). En la Figura I-14 se muestran los promedios de los triplicados de  $DO_{600nm}$  para la experiencia de Siembra por Suspensión con el objeto de evaluar la evolución del crecimiento celular en estado libre para cada medio de cultivo. Como se puede ver en el gráfico, las curvas de crecimiento presentaron tendencias similares en los medios de cultivos estudiados. Prácticamente a las 7 h de haber iniciado la experiencia, los cultivos entraron en la fase estacionaria correspondiente al crecimiento en estado libre. Cabe

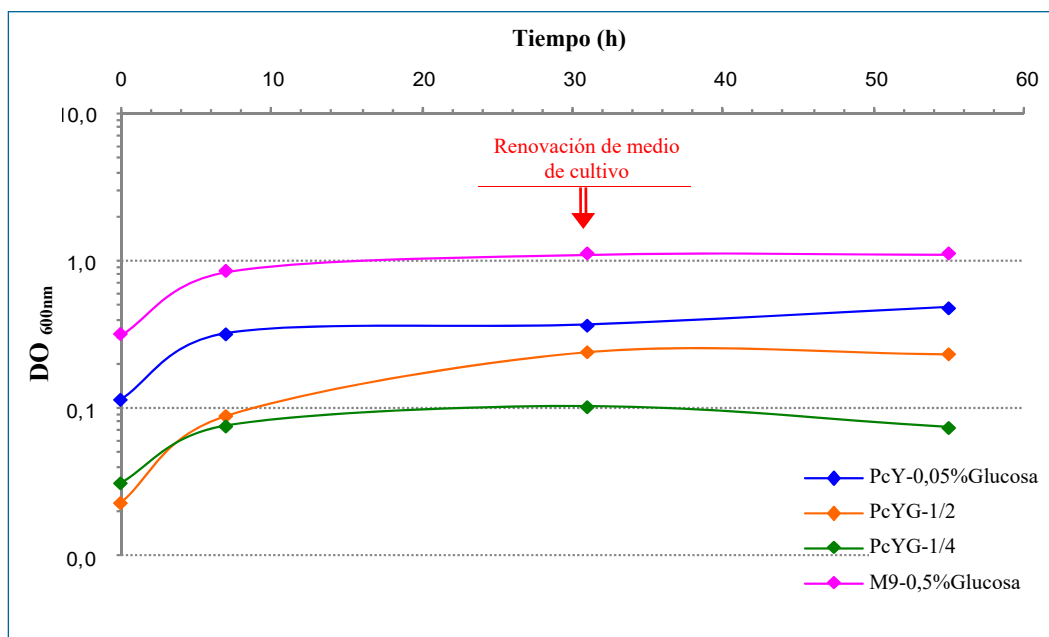


Figura I-14.  $DO_{600nm}$  promedio de los triplicados de cada medio de cultivo en función del tiempo de la experiencia de Siembra por Suspensión.

El eje correspondiente a la  $DO_{600nm}$  se graficó en escala logarítmica.

destacar que no es posible estimar las velocidades de crecimiento a partir del rango lineal de la fase exponencial de crecimiento para cada medio por carecer de mediciones a corto plazo por el tiempo muestral implementado. Mientras que el lavado y la renovación con medio de cultivo fresco realizado en  $t_2$  no impactó en el cultivo planctónico.

Con M9-0,5%Glucosa, *P. veronii* 2E evolucionó satisfactoriamente en forma de células libres llegando a altos valores de densidades bacterianas en suspensión (superiores a 1). Mientras que para los medios de cultivos complejos (PcY-0,05%Glucosa y las diluciones), los valores de  $DO_{600nm}$  fueron menores a los registrados con el medio salino e inferiores a 1 en todos los casos. Acentuándose esta diferencia a medida que disminuyó la concentración de nutrientes del medio complejo. Los bajos valores de  $DO_{600nm}$  registrados en los medios complejos fueron consecuencia de la formación de los agregados bacterianos suspendidos en el medio líquido provocando lecturas de densidades ópticas aparentes. No obstante, a pesar de ser baja la densidad óptica en los sobrenadantes de los medios complejos, a las 55 h de iniciada la colonización en todos los casos se llegó a un pH = 8. Con el medio PcYG-1/4, en particular, la  $DO_{600nm}$  no superó el valor de 0,1 en el tiempo de estudio y el pH llegó a 8 en  $t_3$  (durante el transcurso de las primeras 31 h de cultivo, se llegó a pH = 7,5 y en 24 h, tras la renovación del medio de cultivo, pudo llegar a pH = 8 en  $t_3$ ).

A modo de síntesis, en estas condiciones de estudio, *P. veronii* 2E con el medio de cultivo salino se desarrolló mayoritariamente en estado libre, desarrollando un fino y delgado tapiz inmovilizado sobre el vidrio en el tiempo de estudio de la cinética. Mientras que con los medios complejos estudiados, se hallaron buenos recubrimientos de la superficie del cubreobjeto, desarrollando una densa y heterogénea biopelícula sobre el cubreobjeto con un bajo desarrollo del cultivo planctónico.

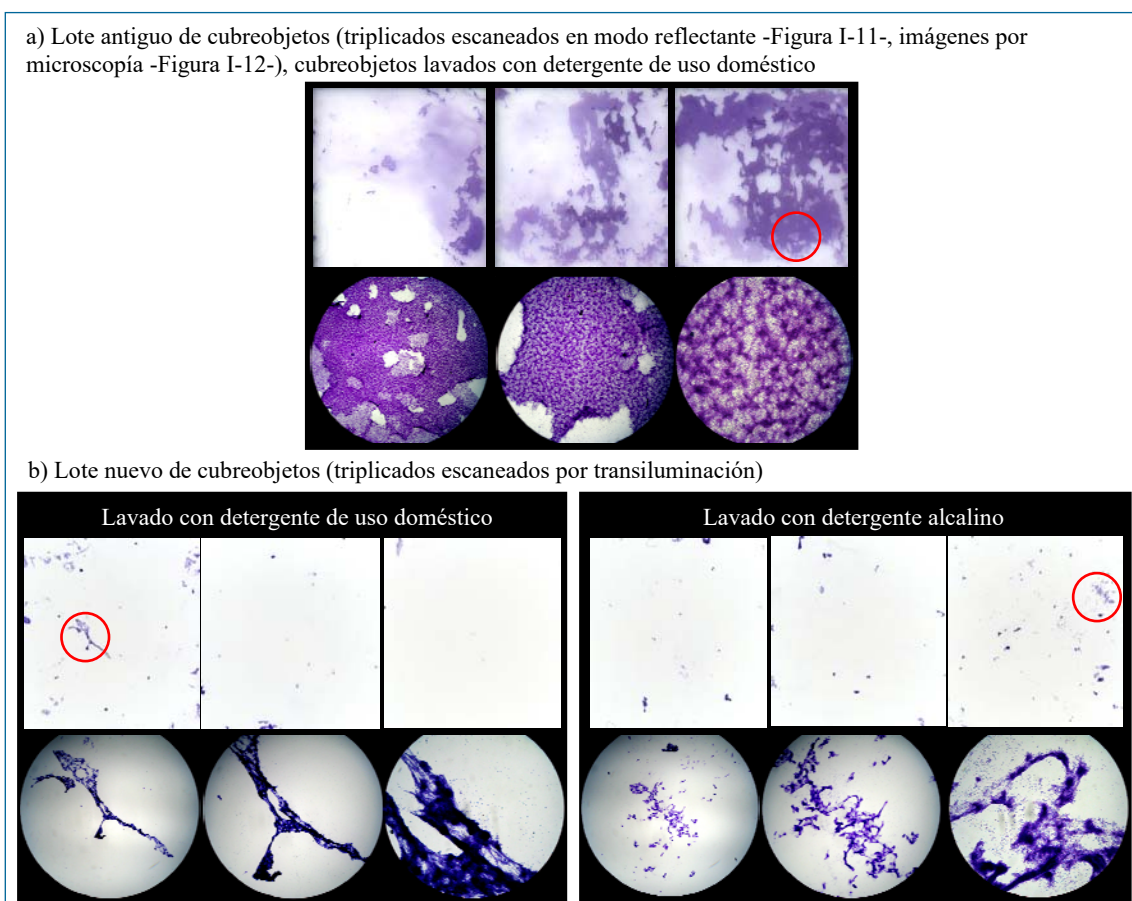
Tras comparar los resultados obtenidos con ambos tipos de siembra, se seleccionó la siembra del inóculo a partir de la preparación previa de suspensiones bacterianas para el estudio de las perturbaciones en el desarrollo de las biopelículas. Por lo que no se ha realizado otro análisis aplicando la metodología de Siembra Directa.

## 2.2- Efecto de la Naturaleza de la Fuente de Carbono

En el presente apartado se estudia el efecto de la naturaleza de la fuente de carbono (glucosa, citrato, glutamato o succinato) en los cubrimientos desarrollados por *P. veronii* 2E a 32 °C con el medio mínimo M9 o con el medio complejo PcY y manteniendo la misma concentración en la fuente de carbono (0,5%).

## 2.2.a- Consideraciones metodológicas

Durante el transcurso de las primeras experiencias, cada cubreobjeto se lavó con detergente comercial de uso doméstico (resultados presentados en el apartado anterior). A partir del cambio de lote de los cubreobjetos, se comenzó a registrar una baja adhesión celular al vidrio. Se repitió la experiencia PcY-0,05%Glucosa a 32 °C sobre dos sets diferentes de cubreobjetos en los que se modificó el proceso de lavado. Un set de cubreobjetos fue lavado con el detergente de uso doméstico, mientras que el set restante fue lavado con detergente alcalino. Se seleccionaron los cubreobjetos que quedaron cubiertos por una fina capa de agua destilada tras el enjuague, descartando aquellos que presentaron una superficie de mayor hidrofobicidad (formación de gotas de agua en la superficie del cubreobjeto). En la Figura I-15 se encuentran la serie de triplicados correspondientes a  $t_3$  para ambos sets de cubreobjetos del nuevo lote en comparación con los triplicados de la primera inmovilización. Como puede verse en las series de imágenes, en el nuevo lote de cubreobjetos, disminuyó drásticamente el área colonizada. La biopelícula bacteriana



**Figura I-15. Comparación de diferentes lotes de cubreobjetos en la colonización bacteriana de *P. veronii* 2E a las 55 h de iniciada la cinética de inmovilización utilizando el medio complejo PcY-0,05%Glucosa a 32 °C.**

a) Lote antiguo de cubreobjetos (triplicados escaneados en modo reflectante -Figura I-11-, imágenes por microscopía -Figura I-12-).

b) Lote nuevo de cubreobjetos (triplicados escaneados por transiluminación)

Las imágenes por microscopía de campo claro fueron obtenidas de la región marcada en rojo y con los aumentos finales 10x, 100x y 400x respectivamente.



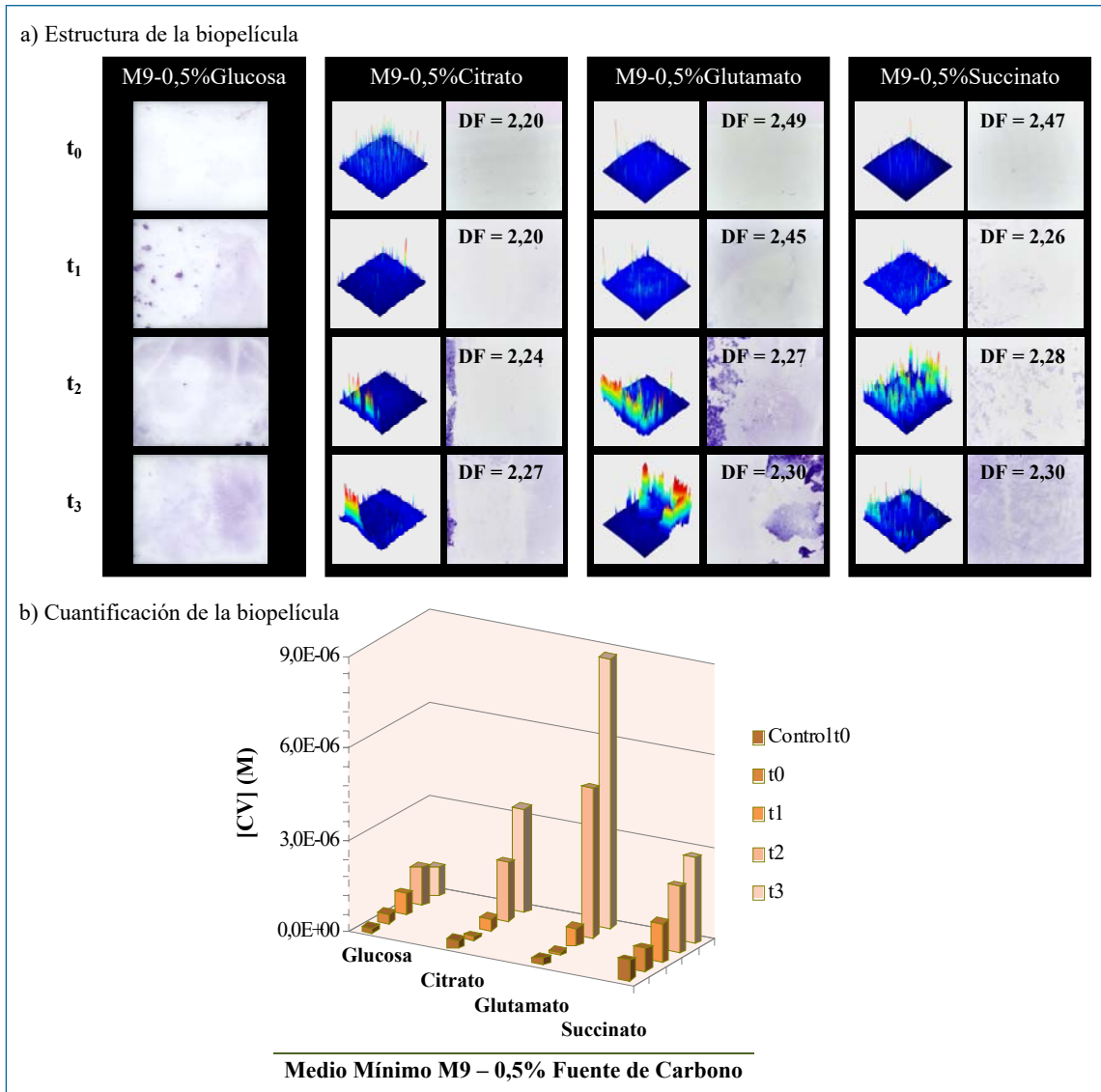
desarrollada se caracterizó por microcolonias dispersas por la superficie. Se ha registrado una baja adhesión celular inicial, en donde cada microcolonia se expandió en el tiempo tanto en área como en altura a partir de la zona de anclaje inicial. A diferencia del viejo lote de cubreobjetos, en el nuevo lote la biopelícula no ha sido capaz de colonizar un área extensa de la matriz, y en otras áreas del cubreobjeto se registró una colonización difusa, tipo monocapa bacteriana, sobre todo en los alrededores de las microcolonias.

La edad del vidrio resultó ser una variable importante en el estudio de la colonización bacteriana superficial, variable no contemplada al inicio del estudio. El material de vidrio suele estar recubierto por películas protectoras del material que se van degradando con el tiempo. El primer lote de cubreobjetos utilizado, resultó ser un lote muy antiguo que carecía de dicha protección del vidrio favoreciendo la fijación bacteriana sobre la superficie en estudio. El lavado de la matriz con detergente alcalino favoreció ligeramente la colonización bacteriana, por lo que fue seleccionado dicha metodología de lavado para los posteriores análisis.

En los siguientes apartados se presentan y discuten los resultados hallados con los cubreobjetos lavados con detergente alcalino.

### **2.2.b- Medio mínimo salino (M9, 32 °C)**

A 32 °C, con el medio mínimo se registró un bajo desarrollo de la biopelícula bacteriana caracterizada por un fino tapiz recubriendo la superficie del cubreobjeto. La fuente succinato mejoró considerablemente la colonización bacteriana desarrollada sobre el vidrio comparando las diferentes fuentes de carbono en estas condiciones de trabajo (ver Figura I-16.a). Se observa un incremento paulatino de la biopelícula sobre el vidrio cubriendo la superficie a lo largo del tiempo. Se desarrolló un delgado tapiz constituido por agregados celulares (de baja densidad celular) dispersos por la superficie y separados entre sí por pequeños canales. En los primeros tiempos de muestreo, se halló una colonización más bien heterogénea,  $t_1$  y  $t_2$ , se pudieron encontrar regiones cubiertas por una colonización difusa tipo monocapa celular en contraste con regiones con presencia de pequeñas microcolonias. En  $t_3$ , se observó una fina biopelícula homogénea que cubrió la superficie del cubreobjeto provocando un perfil de heterogeneidad chato. El lavado y renovación del medio de cultivo favoreció el desarrollo de la biopelícula sobre el vidrio con la fuente succinato, siendo la fuente de carbono que más favoreció el desarrollo de la biopelícula a lo largo tiempo ( $t_3$ ) con M9.



**Figura I-16. Efecto de la naturaleza de la fuente de carbono (0,5% para cada fuente de carbono) en la cinética de colonización superficial con el medio mínimo M9 a 32 °C.**

a) Estructura de la biopelícula.

b) Cuantificación de la biopelícula.

Se seleccionó uno de los triplicados con el perfil de heterogeneidad y el valor de dimensión fractal (DF) para poder analizar la estructura de la biopelícula. En cuanto a la cuantificación, se graficó el promedio de las concentraciones obtenidas a cada tiempo.

En cuanto a la dimensión fractal (DF) podemos decir que se hallaron bajos valores, indicando poca rugosidad o irregularidad en los bordes de las muestras de las biopelículas. No se hallaron diferencias en la DF de las biopelículas desarrolladas en función del tiempo y en función de la fuente de carbono utilizada. Cabe destacar que los valores de DF para los casos de tiempo inicial ha dado un valor alto en algunos casos, posiblemente debido al bajo número de microcolonias colonizadoras en la extensión de la superficie del cubreobjeto generando una alta la relación perímetro sobre área cubierta y registrando un aumento de la rugosidad superficial. Comparables a los valores hallados para los controles a tiempo inicial.

La cuantificación espectrofotométrica para el medio M9 con concentración 0,5% para cada fuente de carbono a 32 °C se detalla en Figura I-16.b. La metodología describió adecuadamente las tendencias analizadas a partir del análisis de las imágenes en lo referente a las fuentes de carbono succinato y glucosa.

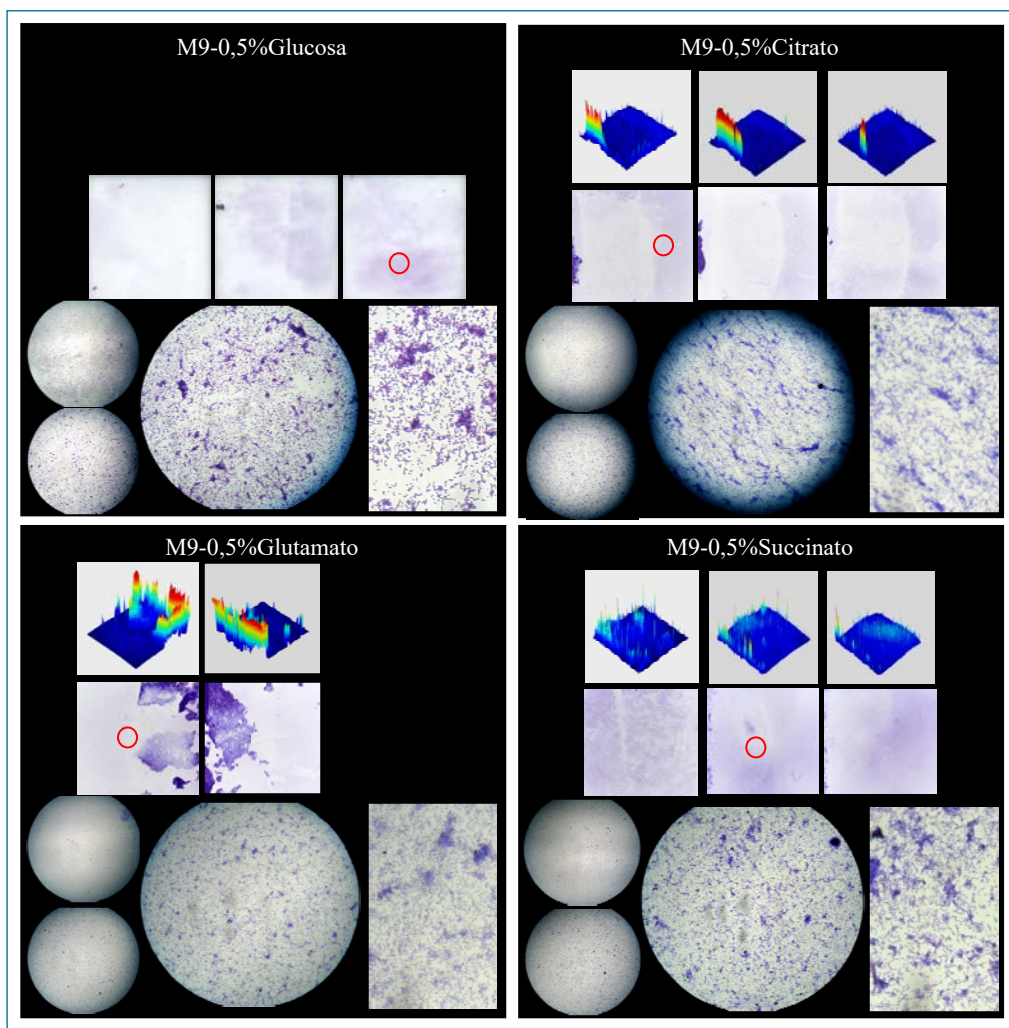
Mientras que las fuentes de carbono citrato y glutamato, en condiciones de cultivos estáticos, han favorecido una diferenciación celular capaz de desarrollarse formando películas bacterianas en la interfase líquido-aire capaces de flotar sobre el medio líquido. En inglés, se utiliza el término *pellicle* al referirse a dichas formaciones bacterianas crecidas en la interfase líquido-aire. Para *P. veronii* 2E, estas estructuras presentaron gran tendencia a adherirse de forma irreversible a las superficies sólidas, tales como a las paredes plásticas de la microplaca como a los cubreobjetos en sí mismos. A la temperatura de trabajo, con dichas fuentes de carbono, fue común hallar gran número de fragmentos de *pellicle*, no unidos entre sí, flotando sobre la superficie del líquido, siendo compleja la separación de los mismos durante la extracción de los cubreobjetos. En la Figura I-16.a se observan restos de *pellicle* adheridos a las muestras correspondientes a  $t_2$  y  $t_3$  tanto con glutamato como con citrato en menor proporción. Otro tipo de adhesiones registradas, como consecuencia de la metodología de extracción de los cubreobjetos, fue debido al arrastre del vidrio por el fondo de la microplaca adhiriéndose irreversiblemente parte del tapiz desarrollado sobre el plástico de la cavidad. En las imágenes de  $t_2$  y  $t_3$  para citrato se observa una franja muy densa de biopelícula sobre un lateral del cubreobjeto. Por la metodología de adquisición de las imágenes sobre la plantilla de vidrio, la ventana visible del área escaneada produce un recorte digital de los cubreobjetos con pérdida de información de los bordes de los cubreobjetos.

Las adhesiones colaterales descritas (tanto *pellicle* como arrastre de fondo) produjeron una sobrecuantificación de la biopelícula bacteriana colonizadora del vidrio aumentando la concentración de CV. Se alcanzaron las concentraciones de CV - respectivamente para  $t_2$  y  $t_3$ - para el citrato de  $1,9 \cdot 10^{-6}$  M y  $3,4 \cdot 10^{-6}$  M y para el glutamato,  $4,8 \cdot 10^{-6}$  M y  $8,8 \cdot 10^{-6}$  M.

En la Figura I-17 se hallan las imágenes de los triplicados correspondientes a  $t_3$  para los diferentes casos ensayados destacando las imágenes obtenidas por microscopía de campo claro. Se puede observar, por un lado, que se ha registrado un comportamiento similar en el juego de cada triplicado de cada condición.

Para el caso del succinato, se halló una delgada biopelícula colonizando la superficie del cubreobjeto con pequeños agregados celulares dispersos aleatoriamente. Mientras que para citrato se ha hallado una colonización compuesta por microcolonias de mayor tamaño que las halladas con succinato y separadas por grandes canales colonizados





**Figura I-17. Triplicados correspondientes a  $t_3$  con el medio M9 y con las fuentes de carbono en concentraciones 0,5% (glucosa, citrato, glutamato y succinato) a 32 °C.**

Para cada fuente de carbono se detallan los triplicados escaneados con los perfiles de heterogeneidad, la secuencia de imágenes por microscopía de campo claro de la región seleccionada (con los aumentos 40x, 100x y 400x), además se agregó el recorte de la región central ampliada de la imagen correspondiente a 400x.

Para el caso de glutamato solo se cuenta con duplicado (debido a rotura del triplicado) y para la glucosa no se cuenta con el análisis por MATLAB® debido a que las imágenes fueron escaneadas en formato reflectante.

por una monocapa celular. Siguiendo para el caso del glutamato, se hallaron microcolonias de mayor tamaño e interconectadas entre sí, separados por canales colonizados por una delgada película bacteriana. Por último, se halló con la glucosa la película más densa colonizando la superficie del cubreobjeto. Se visualiza la presencia de pilares celulares separados por canales poco colonizados.

### 2.2.c- Medio complejo basado en peptona de caseína (PcY, 32 °C)

En el presente apartado se analizan los resultados hallados con las concentraciones 0,5% de las fuentes de carbono en los medios complejos de cultivo a 32 °C.

La cinética de colonización bacteriana evidenció un aumento en el crecimiento de la biopelícula desarrollada sobre el vidrio en función del tiempo en la mayoría de los casos (ver Figura I-18.a). El succinato mostró el menor cubrimiento superficial a lo

largo del tiempo que duró la experiencia, y la glucosa, el mayor desarrollo de la biopelícula a partir de las 31 h.

Con las fuentes de carbono citrato, glutamato y succinato se ha desarrollado un delgado tapiz, con pequeñas regiones de mayor heterogeneidad dispersas por la superficie (como puede observarse en los perfiles la aparición de picos aislados). Para el succinato, se halló un aumento en el tiempo de la presencia de las microcolonias en torno a los puntos de anclaje inicial, con el consecuente aumento de densidad de las microcolonias. Mientras que con el glutamato y con el citrato, se observó además la expansión de la biopelícula al colonizar nuevas regiones de la superficie, como puede observarse en los cubreobjetos correspondientes a  $t_2$  y  $t_3$  generando un cubrimiento

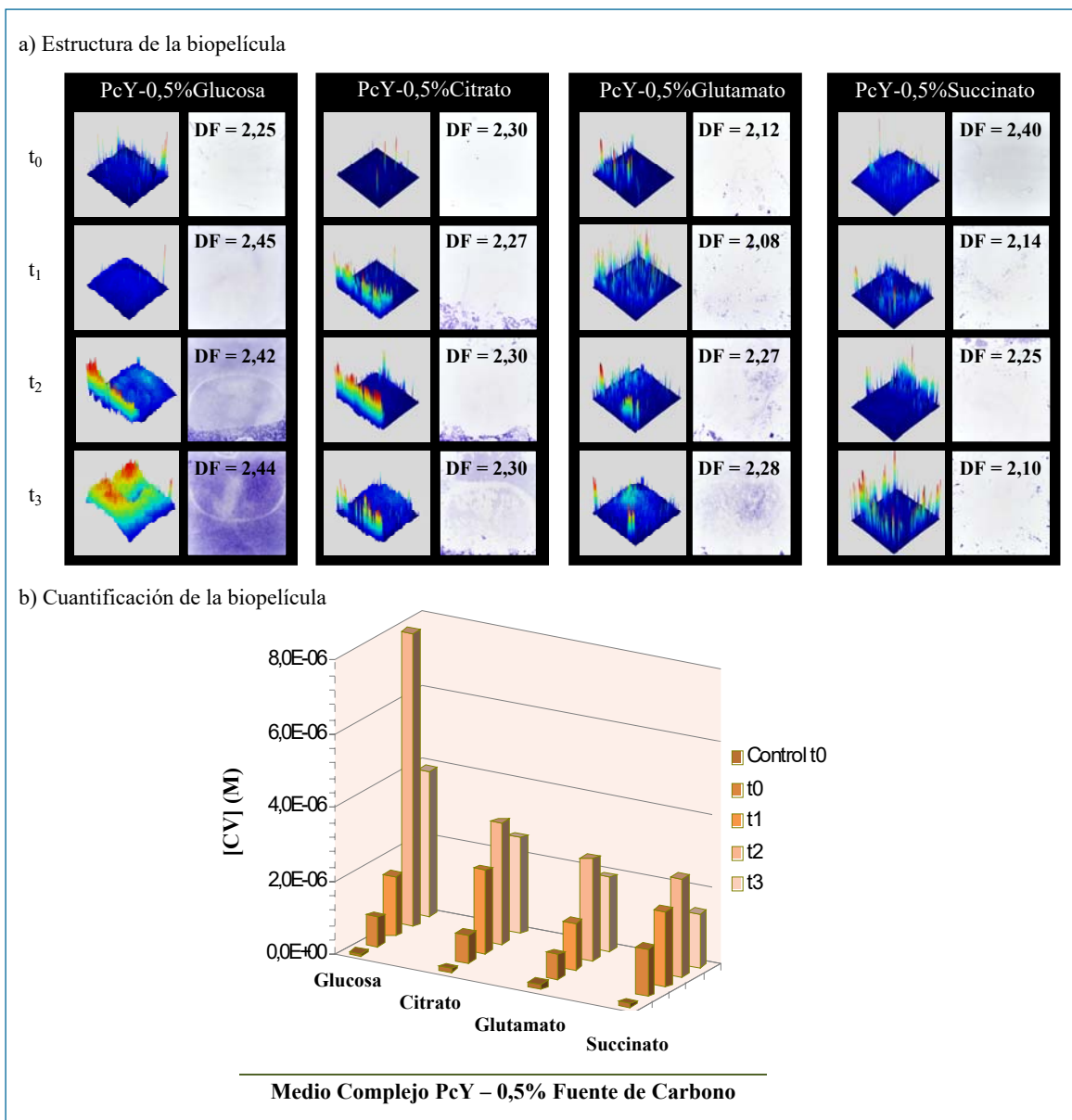


Figura I-18. Efecto de la naturaleza de la fuente de carbono (0,5 % para cada fuente de carbono) en la cinética de colonización superficial con el medio complejo basado en peptona de caseína (PcY) a 32 °C.

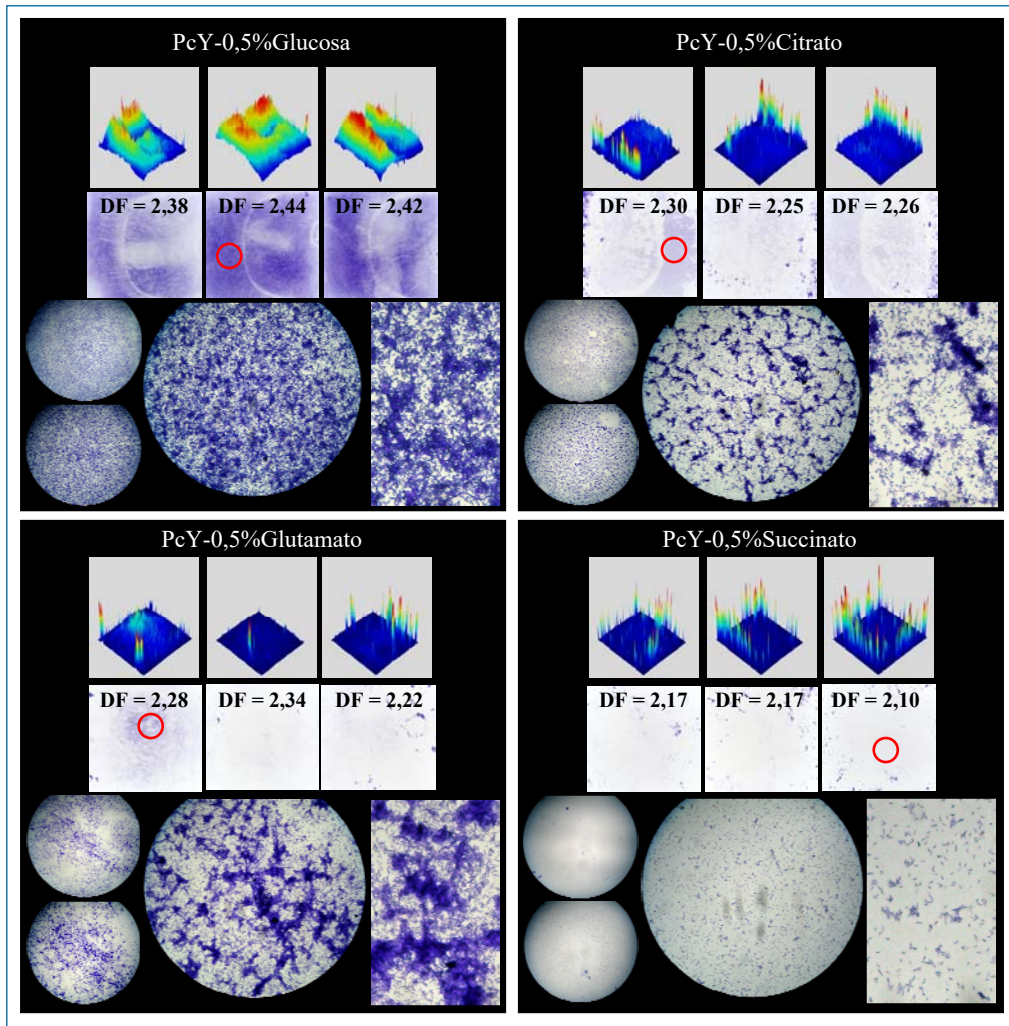
- a) Estructura de la biopelícula.  
b) Cuantificación de la biopelícula.

más homogéneo en el cubreobjeto. El lavado y renovación del medio de cultivo favoreció el crecimiento de la biopelícula para ambas fuentes de carbono. Se hallaron bajos valores de DF, evidenciando películas más bien planas y de baja rugosidad, no se hallaron diferencias entre los diferentes tratamientos.

Para el caso de la glucosa, se ha hallado una biopelícula en constante crecimiento que colonizó homogéneamente la superficie del cubreobjeto (como puede verse en el perfil de heterogeneidad). El lavado y renovación del medio de cultivo favoreció su expansión. En referencia a la DF, se hallaron valores ligeramente superiores a los hallados con las restantes fuentes de carbono, por lo que podría decirse que aumentó la rugosidad en la colonización.

En las muestras correspondientes a  $t_2$  para la glucosa y para el succinato (en menor medida) como en las muestras para el citrato a partir de  $t_1$ , fue notable hallar sobre un lateral del cubreobjeto, regiones colonizadas por una densa película bacteriana, reflejado en las franjas de los correspondientes perfiles de heterogeneidad como consecuencia de las adherencias irreversibles por arrastre de fondo.

La Figura I-19 detalla el cubrimiento hallado a las 55 h en cuanto a los triplicados escaneados con sus respectivos perfiles de heterogeneidad y las imágenes por microscopía de campo claro para cada fuente de carbono y la DF hallado para cada uno. Como puede observarse, los triplicados presentaron similares cubrimientos y similares valores de DF entre sí para las fuentes de carbono glucosa, citrato y succinato. Para el succinato, se desarrolló una biopelícula heterogénea, gobernada por una monocapa celular con agregados bacterianos de pequeño tamaño dispersos por la superficie del cubreobjeto, como se destaca en las imágenes obtenidas por microscopía. En promedio la DF estuvo en torno al valor de  $2,15 \pm 0,03$  (considerando los intervalos de confianza en el 95%). Con el citrato se desarrolló una delgada biopelícula formada por pequeñas colonias dispersas por la superficie y separadas por canales de baja densidad celular. Se halló además presencia de pocos agregados celulares de mayor tamaño que incrementaron la heterogeneidad de la misma. El promedio de la DF estuvo en torno a  $2,17 \pm 0,04$ . Como se mencionó anteriormente, la glucosa fue la fuente de carbono que generó el mejor desarrollo de la biopelícula sobre el vidrio (similar cubrimiento en todos los triplicados) generando un tapiz de mayor densidad bacteriana respecto de las fuentes ya descritas. Como puede verse en las imágenes por microscopía, la superficie fue colonizada por un gran número de microcolonias densas separadas por pequeños canales con menor densidad celular. Además, puede observarse en las imágenes escaneadas, una franja de baja densidad bacteriana en forma de semicírculo, indicio de una biopelícula interconectada entre sí, y como consecuencia de la extracción del cubreobjeto, se produjo el estiramiento y



**Figura I-19. Triplicados correspondientes a  $t_3$  con el medio PcY y con las fuentes de carbono en concentraciones 0,5% (glucosa, citrato, glutamato y succinato) a 32 °C.**

Para cada fuente de carbono, se detallan los triplicados escaneados con los perfiles de heterogeneidad, la secuencia de imágenes por microscopía de campo claro de la región seleccionada (señalizada con rojo, ampliaciones finales 40x, 100x y 400x), además se agregó el recorte de la región central ampliada de la imagen correspondiente a 400x.

desgarro de la misma. El promedio de la DF estuvo en torno a  $2,41 \pm 0,07$ , obteniéndose una rugosidad mayor para la glucosa respecto a las fuentes citrato y succinato.

Mientras que para el caso del glutamato, no se halló un resultado concluyente al comparar las imágenes de los triplicados entre sí. En uno de los triplicados se halló una colonización superficial más homogénea. Se destacaron microcolonias con una alta densidad bacteriana separadas por canales de baja densidad celular (de similar aspecto a las colonizaciones con las fuentes citrato y glucosa), siendo la DF en ese caso  $2,28 \pm 0,05$ . En los restantes cubreobjetos, por el contrario, se caracterizó la presencia de una monocapa celular con escasos desarrollos de microcolonias dispersas por la superficie. En estos casos, se observan en los perfiles la presencia de picos aislados. Para el triplicado que menor cantidad de microcolonias ha colonizado



la superficie se halló una DF relativamente más alta que en el otro caso, siendo  $2,34 \pm 0,02$  y  $2,25 \pm 0,03$ . Sin considerar el triplicado que dio la DF más alta de lo esperado, podríamos decir que el promedio de la DF fue  $2,26 \pm 0,05$ .

Desde el punto de vista de DF se hallaron rugosidades superficiales diferentes, por un lado con citrato y succinato se hallaron los valores más bajos y compatibles con una baja colonización bacteriana. A continuación se halla glutamato y por último (la colonización más rugosa) se halló con la glucosa.

En cuanto a la cuantificación espectrofotométrica (Figura I-18.b), se hallaron mayores concentraciones de CV con la fuente de carbono glucosa. Mientras que con las restantes fuentes de carbono, se hallaron concentraciones similares a lo largo de toda la cinética de inmovilización compatible con la baja colonización descrita a partir del análisis de las imágenes. En todos los casos, se hallaron los valores máximos de concentración de CV a las 31 h ( $t_2$ ), registrando una disminución en la colonización bacteriana tras el lavado de la matriz. El caso más marcado, se halló con la glucosa en la que se alcanzó la concentración  $8,0 \cdot 10^{-6}$  M del colorante en  $t_2$  disminuyendo a la mitad la concentración al finalizar la cinética. Con la fuente de carbono citrato se registró una tendencia similar siendo  $0,7 \cdot 10^{-6}$  M la disminución en la concentración de CV de  $t_2$  a  $t_3$ . Las concentraciones halladas al finalizar la cinética fueron  $4,0 \cdot 10^{-6}$  M para la glucosa,  $2,6 \cdot 10^{-6}$  M con citrato,  $2,0 \cdot 10^{-6}$  M con glutamato y  $1,4 \cdot 10^{-6}$  M para succinato. La metodología de cuantificación implementada no permite discriminar entre el tapiz desarrollado sobre el vidrio a lo largo del tiempo de las adhesiones irreversibles producidas por el proceso de extracción de los cubreobjetos. Como se analizó anteriormente, el arrastre del cubreobjeto por el fondo de la placa, provocó el levantamiento y la adhesión al vidrio de la biopelícula desarrollada sobre el fondo de la placa de cultivo. Durante la tinción, se tiñeron todas las células indistintamente, sobrecuantificando la biopelícula desarrollada sobre el cubreobjeto, especialmente en  $t_2$ . Un análisis complementario entre las diferentes metodologías de análisis (macro y microestructura y la cuantificación espectrofotométrica) permitió describir de manera adecuada la colonización superficial, sin llegar a conclusiones erróneas por el uso aislado de alguna de ellas.

### **2.3- Efecto de la Concentración de la Fuente de Carbono**

En el presente apartado se discuten los cubrimientos hallados tras variar la concentración de las cuatro fuentes de carbono en los medios de cultivo M9 y PcY.

### 2.3.a- Medio mínimo (M9, 32 °C)

Se testeó la posibilidad de disminuir la concentración de la fuente de carbono para el caso de la glucosa y se analizó el desarrollo de la biopelícula a 31 h y 55 h ( $t_2$  y  $t_3$ ) a 32 °C. La disminución en la concentración de la fuente de carbono a 0,1% para la glucosa provocó un impacto negativo en el desarrollo de la biopelícula bacteriana sobre el vidrio. Dicha disminución no respetó la proporción carbono/nitrógeno, pudiendo ser consecuencia una baja producción de exopolímeros esenciales en el desarrollo de la biopelícula bacteriana (ver Figura I-20 triplicados escaneados). Se puede observar en los triplicados correspondientes a  $t_3$  el bajo desarrollo de la biopelícula a lo largo de toda la superficie. Por otro lado, sobre el lateral derecho se observa la franja de arrastre de células del fondo de la placa. En busca de las mejores condiciones de desarrollo de biopelículas bacterianas, tras los resultados preliminares obtenidos, se decidió no analizar la disminución en la concentración de la fuente de carbono con el medio mínimo, estudiando sólo el aumento en la concentración de la fuente de carbono. En cuanto al promedio de la DF se halló un valor de  $2,37 \pm 0,05$ , dando un valor relativamente alto (comparado con los anteriores resultados) e indicando cierta rugosidad en la superficie colonizada.

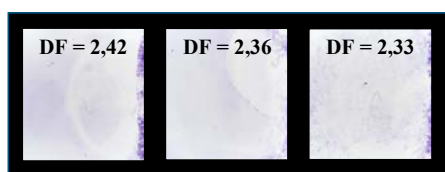


Figura I-20. Triplicados obtenidos a las 55 h de incubación con el medio mínimo M9-0,1%Glucosa a 32 °C.

En el caso de aumentar la concentración de la fuente de carbono a 1,0%, los resultados mostraron una disminución en el desarrollo de la biopelícula a pesar de estar en exceso la fuente de carbono (ver Figura I-21, en este caso, no se cuenta con el análisis con la fuente de carbono succinato). Como puede observarse en las secuencias de imágenes, se registró una delgada película bacteriana con todas las fuentes de carbono utilizadas, generando perfiles de heterogeneidad similares en las diferentes condiciones. Las regiones que presentaron mayor heterogeneidad en la colonización (presencia de picos en los perfiles) fueron los bordes como consecuencias de adhesiones colaterales debido al proceso de extracción de las muestras (como en  $t_3$ -glucosa se evidencia una franja de arrastre de fondo).

En cuanto a la DF, se observó que para la glucosa no hubieron diferencias en función del tiempo (pasó de un promedio de  $2,27 \pm 0,07$  en  $t_0$  a  $2,25 \pm 0,02$  en  $t_3$ ). Mientras que para el citrato, aumentó ligeramente a partir de  $t_2$ , pasando de  $2,23 \pm 0,02$  a un valor de  $2,31 \pm 0,04$  en promedio en  $t_3$ , incrementando la rugosidad en la

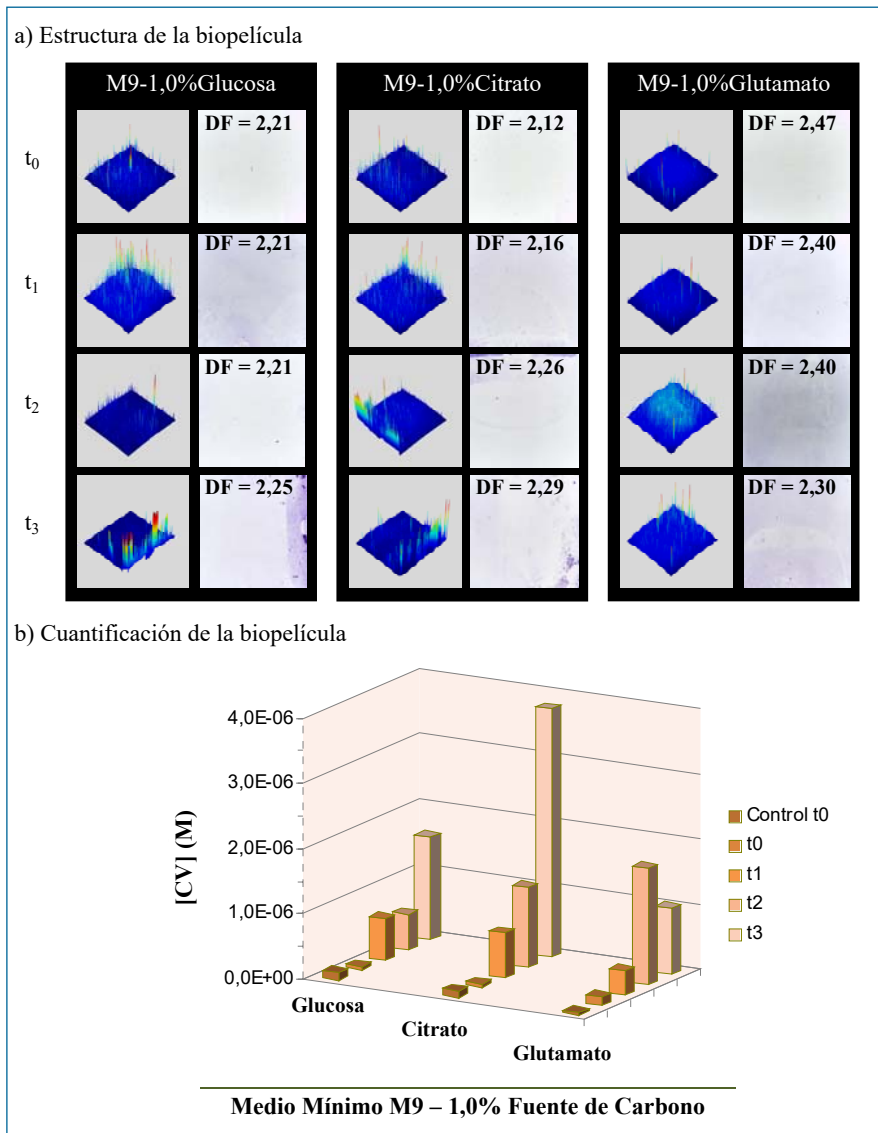


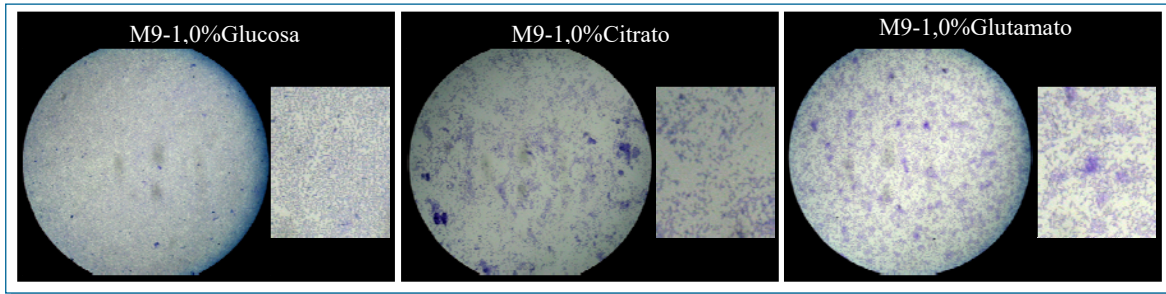
Figura I-21. Efecto de concentración de la fuente de carbono (1,0 % para cada fuente de carbono) en la cinética de colonización superficial con el medio mínimo M9 a 32 °C.

a) Estructura de la biopelícula.

b) Cuantificación de la biopelícula.

superficie colonizada, coincidentemente con la aparición de la película adherida en los bordes por arrastre de fondo. Para el caso del glutamato, se hallaron valores mayores de DF indicando una película de mayor rugosidad a pesar de ser baja la colonización bacteriana. En función del tiempo para esta fuente de carbono se halló una disminución de la rugosidad superficial, pasando de un promedio de  $2,45 \pm 0,03$  en t<sub>0</sub> a  $2,30 \pm 0,02$  en t<sub>3</sub>.

En cuanto a la cuantificación del CV, consecuentemente a lo observado, se halló un incremento en su concentración para la glucosa a las 55 h (de  $5,4 \cdot 10^{-7}$  M en t<sub>2</sub> a  $1,6 \cdot 10^{-6}$  M en t<sub>3</sub>). Para el citrato también se registró un incremento muy marcado en la CV (de  $1,2 \cdot 10^{-6}$  M en t<sub>2</sub> a  $3,8 \cdot 10^{-6}$  M en t<sub>3</sub>) como consecuencia de su



**Figura I-22. Colonización a las 55 h a 32 °C con M9 y 1% de las fuentes de carbono.**  
Imágenes por microscopía de campo claro 400x y ampliación de la región central.

sobrecuantificación sobre los laterales del cubreobjeto (registrado sutilmente sobre los bordes de las imágenes y la aparición de franjas en los perfiles).

En un medio mínimo salino, variar la concentración de uno de los componentes modifica la proporción en la condición nutricional impactando negativamente en la colonización superficial. Como puede corroborarse con las imágenes obtenidas por microscopía (ver Figura I-22), la micro-estructura de la biopelícula desarrollada a las 55 h con las fuentes de carbono ensayadas muestra una baja colonización superficial con la formación de pequeños agregados celulares dispersos por la superficie.

### 2.3.b- Medio complejo basado en peptona de caseína (PcY, a 32 °C)

En la Figura I-23 se detallan los cubrimientos hallados a cada tiempo de muestreo con el medio PcY y con 0,05% en las diferentes fuentes de carbono. Como puede observarse, se registró una colonización de la superficie baja y heterogénea. En los perfiles de heterogeneidad fue frecuente la presencia de picos en torno a las pequeñas zonas colonizadas.

A corto tiempo (7 h) la fuente glucosa favoreció la colonización superficial. Mientras que a las 31 h, la fuente succinato fue la que generó un mejor cubrimiento previo a la renovación del medio de cultivo. La biopelícula bacteriana se ha desarrollado en el entorno de la zona de anclaje inicial, pero no ha podido expandirse y colonizar la superficie del vidrio.

En cuanto a la DF, no se halló una tendencia clara conforme se varió la fuente de carbono ni en función del tiempo. Se podría decir que para la glucosa y para el glutamato, el valor de DF ha disminuido en función del tiempo, coincidente con la rugosidad superficial. Pasó de un promedio de  $2,45 \pm 0,04$  ( $t_0$ ) a  $2,24 \pm 0,03$  ( $t_3$ ) para la glucosa y de  $2,27 \pm 0,01$  ( $t_0$ ) a  $2,18 \pm 0,03$  ( $t_3$ ) para el glutamato, una superficie más plana y mayor homogeneidad en los bordes de las microcolonias. Mientras que para las fuentes de carbono citrato y succinato prácticamente no ha variado la DF a lo largo del tiempo. Para el succinato pasó de  $2,19 \pm 0,02$  ( $t_1$ ) a un promedio de  $2,21 \pm 0,03$



( $t_3$ ). Para el citrato, observando tiempo inicial y final, no se hallaron diferencias en los promedios de DF, pasó de un promedio de  $2,26 \pm 0,01$  ( $t_0$ ) a  $2,26 \pm 0,03$  ( $t_3$ ).

En cuanto a la cuantificación de la biopelícula, se ha registrado que para la glucosa, el glutamato y el succinato un aumento hasta  $t_2$  y una ligera disminución de la concentración de CV tras la renovación del medio de cultivo. Siendo los promedios hallados  $1,8 \cdot 10^{-6}$  M,  $1,9 \cdot 10^{-6}$  M y  $2,4 \cdot 10^{-6}$  M a las 31 h, respectivamente. Mientras que para el citrato se halló un continuo crecimiento de la biopelícula en el vidrio, hallándose a las 55 h un promedio de  $2,6 \cdot 10^{-6}$  M, aumentando al doble respecto de la concentración hallada a las 31 h ( $1,3 \cdot 10^{-6}$  M). De las cuatro fuentes de carbono, el citrato fue la fuente que mayor concentración de CV produjo a tiempo inicial (con una concentración de  $1,0 \cdot 10^{-6}$  M).

Al comparar el cambio de concentración en la fuente de carbono en el medio

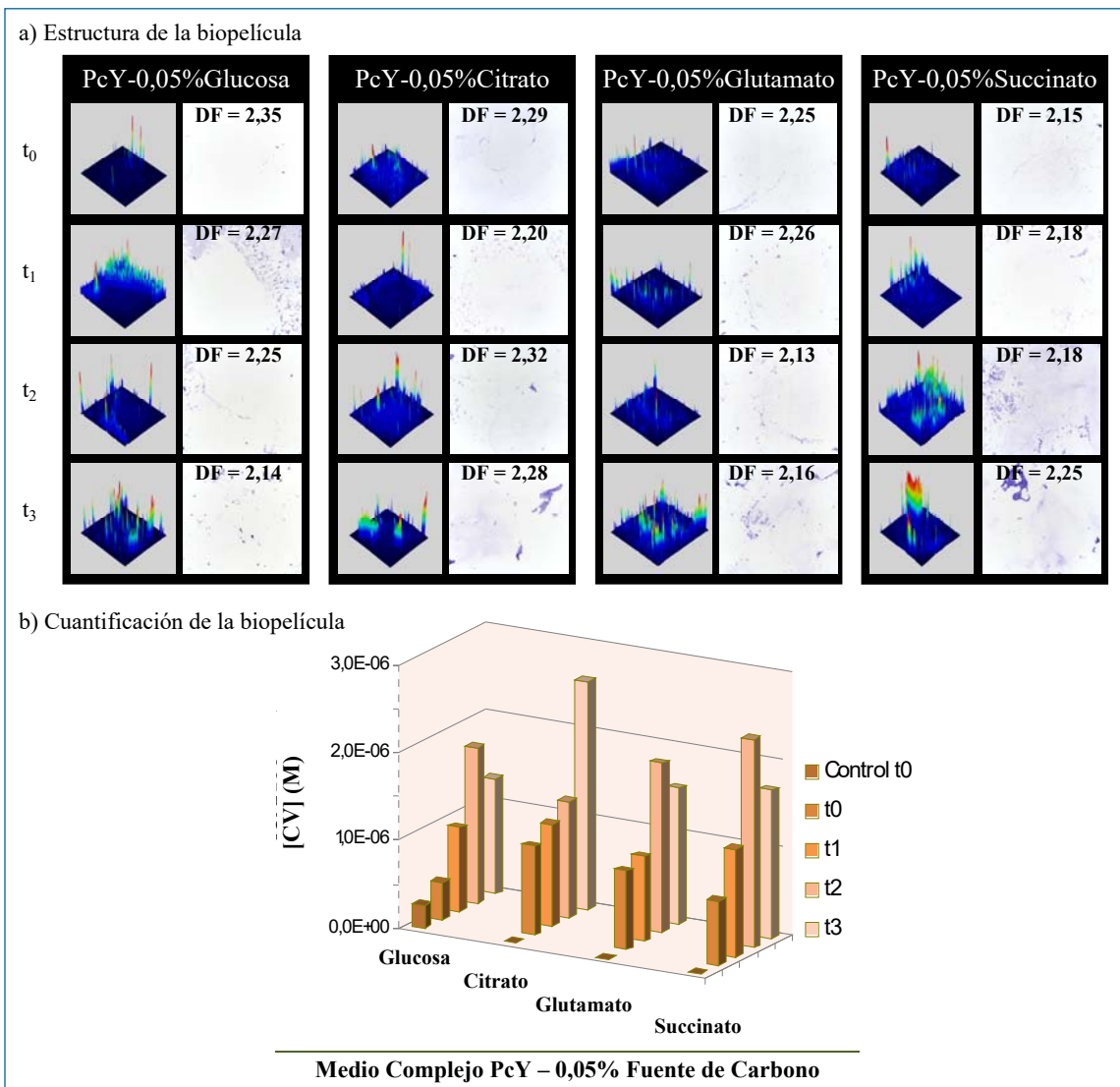


Figura I-23. Efecto de concentración de la fuente de carbono (0,05 % para cada fuente de carbono) en la cinética de colonización superficial con el medio complejo PcY a 32 °C.

a) Estructura de la biopelícula.

b) Cuantificación de la biopelícula.

complejo (Figura I-23 y Figura I-18 del apartado 2.2.c), para la fuente succinato se favoreció la colonización del cubreobjeto con la menor concentración de la fuente de carbono (0,05%). Mientras que para las restantes fuentes de carbono, la concentración 0,5% favoreció en gran medida el desarrollo de la biopelícula, siendo la glucosa la fuente de carbono con mejor colonización bacteriana sobre los cubreobjetos (como se analizó en el apartado anterior). Desde el punto de vista de DF, la disminución en la concentración de glucosa como de glutamato ha reducido la rugosidad superficial a medida que el tiempo transcurrió. Para el citrato y el succinato, a ambas concentraciones de la fuente de carbono no se han hallado variaciones en la DF en función del tiempo, se ha mantenido prácticamente constante la DF y la variación en la concentración no alteró la rugosidad superficial.

## **2.4- Efecto de la Naturaleza de la Fuente de Nitrógeno en el Medio de Cultivo Complejo**

### **2.4.a- Naturaleza de la fuente de nitrógeno en los medios de cultivo complejos**

La principal fuente de nitrógeno en los medios de cultivo complejos fue la peptona, que es un digerido proteico obtenido por la degradación enzimática de proteínas. Para estudiar el efecto en la naturaleza de la fuente de nitrógeno fue necesario utilizar diferentes tipos de peptonas. En el caso de la peptona de caseína, su composición en masa fue 12,7 %m/m de nitrógeno total ( $N_{Total}$ ) y 3,7 %m/m de nitrógeno en la forma amino ( $N_{Amino}$ ). Mientras que la peptona de carne presentó una composición porcentual de 14,0 %m/m en  $N_{Total}$  y 2,6 %m/m en  $N_{Amino}$ .

En la formulación inicial del medio complejo PcY, la composición del digerido proteico fue 2,5 g/L de peptona de caseína, siendo las concentraciones 0,3175 g/L para  $N_{Total}$  y 0,0925 g/L para  $N_{Amino}$ .

Al variar de fuente de nitrógeno del medio complejo, se seleccionaron dos condiciones diferentes al preparar el medio complejo alternativo con la peptona de carne (PY), manteniendo constante la concentración de la fuente de vitaminas y aminoácidos esenciales (1,25 g/L de extracto de levadura).

En el medio PY- $N_{Amino}$ , se utilizó la concentración de peptona en el medio de cultivo de 2,2679 g/L, siendo constante la concentración de nitrógeno total final (0,3175 g/L  $N_{Total}$ , tanto para PY- $N_{Amino}$  como para PcY) y resultando menor la proporción de nitrógeno en la forma amino en este nuevo medio de cultivo (0,0590 g/L  $N_{Amino}$ ).

En el medio denominado PY- $N_{Total}$ , se mantuvo constante la concentración de peptona (2,5 g/L de peptona), variando la proporción de nitrógeno total y nitrógeno amino en el medio final. La concentración de  $N_{Total}$  fue de 0,3500 g/L y la

concentración de  $N_{\text{Amino}}$ , 0,0650 g/L (siendo mayor  $N_{\text{Total}}$  y menor  $N_{\text{Amino}}$  respecto a lo aportado con la peptona de caseína en el medio PcY).

#### 2.4.b- Medio complejo basado en peptona de carne (PY- $N_{\text{Amino}}$ y PY- $N_{\text{Total}}$ , a 32 °C)

En la Figura I-24.a) se detallan las cinéticas de colonización en imágenes halladas con los medios PY- $N_{\text{Amino}}$  y PY- $N_{\text{Total}}$  con glucosa como fuente de carbono en las concentraciones 0,05% y 0,5% incubados a 32 °C. Se encuentran los cubreobjetos escaneados, los perfiles de colonización, el valor de DF y las imágenes a 400x por microscopía de campo claro. Se ha hallado una baja colonización bacteriana con la concentración 0,05% de glucosa para ambos medios de cultivos PY, llegando incluso a ser menor que la registrada con el medio basado en peptona de caseína (PcY). De manera similar al medio PcY, el aumento en la concentración de la glucosa como fuente de carbono mejoró la colonización del vidrio a largo tiempo con los medios basados en peptona de carne. A corto tiempo, donde se registraron las menores adhesiones celulares, se han hallado altos valores de DF, pudiendo estar vinculado con el bajo número de microcolonias en la superficie colonizada impactando en una alta heterogeneidad en los bordes de cada microcolonia respecto al área cubierta. Siendo los promedios a  $t_0$  para PY- $N_{\text{Amino}}$ -0,05%Glucosa igual a  $2,52 \pm 0,02$ , para PY- $N_{\text{Amino}}$ -0,5%Glucosa de  $2,51 \pm 0,02$ , para PY- $N_{\text{Total}}$ -0,05%Glucosa de  $2,56 \pm 0,02$  y para PY- $N_{\text{Total}}$ -0,5%Glucosa de  $2,42 \pm 0,02$ , valores relativamente altos.

Para el medio PY- $N_{\text{Amino}}$ -0,05%Glucosa, hasta  $t_2$ , se registró un bajo número de microcolonias bacterianas dispersas por la superficie de vidrio mostrando un perfil de heterogeneidad más bien chato con presencia de picos en las zonas colonizadas. Al aumentar la concentración de la fuente de carbono en el medio PY- $N_{\text{Amino}}$ -0,5%Glucosa, se halló un mejor cubrimiento del vidrio a partir de  $t_2$ . En los triplicados correspondientes a las 31 h se encontró una región colonizada por una densa biopelícula caracterizada por pequeños pilares separados por canales. Fuera de dicha región, la biopelícula se caracterizó por una estructura de monocapa celular. Los promedios correspondientes a la DF para cada medio a  $t_2$  fueron para PY- $N_{\text{Amino}}$ -0,05%Glucosa de  $2,30 \pm 0,03$  y para PY- $N_{\text{Amino}}$ -0,5%Glucosa de  $2,40 \pm 0,03$ . Luego de la renovación del medio de cultivo (con tan sólo 24 h de diferencia), a  $t_3$  se desarrolló una densa biopelícula que cubrió la totalidad del cubreobjeto. De similar comportamiento que con el medio PcY-0,5%Glucosa, se halló una franja como de fisura de la biopelícula como consecuencia del proceso de extracción del cubreobjeto para dicho tiempo. En cuanto a la DF, se hallaron a  $t_3$  los promedios PY- $N_{\text{Amino}}$ -0,05%Glucosa de  $2,27 \pm 0,05$  y para PY- $N_{\text{Amino}}$ -0,5%Glucosa de  $2,42 \pm 0,06$ .

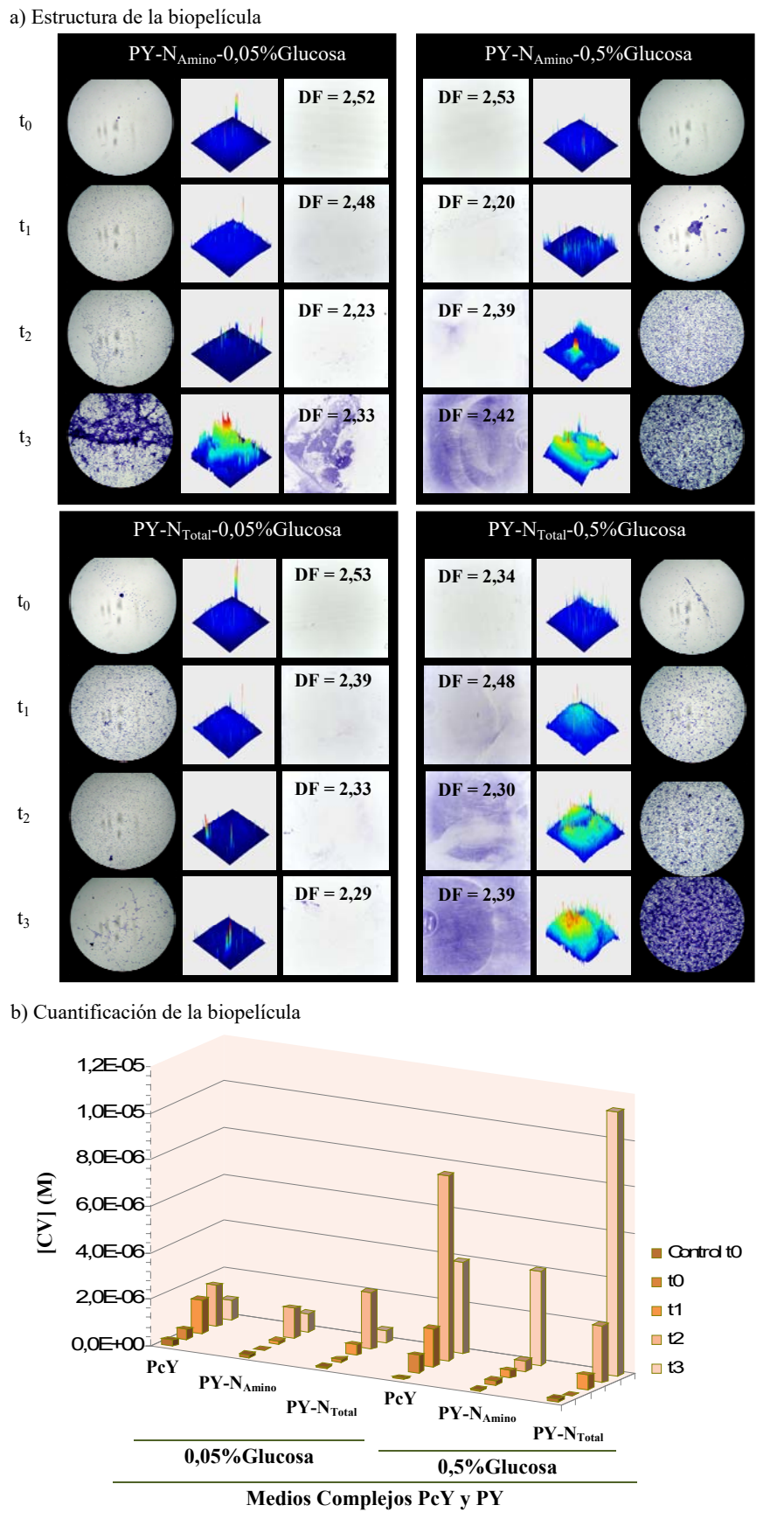


Figura I-24. Efecto de la naturaleza de la fuente de nitrógeno y efecto en la concentración de glucosa como fuente de carbono (0,05% y 0,5%) en la cinética de colonización superficial con los medios complejos PY-N<sub>Amino</sub> y PY-N<sub>Total</sub> a 32 °C.

a) Estructura de la biopelícula.

b) Cuantificación de la biopelícula. Se agregaron las concentraciones halladas con el medio PcY para poder comparar (ver Figura I-18 y Figura I-23).

Desde el punto de vista de rugosidad superficial, no se hallaron diferencias en función del tiempo (comparar  $t_2$  con  $t_3$  para cada medio), se halló ligeramente mayor rugosidad a mayor concentración de glucosa, como con el medio basado en peptona de caseína (PcY). En cuanto a la cuantificación del CV, se describió adecuadamente la tendencia registrada en las imágenes, hallándose el máximo valor una concentración en  $t_3$  para 0,5%Glucosa (PY-N<sub>Amino</sub>) e igual a  $4,0 \cdot 10^{-6}$  M, mucho mayor que la concentración registrada con 0,05%Glucosa como fuente de carbono.

Para el medio PY-N<sub>Total</sub>-0,05%Glucosa, se ha registrado una baja colonización superficial del vidrio desarrollando una delgada biopelícula tipo monocapa celular. Se han registrado microcolonias de mayor densidad bacteriana dispersas, como puede observarse en la presencia de picos en los perfiles de heterogeneidad. El lavado y renovación del medio de cultivo provocó la maduración de la biopelícula, disminuyendo la superficie cubierta. Mientras que para el medio PY-N<sub>Total</sub>-0,5%Glucosa se halló una biopelícula de mayor densidad y en continuo crecimiento compuesta por microcolonias en forma de pilares y separados por canales poblados por una monocapa celular. A las 55 h se halló la típica franja de fisura que denota una película interconectada entre sí sobre toda la extensión del cubreobjeto desgarrada como consecuencia de la metodología de extracción. Desde la DF, para la concentración de glucosa igual a 0,05%, se halló una disminución en el promedio pasando de  $2,39 \pm 0,02$  en  $t_1$  a  $2,29 \pm 0,02$  en  $t_3$ , siendo más homogéneos los bordes de las microcolonias. Para la concentración 0,5%-Glucosa, no se halló una tendencia clara en función del tiempo de  $t_1$  a  $t_2$ , se registró una diferencia en la DF de 0,15 (siendo los promedios  $2,47 \pm 0,05$  y  $2,32 \pm 0,04$  respectivamente) mientras que de  $t_2$  a  $t_3$  se registró un aumento resultando ser  $2,42 \pm 0,06$  a las 55 h de exposición. Comparando los promedios de DF a tiempo final se observó que a mayor concentración de glucosa, mayor valor de DF, mayor rugosidad superficial y mayor heterogeneidad en los bordes de las microcolonias. Desde el punto de vista de la cuantificación espectrofotométrica, se ha descrito adecuadamente la biopelícula desarrollada salvo a  $t_2$  con 0,05%Glucosa, que por una cuestión de sobrequantificación, se halló un valor anómalo para la biopelícula colonizadora del vidrio.

Comparando las imágenes por microscopía obtenidas a las 55 h, con la concentración 0,5%Glucosa, la película desarrollada con PY-N<sub>Total</sub> fue más compacta y de mayor densidad bacteriana que la desarrollada con el medio PY-N<sub>Amino</sub>. Este resultado se ve reflejado también en la cuantificación espectrofotométrica que alcanzó la concentración de  $1,1 \cdot 10^{-5}$  M, superando por más del doble a la concentración hallada con el medio PY-N<sub>Amino</sub>.

## 2.5- Efecto de la Presencia de Fe(II) en el Medio de Cultivo

En el presente apartado se estudia el efecto del agregado del catión ferroso (Fe(II)) en diferentes medios de cultivo, con una concentración 3  $\mu$ M de Fe(II).

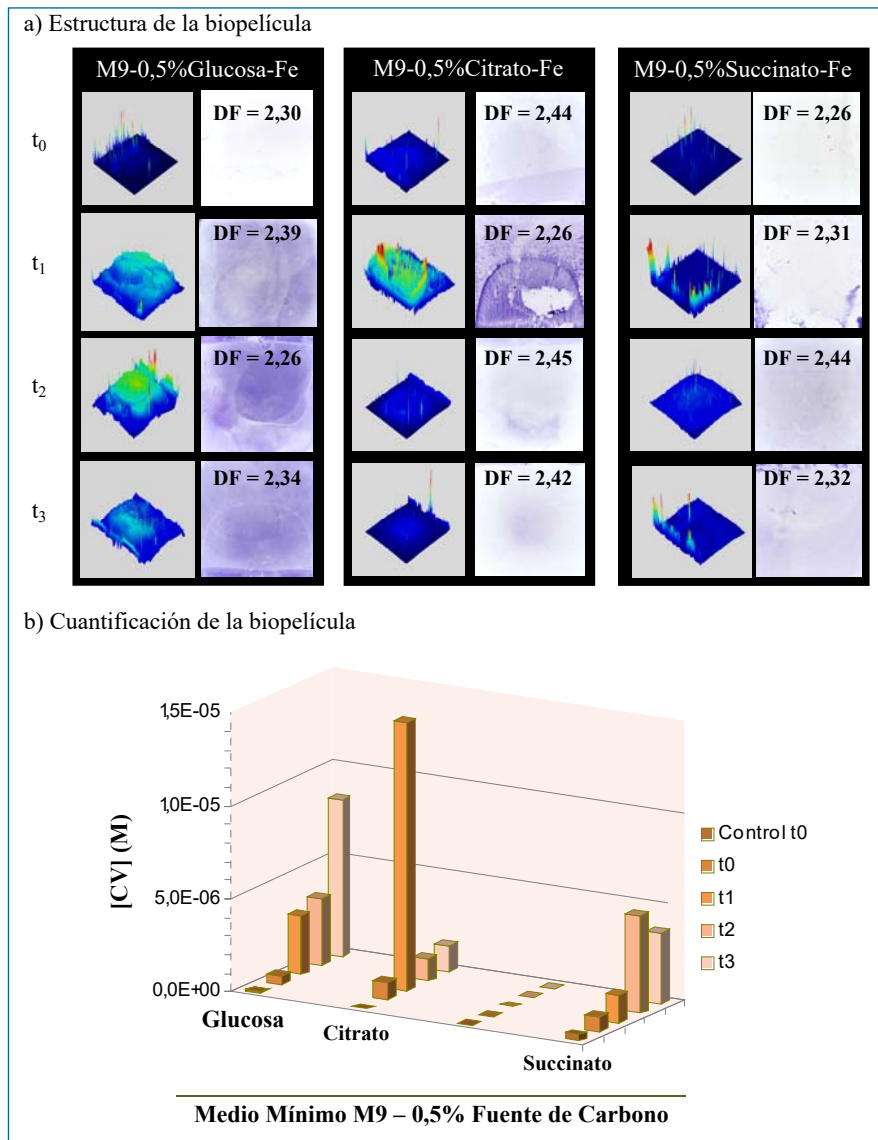
La presencia de Fe(II) en los medios de cultivo no evidenció una tendencia clara en los desarrollos de biopelículas desarrolladas sobre vidrio en las diferentes condiciones de estudio ensayadas. En los medios complejos, el Fe(II) se oxidó rápidamente, precipitando y formándose agregados de color amarronado tipo herrumbre, liberando el olor típico. Mientras que en los medios mínimos no se observó la presencia de óxidos de hierro hidratados insolubles, quedando el catión biodisponible en solución.

### 2.5.a- Medio mínimo (M9, 0,5%Fuente de carbono, 32 °C)

Con las fuentes de carbono utilizadas en el medio mínimo salino, la presencia del Fe(II) ha impactado en el desarrollo de las biopelículas bacterianas, en algunos casos se ha beneficiado la colonización superficial mientras que en otros se ha desfavorecido el cubrimiento (ver Figura I-25). Cabe destacar, si bien se realizó la cinética de colonización bacteriana utilizando el glutamato como fuente de carbono, ésta no ha podido procesarse (desde el análisis de imágenes ni redisolución de CV) debido a inconvenientes con la calidad de uno de los componentes del medio de cultivo, por lo tanto no se muestran los resultados hallados.

Si se analiza el efecto a corto plazo, la condición más favorecida fue con el citrato, donde a  $t_0$  se halló una monocapa celular colonizando la superficie. Tras 7 h de inmovilización, se desarrolló una biopelícula densa y con una compleja estructura formada con microcolonias, interconectadas entre sí e intercalando con regiones poco pobladas a modo de canales. La película se encontró débilmente adherida al vidrio dado que se desgarró y desprendió como consecuencia el proceso de extracción del cubreobjeto. Pasado  $t_1$ , se produjo la maduración de la biopelícula con el consecuente desprendimiento de las bacterias, quedando el cubreobjeto cubierto por un fino tapiz tipo monocapa celular y perdiendo la estructura compleja desarrollada a tiempos cortos. La secuencia de imágenes por microscopía (ver Figura I-26) y la cuantificación del CV confirman lo observado. En referencia a la DF, a las 7 h se halló el valor más bajo, hallándose mayor uniformidad en los bordes de las microcolonias, siendo el promedio igual a  $2,24 \pm 0,06$ . En los restantes tiempos no se hallaron diferencias entre sí en los valores de DF y son valores relativamente altos debido a la pobre colonización superficial, alta rugosidad y heterogeneidad de los bordes caracterizó a los restantes tiempos.





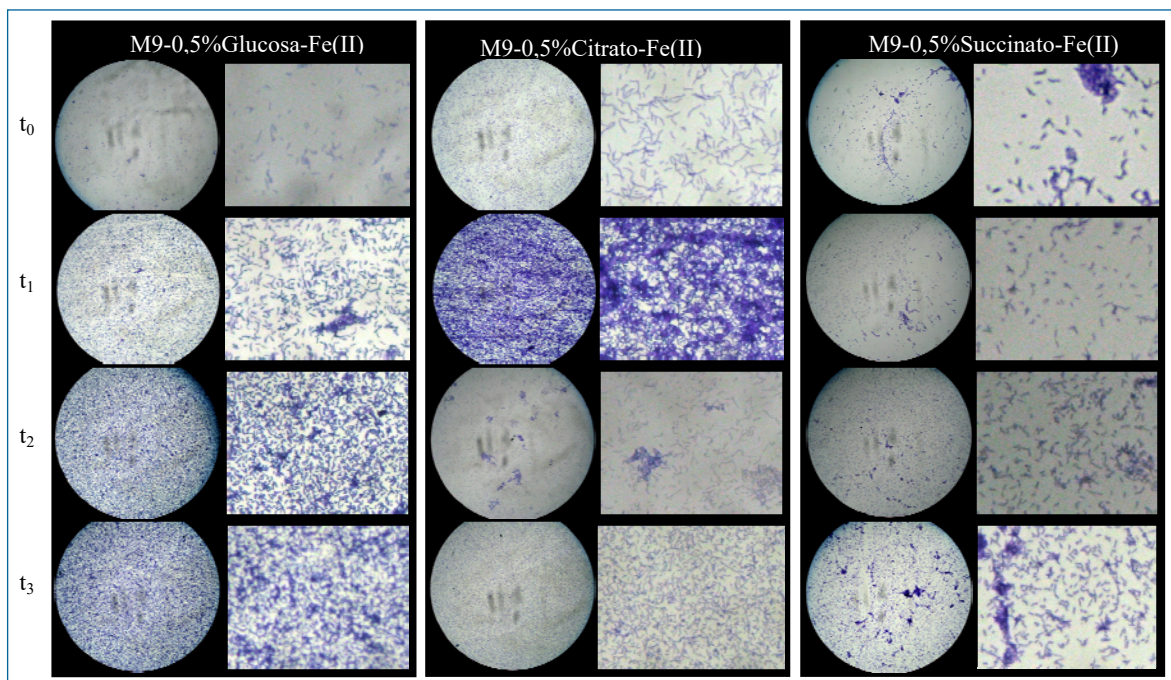
**Figura I-25. Efecto de la presencia de Fe(II) en el medio mínimo M9 a 32 °C con 0,5% fuente de carbono.**

- a) Estructura de la biopelícula.  
 b) Cuantificación de la biopelícula.

Utilizando la glucosa como fuente de carbono se observó que el agregado de Fe(II) mejoró la colonización superficial, aumentando la densidad de la película hasta las 31 h de crecimiento y se mantuvo constante posterior a la renovación del medio de cultivo. En este caso se han desarrollado películas bacterianas colonizando homogéneamente la superficie del vidrio. En t<sub>3</sub> se ha detectado una delgada línea de fisura (en forma de semicírculo) de la película tras la extracción del cubreobjeto, evidenciando una interconexión de la película en la extensión de la colonización. La secuencia de imágenes por microscopía y la cuantificación del CV confirman lo observado. En particular, en t<sub>3</sub> se halló una sobrecuantificación del CV debido al arrastre del cubreobjeto durante la extracción del mismo, como puede observarse a partir de la imagen escaneada. Siendo las concentraciones  $3,6 \cdot 10^{-6}$  M en t<sub>2</sub> y  $8,4 \cdot 10^{-6}$

M en  $t_3$ , aumentando al doble la concentración. El valor más alto de la DF se halló para las 7 h, siendo el promedio igual a  $2,40 \pm 0,04$ , alta rugosidad superficial y heterogeneidad en los bordes de las microcolonias. A partir de las 31 h, disminuyó parcialmente el valor, pero no se hallaron diferencias significativas conforme aumentó el tiempo de cultivo (siendo los promedios  $2,36 \pm 0,04$  y  $2,36 \pm 0,02$  para  $t_2$  y  $t_3$ ).

Para la fuente de carbono succinato, el agregado de Fe(II) ha desfavorecido la colonización bacteriana en la superficie del vidrio. La biopelícula desarrollada en presencia de Fe(II) fue más homogénea que la hallada sin el agregado del catión. En  $t_1$ , se desarrolló una colonización más heterogénea, una monocapa celular salpicada por microcolonias de mayor tamaño. Mientras que a partir de  $t_2$ , se desarrolló un fino tapiz que cubrió la superficie del cubreobjeto, con pequeños agregados celulares dispersos por la superficie, desarrollando una biopelícula delgada y compacta (comparar con Figura I-16). Se han hallado pocos desarrollos de agregados celulares de gran tamaño y poca contaminación por la adhesión de las biopelículas formadas en la interfase líquido-aire. El lavado y renovación del medio de cultivo ayudó al desarrollo de la biopelícula aumentando de tamaño y densidad a los agregados celulares. Mientras que en ausencia de Fe(II) se observó mayor heterogeneidad en el cubrimiento del vidrio, hasta  $t_2$  (31 h) se observa mayor cantidad de agregados celulares formados por una menor densidad bacteriana. La cuantificación del CV describió adecuadamente la cinética de colonización, hallándose el máximo valor a las 31 h con una concentración de  $5,2 \cdot 10^{-6}$  M, disminuyendo a  $3,4 \cdot 10^{-6}$  M al finalizar la experiencia. Mientras que la secuencia de imágenes por microscopía (ver Figura I-26)



**Figura I-26. Cinética de colonización por microscopía-**  
 Imágenes por microscopía de campo claro, aumento final 400x y ampliación de la región central.



no describió de manera adecuada la colonización superficial, como se evidencia en las imágenes, una monocapa celular ha gobernado el cubrimiento del vidrio en la región de interés. En cuanto a la DF, se registró una ligera disminución de la DF tras el lavado y renovación del medio de cultivo. El máximo valor se halló a las 7 h alcanzando un promedio de  $2,36 \pm 0,03$ , indicando una alta rugosidad superficial y heterogeneidad en los bordes de las microcolonias respecto del área colonizada (a las 31 h el promedio hallado coincidió con el valor correspondiente a  $t_1$ , siendo  $2,36 \pm 0,02$ ). Luego del lavado y renovación del medio de cultivo, 24 h más tarde, se registró una ligera disminución de la DF hallando un promedio de  $2,28 \pm 0,05$ , indicando una disminución de la rugosidad superficial y mayor homogeneidad en los bordes de las microcolonias.

### **2.5.b- Medios complejos con glucosa (PY y PcY, 0,05%Glucosa, a 32 °C)**

En la Figura I-27 se encuentra la cinética de colonización superficial bacteriana para medios complejos PcY, PY-N<sub>Amino</sub> y PY-N<sub>Total</sub> con 0,05% de Glucosa como fuente de carbono y estimulados con Fe(II).

Para el medio PcY-0,05%Glucosa, la presencia del catión impactó negativamente en la colonización superficial a largo tiempo. A corto tiempo,  $t_1$ , se observó una delgada capa celular colonizando la superficie del vidrio, tipo monocapa con microcolonias dispersas por la superficie. Posteriormente, se registró un bajo desarrollo de la biopelícula sobre la superficie del cubreobjeto al comparar con los resultados hallados en ausencia de Fe(II) (comparar con Figura I-23). En cuanto a la DF, no se hallaron diferencias en función del tiempo, por lo que no varió la rugosidad superficial ni la heterogeneidad de los bordes de las microcolonias respecto del área colonizada, a pesar de la baja colonización hallada a largo tiempo. Se registró un promedio de  $2,36 \pm 0,03$  en  $t_0$  y de  $2,39 \pm 0,02$  en  $t_3$ .

En los medios PY basados con peptona de carne se registró un aumento de la biopelícula desarrollada a corto tiempo (hasta las 7 h de iniciada la colonización), comparar con Figura I-24 en ausencia de Fe(II). En los triplicados se ha observado un cubrimiento homogéneo de la superficie del vidrio como puede observarse en el perfil de heterogeneidad para la muestra a  $t_1$ . Siendo la mejor condición en el medio PY-N<sub>Total</sub> donde se ha hallado una colonización tipo panal de abeja con microcolonias interconectadas entre sí y separadas por huecos colonizados por una monocapa celular. Pasado ese tiempo, la biopelícula maduró y se desprendió del cubreobjeto hallándose una monocapa celular en los tiempos sucesivos ( $t_2$  y  $t_3$ ) con baja cantidad de densos agregados celulares dispersos por la superficie como puede observarse la presencia de picos en los perfiles de heterogeneidad.

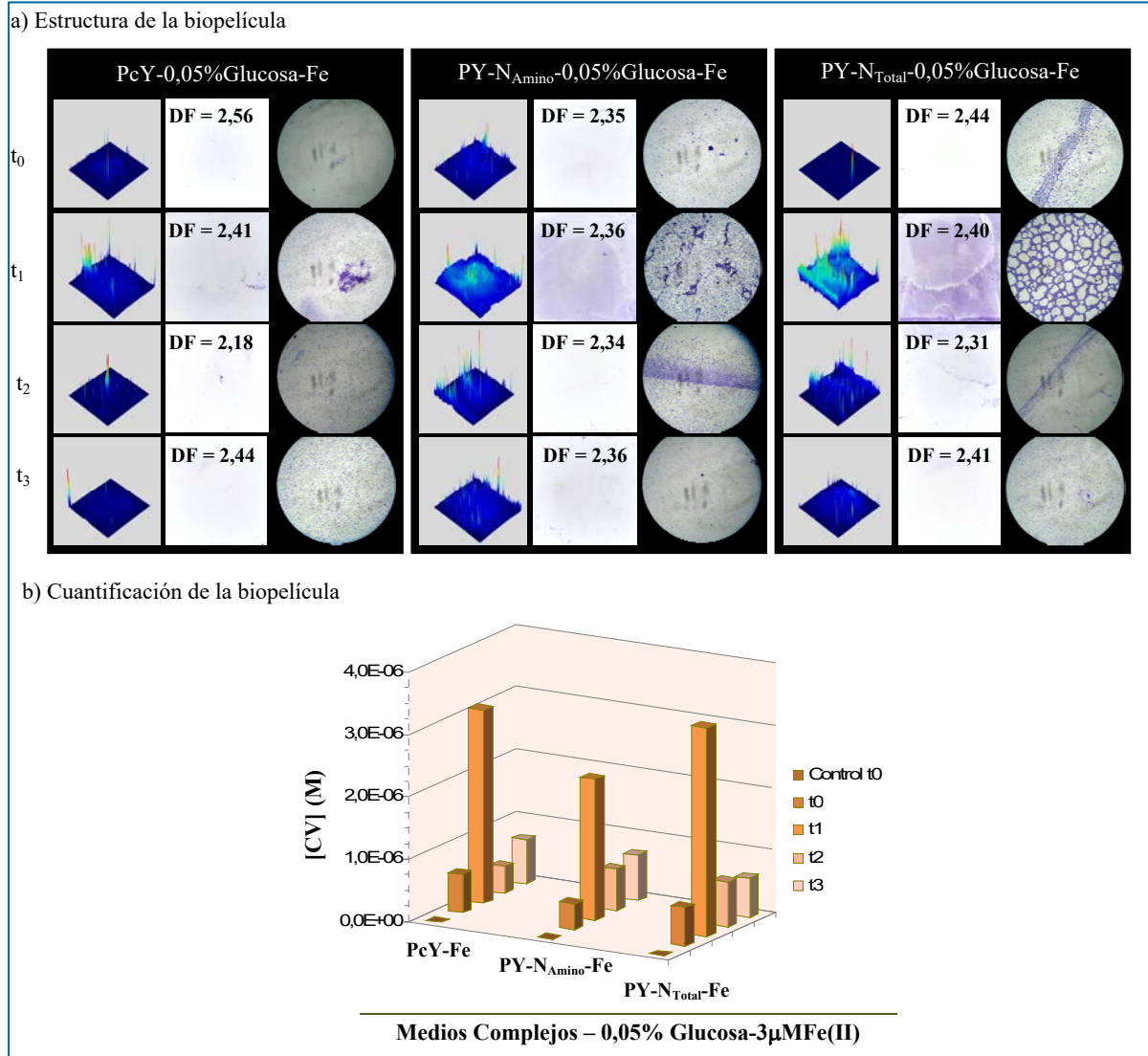


Figura I-27. Efecto de la presencia de Fe(II) en los medios complejos y concentración 0,05% glucosa como fuente de carbono a 32 °C.

- a) Estructura de la biopelícula.  
 b) Cuantificación de la biopelícula.

La presencia de Fe(II) mejoró el desarrollo de la biopelícula a corto tiempo, mientras que a largo tiempo desfavoreció el cubrimiento del vidrio.

En cuanto a la DF, para el medio PY-N<sub>Amino</sub> no se hallaron diferencias significativas en los valores promedios en función del tiempo, pasando de  $2,37 \pm 0,04$  en t<sub>0</sub> a  $2,35 \pm 0,02$  en t<sub>3</sub>. Se mantuvo constante la rugosidad superficial con dicho medio de cultivo. Mientras que para el medio PY-N<sub>Total</sub>, se registró una disminución de la rugosidad para las 31 h y luego del lavado volvió a aumentar ligeramente la DF, aumentando la rugosidad superficial. Los promedios hallados fueron  $2,40 \pm 0,4$  en t<sub>1</sub> (manteniéndose constante respecto al valor hallado a tiempo inicial),  $2,31 \pm 0,02$  en t<sub>2</sub> y  $2,36 \pm 0,03$  en t<sub>3</sub>.

En cuanto a la cuantificación con CV, como puede observarse en el gráfico de la Figura I-27.b, la concentración del colorante describió adecuadamente la tendencia

analizada en el desarrollo de la biopelícula en función del tiempo. Como puede observarse en  $t_1$ , la adición de Fe(II) a los medios de cultivos mejoró la colonización del cubreobjeto. El mayor cambio se registró con los medios PY, aumentando la concentración de CV prácticamente en un factor de 10 en presencia del Fe(II) respecto de los medios sin agregado del catión. Siendo las concentraciones para  $t_1$  con el medio PY-N<sub>Amino</sub>  $2,3 \cdot 10^{-6}$  M en presencia de Fe(II) frente a  $1,5 \cdot 10^{-7}$  M en ausencia del mismo. Mientras que en el medio PY-N<sub>Total</sub> varió la concentración  $3,3 \cdot 10^{-6}$  M en presencia del agregado del catión frente a  $4,7 \cdot 10^{-7}$  M en ausencia del mismo.

Para el medio en base a peptona de caseína, se halló una diferencia menor en los valores de las concentraciones a las 7 h en presencia del catión ferroso respecto de su ausencia. No obstante, en presencia de Fe(II) se halló una sobreestimación en la concentración del colorante en las experiencias estimuladas con el catión dado que se ha adherido parte del *pellicle* sobre el borde del cubreobjeto, no perceptible en las imágenes escaneadas.

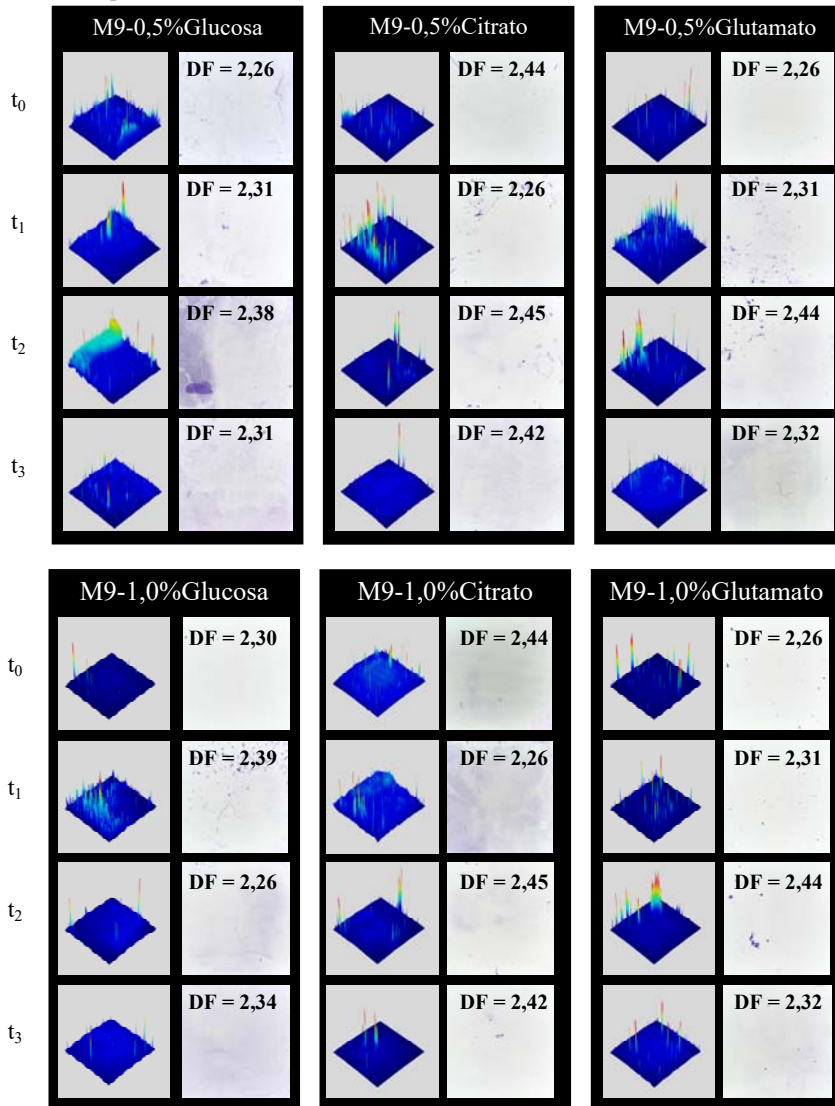
## 2.6- Efecto de la Temperatura de Incubación

A lo largo de los apartados anteriores se han presentado las cinéticas de colonización del cubreobjeto por la cepa *P. veronii* 2E a 32 °C. En el presente apartado se discuten los cubrimientos desarrollados al cambiar la temperatura de incubación a 28 °C.

### 2.6.a- Medio mínimo (M9, a 28 °C)

A la temperatura de incubación de 28 °C, se ha registrado un bajo desarrollo de las biopelículas sobre el vidrio con las fuentes de carbono ensayadas (con concentraciones 0,5% y 1,0%). Se ha realizado la cinética con la fuente succinato pero no se han podido procesar las muestras debido problemas de calidad en uno de los componentes del medio de cultivo. Como puede observarse en la Figura I-28, los mejores cubrimientos se desarrollaron con la fuente de carbono glucosa. En estas condiciones de estudio, se desarrolló un fino tapiz (tipo monocapa celular) con pequeños agregados celulares dispersos por la superficie del cubreobjeto que aumentaron la heterogeneidad del cubrimiento de la matriz (como puede verse en los perfiles de heterogeneidad). El lavado y renovación del medio de cultivo de las 30 h favoreció la maduración de la biopelícula, provocando el desprendimiento de células de la matriz con la consecuente disminución del área cubierta del vidrio. No se han hallado diferencias en las colonizaciones entre las diferentes fuentes de carbono, siendo, a esta temperatura de trabajo, la glucosa la mejor fuente de carbono que favoreció el desarrollo hasta las 31 h (previo al lavado).

a) Estructura de la biopelícula



b) Cuantificación de la biopelícula

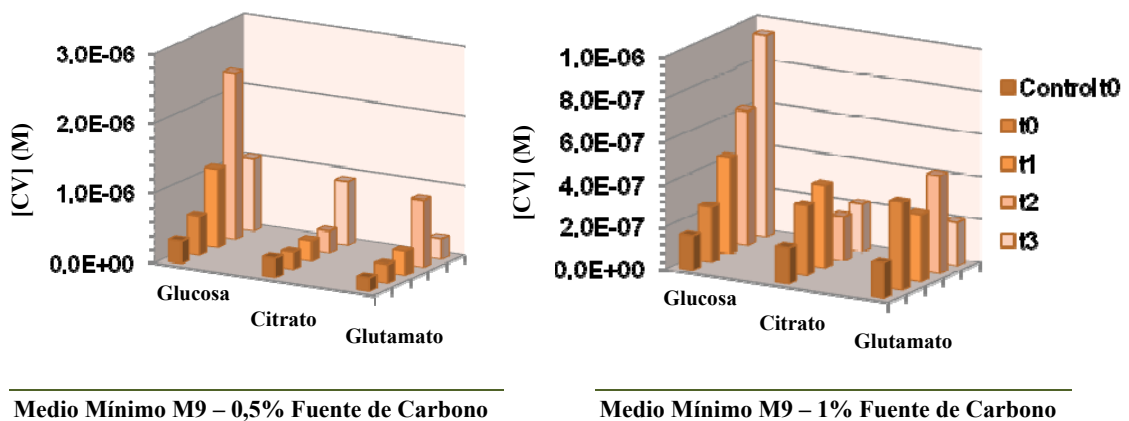


Figura I-28. Efecto de la naturaleza de la fuente de carbono en la cinética de colonización superficial con el medio mínimo M9 a 28 °C con 0,5% y 1,0% fuente de carbono.

a) Estructura de la biopelícula.

b) Cuantificación de la biopelícula.

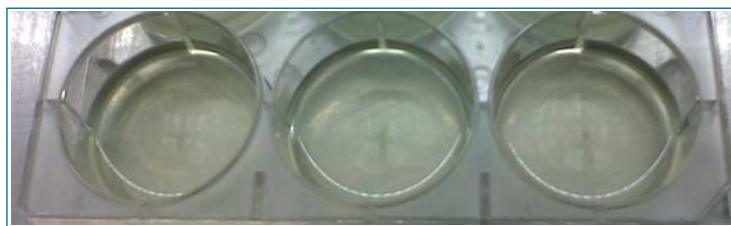
Para la concentración 1,0% en cada fuente de carbono, se ha hallado una baja

colonización superficial afectada por el aumento en la concentración y la naturaleza de la fuente de carbono y no por efecto del cambio en la temperatura de inmovilización. Una sutil mejora se ha hallado a corto tiempo inmovilizando a 28 °C, siendo poco significativa la diferencia a ambas temperaturas de trabajo.

El cambio de la temperatura ha favorecido el desarrollo de *pellicle* en la interfase líquido-aire fundamentalmente con las fuentes de carbono citrato y glutamato. Llegando a desarrollar incluso con el glutamato una película como una fina tela flexible, capaz de estirarse y con gran tendencia a adherirse irreversiblemente al vidrio, con apariencia similar a la “nata de la leche”. En cuanto a la concentración de CV, se hallaron los valores máximos del colorante a  $t_3$  para glutamato y a  $t_2$  para citrato ( $9,6 \cdot 10^{-7}$  M y  $9,1 \cdot 10^{-7}$  M, respectivamente). Mientras que desde el punto de vista de vista de las imágenes no se observaron diferencias significativas en el cubrimiento en las cinéticas con cada fuente de carbono. Dicha diferencia en los análisis radicó en adhesiones de *pellicle* en los triplicados principalmente en los bordes de los cubreobjetos (sin registro en las imágenes escaneadas), lo que sobrecuantificó la concentración del colorante al disolverlo con el etanol.

El cambio en la fuente de carbono (citrato y glutamato, y succinato a pesar de no mostrar los resultados en la cinética de colonización) en el medio salino influyó en el metabolismo celular otorgando una coloración verdosa al medio de cultivo tras la liberación de compuestos debido al crecimiento celular a 28 °C. Dicha coloración no se registró ni en los cultivos de acostumbramiento ni en los cultivos inóculos cuya temperatura de incubación fue de 32 °C.

En la Figura I-29 puede observarse la coloración verdosa del cultivo en la microplaca correspondiente a  $t_3$  de M9-0,5%Succinato. Estos subproductos están vinculados con la producción de sideróforos en estas condiciones de cultivo. Los sideróforos se producen en general en medios con limitaciones de Fe(II) complejando el catión y dejándolo biodisponible para las funciones celulares. Si bien en el medio mínimo M9, en estas condiciones, no se ha agregado Fe(II), éste está presente en forma de trazas en los diferentes reactivos utilizados, incluso una mínima cantidad en el agua destilada.



**Figura I-29. Triplicados de cultivos de inmovilización correspondientes a  $t_3$  con M9-0,5%Succinato desarrollados a 28 °C.**

Las microcolonias desarrolladas a 28 °C fueron de menor tamaño respecto de las halladas a 32 °C desarrollándose estructuras más simples, delgadas biopelículas tipo monocapa celular. Se ha hallado que la temperatura de 32 °C fue la temperatura que ha favorecido el cubrimiento del vidrio con M9, siendo la glucosa la fuente de carbono que ha beneficiado la colonización superficial.

### **2.6.b- Medio complejo en base a peptona de caseína y diluciones (PcY-0,05%Glucosa, PcY-1/2 y PcY-1/4)**

En la Figura I-30 se detalla la cinética de colonización hallada a 28 °C con el medio complejo PcY-0,05%Glucosa y las diluciones correspondientes (PcYG-1/2 y PcYG-1/4). Como puede observarse, a la temperatura de 28 °C, la cepa bacteriana ha colonizado pobremente la superficie del vidrio y no se han hallado diferencias en los cubrimientos al diluir el medio de cultivo. Se caracterizó por ser una monocapa con agregados dispersos por la superficie. Se ha registrado la presencia de *pellicle* en la interfase líquido-aire, siendo de mayor importancia a medida que el medio fuera más concentrado y sobreestimando la concentración de CV en la cuantificación. Como puede observarse en el gráfico, para los medios más concentrados, la concentración de CV aumentó en el tiempo, hallándose como concentración máxima de  $6,1 \cdot 10^{-6}$  M y de  $2,7 \cdot 10^{-6}$  M para PcY-0,05Glucosa y PcYG-1/2, respectivamente, a las 55 h de iniciada la colonización. Para PcYG-1/4 el máximo valor se halló a  $t_1$  siendo igual a  $2,6 \cdot 10^{-6}$  M y disminuyendo a la mitad al finalizar la experiencia.

Al considerar la DF, se registraron ligeros aumentos de la rugosidad superficial (mayor textura y heterogeneidad de los bordes de las microcolonias respecto del área colonizada) conforme aumento el tiempo de inmovilización. Para el medio concentrado, PcY-0,05%Glucosa, se pasó de un promedio de  $2,20 \pm 0,02$  en  $t_0$  a  $2,32 \pm 0,04$  en  $t_3$ ; para PcYG-1/2, varió de  $2,16 \pm 0,02$  en  $t_0$  a  $2,31 \pm 0,03$  en  $t_3$ ; y para PcYG-1/4, pasó de  $2,16 \pm 0,02$  en  $t_0$  a  $2,27 \pm 0,02$  en  $t_2$  (registrando un aumento a las 55 h del valor promedio de la DF, considerando el intervalo de confianza, no se hallaron diferencias significativas respecto del valor hallado a las 31 h,  $2,21 \pm 0,05$  en  $t_2$ ).

Al comparar con la colonización hallada a 32 °C con el medio PcY-0,05%Glucosa (ver Figura I-23), se halló que la temperatura de 32 °C favorece la colonización bacteriana sobre el vidrio.

Si bien se estudió el efecto de la dilución del medio complejo PcY-0,05%Glucosa a 32 °C con el lote antiguo de cubreobjetos (ver Figura I-11 en el apartado 2.1.c), se habían registrado similares cubrimientos con las diluciones planteadas y hallando una



biopelícula más densa y compacta con el medio concentrado. Los resultados se correlacionan de similar manera dado que la tendencia hallada fue igual.

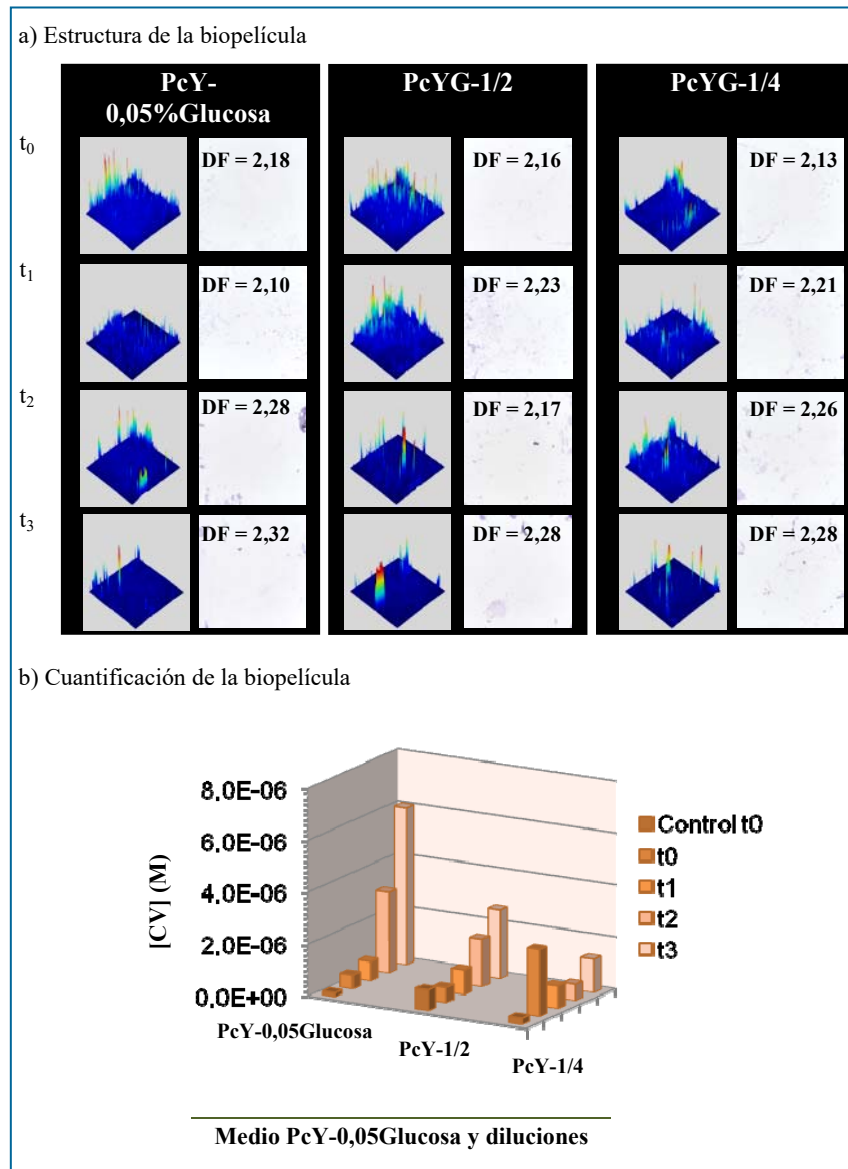


Figura I-30. Cinética de colonización bacteriana con los medios complejos basados en peptona de caseína y las diluciones a 28 °C.

a) Estructura de la biopelícula.  
b) Cuantificación de la biopelícula.

### 2.6.c- Medios estimulados con Fe(II): M9-0,5%Glucosa-Fe y PcY-0,05%Glucosa-Fe

Se estudió el efecto del cambio en la temperatura de incubación en el medio mínimo y en el medio complejo PcY utilizando glucosa como fuente de carbono (en las concentraciones originales de ambos medios de cultivo, 0,5% y 0,05%, respectivamente) y aditivados con Fe(II) en concentración 3  $\mu$ M. En la Figura I-31 se detallan las cinéticas de colonización para ambos medios de cultivo.

Como puede observarse, para el medio mínimo, el cambio en la temperatura desfavoreció la colonización bacteriana del vidrio (comparar con Figura I-25). Se registró en  $t_2$  un cubrimiento bastante homogéneo de la superficie, conformado por un delgado tapiz con pequeñas agrupaciones celulares interconectadas entre sí y separadas por regiones de baja densidad celular. A tiempos menores, se halló un cubrimiento más heterogéneo donde se intercalaron regiones con monocapa frente a regiones colonizadas por densas microcolonias. En cuanto a la DF, aumentó el promedio de  $2,30 \pm 0,05$  en  $t_0$  a  $2,44 \pm 0,06$  en  $t_2$ , (manteniéndose constante el promedio al finalizar la cinética en  $2,43 \pm 0,01$ ). Por lo tanto, aumentó la rugosidad superficial hacia las 31 h de iniciada la colonización bacteriana.

Mientras que para el medio complejo (comparar con Figura I-27), la temperatura de

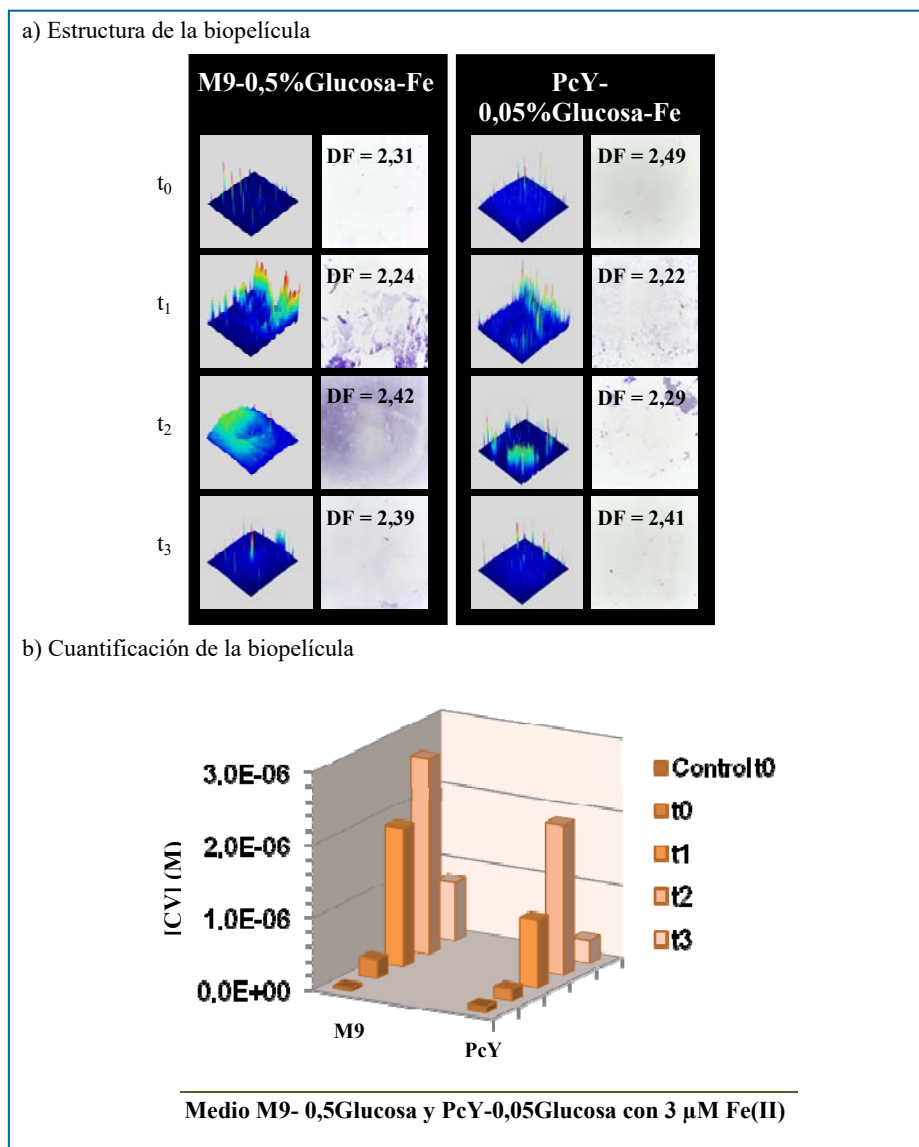


Figura I-31. Cinética de colonización bacteriana con los medios de cultivos M9-0,5%Glucosa-Fe y PcY-0,05%Glucosa-Fe a  $28^\circ\text{C}$ .

- a) Estructura de la biopelícula.  
b) Cuantificación de la biopelícula



28 °C mejoró ligeramente el cubrimiento de la superficie (cubrimiento heterogéneo) hasta  $t_2$ , hallándose la superficie colonizada por una monocapa bacteriana salpicada por densas microcolonias en algunas regiones del cubreobjeto. Desde la DF, se halló un valor alto a tiempo inicial ( $2,49 \pm 0,03$ ) vinculado a la pobre colonización hallada (perfil de heterogeneidad muy chato) y cercano al valor de DF del control a tiempo inicial ( $2,54 \pm 0,03$ ), por lo que no será tenido en cuenta en el análisis porque el valor hallado es comparable al valor de los controles. Si se analiza la tendencia hallada de  $t_1$  a  $t_3$ , se observó que aumentó la DF conforme aumentó el tiempo, pasando de  $2,21 \pm 0,03$  a  $2,44 \pm 0,02$ , respectivamente. Aumentando la rugosidad superficial de la película colonizadora del vidrio y aumentando la heterogeneidad de los bordes de las microcolonias.

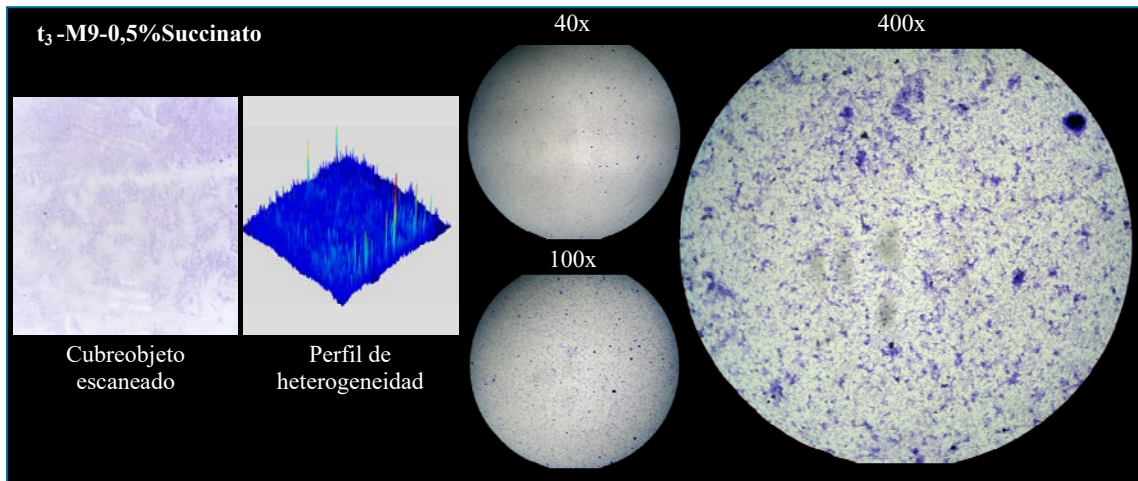
Para ambos medios de cultivos, el lavado y renovación con medio fresco llevado a cabo a las 31 h provocó la maduración de la biopelícula con la consecuente dispersión celular, como puede observarse la baja colonización superficial hallada en  $t_3$ . Este resultado es compatible con lo registrado desde la evolución de la concentración del CV en el tiempo, siendo los valores máximos registrados en  $t_2$  iguales a  $2,7 \cdot 10^{-6}$  M y  $2,1 \cdot 10^{-6}$  M para M9 y PcY, reduciéndose a  $8,2 \cdot 10^{-7}$  M y  $3,1 \cdot 10^{-7}$  M, respectivamente, a las 55 h.

## 2.7- Efecto de la Composición del Medio de Cultivo: Medio Mínimo vs Medio Complejo

A los efectos de comparar el desarrollo de las biopelículas en medios mínimos o complejos, se decidió comparar una fuente de carbono en las concentraciones originales de los medios de cultivos (0,5% para el medio M9 y 0,05% para el medio PcY). Como buen ejemplo de las tendencias registradas, se seleccionó la fuente de carbono succinato para analizar las imágenes.

El tipo de medio de cultivo condiciona el desarrollo de la biopelícula sobre vidrio a partir de que define la actividad metabólica celular. Se pueden diferenciar dos tipos de biopelículas desarrolladas con el medio mínimo salino basado en M9 (con una fuente inorgánica de nitrógeno) frente a los cubrimientos desarrollados con medios complejos (PcY o PY, utilizando fuentes orgánicas de nitrógeno y vitaminas esenciales).

A grandes rasgos, *P. veronii* 2E en un medio de cultivo mínimo desarrolló una biopelícula bastante plana colonizando gran parte de la superficie con aspecto de monocapa celular y con pequeños agregados celulares poco densos dispersos. Es una biopelícula bastante compacta y lisa, generando perfiles más homogéneos en el cubrimiento (ver Figura I-32). Se ha observado una mejor adhesión celular inicial con los medios mínimos hallándose mayor número de células adheridas respecto de los

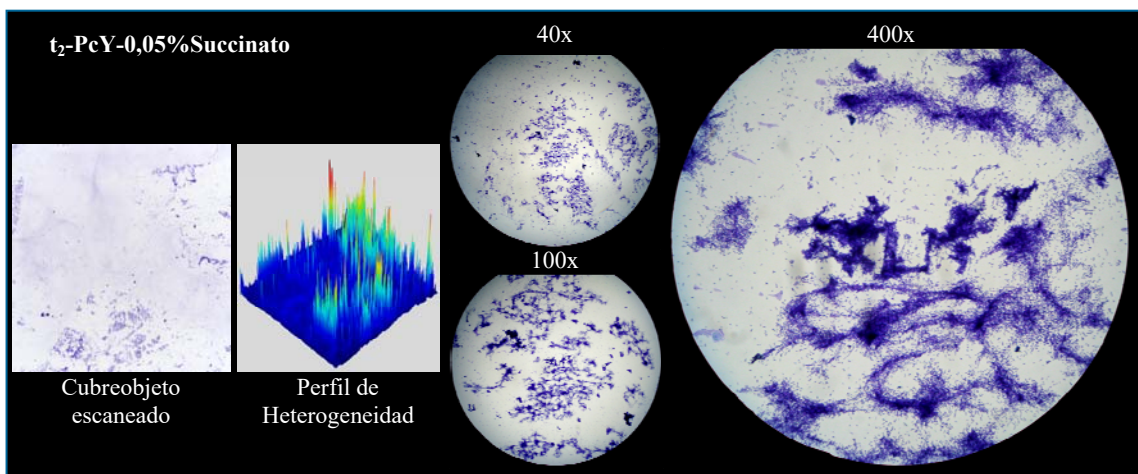


**Figura I-32. Biopelícula desarrollada sobre vidrio con el medio de cultivo mínimo.**  
Inmovilización a 32 °C de *P. veronii* 2E en vidrio correspondiente a t<sub>3</sub>-M9-0,5%Succinato.

medios complejos. No obstante, con los medios mínimos no se ha favorecido el crecimiento de la biopelícula sobre la superficie de análisis. Desde la DF, se ha caracterizado por hallarse películas de baja rugosidad y mayor homogeneidad de los bordes de las microcolonias.

En cuanto al cambio en la concentración de la fuente de carbono, se halló que la proporción original del medio (0,5%) fue la que mejor cubrimiento en general se ha logrado a lo largo del tiempo. Este hecho puede estar influenciado con el hecho de ser un medio mínimo: una perturbación en la concentración de algún componente puede desbalancear la condición mínima para crecer.

En contraposición (ver Figura I-33), en un medio de cultivo complejo basado en peptona (peptona de carne (P) o peptona de caseína (Pc)) y extracto de levadura (Y), la biopelícula se caracterizó por desarrollarse en forma de densos pilares separados por canales con baja densidad celular. En general se halló una menor adhesión celular inicial en comparación con los medios mínimos estudiados, pero se ha observado una evolución favorable de la biopelícula sobre el vidrio a partir de las primeras células



**Figura I-33. Biopelícula desarrollada sobre vidrio con un medio de cultivo complejo.**  
Inmovilización a 32 °C de *P. veronii* 2E en vidrio correspondiente a t<sub>2</sub>-PcY-0,05%Succinato.

adheridas a la superficie llegando, en algunos casos, a estructuras complejas en forma de pilares muy densos a lo largo del tiempo. Se observó la presencia de perfiles heterogéneos en los cubrimientos con las concentraciones 0,05% en las fuentes de carbono ensayadas. Por otro lado, el aumento en la concentración de las fuentes de carbono a 0,5% ayudó a desarrollar biopelículas de mayor densidad bacteriana, mayor interconexión (presencia de líneas de fisura de las películas), aumento en su homogeneidad y cubrimientos de mayor rugosidad (en general se han hallado mayores valores de DF para los cubreobjetos con los medios de cultivo complejos).

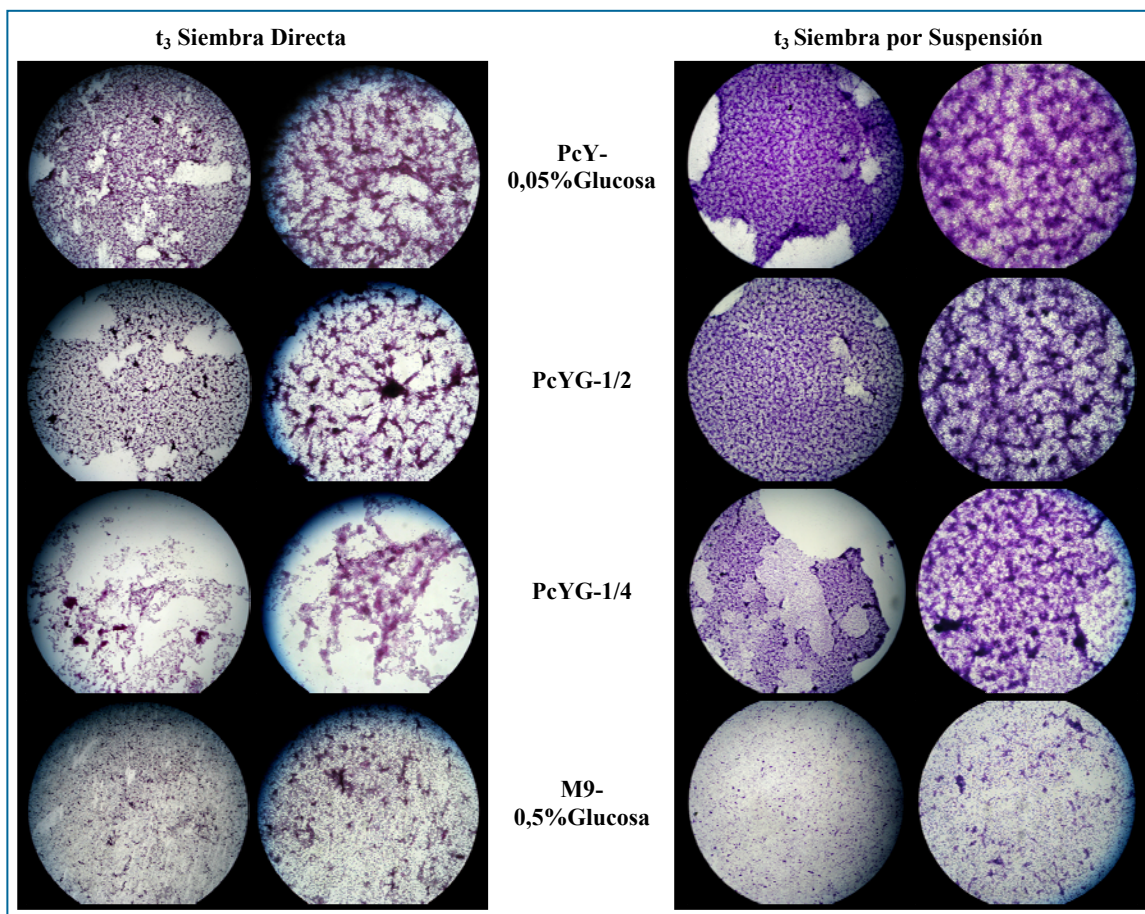
## INTEGRACIÓN FINAL

### 1- Efecto de siembra del inóculo: ¿Siembra Directa o Siembra por Suspensión?

En las condiciones de estudio, tanto en la experiencia de Siembra Directa como en la Siembra por Suspensión a 32 °C, con el medio complejo PcY-0,05%Glucosa se obtuvo la biopelícula más densa. En la Figura I-34 se amplía dicha observación al comparar las imágenes por microscopia (aumentos 100x y 400x) correspondientes a las muestras de 55 h de cada medio de cultivo y siembra de inóculo. Conforme disminuyó la concentración de nutrientes del medio complejo, aumentó el tamaño de los canales de separación entre las microcolonias bacterianas con la consecuente disminución de la densidad de la biopelícula. Una característica de la biopelícula desarrollada con los medios complejos fue la heterogeneidad en la colonización de la matriz, alternando regiones con un tupido tapiz contrastado con regiones con solo una monocapa celular. Respecto del medio salino, con ambas siembras se formó una delgada biopelícula colonizando homogéneamente la superficie del cubreobjeto con agregados celulares en forma de pilares dispersos por toda la extensión del soporte. En ambientes con alto niveles de nutrientes las biopelículas son más abundantes y de mayor espesor, mientras que bajos niveles de nutrientes puede producir biopelículas más compactas. Una alta concentración de nutrientes promueve la transición de bacterias del crecimiento planctónico al desarrollo de biopelículas, mientras que el agotamiento de los nutrientes puede provocar la dispersión de las células de la biopelícula (Bajpai, 2015).

Al comparar el tipo de siembra entre sí, a tiempo inicial, se observaron mejores anclajes y adhesiones iniciales a partir de las Siembras Directas del cultivo inóculo. Mientras que a largo tiempo, se observó que la preparación previa de las suspensiones bacterianas como inóculo mejoró considerablemente el desarrollo de las biopelículas sobre el vidrio con los medios de cultivos complejos. Siendo los cubrimientos desarrollados con las diluciones PcYG-1/2 y PcYG-1/4 los más beneficiados respecto de la Siembra Directa. Este hecho se vincula con la mejora en la disgregación de las aglomeraciones celulares del cultivo inóculo y el aumento de las células libres en condiciones de colonizar la superficie del cubreobjeto al inicio de estos estadios. La formación de biopelículas sobre cubreobjetos puede ser cuantificada mediante la solubilización del CV y la medición de la densidad óptica (DO) (Walker, 2012; Sheikh, 2001). Desde el punto de vista de la cuantificación a partir de la





**Figura I-34. Comparación de las biopelículas desarrolladas a  $t_3$  por Siembra Directa y Siembra por Suspensión.** Imágenes obtenidas por microscopía de campo claro (aumentos finales 100x a la izquierda y 400x a la derecha de cada columna) de las muestras correspondientes a  $t_3$  para cada medio de cultivo utilizado.

concentración de CV, se llegó a la misma conclusión, ver Figura I-35. Para los medios complejos, prácticamente se triplicaron las concentraciones del colorante en  $t_2$  para la experiencia de siembra por suspensión (en el caso del medio PcYG-1/2 se pasó de  $1,9 \cdot 10^{-6}$  M -Figura I-10, Siembra Directa- a  $5,7 \cdot 10^{-6}$  M -Figura I-13, Siembra por Suspensión-). En referencia al medio mínimo M9-0,5%Glucosa se halló la tendencia contraria, en la experiencia de Siembra Directa se logró desarrollar un mejor cubrimiento sobre el cubreobjeto ( $5,9 \cdot 10^{-6}$  M -Figura I-10- frente a  $1,2 \cdot 10^{-6}$  M -Figura I-13- para  $t_2$ ). Cabe destacar que el tiempo de extracción del CV no fue suficiente para el caso de las películas espesas, quedando teñidas las superficies y subestimando su cuantificación. Al comparar las concentraciones de los medios complejos, resulta que los medios diluidos presentaron mayor concentración de CV cuando las biopelículas en realidad fueron de mayor espesor con el medio concentrado.

A partir de estos resultados, se seleccionó el sistema de Siembra por Suspensiones para el estudio de las perturbaciones en el desarrollo de las biopelículas. Por lo que no se ha realizado otro análisis aplicando la metodología de Siembra Directa.

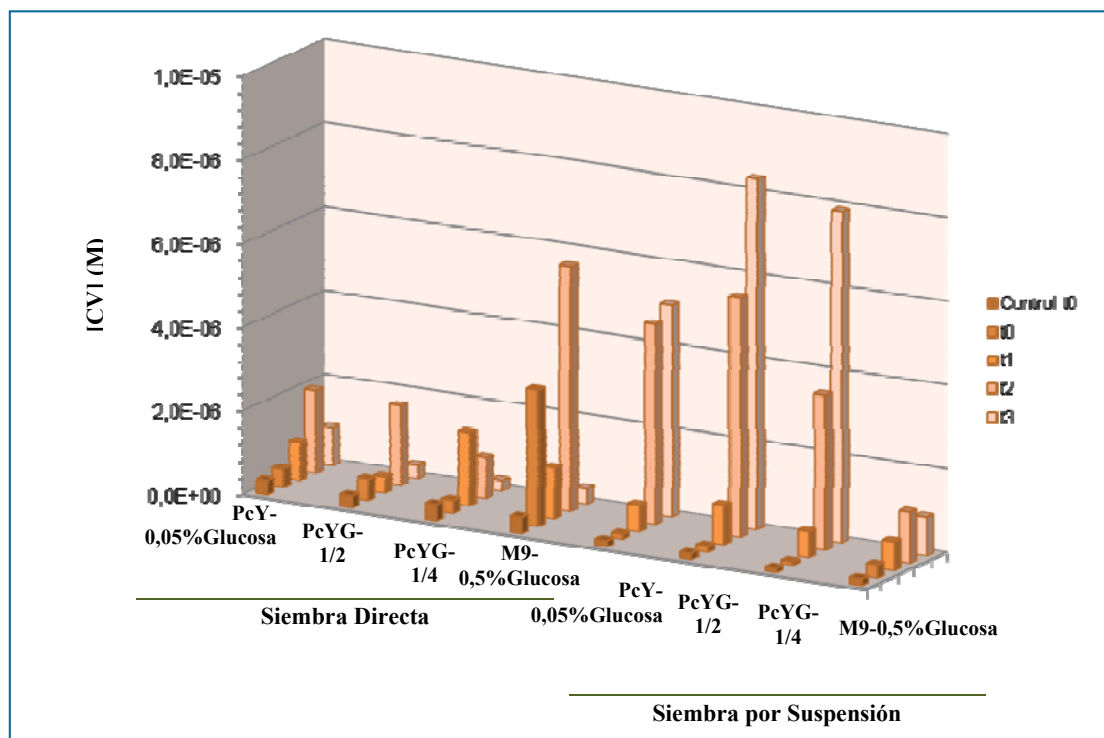


Figura I-35. Comparación de la concentración de CV en función del tiempo para Siembra Directa y Siembra por Suspensión para los medios M9 y PcY-0,05%Glucosa y diluciones.

Por último, soluciones acuosas del colorante CV pueden fotodegradarse, tanto por consecuencia de la luz natural como la luz artificial (Li, Y., 2016). Pudiendo explicarse el registro de la degradación del color para las muestras correspondientes a  $t_3$  de Siembra Directa tras haberlas dejado expuestas a la luz ambiente. Como consecuencia, las muestras posteriores se resguardaron en la oscuridad para evitar dicha degradación.

## 2- ¿Cuál es la fuente de carbono que favorece la colonización de *P. veronii* 2E en el vidrio a 32 °C?

Para analizar el efecto de la fuente de carbono a 32 °C, se mantuvo constante la concentración de las mismas en 0,5% para comparar el efecto de cada una (glucosa, citrato, glutamato y succinato) en los medios de cultivos M9 y PcY. En la Figura I-36, se puede apreciar la concentración del CV halladas para cada fuente de carbono y con ambos medios de cultivos para facilitar la comparación en la cuantificación de la biopelícula.

Para el medio mínimo M9, la fuente succinato favoreció la colonización superficial tras la renovación del medio, como puede observarse en la cuantificación del CV al comparar los resultados con glucosa y succinato. Un tapiz delgado, plano y homogéneo, constituido por pequeñas microcolonias separadas por grandes canales de baja densidad bacteriana caracterizó este cubrimiento. Barken (Barken, 2008)

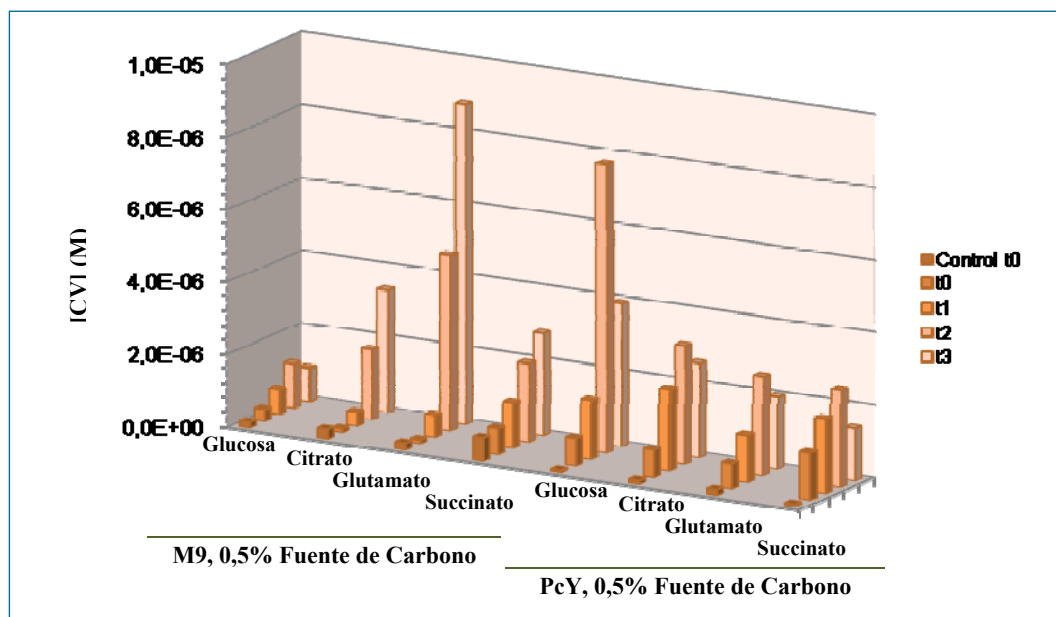


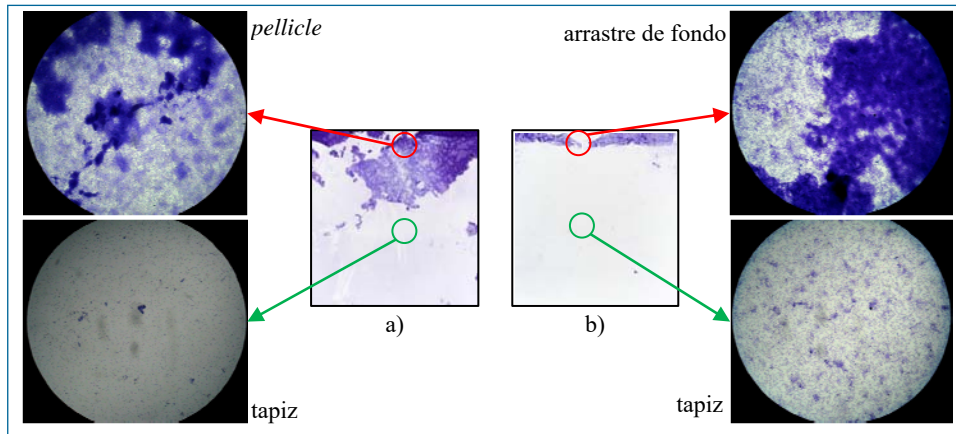
Figura I-36 Comparación de la concentración de CV en función del tiempo y de la fuente de carbono en concentración 0,5% para los medios M9 y PcY.

menciona que las estructuras espaciales de las biopelículas pueden depender de las condiciones en las que se desarrollan, adquiriendo una forma de tapiz (*flat*) al desarrollarse en medios mínimos con citrato, mientras que adquieren estructuras más complejas, tipo pilares (*mushroom*) con medios mínimos y glucosa como fuente de carbono. En cuanto a la DF, se hallaron valores bajos describiendo películas más bien planas y de baja rugosidad superficial. En experimentos en cámara de cultivo (bajo condiciones de flujo continuo) se ha hallado que en presencia de glucosa las biopelículas formadas eran en forma de pilares multicelulares, mientras que con citrato la forma de la biopelícula era más plana (Harsen, 2010).

Mientras que para el medio complejo PcY, se halló que la glucosa fue la fuente nutricional que favoreció el desarrollo de las biopelículas luego de la renovación del medio de cultivo realizado en  $t_2$ . Hallándose una colonización mediada por un tapiz rugoso, altos valores de DF y homogéneamente distribuido por la superficie del cubreobjeto. Las microcolonias presentaron forma de pilares (*mushroom*) separados por canales de baja densidad bacteriana. En cuanto a la cuantificación del CV, se puede observar que con la glucosa se hallaron las concentraciones más altas.

La fuente de carbono citrato introdujo una sutil diferenciación celular detectada por microscopía de campo claro. Las células bacterianas fueron más alargadas y delgadas en ambos medios de cultivos, en comparación con las restantes fuentes de carbono, lo que dificultó la adquisición de imágenes a partir de la metodología implementada.

Otra diferenciación celular registrada fueron los desarrollos de biopelículas muy resistentes en la interfase líquido-aire (*pellicle*) bajo condiciones de crecimiento



**Figura I-37 Diferencia en la estructura de la biopelícula hallada a  $t_3$  a 32 °C con los medios M9-0,5%Glutamato y M9-0,5%Citrato.**

a) Imágenes del triplicado correspondientes al  $t_3$  con el medio M9-0,5%Glutamato (32 °C) e imágenes obtenidas por microscopía de campo claro (400x) correspondientes a la biopelícula que colonizó el cubreobjeto (tapiz) frente a las adhesiones inespecíficas de restos de la película desarrollada en la interfase líquido-aire (*pellicle*).

b) Imágenes del triplicado correspondientes al  $t_2$  con el medio M9-0,5%Citrato (32 °C) e imágenes obtenidas por microscopía de campo claro (400x) correspondientes a la biopelícula que colonizó el cubreobjeto (tapiz) frente a las adhesiones inespecíficas de restos de la película desarrollada en la base de la microplaca de cultivo (arrastré de fondo).

estático y con acceso a altas concentraciones de oxígeno puede ser favorable para microorganismos aerobios (Hölscher, 2015). La fuente glutamato fue el nutriente que facilitó en mayor medida el desarrollo de los *pellicles*. Dichas estructuras fueron difíciles de separar y, durante la extracción de los cubreobjetos, fragmentos de los mismos se adhirieron irreversiblemente al vidrio, tiñéndose con el colorante sin distinción de la naturaleza de la biopelícula. Para reducir y minimizar las adhesiones irreversibles de fragmentos de *pellicle* se probaron diferentes alternativas al momento de la extracción de los cubreobjetos, como apartar la película flotante, extraer la película flotante con ayuda de una pipeta Pasteur, incluso la extracción completamente el medio de cultivo previo a la extracción del vidrio. Desde un punto de vista estructural, el tapiz que colonizó la superficie del vidrio presentó características muy diferentes a los restos de *pellicle* adheridos, como puede observarse en la Figura I-37.a. El tapiz desarrollado sobre el vidrio fue delgado y plano, con pequeñas microcolonias dispersas por la superficie del cubreobjeto. Mientras que los fragmentos de *pellicle*, presentaron mayor rugosidad, mayor densidad bacteriana, una película muy espesa y una estructura de mayor complejidad.

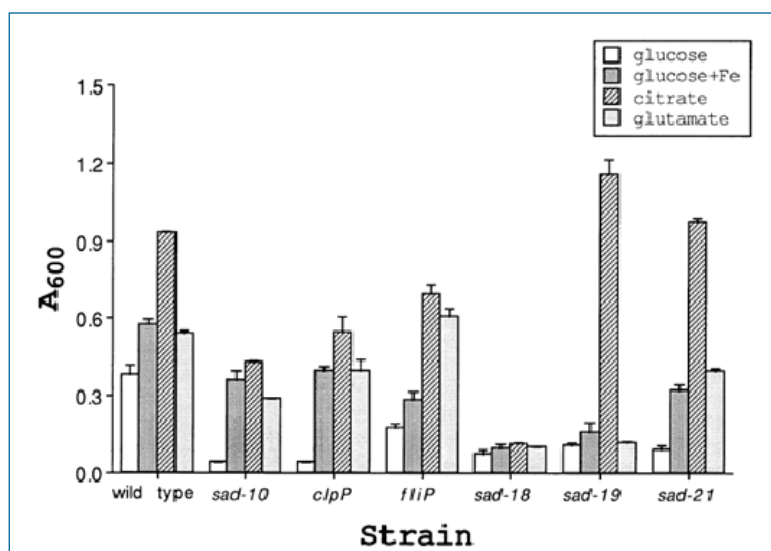
Otra consecuencia de la metodología de extracción de los cubreobjetos tras el arrastre del vidrio sobre la base de la microplaca provocando la adhesión irreversible de la biopelícula desarrollada en la interfase plástico-líquido (arrastré de fondo), Figura I-37.b. Evidencias de estas adhesiones irreversibles fueron observadas en las franjas densas registradas sobre un lateral del cubreobjeto, siendo más evidentes en los perfiles de heterogeneidad donde se pusieron de manifiesto las franjas de mayor colonización.



Al disolver el colorante en etanol para la cuantificación, se disolvió sin discriminar la procedencia de las células adheridas a la superficie. Desde el punto de vista de cuantificación espectrofotométrica, a 32 °C, la fuente glutamato en M9 sería la fuente de carbono que favorecería el desarrollo de la biopelícula sobre el vidrio, siguiendo el citrato como mejor fuente de carbono, como puede apreciarse en la Figura I-36. Dicho registro -mayor [CV]- se debió a la sobrecuantificación de la biopelícula colonizadora del vidrio con la metodología empleada. La cuantificación espectrofotométrica no describió adecuadamente la colonización bacteriana de la superficie del vidrio.

Si se compara con los resultados hallados en el trabajo de O'Toole (O'Toole, 1998) se estudió el desarrollo de biopelículas de la cepa *Pseudomonas fluorescens* WCS365 en placas de cultivo de 96 cavidades utilizando 100 µL de medio mínimo de cultivo (medio M63). Siendo las concentraciones de las fuentes de carbono utilizadas en dicho estudio glucosa 0,2%, ácido cítrico 0,4% y ácido glutámico 0,4% (sal monosódica) (ver Figura I-38). Cuando se estudia el desarrollo de las biopelículas en placas de cultivo de 96 cavidades, se analiza la capacidad total de desarrollar biopelículas, tanto sobre la base plástica de la cavidad sumergida en el medio de cultivo como la capacidad de desarrollar *pellicles*. Como puede observarse en el gráfico de absorbancia a 600nm ( $A_{600}$ ), para la cepa salvaje (o *wild type*) se halló que las fuentes de carbono citrato y glutamato han favorecido el desarrollo de biopelículas respecto de lo hallado con la glucosa, como se ha hallado en la cuantificación de la *P. veronii* 2E.

En el estudio de la cinética de colonización bacteriana sobre vidrio fue necesario



**Figura I-38. Formación de biopelícula de la cepa *Pseudomonas fluorescens* WCS365 (cepa salvaje o *wild type*) y cepas mutantes seleccionadas según la fuente de carbono utilizada con un medio mínimo salino denominado M63 (O'Toole, 1998).**

Se graficó la absorbancia a 600nm ( $A_{600}$ ) de la redisolución del CV en etanol, siendo las concentraciones de las fuentes de carbono iguales a 0,2% glucosa, 0,4% citrato, 0,4% glutamato y 3 µMFe con glucosa (0,2%)

complementar las diferentes técnicas de análisis. Analizando conjuntamente la microestructura con la macroestructura en conjunto con la cuantificación espectrofotométrica de la película bacteriana, y no llegar a conclusiones erróneas por el uso aislado de alguna de ellas.

### 3- ¿La diferencia de la concentración de la fuente de carbono puede afectar en el desarrollo de la biopelícula?

Para estudiar el efecto del cambio en la concentración de las fuentes de carbono, se analizaron dos concentraciones diferentes para cada medio de cultivo (la concentración de base del medio de cultivo y una concentración superior) y diferentes fuente de carbono. En la Figura I-39 se sintetizan las cuantificaciones del CV para los

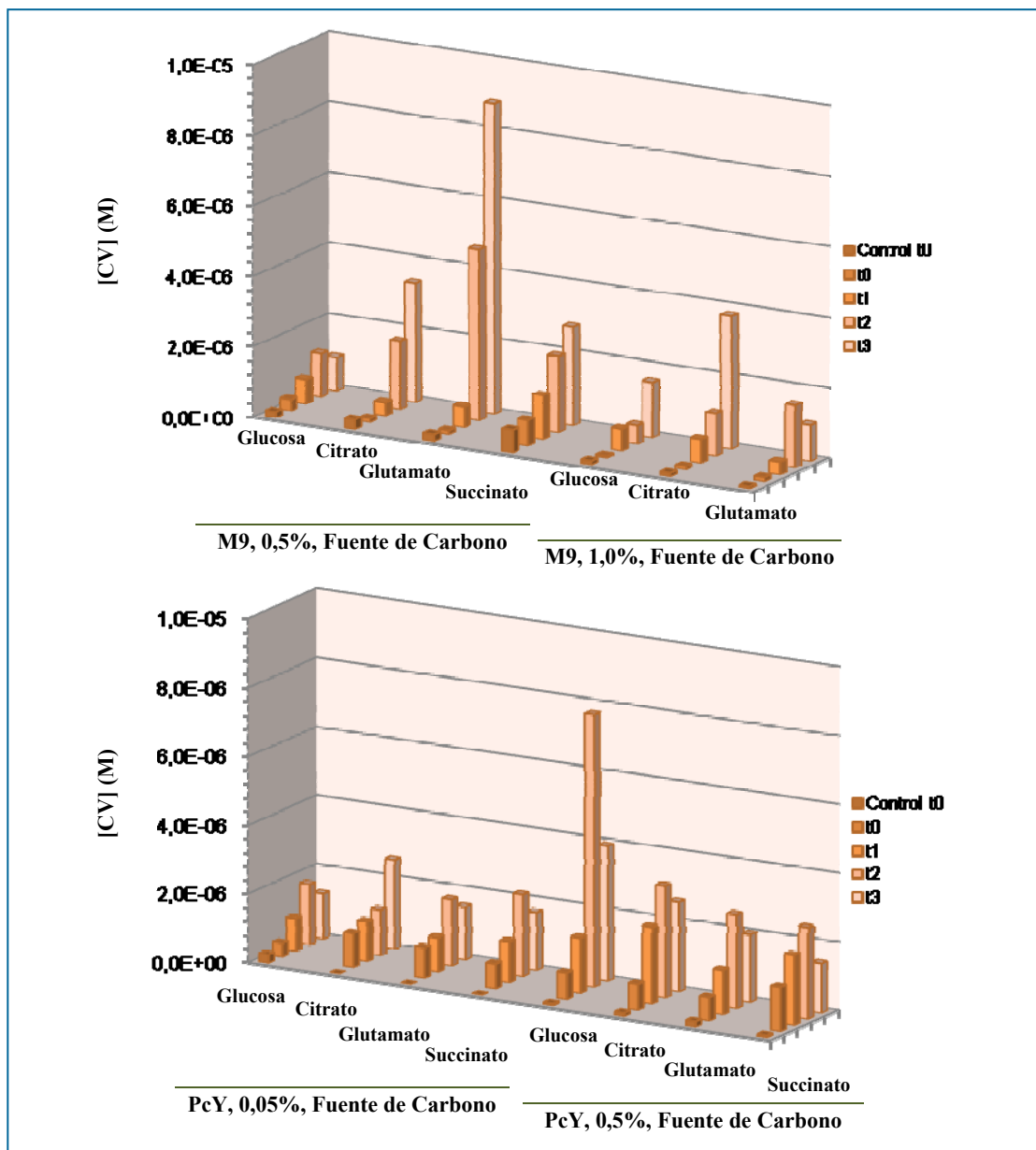


Figura I-39. Comparación de la concentración de CV en función del tiempo para los medios M9 y PcY y en función de la fuente de carbono utilizada (glucosa, citrato, glutamato y succinato) y en concentración (0,5% y 1,0% para M9 y 0,05% y 0,5% para PcY).

medios M9 y PcY para facilitar la comparación del efecto de la concentración para cada fuente de carbono en los medios estudiados. El cambio en la concentración de la fuente de carbono influyó en el desarrollo de las biopelículas sobre vidrio.

En la composición original del medio mínimo salino, las concentraciones de fuente de carbono y de nitrógeno responden a 0,5 %m/V de glucosa frente a 1,0 g/L para el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (fuente de nitrógeno inorgánico). Al aproximar la relación entre la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno como el cociente en masa entre cada fuente, se tendría una relación “FuenteC/FuenteN” (C/N) en torno a 7,6<sup>11</sup>. Al variar de fuente de carbono, se mantuvo aproximadamente constante esta proporción en masa (manteniendo una concentración 0,5% para cada fuente de carbono y manteniendo constante la masa de la fuente de nitrógeno). El cambio en la concentración de la fuente de carbono (sea por disminución a 0,1% para glucosa o aumento al 1,0% para las demás fuentes de carbono) modificó la proporción C/N del medio de cultivo salino provocando un desbalance nutricional y desfavoreciendo la biopelícula desarrollada sobre el vidrio (comparar Figuras I-16 con I-20 y I-22 de apartados de la sección anterior, ver también Figura I-39 en este apartado).

Para el medio complejo PcY, la situación fue diferente. Durante La etapa de aislamiento, identificación y caracterización de *P. veronii* 2E se utilizó el medio de cultivo PcY-0,05%Glucosa, siendo la formulación inicial del medio complejo 0,05% la concentración de la glucosa como fuente de carbono y la peptona de caseína, la fuente de nitrógeno (Vullo, 2008; Vullo, 2003). En base a esta formulación inicial se estudiaron los efectos del cambio en el tipo de fuente de carbono y su concentración. En el apartado 2.3.b se presentaron los resultados hallados con las concentraciones 0,05% para cada fuente de carbono ensayada, respetando la proporción nutricional inicial del medio de cultivo complejo basado en peptona de caseína. Mientras que en el apartado 2.2.c se analizaron los resultados hallados con las concentraciones 0,5%. Desde este punto de vista, el aumento de la concentración en la fuente de carbono en un factor de 10 (de 0,05% a 0,5%) favoreció las colonizaciones bacterianas para las fuentes de carbono glucosa, citrato y glutamato (ver Figura I-39), siendo el mayor efecto para el caso de la glucosa. Bajpai (Bajpai, 2015) informa que un aumento en la concentración de los nutrientes puede promover la adhesión, como hemos hallado para los medios complejos con el aumento de la concentración de la fuente de carbono. En cambio, para el succinato, la colonización superficial se vio ligeramente favorecida a menor concentración de la fuente de carbono (0,05%).

---

<sup>11</sup> Ver en Anexo E Relación C/N la relación C/N para el medio mínimo considerando la masa de carbono de cada fuente de carbono estudiada, en el anexo se detalla la relación en masa sobre C y N, que es la relación adecuada.

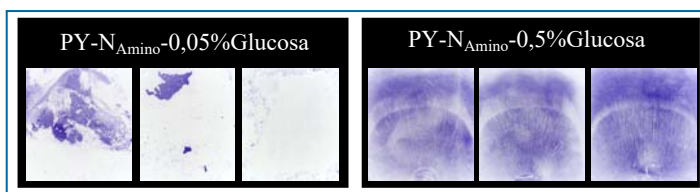
#### 4- ¿La naturaleza de la fuente de nitrógeno puede influir en la colonización bacteriana?

La naturaleza del digerido proteico utilizado en la formulación del medio complejo como fuente de nitrógeno orgánico influyó en la colonización superficial del cubreobjeto, siendo su concentración crucial en el desarrollo de la biopelícula.

Para analizar el efecto de la fuente de nitrógeno, se seleccionó la fuente de carbono glucosa (en concentraciones 0,05% y 0,5%) tras haber hallado los mejores desarrollos de biopelículas con el medio PcY. Se estudiaron los medios complejos formulados con peptona de carne PY-N<sub>Amino</sub> (2,2679 g/L peptona) y PY-N<sub>Total</sub> (2,5 g/L peptona) frente a lo hallado con PcY (2,5 g/L peptona de caseína). En el primer medio PY, se mantuvo constante la relación de N<sub>Total</sub> frente a PcY, mientras que en el segundo se mantuvo constante la concentración del digerido proteico en el medio (ver apartado 2.4.a).

Desde la cuantificación espectrofotométrica, se hallaron similares comportamientos con los medios con peptona de carne, la baja concentración del CV obtenido a cortos tiempos de exposición fue coherente con la baja adhesión celular observada en las imágenes (Figura I-24). De manera similar al medio complejo PcY-Glucosa, el aumento en la concentración de la fuente de carbono -de 0,05% a 0,5%- benefició la colonización del cubreobjeto, llegando a desarrollar una densa y homogénea biopelícula sobre el vidrio. La biopelícula desarrollada con los medios complejos presentó similares características en su estructura utilizando la glucosa como fuente de carbono. En todos los casos (ya sea con PcY o con las variantes de PY), el lavado y la renovación del medio de cultivo favoreció el crecimiento de la biopelícula, desarrollando una matriz compleja e interconectada entre sí.

A corto tiempo, se hallaron los mejores desarrollos de biopelículas con el medio PcY (tanto en 0,05% como en 0,5% de glucosa). Considerando el medio PcY-0,05%Glucosa, se desarrolló una película heterogénea, donde se alternaron regiones colonizadas por densas microcolonias con grandes regiones colonizadas por un delgado tapiz (monocapa celular). Con el medio PcY-0,5%Glucosa, a corto tiempo con la peptona de caseína, se halló la formación de la monocapa celular con pequeñas microcolonias dispersas. A partir de las 7 h de iniciada la colonización, con el medio PY-0,5%Glucosa (tanto en PY-N<sub>Amino</sub> como en PY-N<sub>Total</sub>) se desarrolló una fina y homogénea película bacteriana que comenzó a cubrir la superficie (PY-N<sub>Total</sub>-0,5%Glucosa), la biopelícula fue creciendo y aumentando su densidad.

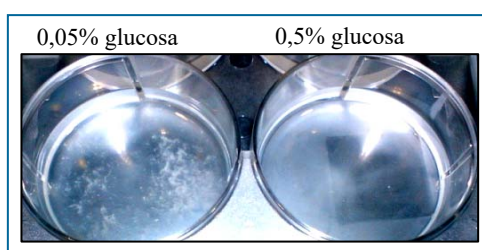


**Figura I-40. Triplicados correspondientes a  $t_3$  para el medio PY-N<sub>Amino</sub> con las concentraciones 0,05% glucosa y 0,5% glucosa a 32 °C.**

Al comparar los resultados hallados en los medios complejos PcY y PY-N<sub>Amino</sub>, se hallaron similares colonizaciones superficiales a las 55 h, tanto en el registro de imágenes como la determinación espectrofotométrica. Mientras que un leve aumento en la concentración de nitrógeno total en el medio PY-N<sub>Total</sub> mejoró el desarrollo de la biopelícula bacteriana, como pudo observarse en las colonizaciones obtenidas a partir de  $t_1$  con el medio PY-N<sub>Total</sub>-0,5%Glucosa frente a PY-N<sub>Amino</sub>-0,5%Glucosa. Por lo tanto, la leve diferencia en la formulación de los medios complejos basados en peptona de carne impactó en la colonización superficial.

Para el medio PY-N<sub>Amino</sub>-0,05%Glucosa no se hallaron resultados reproducibles para  $t_3$  (tras la renovación del medio) desde el punto de vista de área cubierta y estructura de la biopelícula (como puede observarse en la Figura I-40). En dos de los cubreobjetos, la cepa bacteriana comenzó a desarrollar una biopelícula de mayor complejidad desarrollando estructuras en forma de pilares muy densos y separados por canales de baja densidad bacteriana. En el tercer cubreobjeto, se desarrolló una biopelícula plana, tipo monocapa celular con bajo desarrollo de microcolonias. Mientras que para la concentración 0,5% de glucosa, se registró en los triplicados un cubrimiento homogéneo de la superficie y una biopelícula interconectada entre sí con la presencia de la línea de fisura como consecuencia del proceso de extracción de la matriz. Se ha demostrado (Saur, 2016) que las biopelículas con diferentes historias de crecimiento no desarrollan la misma biopelícula expuestas a idénticas condiciones operacionales. Es decir, puede ocurrir que bajo mismas condiciones operacionales pueden generarse distintas biopelículas bacterianas.

Con el cambio en la fuente de nitrógeno se registró un aumento en la formación de agregados celulares en los cultivos preparados, incrementándose la formación de



**Figura I-41. Placa de cultivo correspondiente a  $t_3$  con el medio PY-N<sub>Amino</sub> y glucosa 0,05% y 0,5%.**

grupos al incrementar la concentración de la fuente de carbono. En particular, con el medio PY-N<sub>Amino</sub>-0,05%Glucosa, a t<sub>3</sub>, se registró el fondo de la placa colonizado por un tapiz bacteriano en la cual se desarrollaron agregados celulares en forma de pilares observables a simple vista (ver Figura I-41). En torno a las zonas de anclaje inicial, se desarrollaron estas estructuras, aumentando la densidad de la biomasa y el espesor de cada pilar a lo largo del tiempo, presentaron gran elasticidad y adherencia, principalmente al vidrio. Si bien la formación de los pilares se desarrolló principalmente sobre el poliestireno de la placa de cultivo, algunos de los agregados se desarrollaron sobre el vidrio del cubreobjeto, provocando la colonización peculiar y no reproducible entre triplicados hallados en t<sub>3</sub>. Al aumentar la concentración de la glucosa a 0,5%, *P. veronii* 2E mostró una selección particular que creció fundamentalmente en estado inmovilizado, formando un tapiz que cubrió todo el fondo, como puede observarse en la Figura I-41 tras extraer el cubreobjeto. Se registró un bajo crecimiento en estado planctónico. Una consecuencia de dicho hecho fue hallar un menor crecimiento en estado planctónico con la peptona de carne como fuente de nitrógeno (menores DO<sub>600nm</sub>) respecto de los medios PcY, efecto acentuado con las concentraciones mayores en las fuentes de carbono.

Si se compara con los resultados hallados con M9-0,5%Glucosa (como fuente inorgánica de nitrógeno e igual concentración de la fuente de carbono), la biopelícula hallada es más compacta y de menor espesor, donde domina una monocapa bacteriana con pequeños agregados dispersos por la superficie con la fuente inorgánica de nitrógeno.

##### **5- ¿La adición del catión ferroso a los medios de cultivo puede influir en el desarrollo de la biopelícula?**

De acuerdo a los resultados obtenidos, la presencia de Fe(II) en los medios de cultivo ha impactado en el desarrollo de las biopelículas desarrolladas a 32 °C, en algunos casos se ha beneficiado la colonización bacteriana y en otros se ha desprendido la biopelícula colonizadora. En la Figura I-42 se sintetizan las curvas de CV en función del tiempo para los medios en ausencia y en presencia de Fe(II).

Con el medio salino M9, no se halló una tendencia general para describir el efecto de la presencia de Fe(II) en función del tiempo con las diferentes fuentes de carbono estudiadas (concentración 0,5%). En líneas generales, el agregado de Fe(II) en una mínima cantidad ha beneficiado la colonización bacteriana superficial (ver Figura I-42), siendo con la glucosa el medio que más promovió la fijación.

Para el caso del citrato en particular, se favoreció la biopelícula a corto tiempo fundamentalmente, hallándose el máximo valor a las 7h, pasado dicho tiempo, la biopelícula maduró, se desprendió la biopelícula, presentando una baja colonización superficial a las 55 h. Para el caso del succinato, se vio ligeramente favorecida la biopelícula a partir de las 31 h, se halló mayor homogeneidad en el cubrimiento. Para la glucosa se desarrolló a las 55 h una película compuesta por gran número de pequeñas microcolonias en forma de pilares bacterianos separados por canales de baja densidad bacteriana, una película densa fue capaz de colonizar homogéneamente la superficie. No obstante, la presencia de Fe(II) con un medio mínimo y glutamato como fuente de carbono, se vio que la biopelícula era desfavorecida por la presencia del catión (los resultados no se han presentado debido

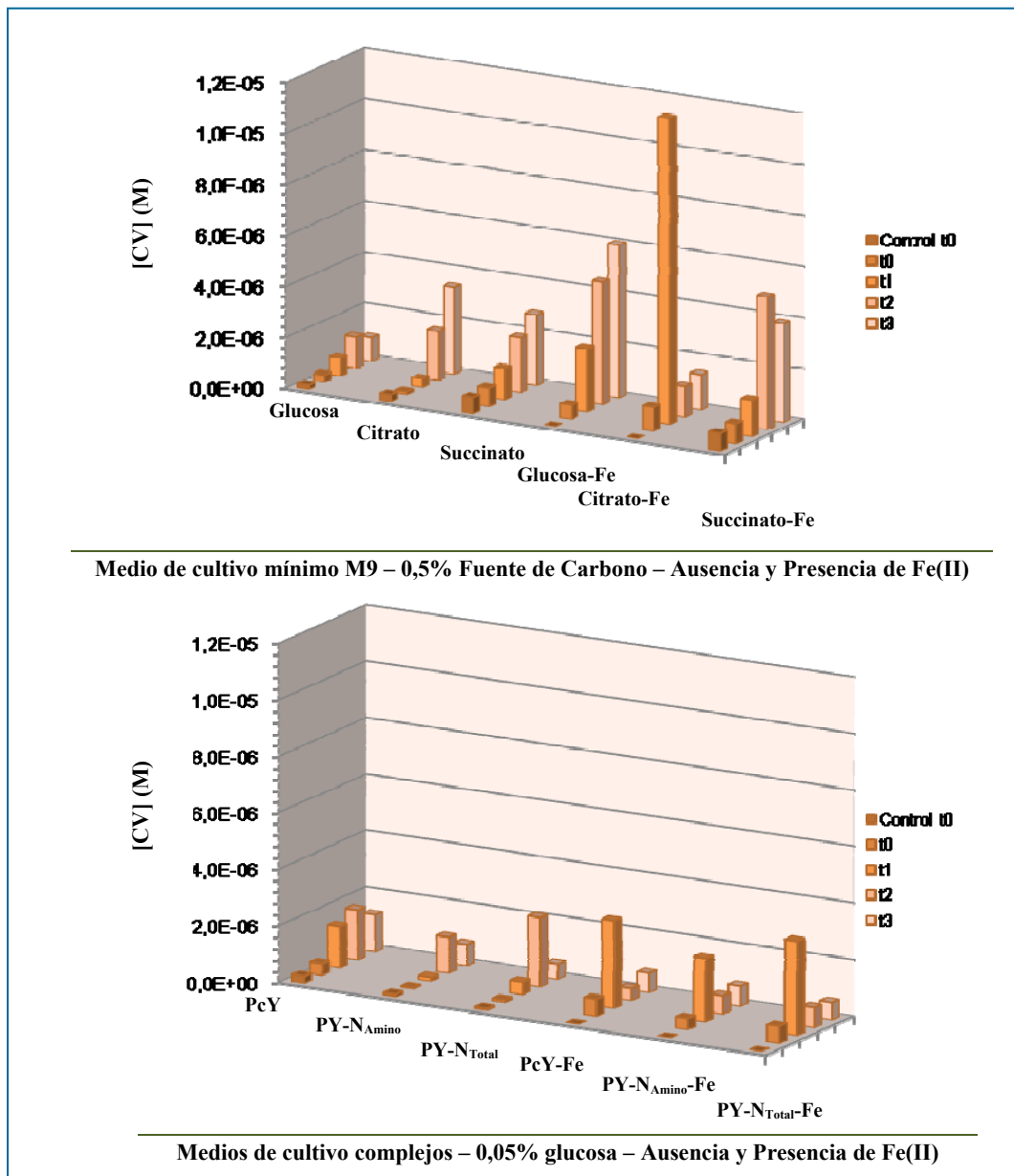


Figura I-42. Comparación de la concentración de CV para el medio mínimo M9 y 0,5% fuente de carbono y los medios complejos con 0,05% glucosa como fuente de carbono en ausencia y presencia de Fe(II).



a la dudosa calidad de uno de los componentes del medio de cultivo). Al comparar con los resultados expuestos por O’Toole, ver Figura I-38 (O’Toole, 1998), se halló que la presencia de Fe(II) en un medio mínimo salino con glucosa favorece el desarrollo de biopelículas en placas de cultivos. En experimentos de cámara de flujo se ha hallado que la cepa *Pseudomonas aeruginosa* en medios con Fe(II) es capaz de desarrollar estructuras más complejas (*mushrroom*) mientras que en medios carentes de Fe(II) forma tapices poco densos (*flat*) (Harmsen, 2010)

En los medios complejos estudiados (variando la fuente de nitrógeno y manteniendo la fuente de carbono en 0,05% de glucosa) se estimuló la colonización bacteriana a corto plazo, hasta las 7 h de iniciada la inmovilización, con la consecuente maduración y desprendimiento de la biopelícula a tiempos posteriores. De los tres medios complejos, el medio que mayor estimulación presentó fue el medio con mayor concentración de nitrógeno total, desde el punto de vista nutricional, el medio más rico en nutrientes (PY-N<sub>Total</sub>), como puede observarse en la Figura I-42.

Comparando el efecto entre medios mínimos y medios complejos en sus composiciones nutricionales originales, la presencia de Fe(II) favoreció más el desarrollo de las biopelículas en los medios mínimos de cultivos, como lo refleja la comparación entre los gráficos de la Figura I-42.

La presencia de Fe(II) ha favorecido la presencia de *pellicle* (tanto en los medios mínimos como en los medios complejos) quedando adherido el mismo a los bordes de los cubreobjetos, como puede observarse en la Figura I-43 algunos casos representativos de medios complejos. El caso de mayor sobreestimación de la concentración de CV se correspondió a las 7 h (t<sub>1</sub>) con el medio PcY-0,05%Glucosa-Fe. Se ha adherido al borde del cubreobjeto restos del *pellicle* siendo una densa biopelícula e incrementando la concentración de colorante. Para el medio PY-N<sub>Amino</sub>-0,05%Glucosa-Fe en t<sub>1</sub> se registró un arrastre de fondo denotando una franja de

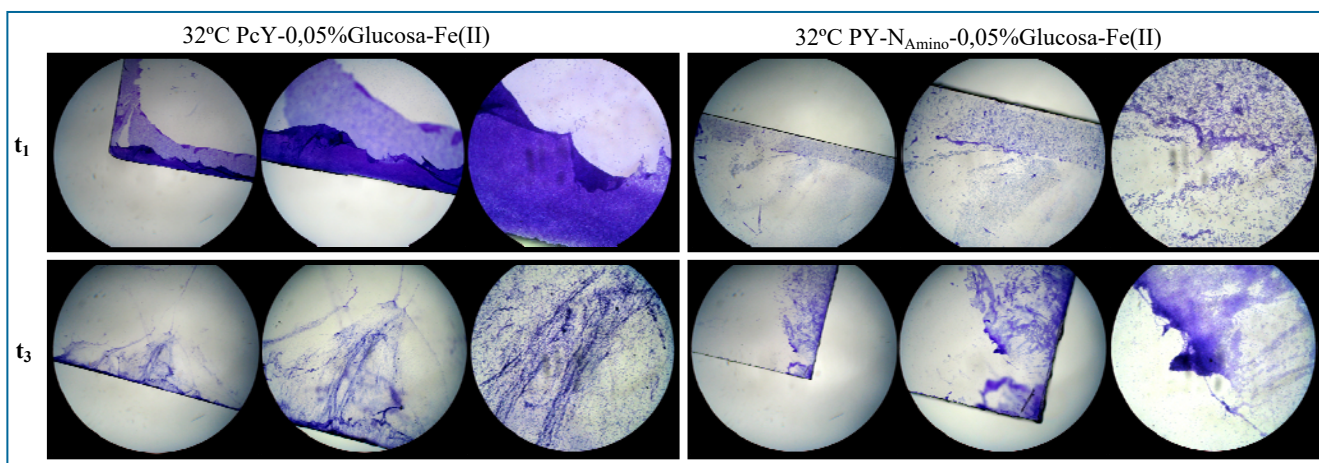


Figura I-43. Imágenes por microscopía de campo claro correspondientes a t<sub>1</sub> y t<sub>3</sub> para los medios complejos PcY-Fe(II) y PY-N<sub>Amino</sub>-Fe(II) a 32 °C y con concentración 0,05% glucosa como fuente de carbono.



mayor densidad adherida al vidrio. En  $t_3$  se ha registrado adhesiones de finos pellicles sobreestimando levemente la concentración del colorante en ambos medios de cultivo.

El agregado de la baja concentración de Fe(II) en los medios de cultivo ha impactado en el valor de pH, hallándose un valor de 4,5 para la situación inicial con los medios complejos PY y aumentando hasta 8 al finalizar las experiencias. Para el medio basado en peptona de caseína en presencia de Fe(II), el pH inicial fue menor que los medios en ausencia del catión, iniciando en 5,5 y alcanzando el valor de 7 a las 31 h. En referencia a los cultivos planctónicos, no se ha registrado una perturbación en el crecimiento en estado libre, se ha alcanzado el valor de  $DO_{600nm}$  de 1 a las 31 h de iniciada la cinética. Evidenciando que la cepa bacteriana fue capaz de crecer en estado libre en los medios de cultivo modificados pero el agregado de una baja concentración de Fe(II) provocó el desprendimiento de las células de la superficie del vidrio con los medios complejos.

#### **6- ¿Influye la temperatura de incubación en la colonización superficial del vidrio? Evaluación del crecimiento planctónico**

La colonización bacteriana superficial dependió tanto de la temperatura de incubación como del tipo de medio de cultivo utilizado (medio salino o medio complejo). Se ha registrado en general que 32 °C fue la temperatura que favoreció la colonización superficial. En la Figura I-44 se comparan las concentraciones halladas a ambas temperaturas de trabajo para el medio de cultivo M9 según la fuente de carbono y su concentración. Mientras que en la Figura I-46 se detalla la cinética para los medios PcY-0,05%Glucosa y sus diluciones, y el efecto de la presencia de Fe(II) en M9-0,5%Glucosa y PcY-0,05%Glucosa.

Las bajas colonizaciones registradas a 28 °C determinaron la selección de la temperatura de 32 °C como temperatura ideal para analizar los efectos propuestos, tales como la variación en la concentración de las fuentes de carbono para los medios complejos o incluso el efecto del cambio en la fuente de nitrógeno propuesto. Bajpai (Bajpai, 2015) indica que la temperatura está correlacionada con la tasa de reacción de las enzimas y tiene un efecto sobre el desarrollo de las células, pequeños cambios en la temperatura pueden provocar cambios sustanciales en el desarrollo de las biopelículas, como se ha encontrado en los desarrollos descriptos

Para el medio mínimo, se hallaron diferentes comportamientos de acuerdo a la temperatura de incubación seleccionada. A 28 °C la glucosa favoreció la colonización superficial, caracterizada por un delgado y plano tapiz bacteriano, formando una monocapa celular con pequeñas microcolonias dispersas homogéneamente por la superficie. El lavado y renovación del medio de cultivo provocó la maduración de la

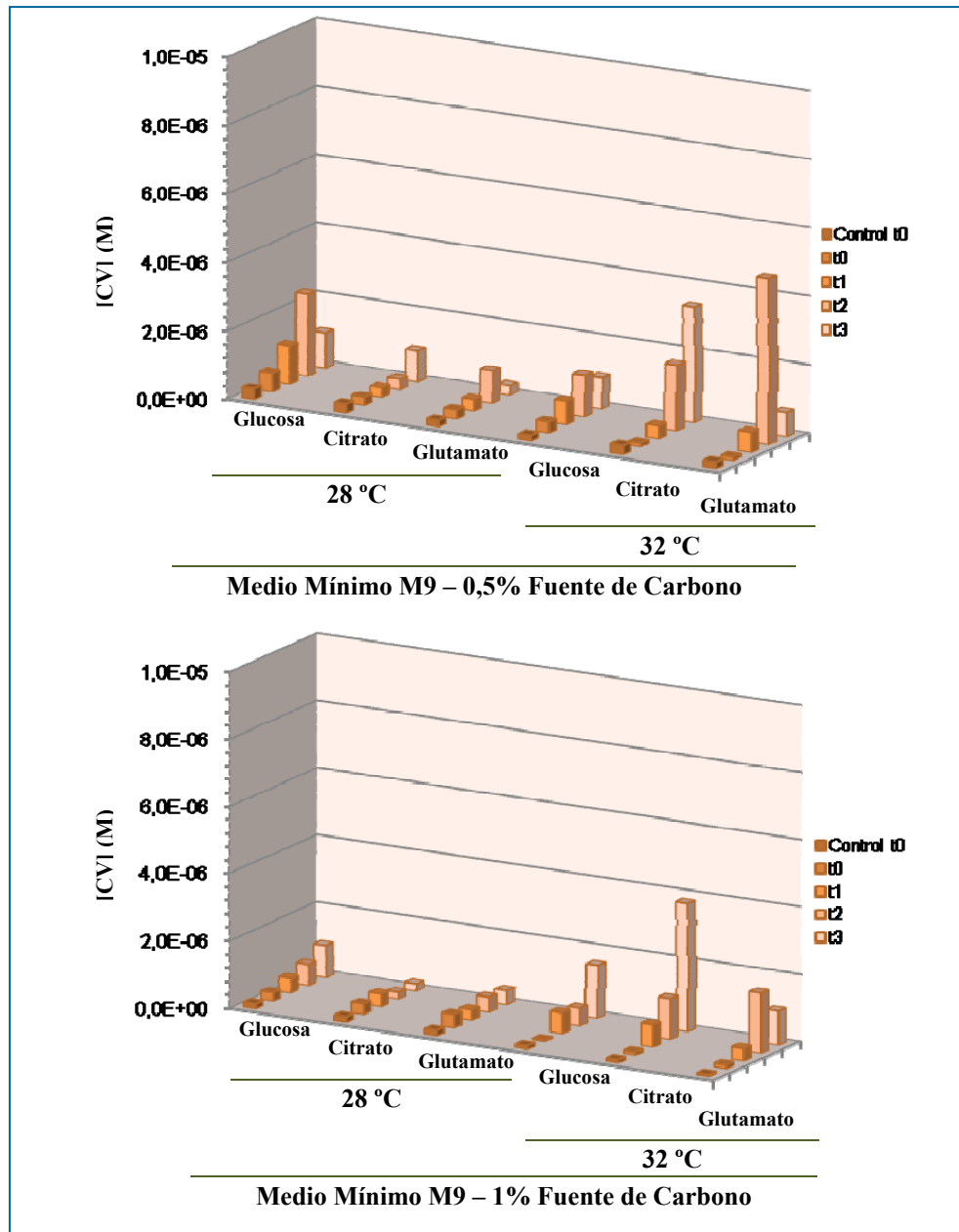


Figura I-44. Comparación de la concentración de CV en función del tiempo para *P. veronii* 2E a 28 y a 32 °C para el medio mínimo M9 según la fuente de carbono y su concentración.

biopelícula, registrando menor cubrimiento a las 55 h. Al comparar entre sí las imágenes de las cinéticas de colonización a ambas temperaturas de trabajo (Figura I-16, apartado 2.2.b, Figura I-21, apartado 2.3.a y Figura I-28, apartado 2.6.a), se puede observar que la temperatura de 32 °C fue la temperatura que ha favorecido la colonización superficial

A 28 °C se registró una mayor facilidad en desarrollar la formación de películas bacterianas resistentes y flexibles sobre la interfase líquido-aire bajo condiciones de crecimiento estático. En cuanto a la fuente de carbono, el glutamato fue el nutriente que más facilitó el desarrollo de los *pellicles*, adquiriendo un aspecto similar a la “nata de la leche” en cuanto a textura y rigidez de la película flotante. Dichas estructuras

fueron más difíciles de separar a la temperatura de 32 °C (registrando la mayor contaminación con estas estructuras) y, durante la extracción de los cubreobjetos, fragmentos de los *pellicles* se adhirieron irreversiblemente al vidrio sobrecuantificando la biopelícula. Para reducir y minimizar las adhesiones irreversibles de dichos fragmentos se han probado diferentes alternativas durante la extracción de los cubreobjetos, como apartar la película flotante, o bien la extracción de la película flotante con pipeta Pasteur, incluso la extracción del medio de cultivo previo a la extracción del vidrio. Desde un punto de vista estructural, el tapiz que colonizó la superficie del vidrio presentó características muy diferentes a los restos de *pellicle* adheridos. Presentaron mayor rugosidad, mayor densidad bacteriana, mayor espesor en la película y una estructura de mayor complejidad.

Otra característica registrada a 28 °C con los medios mínimos fue la coloración verdosa de los medios de cultivo (ver Figura I-29, apartado 2.6.a), pudiendo estar vinculados con la producción y liberación de sideróforos al medio. En el trabajo de Ferreira (Ferreira, 2016; Ferreira, 2013), ver Figura I-45, se halló que la *P. veronii* 2E es capaz de liberar sideróforos a 25 °C y no a 32 °C y produciendo mayor cantidad de dichos productos en condiciones de luz, compatible con los resultados hallados. Las placas de cultivo correspondientes a 28 °C fueron cultivadas sobre mesada manteniendo la temperatura constante del ambiente y bajo condiciones de exposición a la luz ambiente. Mientras que las placas a 32 °C fueron cultivadas en estufa de cultivo, sometidas a condiciones de oscuridad. De la misma manera, se registró la coloración verdosa a 28 °C y no a 32 °C.

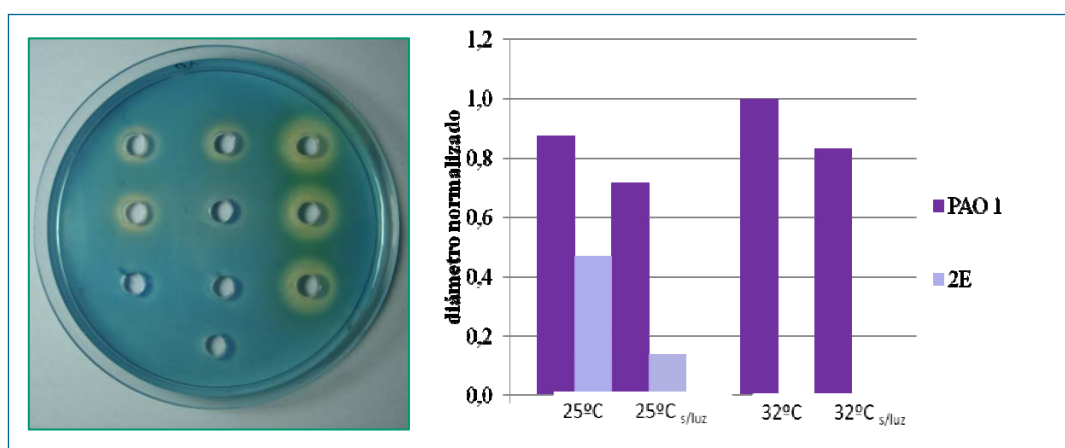


Figura I-45. Producción de sideróforos de *P. veronii* 2E y *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 (Ferreira, 2016; Ferreira, 2013)

La producción de sideróforos se estudió en sobrenadantes de cultivos en M9-2%Glicerol2%, extracto de levadura 0,01% sobre placas agar-CAS. Siendo: diámetro normalizado= (diám./DO<sub>600nm</sub>)<sub>2E</sub> / (diám./DO<sub>600nm</sub>)<sub>PAO1,32°C</sub>

a) Placa de Agar CAS.

b) Diámetro normalizado en función de la temperatura (25 °C o 32 °C) y en presencia o ausencia de luz (resaltado en ausencia de luz como “s/luz”)

Si se compararan las cinéticas de colonización de la Figura I-11 (32 °C) (incluso imágenes correspondientes a PcY-0,05%Glucosa de la Figura I-23) con Figura I-30 (28 °C) (a pesar de que se encuentran en formatos de escaneo diferentes), se puede ver que la disminución de la temperatura de incubación ha impactado negativamente en la colonización superficial. En la Figura I-46 se encuentran comparadas las concentraciones de CV (para PcY-0,05%Glucosa se tomaron los datos registrados para la Figura I-23, con el nuevo lavado de los cubreobjetos).

Para los casos analizados a 28 °C de los medios de cultivos originales (M9-0,5%Glucosa y PcY-0,05%Glucosa) aditivados con Fe(II) se registró un beneficio en la

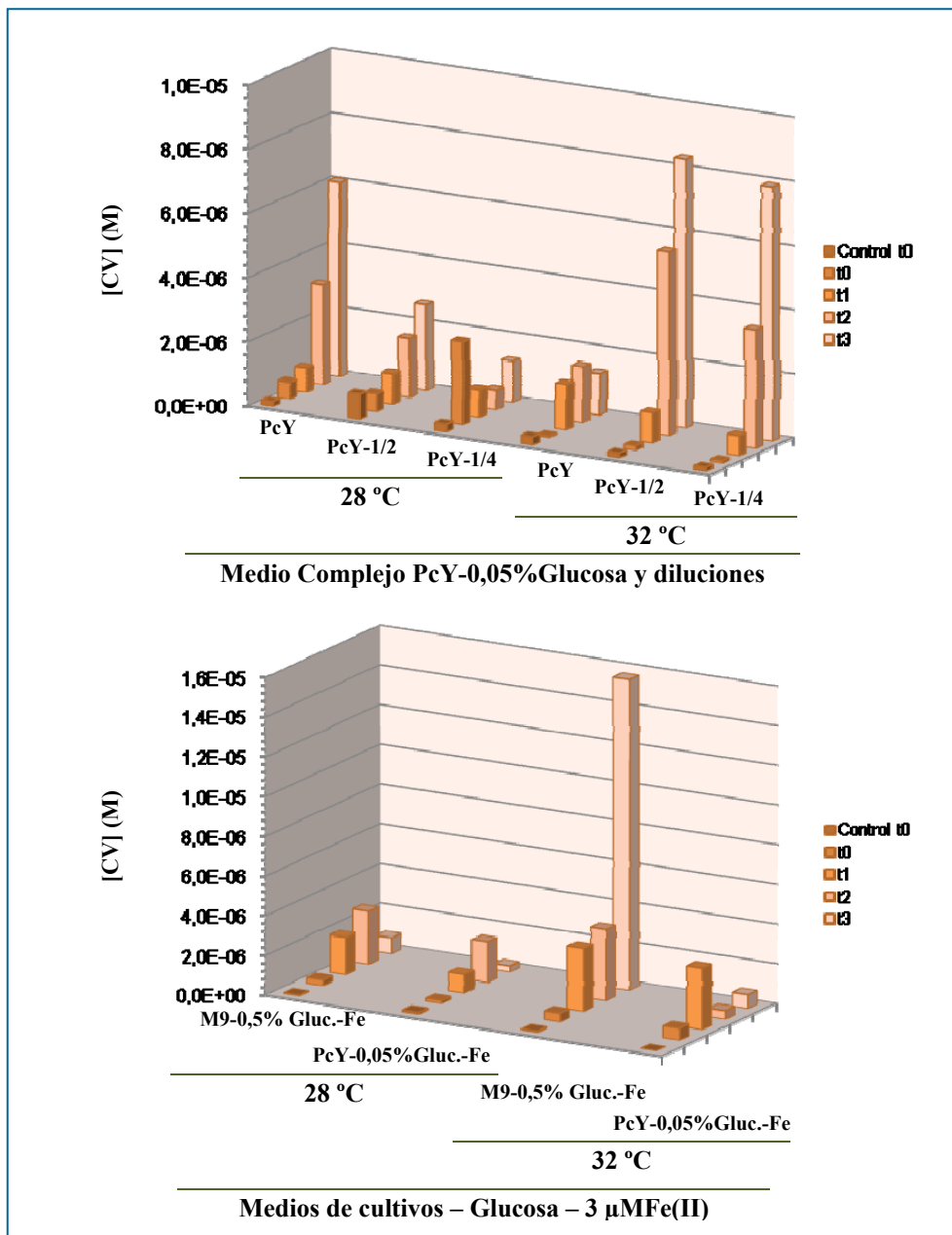
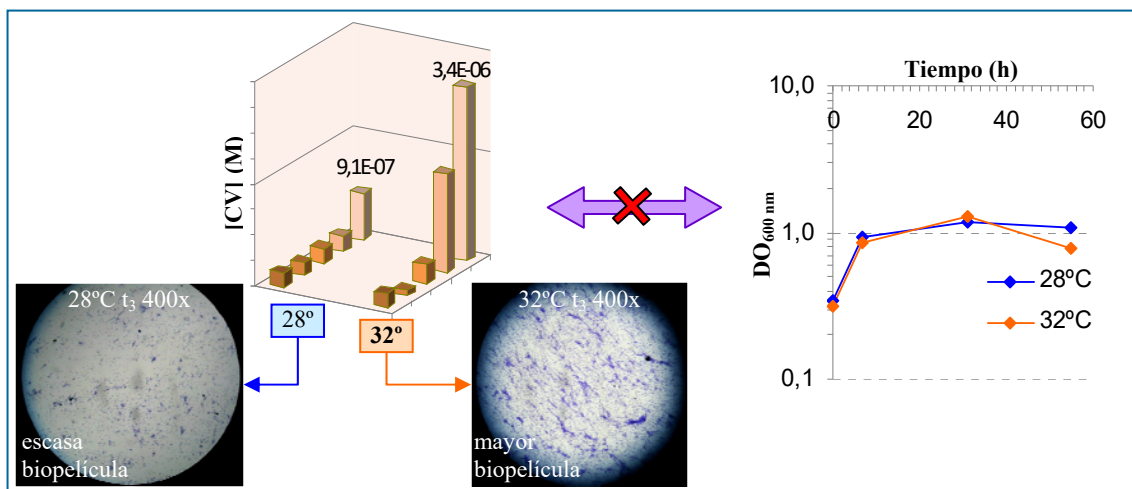


Figura I-46. Comparación en la concentración de CV en función del tiempo para *P. veronii* 2E a 28 y a 32 °C para el medio PcY-0,05%Glucosa y sus diluciones y para los medios de cultivos M9-0,05%Glucosa-Fe y PcY-0,05%Glucosa-Fe aditivados con Fe(II).



**Figura I-47. Efecto de la temperatura en el desarrollo del biopelícula de con el medio M9-0,5%Cittrato.** Evolución temporal de la concentración de CV para las inmobilizaciones bacterianas a 28 °C y a 32 °C, imagen de colonización registrada a las 55h por microscopía (400x) y evolución de la DO<sub>600nm</sub> en función del tiempo.

colonización superficial para el caso de M9 a 32 °C. Mientras que para el medio complejo, se halló un aumento en el cubrimiento a corto tiempo a 32 °C (máximo hallado en la concentración de CV a las 7 h), pero hacia las 31 h de iniciada la colonización, se registró un ligero beneficio a la temperatura de 28 °C.

En la mayoría de las condiciones de cultivo estudiadas, se han hallado buenos crecimientos planctónicos tras registrar valores de DO<sub>600nm</sub> cercanos a 1 a las 31 h de iniciada la experiencia. Mientras que el crecimiento y maduración de las biopelículas dependió de la selección natural de la población como consecuencia del medio de cultivo utilizado (naturaleza de las fuentes de nutrientes y concentraciones), de las condiciones de incubación experimentales y de la habilidad de poder colonizar la cepa bacteriana la matriz sólida (vidrio). En los casos estudiados con la cepa *P. veronii* 2E, el desarrollo de la biopelícula no dependió de la densidad bacteriana que se alcanzó en estado libre en el tiempo transcurrido. Por lo que no se ha encontrado una relación directa entre el crecimiento planctónico con el crecimiento sésil (inmovilizado sobre el cubreobjeto). Un ejemplo claro que refleja esta situación se halló con el medio M9-0,5%Cittrato bajo una misma condición nutricional pero a diferente temperatura de incubación como puede observarse en la Figura I-47. En ambas condiciones, se alcanzó un crecimiento planctónico similar (gráfico de DO<sub>600nm</sub> en función del tiempo) mientras que las colonizaciones superficiales evidenciaron diferente comportamiento (gráfico de [CV] en función del tiempo e imágenes de la estructura de las biopelículas por microscopía). Como puede observarse en las curvas de crecimiento planctónico descritas presentaron similares tendencias en ambos cultivos, llegando a superar el valor de 1,0 a las 31 h de iniciada la cinética de inmobilización ( $t_2$ ). Se registró una ligera disminución de la densidad óptica tras la renovación del medio de cultivo en el

caso de 32 °C como consecuencia de la formación de grumos en el cultivo (registrando una densidad óptica aparente menor). Se halló una biopelícula en continuo crecimiento siendo mayor la inmovilización celular alcanzada a 32 °C con una concentración  $3,4 \cdot 10^{-6}$  M, frente a  $9,1 \cdot 10^{-7}$  M hallada a 28 °C.

**7- ¿Influye el tipo de medio de cultivo en la colonización superficial del cubreobjeto?**

A partir de los resultados analizados, la estructura de la biopelícula depende del tipo de medio de cultivo utilizado, logrando un tapiz más bien plano, poco denso y baja rugosidad con presencia de microcolonias de pequeño tamaño dispersos por la superficie con medios de cultivo mínimos y una fuente inorgánica de nitrógeno. Mientras que con medios complejos, se halló la presencia de biopelículas más espesas, con presencia de microcolonias más grandes, interconectadas entre sí (evidenciando líneas de fisura como consecuencia de la metodología de extracción) y separadas por canales colonizados por una monocapa celular, y una mayor rugosidad.

**8- ¿Se puede utilizar una técnica aislada para estudiar biopelículas sobre vidrio?**

En la bibliografía (Li C., 2016) comúnmente se habla que la microscopía de campo claro da idea de la macroestructura de la biopelícula comparada con el análisis de la microscopía confocal (como entre otras técnicas microscópicas) que da idea de la microestructura de la biopelícula. Mientras que a las técnicas que dan idea del estudio a escala de los centímetros se las denominan análisis de la mesoestructura de la biopelícula. No obstante, a lo largo de este trabajo se ha clasificado el estudio de la microescala a los resultados hallados a partir de la microscopía de campo claro y macroescala a los resultados hallados a partir del escaneo de los cubreobjetos. Por otro lado, Bar-Zeev (Bar-Zeev, 2014) observa que cuando se deshidrata la biopelícula (en su caso se realiza por lavados sucesivos con alcohol), la biopelícula se deforma, haciéndose plana (18  $\mu$ m) y una película no estructurada de células vivas y muertas encapsuladas en una pequeña capa de exopolisacáridos, incluso con ausencia de túneles en los pilares de cada microcolonia, pudiendo explicar así la tendencia registrada en las biopelículas estudiadas. Con técnicas de estudio no destructivas de la biopelícula, como con la microscopía confocal, podría salvarse este problema. En la actualidad, es común analizar las biopelículas a partir de la microscopía por escaneo láser confocal (CLSM) acoplada al análisis de imágenes. Si bien se trabaja con la biopelícula sin alterarla es un análisis de la microescala (Pavissich, 2014).

El análisis de la estructura de la biopelícula bacteriana sobre el vidrio por microscopía hace énfasis en una región pequeña del área en estudio, se pueden analizar con mayor detalle cómo es la estructura de la película, la estructura microscópica del cubrimiento. El análisis del área total del cubreobjeto presenta la ventaja de que se puede estudiar un área más importante y da idea de toda la película bacteriana, se puede analizar la estructura macroscópica del cubrimiento. Por otro lado, pueden diferenciarse adhesiones colaterales al vidrio como consecuencia del proceso de extracción (restos de *pellicle* o arrastre de fondo). Si bien se pierden detalles del microanálisis (debido a los bordes difusos de las microcolonias), da un buen acercamiento al cubrimiento en la extensión del cubreobjeto. Un punto en contra de dicha técnica fue el recorte de los bordes de los cubreobjetos, perdiendo información digital de parte del área colonizada y en particular la pérdida de información como producto de las adhesiones inespecíficas producidas por el método de extracción de los cubreobjetos. La técnica de disolución del CV es una técnica rápida, pero disuelve todo el colorante, indistintamente del origen del tapiz adherido al vidrio, resultando una sobrequantificación en los casos de adhesiones de *pellicle* o de arrastre de fondo. Cuando el tapiz es muy rugoso y tupido, el tiempo de disolución en etanol (30 min a 150 rpm) no fue suficiente para que se disuelva todo el colorante, subestimando la concentración y quedando teñidos los cubreobjetos.

En el estudio de la cinética de colonización bacteriana sobre el vidrio fueron necesarias complementar las diferentes técnicas de análisis, analizando conjuntamente la microestructura con la macroestructura en conjunto con la cuantificación espectrofotométrica de la película bacteriana y no llevar a conclusiones erróneas por el uso aislado de alguna de las técnicas.

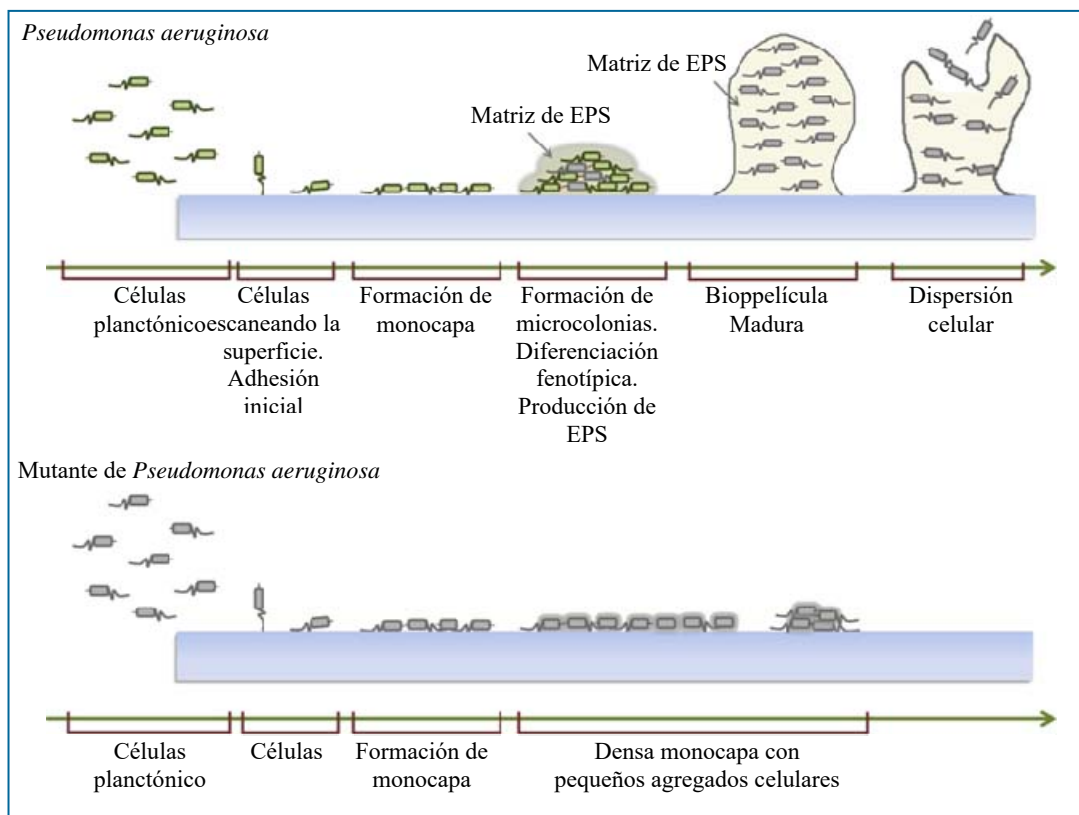
### **9- En resumen, ¿de qué factores depende el desarrollo de las biopelículas formadas?**

El 99% de los microorganismos vive en forma de biopelículas en la naturaleza, es por tal que es muy importante el estudio y comprensión de las mismas. Las biopelículas son dinámicas y responden a su ambiente (Yang, S., 2013). Costa (Costa, 2017) define el proceso de formación de una biopelícula como un proceso que involucra cinco estadios: adhesión inicial por células del cultivo planctónico, adhesión irreversible, formación de una monocapa celular, producción de EPS con el consecuente crecimiento de la biopelícula, la maduración y el desprendimiento celular. La Figura I-48 sintetiza la cinética de colonización de la cepa bacteriana *Pseudomonas aeruginosa* y de una mutante, siendo la diferencia entre cada una el tipo de biopelícula desarrollada (microcolonias en forma de pilares o monocapa celular). Las biopelículas



pueden asumir diversas morfologías superficiales, desde suaves hasta rugosas. La heterogeneidad morfológica de la biopelícula (o rugosidad) puede conducir a efectos significantes en la tasa de conversión de sustratos debido a las limitaciones en el transporte de masa sujeto a condiciones de disponibilidad de nutrientes y condiciones hidrodinámicas. (Pavissich, 2014). Es común el desarrollo de canales de agua entre medio de la biopelícula para acceder a los nutrientes del medio circundante (Costa, 2017).

La arquitectura que adquiere la biopelícula depende de varios factores, tales como la disponibilidad de nutrientes, propiedades de la superficie y de la interfase, la composición de la comunidad microbiana y las fuerzas de corte (cizallamiento). Cuando se encuentra la biopelícula sometida a ambientes de bajo nivel de estrés, se desarrollan estructuras espesas de multicapa celulares; mientras que bajo ambientes de alto nivel de estrés, pueden ser más planas o formar filamentos largos. Entonces puede favorecer desde una densa biopelícula hasta un modelo de un mosaico heterogéneo, o con presencia de estructuras más complejas en forma de pilares separados por canales de agua (Costa, 2017). Como se ha encontrado así la diferencia entre las biopelículas desarrolladas con medios mínimos de cultivo frente a medios nutritivos (o complejos). *P. veronii* 2E fue capaz de favorecer fenotipos



**Figura I-48. Cinética de colonización superficial (adaptado de Costa, 2017).**

Modelo de colonización bacteriana de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* y de una cepa mutante de la misma que presentó diferencias en la producción de *pili* involucrados en la adhesión celular (*type IV pili mutant*)

particulares que desarrollaron biopelículas densas (en general con medios de cultivos complejos) o bien favorecer fenotipo que crecían desarrollando una monocapa celular con algunos agregados pequeños dispersos (en general, con los medios mínimos de cultivo). Asumiendo una lista de los posibles factores que influyen a la formación de las biopelículas se encuentran (Bajpai, 2015; Costa, 2017):

- Factores que dependen del soporte: textura, hidrofobicidad, química superficial, carga, condicionamiento de la película, porosidad, nanoestructura
- Factores que dependen del medio acuoso circundante: temperatura, pH, velocidad de flujo, tiempo de residencia, fuerza iónica, fuentes de nutrientes, concentración de nutrientes, concentración de oxígeno en el fluido, concentración de dióxido de carbono en el fluido, estrés en la interfase
- Factores que dependen de las células: hidrofobicidad y composición química de la superficie celular, presencia de *pili* y flagelos, composición de polímeros extracelulares, comunicación celular.



## Capítulo II: Diseño de biorreactores para el tratamiento de efluentes con Cd y Zn





## INTRODUCCIÓN

Se diseñaron dos biorreactores en forma de columna donde se inmovilizaron por desarrollo de biopelículas las células de *P. veronii* 2E sobre cubos de espuma de poliuretano con el fin de remediar efluentes con baja concentración de metales disueltos. Se estudiaron las eficiencias de dos sistemas cuyo volumen de trabajo fueron diferentes (C50 con una capacidad de 50 mL y C200 cuya capacidad fue de 200 mL). Para ello se ensayaron diferentes medios de cultivos y matrices poliméricas con objeto de hallar las mejores condiciones para el funcionamiento de los reactores. Desde el punto de vista de la biorremediación, se estudiaron efluentes artificiales con contenido en Cd y Zn, comunes en la industria galvanoplástica.

Las actividades desarrolladas incluidas en este capítulo se enmarcan dentro de los objetivos específicos:

- ☞ Estudiar la inmovilización de microorganismos tolerantes/resistentes a metales (Cd y Zn) en diversos soportes inertes de bajo costo, material de relleno de los reactores a utilizar.
- ☞ Efectuar el seguimiento del desarrollo y características de las biopelículas formadas sobre diferentes matrices.
- ☞ Simular procesos de remediación de aguas empleando los microorganismos inmovilizados, selección de las condiciones óptimas a través del uso de efluentes artificiales.
- ☞ Evaluar el funcionamiento del biorreactor mediante el cálculo de la eficiencia de retención de metales en efluentes artificiales. Estudiar la inmovilización de microorganismos tolerantes/resistentes a metales (Cd y Zn) en diversos soportes inertes de bajo costo, material de relleno de los reactores a utilizar.

# METODOLOGÍA

## 1- Medios de cultivo e inóculo

Se utilizaron diferentes medios de cultivo para seleccionar las mejores condiciones de trabajo en los procesos de biorremediación desarrollados. Las composiciones de los mismos (expresadas en g/L) fueron:

- Medio PcY-0,05%Glucosa (g/L): peptona de caseína, 2,5; extracto de levadura, 1,25; glucosa, 0,5.
- Medio PY-N<sub>Total</sub>-0,5%Glucosa (g/L): peptona de carne, 2,5; extracto de levadura, 1,25; glucosa, 5,0.
- M9-0,5%Glucosa-Fe(II) (g/L): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7,3; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3,0; NH<sub>4</sub>Cl, 1,0; NaCl, 0,5; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,246; CaCl<sub>2</sub>, 0,01; glucosa, 5,0; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 8,3·10<sup>-4</sup> (3,0 μM).

Cada columna de tratamiento se inoculó con un volumen equivalente al 1% del volumen de trabajo a partir de un cultivo en lote de 48 h de la cepa bacteriana *P. veronii* 2E (el cultivo inóculo fue realizado en erlenmeyer con 10 mL de medio de cultivo fresco, a 32 °C y 120 rpm en baño termostático con agitación orbital). El inóculo fue sembrado en cada columna de tratamiento por inyección manual por el extremo superior del biorreactor.

## 2- Soporte de inmovilización bacteriana

Se seleccionaron tres tipos de espumas de poliuretano como soporte para inmovilizar superficialmente la masa celular.

La primer espuma de poliuretano utilizada fue esponja Mortimer® lavavajillas (de aproximadamente 30 kg/m<sup>3</sup> de densidad). Luego se utilizó una espuma de poliuretano de color amarilla de mayor porosidad denominada Espuma Amarilla (utilizada frecuentemente como espuma de relleno de almohadones, 10 kg/m<sup>3</sup>). La tercer espuma utilizada fue espuma de poliuretano de baja densidad Porosint® (10 kg/m<sup>3</sup>).

Las diferentes matrices de inmovilización fueron cortadas en forma de cubos de 1 cm<sup>3</sup> de volumen (1 cm de arista del cubo de espuma aproximadamente, salvo la espuma blanca que como era una plancha de 0,9 cm de espesor, una de sus arista no fue de 1cm). Las matrices fueron lavadas con agua y detergente de uso doméstico y enjuagadas, finalmente, con agua destilada, se dejaron secar a temperatura ambiente. Se fraccionaron muestras de 10 cubos y 25 cubos de espuma en cajas de petri de



vidrio previamente pesadas. Se secaron en estufa a 80 °C durante 2 h, se determinó la masa total de espuma en balanza analítica ( $\pm 0,0001$  g).

Como matriz soporte de inmovilización bacteriana se introdujeron 10 cubos de espuma en el biorreactor C50 y 50 cubos en total en C200 (se seleccionó dicha matriz a partir de los resultados previos, Vullo, 2003).

### 3- Diseño de los biorreactores

#### 3.1- Características generales de los biorreactores

Los biorreactores utilizados presentaron las siguientes características básicas:

- forma de columna: ingreso del medio de cultivo y del efluente a remediar por el extremo superior de la columna de tratamiento y salida de residuos por el extremo inferior (medio de cultivo con biomasa no inmovilizada o efluente tratado)
- lecho fijo: células bacterianas inmovilizadas en soporte sólido y efluente a tratar en fase líquida

El sistema fue desarrollado para operar bajo condiciones de esterilidad en todo momento del tratamiento microbiológico, esterilizando en autoclave (121 °C y 1 bar o 14,5 psi, durante 30 min) previo y posterior al funcionamiento de los mismos manteniendo conectadas todas las partes del sistema. En la Figura II-1 se esquematiza el diseño general de los biorreactores desarrollados.

Se desarrollaron dos modelos de biorreactor de diferente volumen de tratamiento. El **biorreactor C50** operó con un volumen de trabajo de 50 mL, el diámetro de la columna fue de 3,2 cm y de material plástico (jeringa plástica de 60 mL). Mientras que el **biorreactor C200** operó con un volumen de trabajo de 200 mL, siendo 3,7 cm el diámetro interno de la columna de vidrio borosilicato.

El sistema de conexiones por mangueras se realizó íntegramente con mangueras de silicona curada al platino de Watson Marlow® por su alta resistencia mecánica, no deformables, alta resistencia a la adhesión de partículas o bacterias (paredes internas lisas, con *casi cero de porosidad*, según la ficha técnica) y posibilidad de ser esterilizadas en autoclave. Se utilizaron mangueras de pared de 1,6 mm y diámetro interno de 3,2 mm. Sólo para el caso de la columna C200, los tramos comprendidos entre el reservorio de medio de cultivo fresco y el reservorio de agua de lavado hasta la unión en forma de “Y” de vidrio de borosilicato se utilizó manguera de 1,6 mm de pared y 4 mm de diámetro interno, con la consecuente reducción a 3,2 mm de diámetro. Las conexiones al interior de las columnas de tratamiento se realizaron con tubos de vidrio.

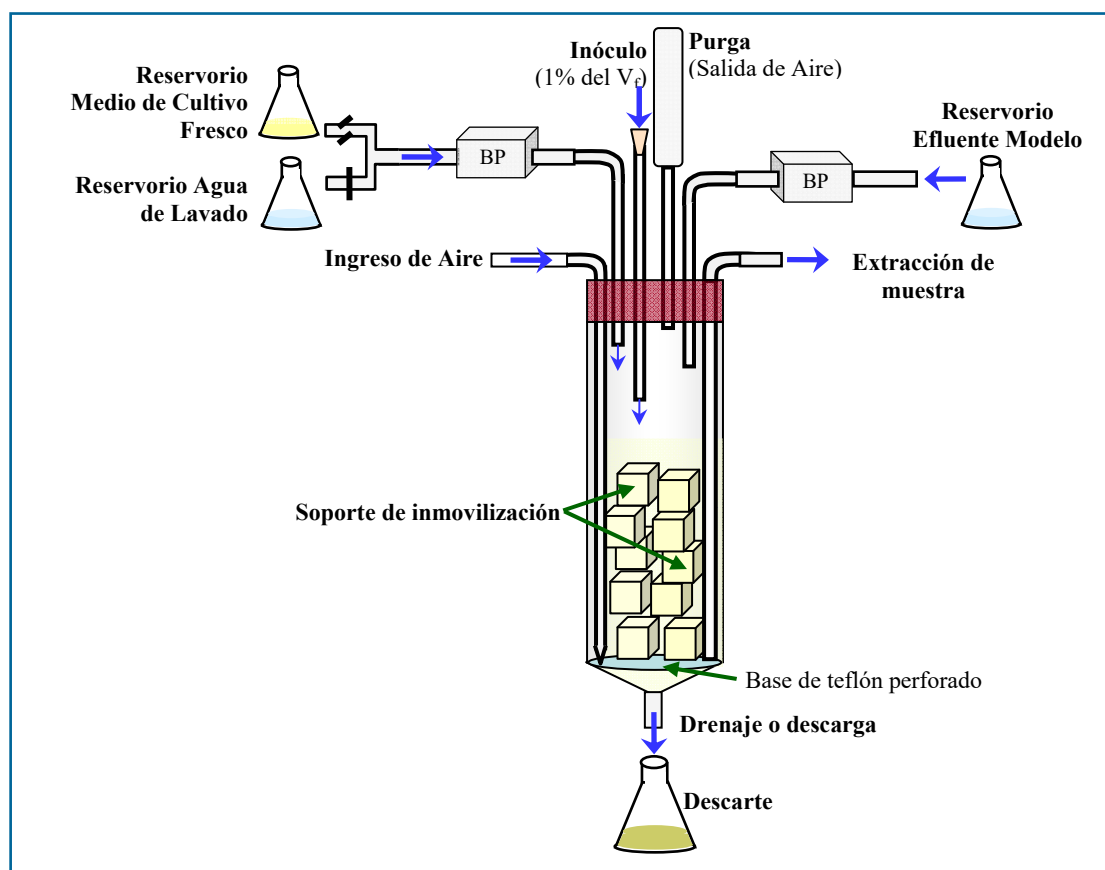


Figura II-1. Esquema general del biorreactor en forma de columna, (siendo BP la bomba peristáltica mediante la cual se carga la columna).

### 3.2- ¿Operación con Flujo Continuo o Sistema en Lote?

Durante el proceso de diseño y optimización de los biorreactores, se evaluó el tipo de funcionamiento de los mismos: Flujo Continuo o Sistema en Lote. Para ello, se estudió la alimentación mediada por la bomba peristáltica (BP) Watson Marlow Alitea SCI Q400 Cronimo® S.A. para evaluar la conveniencia del sistema a implementar en los reactores.

**Flujo Continuo.** Se estudió la velocidad del flujo de la bomba peristáltica para determinar el caudal de carga (llenado) y el caudal de drenaje (descarga o vaciado) de las columnas de tratamiento diseñadas utilizando agua destilada como efluente. El sistema modelo se mantuvo regulado a presión atmosférica dejando el extremo superior abierto y a temperatura ambiente.

El caudal de carga fue regulado mecánicamente por la bomba peristáltica y el caudal de drenaje fue regulado por la presión de la columna de agua fijada al cerrar la manguera de descarga con una pinza Hoffman. Se seleccionaron dos velocidades de la bomba distintas para evaluar los caudales (1 o 3), dejando estabilizar los sistemas y llevando a volumen constante por ajuste manual de la pinza (ver Figura II-2).

Para hallar los caudales de drenaje y carga, se tomaron muestras sucesivas de agua (70 gotas en cada muestra) de la salida de la manguera de drenaje (1<sup>er</sup> Muestreo) y del tapón de llenado de la columna de tratamiento (2<sup>do</sup> Muestreo). Se pesó la masa de agua en función del tiempo requerido en tomar cada muestra. Se calculó la densidad del agua tomando con pipeta automática un volumen de 1,000 mL y pesando en tubo Eppendorf® en balanza analítica. Se determinaron los caudales de drenaje y de carga expresados en mL/min a cada velocidad seleccionada de la bomba peristáltica.

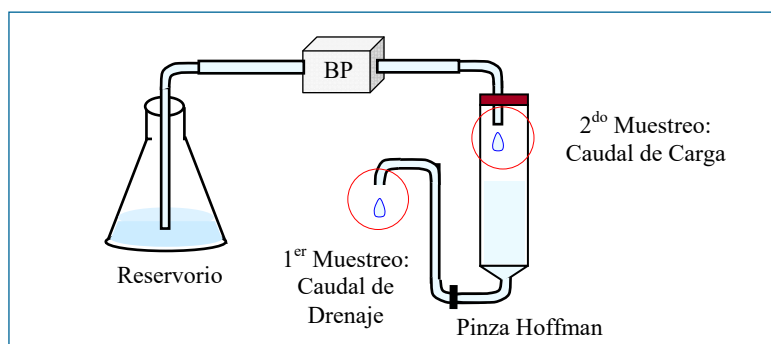


Figura II-2. Esquema del sistema para estudiar el flujo de carga y drenaje de la columna modelo.

**Sistema en Lote.** El llenado de la columna se realizó a máxima velocidad de la bomba peristáltica manteniendo cerrada la vía de drenaje (o descarga de la columna con una pinza Mohr). La descarga de cada columna de tratamiento se realizó por efecto de la misma presión de la columna agua del interior de cada columna al abrir la pinza de la vía de descarga y se dejó evacuar bajo condición de presión atmosférica. Una vez vaciada la columna, se cerró el drenaje y se inició otro ciclo de trabajo de carga/descarga.

El tiempo requerido para llenar cada columna de trabajo fue de 10 min para C50 y 40 min para C200, siendo los caudales de llenado de 5,0 mL/min.

#### 4- Temperatura (32 °C)

La temperatura se mantuvo regulada con termostato de circulación externa a 32 °C. Ambos biorreactores se conectaron en serie en referencia al sistema de termostatación, siendo calefaccionado en primer lugar C50 y luego C200. La columna C200 contó con una camisa de recirculación de vidrio, mientras que la columna C50 se termostató por envoltura con la misma manguera de silicona del baño termostató (conexión desde la salida de agua del termostato con la camisa de recirculación de C200) a modo de serpentina externa.

## 5- Aireación

Se realizaron diferentes experiencias pilotos (*Exp\_Piloto*) en condiciones de crecimiento celular en el sistema C50 utilizando el medio de cultivo complejo PcY-0,05%Glucosa para optimizar el sistema de aireación a implementar en los biorreactores desarrollados.

En la *Exp\_Piloto\_1-C50*, el intercambio de gases en el sistema se realizó por difusión simple a través de un filtro de algodón para la purga del sistema (fabricado con una jeringa descartable de 10,0 mL).

En la *Exp\_Piloto\_2-C50*, la entrada de aire se realizó utilizando un aireador comercial (aireador de pecera). El aire impulsado se prefiltró con tapón de algodón (para retener el material particulado de mayor tamaño presente en el aire y evitar la rápida saturación del filtro) y esterilizado por filtración a través de membranas de ésteres de celulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro. El aire estéril se condujo desde el extremo superior de la columna al fondo de la columna de tratamiento mediante tubo de vidrio. En el extremo inferior del tubo se introdujo espuma de poliuretano a presión (esponja Mortimer®) como difusor de aire.

En la *Exp\_Piloto\_3-C50*, se esterilizó el aire ingresante por filtración con membrana de teflón de 0,45  $\mu\text{m}$  con un prefiltro de tapón de algodón. El aire fue ingresado a la columna de tratamiento mediante un tubo de vidrio con el extremo inferior estirado y afinado (en forma de punta).

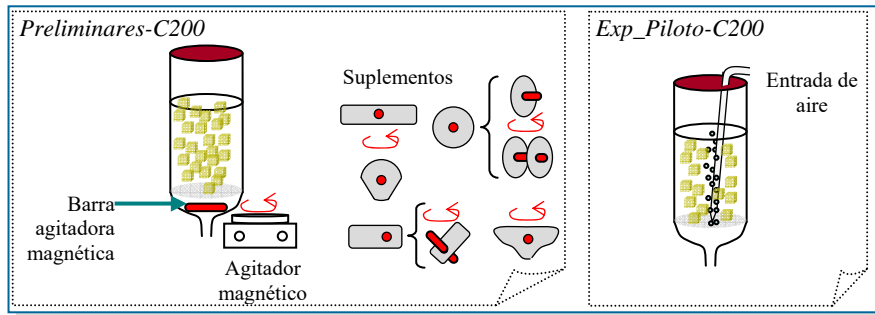
En todas las experiencias, la purga de aire se realizó por tapón de algodón equilibrando a presión atmosférica los sistemas de trabajo.

## 6- Homogeneización

Los sistemas de homogeneización implementados en los biorreactores desarrollados fueron diferentes.

**C50.** El sistema de homogeneización para la columna C50 se optimizó en conjunto con el sistema de aireación durante las experiencias pilotos explicadas en el apartado anterior en condición de crecimiento bacteriano. En la *Exp\_Piloto\_1-C50* la homogeneización del sistema se realizó por agitación magnética a 500 rpm, permitiendo un intercambio de gases sólo por difusión simple mediada por tapón de algodón en el extremo superior. Durante las *Exp\_Piloto\_2-C50* y *Exp\_Piloto\_3-C50*, a la agitación magnética, se le agregó el efecto del flujo ascendente de aire que permitió un aumento de la homogeneización del medio de cultivo.

**C200.** Se evaluó la posibilidad de implementar agitación magnética para homogeneizar el sistema, se realizaron diferentes pruebas preliminares utilizando agua destilada como medio líquido (*Preliminares\_C200*). Por la forma de la columna



**Figura II-3. Esquema de los sistemas de homogeneización en las experiencias realizadas con la columna de 200 mL (C200) y los modelos de adaptaciones de la barra agitadora.**

de tratamiento utilizada en el desarrollo de este reactor, el agitador magnético se ubicó lateralmente limitando la velocidad máxima de agitación a 250 rpm. Se probaron diferentes suplementos de teflón para la barra agitadora magnética para mantener una agitación eficiente y constante en la columna de tratamiento (ver Figura II-3). Posteriormente, se realizó una prueba piloto (*Exp\_Piloto-C200*) en condición de crecimiento celular con el medio PcY-0,05%Glucosa homogeneizando sólo por efecto del flujo de aire ascendente como consecuencia del sistema de aireación (Figura II-3).

## 7- Etapas de trabajo bajo operación en lote

El funcionamiento de ambos biorreactores se dividió en dos etapas de trabajo bien diferenciadas operando los sistemas en forma de lote. Siendo el caudal de llenado de 5,0 mL/min para ambos sistemas (ver apartado 2).

En la primer etapa, denominada Etapa de Inmovilización Celular, se llevó a cabo la inmovilización de la cepa bacteriana *P. veronii* 2E en el soporte polimérico de bajo costo seleccionado (cubos de espuma de poliuretano). En la segunda etapa, denominada Etapa de Biosorción, se realizó la biorremediación del efluente modelo al poner en contacto el efluente a remediar con la biomasa inmovilizada en el soporte.

### 7.1- Etapa de Inmovilización Celular

#### 7.1.a- Crecimiento de la biopelícula

Para reducir posibles focos de contaminación por trabajarse con medios de cultivos ricos no selectivos, se decidió no extraer muestras de las columnas de tratamiento durante el transcurso de la etapa de inmovilización bacteriana. Se testeó la densidad celular en suspensión y la estructura de la matriz de inmovilización por simple inspección ocular en la columna C200 por ser de vidrio. Se renovó el medio de cultivo por medio fresco una vez alcanzado un alto crecimiento bacteriano en suspensión (tras registrar alta turbidez). Se repitieron hasta 4 ciclos de renovación de medio de cultivo con objeto de obtener una alta densidad bacteriana inmovilizada en la matriz.

Al aumentar la turbidez y la concentración de los exudados celulares al medio líquido por el aumento de la biomasa, se registró la formación de espuma en la parte superior de las columnas de tratamiento por efecto de la aireación continua. No obstante, no se han agregado antiespumantes con objeto de no perturbar el desarrollo de la biopelícula sobre las matrices soporte.

La Etapa de Inmovilización Celular tuvo una extensión temporal variable dependiendo del medio de cultivo utilizado, osciló de 2 a 3 meses de duración. Siendo el período de renovación del medio de cultivo cada vez de menor frecuencia tras incrementarse la biomasa inmovilizada en la matriz (de 3 semanas de duración en el primer período de renovación se redujo el tiempo a 2 días en la última renovación con medio de cultivo fresco, según el medio utilizado en cada caso).

### **7.1.b- Lavado de la matriz**

Finalizada la inmovilización celular, se procedió al lavado de la matriz con las células inmovilizadas. Se realizaron tres lavados sucesivos con agua bidestilada (18 MΩcm, Millipore®) desde el reservorio de agua de lavado empleando la bomba peristáltica a máxima velocidad. Se mantuvieron las mismas condiciones operacionales en todo momento (en cuanto a temperatura, homogeneización, aireación y esterilidad) en cada sistema durante el proceso de lavado. Se vaciaron los reactores y se dio inicio a la siguiente etapa.

## **7.2- Etapa de Biosorción**

### **7.2.a- Efluente Modelo**

Se preparó el Efluente Modelo en el reservorio con agua bidestilada destinado a tal fin en cada biorreactor considerando los resultados previos hallados para la cepa *P. veronii* 2E (ver Tabla 8 del apartado 3 de la Introducción de la tesis; Vullo, 2003). Se agregó solución amortiguadora HEPES a pH = 7,5 llevando a concentración final de 10 mM a partir de una solución concentrada (1,0 M, estéril y almacenada en heladera, dilución final en el reservorio 1:100). Se agregó la solución del metal en una concentración final 0,5 mM -Cd(II) o Zn(II)- a partir de soluciones concentradas (0,5 M, estériles y almacenadas en la heladera, dilución final en el reservorio 1:1.000).

Cada solución se agregó por inyección manual por el extremo superior del reservorio del efluente modelo y se homogeneizó el efluente. Se extrajo una muestra del Efluente Modelo preparado que funcionó como “patrón”, se filtró y fraccionó en 5 tubos Eppendorf® con 1,0 mL, aproximadamente, del efluente preparado. Se reservó una fracción sin filtrar de muestra. Se almacenaron las fracciones en freezer hasta su posterior análisis de metal total disuelto.

### 7.2.b- Extracción de muestras del efluente a remediar

La metodología de extracción de muestras de las columnas de tratamiento se optimizó durante el transcurso de las experiencias pilotos con el sistema C50 al finalizar la Etapa de Inmovilización Celular con el lavado de la matriz. Se dejaron cargadas las columnas con agua bidestilada y se extrajeron muestras simulando el muestreo correspondiente de la etapa de tratamiento del efluente. Las muestras fueron extraídas desde la base de cada columna de tratamiento por un tubo de vidrio (ver Figura II-1).

Durante el proceso de optimización, en la *Exp\_Piloto\_2-C50*, la extracción de la muestra se realizó con jeringa de 10,0 mL filtrando simultáneamente con membrana de ésteres de celulosa con diámetro de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ . En la *Exp\_Piloto\_3-C50*, se extrajo la muestra con jeringa de 10,0 mL y se filtró posteriormente con membrana de ésteres de celulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro.

Las muestras filtradas se fraccionaron en tubos Eppendorf® y se almacenaron en freezer hasta su posterior análisis de metal total en suspensión. Se reservó una fracción de 3,0 mL de muestra sin filtrar.

### 7.2.c- Ciclos de Biosorción

Se realizaron dos ciclos sucesivos de biosorción de metal por acción de las células bacterianas inmovilizadas en los cubos de espuma de poliuretano manteniendo las condiciones operacionales de trabajo de la Etapa de Inmovilización (temperatura controlada, aireación, homogeneización y esterilidad). En la Figura II-4 se esquematiza la Etapa de Biosorción.

Se inició el primer ciclo de biosorción (Ciclo de Biosorción-1 o Ciclo 1) al llenar la columna del reactor con el Efluente Modelo utilizando la bomba peristáltica a máxima velocidad para la carga de la columna. Una vez alcanzado el volumen de trabajo de cada sistema, se extrajo una muestra a tiempo inicial del efluente modelo a tratar denominada muestra  $t_{01}$ . Transcurridas 24 h, se extrajo la muestra al finalizar el primer ciclo de tratamiento denominada muestra  $t_1$ . Se vació cada reactor y se repitió el procedimiento para el Ciclo de Biosorción-2 (o Ciclo 2), cargando cada columna con el Efluente Modelo y extrayendo las muestras  $t_{02}$  y  $t_2$ , al inicio y al final del ciclo de biosorción respectivamente. El volumen de extracción de las muestras fue de 4,0 mL (en particular para C50), 3,0 mL se reservaron sin filtrar y el volumen restante fue filtrado y fraccionado (y conservando en freezer).

Se descartó el efluente tratado del Ciclo 2 de cada reactor y se extrajo la matriz con las células inmovilizadas.



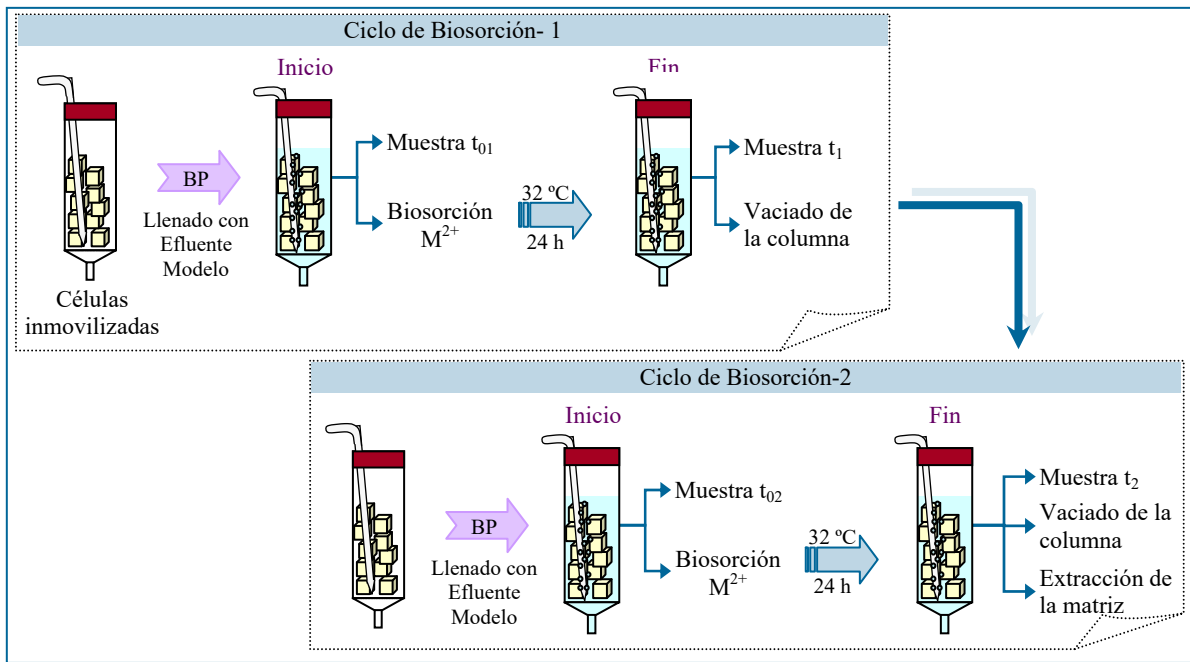


Figura II-4. Esquema de trabajo de los ciclos de biosorción para cada biorreactor diseñado.

Se realizó un control libre de bacterias para cada reactor esterilizando el sistema completo cargado con agua bidestilada. Se realizó un lavado con el agua del reservorio simulando el último lavado de la matriz y se inició la Etapa de Biosorción para el control de biosorción inespecífica del metal en los reactores diseñados.

## 8- Tratamiento de muestras

En la Figura II-5 se encuentra el esquema que resume el procesamiento de las muestras extraídas durante la Etapa de Biosorción para estudiar el funcionamiento de los biorreactores desarrollados.

### 8.1- Biomasa inmovilizada en los reactores

La biomasa inmovilizada en la matriz se determinó por peso seco bacteriano luego de la extracción de la matriz de cada reactor. En primer lugar, se dejó secar en estufa de cultivo (32 °C) el agua retenida en los cubos de espuma tras extraer la matriz de los reactores. Posteriormente, se secó en estufa durante 2 h a 80 °C y se determinó la masa bacteriana inmovilizada en la espuma por diferencia con la masa inicial de matriz de cada reactor:

$$m_{\text{Biomasa Inmovilizada}} (g) = m_{\text{Total}} (g) - m_{\text{Matriz}}$$

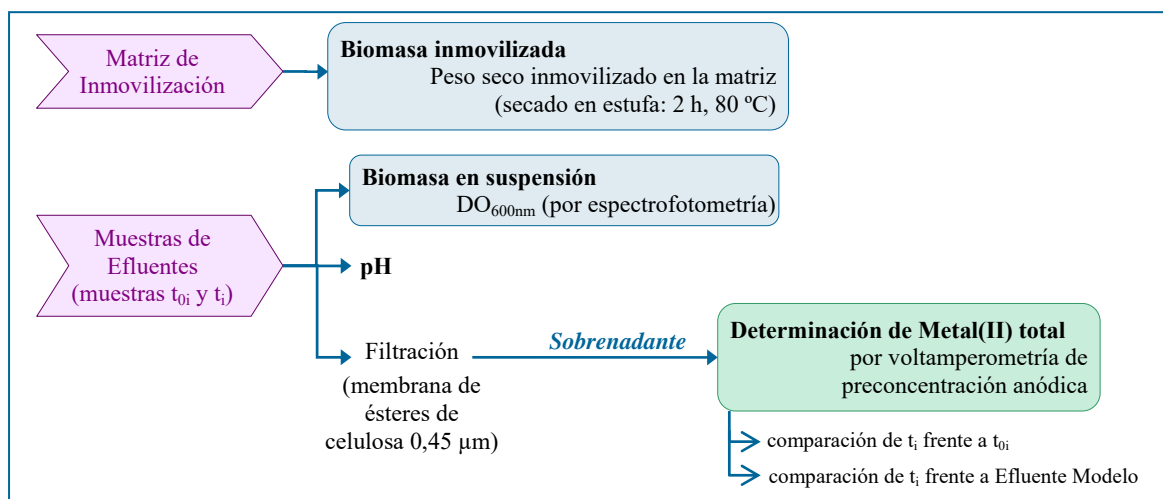


Figura II-5. Esquema del procesamiento de muestras para los reactores desarrollados.

Mientras que la biomasa por unidad de matriz se encontró a partir del cociente entre la masa de la biomasa inmovilizada y la masa de la matriz en cada reactor:

$$m_{Biom. Inmov. / g. Matriz} (g_{Biomasa} / g_{Matriz}) = \frac{m_{Biomasa . Inmovilliz ada} (g)}{m_{Matriz} (g)}$$

## 8.2- Biomasa en suspensión en los ciclo de biosorción

Se midió el pH y la densidad óptica ( $DO_{600nm}$  por espectrofotometría, en espectrofotómetro de doble haz (UV-Visible Perkin-Elmer®)) de cada muestra sin filtrar tanto del Efluente Modelo como de cada muestra  $t_{01}$ ,  $t_1$ ,  $t_{02}$  y  $t_2$  extraídas de los ciclos de biosorción del metal.

Durante la optimización de los reactores desarrollados, se determinó la biomasa en suspensión por peso seco bacteriano (operando los reactores con la matriz de Espuma Mortimer®, el medio de cultivo PcY-0,05%Glucosa y Cd(II) como metal contaminante). Para ello, se secaron membranas de ésteres de celulosa a 80 °C durante 2 h en cajas de petri de vidrio. Se esterilizaron los filtros con la identificación correspondiente a cada membrana. En el caso del reactor C200, se filtró un volumen de 5,0 mL de cada muestra, mientras que para C50 se filtró un volumen de 4,0 mL.

## 8.3- Metal biosorbido

### 8.3.a- Parámetros electroquímicos para la determinación de metal total

La determinación de Cd(II) y Zn(II) se realizó por voltamperometría de preconcentración anódica (*Anodic Stripping Voltammetry, ASV*, utilizando los equipos Autolab PGStat10® (EcoChemie) y polarógrafo estándar Metrohm 663 VA® con

electrodo de gota de mercurio). Se midió el metal total presente en las muestra por comparación de la señal registrada como corriente de pico (en Ampere,  $I_p(A)$ ).

Los parámetros específicos de la metodología electroquímica aplicada fueron:

- electrolito soporte: 15,00 mL  $\text{HNO}_3$   $10^{-2}$  M
- purga:
  - ✓ 120 seg de burbujeo  $\text{N}_{2(g)}$  tras cada agregado realizado
  - ✓ 10 seg de burbujeo  $\text{N}_{2(g)}$  en el duplicado de medición manteniendo la celda sellada
- potencial de preconcentración: -1,1 V
- tiempo de preconcentración: 60 seg
- barrido anódico: desde -1,1 hasta 0,1 V.

### 8.3.b- Concentración del Efluente Modelo

En cuanto a la concentración del Efluente Modelo se trabajó de dos formas diferentes de acuerdo al metal contaminante en estudio en cada tratamiento.

Para los casos de Cd(II), utilizando el medio de cultivo PcY-0,05% Glucosa durante la Etapa de Inmovilización Celular, se trabajó con la concentración teórica del Efluente Modelo preparado (0,5 mM).

Mientras que para las experiencias realizadas con Zn(II) en el Efluente Modelo, se determinó la concentración del metal en el efluente de forma electroquímica por método de agregado patrón (bajo los mismos parámetros de medición descritos en el apartado anterior). Se tomó un volumen de 25,00  $\mu\text{L}$  del Efluente Modelo preparado y se realizaron 5 agregados sucesivos de 10,00  $\mu\text{L}$  de una solución patrón de Zn(II) 100 ppm. Se ajustó el volumen de la celda electroquímica considerando la suma de los volúmenes realizados tras cada agregado. Se halló la concentración de Zn(II) en la celda de medición ( $[Zn]_{\text{Agregado}}$ ) tras cada agregado del patrón a partir de la expresión:

$$[Zn]_{\text{Agregado}} (\text{ppm}) = \frac{100 \text{ ppm} \cdot V_{\text{Agregado} \cdot \text{Patrón} \cdot \text{Zn}} (\text{ml})}{V_{\text{Celda}} (\text{ml})}$$

En la Tabla II-1 se tabularon las concentraciones de Zn(II) tras cada agregado del patrón.

Se midió la corriente de pico ( $I_p(A)$ ) para cada agregado y duplicado de medición. Se graficó  $I_p(A)$  en función de la  $[Zn]_{\text{Agregado}}$  expresada en ppm. A cada valor medido de corriente de pico, se le restó la señal promedio registrada para el electrolito soporte.

| Agregados realizados                    |          | V <sub>Agregado</sub> (mL) | V <sub>Celda</sub> (mL) | [Zn] <sub>Agregado</sub> (ppm) |
|---|----------|----------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| Electrolito soporte (HNO <sub>3</sub> ) |          | 15,00                      | 15,000                  | 0,00000                        |
| Efluente Modelo                         |          | 0,025                      | 15,025                  | (No corresponde)               |
| Patrón Zn(II) 100 ppm                   | 1° 10 µl | 0,010                      | 15,035                  | 0,06651                        |
|   | 2° 10 µl | 0,020                      | 15,045                  | 0,13293                        |
|   | 3° 10 µl | 0,030                      | 15,055                  | 0,19927                        |
|   | 4° 10 µl | 0,040                      | 15,065                  | 0,26552                        |
|   | 5° 10 µl | 0,050                      | 15,075                  | 0,33167                        |

Tabla II-1. Concentración de Zn(II) en la celda de medición tras cada agregado de patrón de Zn(II).

En las condiciones estudiadas, la señal registrada para  $I_p$  se encontró dentro del rango lineal (ver Figura II-6), y a partir de la regresión lineal de la serie de datos registrados (Microsoft Excel®) se obtuvo la relación genérica:

$$I_p (A) = Pendiente[Zn(II)]_{Agregado}(ppm) + Ordenada$$

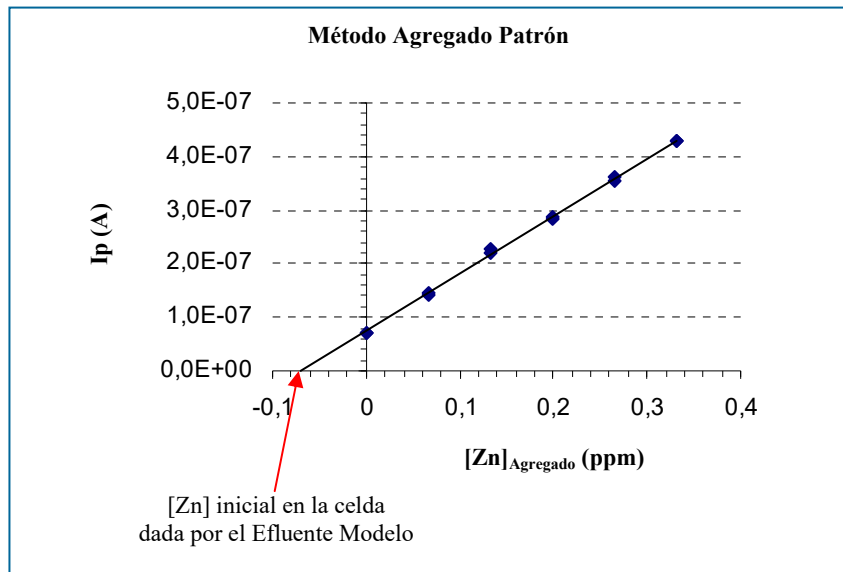
La concentración de Zn(II) en el Efluente Modelo se halló por extrapolación hasta interceptar el eje de la concentración de metal agregado. Analíticamente, se consideró la corriente igual a cero ( $I_p = 0$ ) y se despejó el valor de la concentración de la regresión lineal hallada en el Efluente Modelo en cuestión.

El cálculo de la incertidumbre en la determinación de la concentración de Zn en el efluente se halló considerando:

$$\text{Valor estadístico: } S_{I_p/[Zn]} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n I_{p_i} - I_{p_i}^*}{n - 2}}$$

$$S_{[Zn]_{Ef}} = \frac{S_{I_p/[Zn]}}{Pendiente} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{I}_p^2}{Pendiente^2 \cdot \sum_{i=1}^n ([Zn]_i - [\bar{Zn}])^2}}$$

Siendo:  $n$  el número de agregados realizados del patrón ( $n = 5$ );  $m$  la cantidad de mediciones repetidas ( $m = 2$ );  $I_{p_i}$  las corrientes de pico medidas para cada agregado;  $I_{p_i}^*$  los valores de corrientes ajustados a la regresión lineal;  $[Zn]_i$  la concentración de Zn(II) tras cada agregado de patrón;  $\bar{I}_p$  y  $[\bar{Zn}]$  los promedios correspondientes a la corriente y la concentración de Zn(II) de la curva de agregado patrón.



**Figura II-6. Determinación de la concentración de Zn(II) en el Efluente Modelo a partir del método agregado patrón.** De la regresión lineal hallada para la  $I_p$  (A) en función de la  $[Zn]_{Agregado}$  (ppm), se halló la  $[Zn]_{Efluente\ Modelo}$  (ppm).

### 8.3.c- Concentración de metal total en las columnas de tratamiento (C50 y C200)

En la celda de medición, se realizaron agregados sucesivos de 10,00  $\mu$ L de las muestras extraídas en cada ciclo de biosorción en orden creciente de concentración:

- muestra final del ciclo de biosorción  $i$  (muestra  $t_i$ ),
- muestra a tiempo inicial del ciclo de biosorción  $i$  (muestra  $t_{0i}$ ),
- muestra del Efluente Modelo

Para los Efluentes Modelos preparados con Zn(II), se agregó una alícuota del patrón de 100 ppm del metal como control interno de medición.

Se realizó el promedio de los duplicados de medición para cada agregado realizado.

Las corrientes medidas en orden sucesivo fueron:

- $I_{p1} = I_{p_{Soporte}}$
- $I_{p2} = I_{p1} + I_{p_{Muestra\ t_i}}$
- $I_{p3} = I_{p2} + I_{p_{Muestra\ t_{0i}}}$
- $I_{p4} = I_{p3} + I_{p_{Efluente\ Modelo}}$
- $I_{p5} = I_{p4} + I_{p_{Patrón\ Zn\ 100ppm}}$  (sólo para las experiencias con Zn(II))

Las separaciones de las señales medidas para hallar las corrientes de pico correspondiente a cada agregado fueron:

- $I_{p_{Muestra\ t_i}} = I_{p2} - I_{p_{Soporte}}$
- $I_{p_{Muestra\ t_{0i}}} = I_{p3} - I_{p2}$
- $I_{p_{Efluente\ Modelo}} = I_{p4} - I_{p3}$
- $I_{p_{Patrón\ Zn\ 100ppm}} = I_{p5} - I_{p4}$  (sólo para las experiencias con Zn)

Para hallar el metal biosorbido en los sistemas, se halló la diferencia de señal entre la señal del Efluente Modelo y la señal de cada muestra de las columnas de tratamiento:

$$Ip_{MetalRetenido\ t0i} = Ip_{EfluenteModelo} - Ip_{Muestra\ t0i}$$

$$Ip_{MetalRetenido\ ti} = Ip_{EfluenteModelo} - Ip_{Muestra\ ti}$$

Se calculó el porcentaje de retención al inicio (muestra  $t_{0i}$ ) y al final (muestra  $t_i$ ) de cada ciclo frente a la señal registrada del Efluente Modelo:

$$\%Retención\ t_{0i} = \frac{Ip_{Metal\ Retenido\ t_{0i}} \cdot 100\%}{Ip_{Efluente\ Modelo}}$$

$$\%Retención\ t_i = \frac{Ip_{Metal\ Retenido\ t_i} \cdot 100\%}{Ip_{Efluente\ Modelo}}$$

La cantidad de milimoles (mmol) de metal retenido en las columnas de tratamiento a tiempo inicial de cada ciclo de biosorción:

$$[Metal]_{Biosorbido\ t0i} = \frac{Ip_{Metal\ Retenido\ t_{0i}} \cdot [Metal]_{Efluente\ Modelo}}{Ip_{Efluente\ Modelo}}$$

$$n_{Biosorbido\ t0i} (mmol) = V_{Columna\ Tratamiento} (L) \cdot [Metal]_{Biosorbido\ t0i} (mM)$$

De manera similar se halló la cantidad de metal biosorbido al final de cada ciclo:

$$[Metal]_{Biosorbido\ ti} = \frac{Ip_{Metal\ Retenido\ t_i} \cdot [Metal]_{Efluente\ Modelo}}{Ip_{Efluente\ Modelo}}$$

$$n_{Biosorbido\ ti} (mmol) = V_{Columna\ Tratamiento} (L) \cdot [Metal]_{Biosorbido\ ti} (mM)$$

Para analizar la eficiencia de cada sistema de tratamiento y poder comparar ambas columnas de tratamiento, se halló la cantidad de metal biosorbido por unidad de biomasa inmovilizada por gramo de espuma de poliuretano:

$$n_{M(II)\ Biosorbido\ / (g\ Biom\ .g\ Matriz)}\ t_{0i} (mmol\ / (g\ Biomasa\ / g\ Matriz)) = \frac{n_{Biosorbido\ t_{0i}} (mmol)}{m_{Biom\ .Inmov\ / g\ Matriz}}$$

$$n_{M(II)\ Biosorbido\ / (g\ Biom\ .g\ Matriz)}\ t_i (mmol\ / (g\ Biomasa\ / g\ Matriz)) = \frac{n_{Biosorbido\ t_i} (mmol)}{m_{Biom\ .Inmov\ / g\ Matriz}}$$

En cuanto a la concentración de metal que no fue retenido en los sistemas durante los ciclos de biosorción, se halló la concentración de metal a la salida de cada tratamiento (muestras  $t_i$ ) al finalizar cada ciclo de tratamiento como:

$$[Metal(II)]_i = \frac{Ip_{Muestra\ t_i} \cdot [Metal(II)]_{Efluente\ Modelo}}{Ip_{Efluente\ Modelo}}$$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1- Primeros pasos en el desarrollo de biorreactores

#### 1.1- ¿Operación con Flujo Continuo o Sistema en Lote?

Se estudió la posibilidad de desarrollar biorreactores que funcionaran de forma continua ya sea durante la Etapa de Inmovilización Celular o bien durante la Etapa de Biosorción del metal contaminante. Se diseñó una disposición simple en el armado de las columnas de tratamiento, utilizando una bomba peristáltica para cargar cada sistema de forma continua (alimentación mecánica). Mientras que para la descarga de cada columna, se reguló el efluente por efecto de la presión ejercida por la columna de agua utilizando una pinza Hoffman para cerrar parcialmente el paso por la manguera de descarga (ver Figura II-2 del apartado 3.2 de la Metodología del Capítulo II). La velocidad de la bomba se reguló en 3 de manera de minimizar el tiempo de muestreo y optimizar los sistemas para su funcionamiento con Flujo Continuo. El tiempo promedio de recolección de las muestras de agua fue de 5,5 min con una masa de 5,7 g. En la Tabla II-2 se resumen los resultados hallados para los caudales de carga y de drenaje para los reactores C50 y C200.

Un problema recurrente durante el transcurso de las experiencias realizadas fue la variación del volumen en la columna de agua de los reactores. No se logró estabilizar el volumen de trabajo en las columnas de 50 mL y 200 mL, se hallaron variaciones de volumen durante el muestreo tanto en el mismo día de muestreo como así también en la estabilización de volumen tras 2 días de funcionamiento continuo. Se controló la temperatura ambiente a 25 °C para descartar un posible problema y se utilizó un estabilizador de tensión comercial para reducir fluctuaciones en la tensión.

Se decidió realizar una última prueba preliminar alimentando a la columna C50 con un menor caudal de llenado (velocidad 1 de la bomba peristáltica, con un caudal de llenado de 0,20 g/min). Se registró el volumen de trabajo del reactor en función del tiempo, operando con flujo continuo durante 5 días, manteniendo constantes las condiciones de trabajo, temperatura controlada y tensión eléctrica estabilizada. Al cabo del primer día, el volumen de trabajo en el reactor se estabilizó en 29,0 mL (se trabajó con un volumen intermedio con objeto de poder registrar las fluctuaciones de volumen en el interior de la columna). En el transcurso del segundo día, el volumen varió ligeramente, fluctuando entre 29,0 mL y 28,0 mL durante 11 h de seguimiento en la segunda jornada. Durante el transcurso de la segunda noche de operación en



continuo, el volumen no se mantuvo estable y aumentó a 40,0 mL (volumen registrado al inicio del tercer día de operación). El aumento de 11,0 mL de agua en el interior del reactor durante la segunda noche provocó un aumento del 37,9% del volumen de trabajo en el reactor. En el transcurso del tercer día, el volumen de trabajo disminuyó a 32,0 mL y luego aumentó hasta 37,0 mL al final del tercer día. Al quinto día, el volumen de la columna llegó hasta 55,0 mL, un 89,6% más del volumen establecido el primer día de iniciada la prueba preliminar.

| Cantidad de muestreos<br>(70 gotas cada muestra) |             | Caudal<br>(g/min)            | m <sub>gota</sub><br>(g) | Observaciones y comentarios   |
|--|-------------|------------------------------|--------------------------|---|
| Drenaje de C200                                  | 8 muestreos | Máximo: 1,29<br>Mínimo: 1,20 | 0,082                    | ⚠ <b>Problema:</b> disminuyó el volumen de trabajo durante el transcurso del muestreo   |
|  | 5 muestreos | 1,20                         | 0,082                    |   |
| Carga de C200                                    | 4 muestreos | 1,20                         | 0,081                    |   |
| Drenaje de C50                                   | 8 muestreos | 1,05                         | 0,083                    | ⚡ agitación magnética en la columna<br>⚠ <b>Problema:</b> aumentó el volumen de trabajo durante el muestreo                               |
| Carga de C50                                     | 3 muestreos | 1,07                         | 0,084                    |   |
| Drenaje de C50                                   | 3 muestreos | ---                          | ---                      | ⚡ agitación magnética en la columna<br>⚠ <b>Problema:</b> obstrucción en la purga de aire del reactor, no se reguló a presión atmosférica |
|  | 8 muestreos | 1,02                         | 0,082                    | ⚡ agitación magnética en la columna   |
| Carga de C50                                     | 8 muestreos | 1,03                         | 0,083                    |   |
| Drenaje de C50                                   | 8 muestreos | 1,02                         | 0,081                    | ⚡ sin agitación en la columna<br>⚡ control de la temperatura: T = 25°C, aprox.<br>⚡ estabilización del sistema 48 h                       |
| Carga de C50                                     | 8 muestreos | 1,02                         | 0,083                    | ⚠ <b>Problema:</b> variación del volumen de trabajo durante el muestreo del drenaje (pasó de 57 mL inicialmente a 59 mL a tiempo final)   |

Tabla II-2. Resultados hallados para el flujo de carga (llenado) y el flujo de drenaje (descarga) de las columnas de los reactores para la velocidad 3 de la bomba peristáltica.

A tiempos cortos de trabajo (12 h) fue posible mantener un volumen de trabajo estable en los reactores (alimentando continuamente con la bomba peristáltica y drenando por efecto de la presión de la columna de agua del interior del reactor). Pero no se ha podido extender esta metodología por períodos largos de tiempo debido a que el volumen de trabajo no se ha podido mantener constante a lo largo de varios días consecutivos de operación.

A partir de estos resultados preliminares, se decidió operar los reactores en forma de lote (*batch*).

## 1.2- Optimización de los Sistemas en Lote

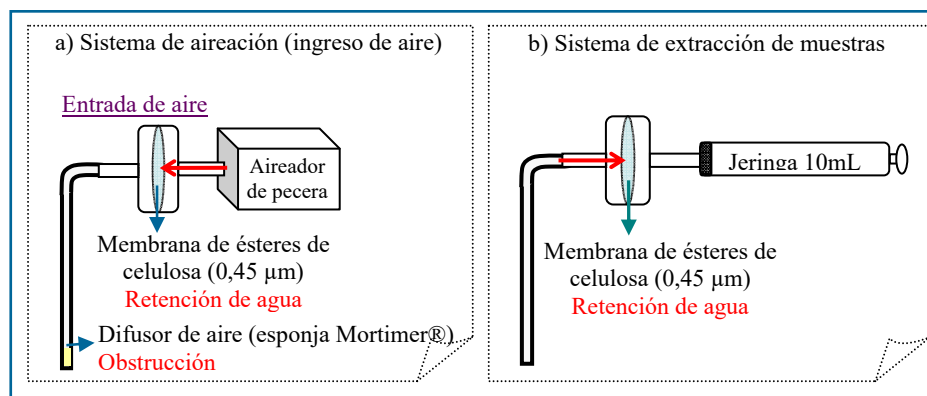
### 1.2.a- Experiencias piloto C50

En la *Exp\_Piloto\_1-C50*, el reactor se inoculó con 0,50 mL de un cultivo inóculo (10% del volumen de trabajo) para optimizar las condiciones de cultivo y desarrollo de la biopelícula sobre la matriz de inmovilización (cubos de Espuma Mortimer®). Se homogeneizó el sistema por agitación magnética y el sistema de aireación consistió en permitir la difusión simple de gases a través de un tapón de algodón.

Al cabo de 10 días de incubación (sin renovación del medio de cultivo), se halló un gradiente de crecimiento bacteriano en función de la disponibilidad de oxígeno disuelto. Incluso, en estas condiciones, se desarrolló *pellicle* en la interfase líquido-aire de aspecto similar a la registrada en cultivos estáticos. La colonización bacteriana sobre la matriz presentó la misma tendencia decreciente en concordancia con la disminución de oxígeno disuelto. Se obtuvo un bajo rendimiento de biomasa inmovilizada, tan solo 0,049 g-biomasa/g-matriz. La baja eficiencia registrada en C50 en cuanto a la homogeneización y aireación impulsó a modificar el sistema de aireación para aumentar la disponibilidad de oxígeno disuelto y mejorar el desarrollo de la biopelícula sobre la matriz.

En *Exp\_Piloto\_2-C50* se incorporó la aireación constante del reactor (mediante el uso de aireador convencional de pecera para impulsar el aire) y una toma para extraer muestras del interior de la columna de tratamiento. Modificando de esta forma el sistema de aireación e incorporando el sistema de extracción de muestras. Se hallaron varios inconvenientes durante el inicio de operación de la experiencia piloto, como puede observarse en la Figura II-7, por lo que el reactor no se inoculó con la cepa bacteriana. En referencia al sistema de aireación, se halló un bloqueo en el ingreso de aire al reactor como consecuencia de dos factores independientes entre sí. Por un lado, la humedad retenida en las membranas de ésteres de celulosa (0,45 µm) impidió el paso de aire debido a que fue insuficiente la presión ejercida por el aireador convencional utilizado. Por otro lado, el difusor de aire (Espuma Mortimer® en el extremo del tubo de ingreso de aire) bloqueó el libre paso de aire al interior la columna tras el proceso de esterilización.

En cuanto al sistema de extracción de muestras propuesto (filtración en simultáneo al extraer la muestra del efluente remediado), se halló el mismo problema de la utilización de membranas de ésteres de celulosa planteado anteriormente. Al extraer la



**Figura II-7. Problemas hallados en la Exp\_Piloto\_2-C50 en los sistemas de aireación y extracción de muestras implementados.**

- a) Sistema de aireación (ingreso de aire). Inconvenientes hallados en el sistema de ingreso de aire luego de esterilizar el reactor.
- b) Sistema de extracción de muestras. Inconveniente hallado en el sistema de extracción de muestras con filtración en simultáneo.

muestra líquida del interior del reactor, se requirió extraer la fracción de aire retenido en los conductos a través de la membrana de ésteres de celulosa humedecida por la esterilización. Por lo tanto, no se pudo extraer la muestra filtrando simultáneamente la fracción líquida.

Para la *Exp\_Piloto\_3-C50* se filtró el aire ingresante al reactor con membranas de teflón (0,45 µm de tamaño de poro) por ser hidrofóbicas y pudiendo esterilizar el aire. En cuanto al sistema de extracción de muestras durante la Etapa de Biosorción, se optó por la extracción de la muestra con la posterior filtración de las fracciones (no se realizaron las operaciones en simultáneo).

### 1.2.c- Exp\_Preliminares-C200

Se diseñaron e implementaron diversos suplementos para la barra agitadora magnética para mantener una agitación eficiente y mejorar la homogeneización del sistema (ver Figura II-3 en el apartado 6 del Capítulo II-Metodología). Los resultados hallados no fueron alentadores a largo plazo debido a la ubicación del agitador magnético provocando:

- baja estabilidad de la barra agitadora en la base inferior de la columna
- aumento de la resistencia a la agitación de la barra con los suplementos de teflón por lo que la velocidad de agitación se debió reducir
- aumento de la resistencia en la agitación al introducir al reactor la base de teflón y el soporte de inmovilización reduciendo más la velocidad de agitación por mayor inestabilidad de la barra agitadora

Resultando ineficiente la agitación magnética en el sistema C200, y descartando esta posibilidad de homogeneización.

Al agregar la aireación constante por el centro del reactor, se generó un movimiento convectivo del líquido en el interior de la columna de tratamiento similar al sistema *air-lift*, garantizando una homogeneización del sistema (ver Figura II-8).

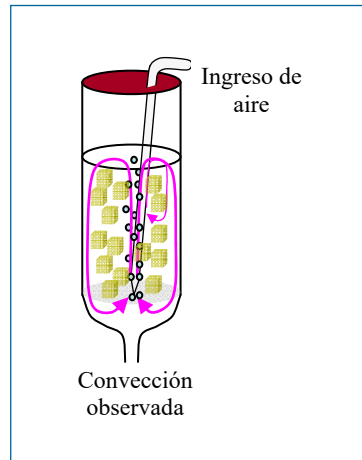


Figura II-8. Movimiento del líquido registrado por efecto del sistema de aireación por el centro de la columna de tratamiento (simulando una homogeneización tipo *air-lift*).

## 2- Funcionamiento de los Biorreactores C50 y C200

### 2.1- Consideraciones metodológicas: Disposición final de los componentes

En la Figura II-9.a se encuentran las imágenes del reactor C200 utilizado detallando cada componente del sistema. En la Figura II-9.b, se encuentra la imagen de ambos reactores en funcionamiento y mantenidos en serie respecto del baño termostatzado.

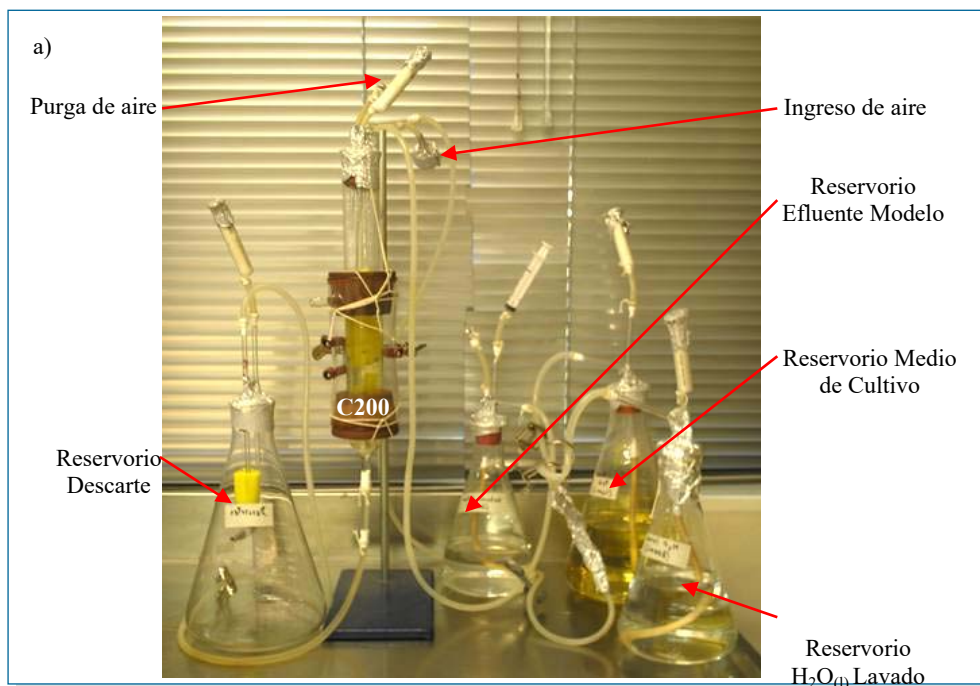
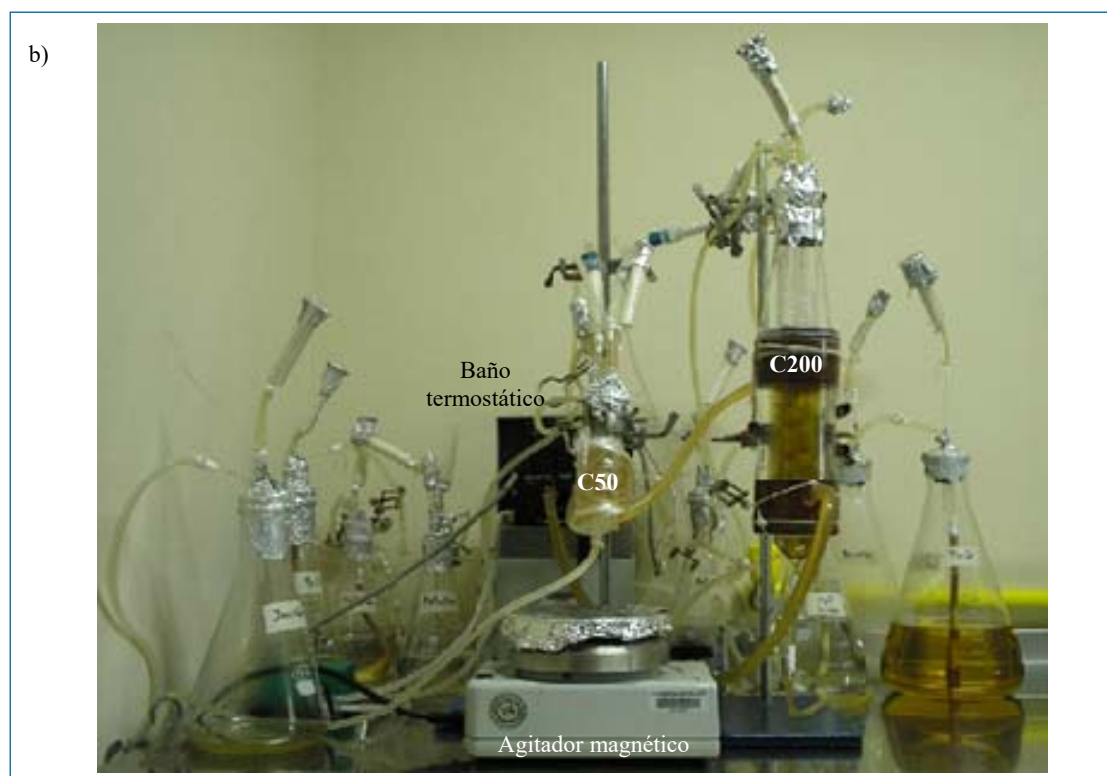


Figura II-9. Fotografía de los biorreactores en funcionamiento durante la Etapa de Inmovilización.  
a) Biorreactor C200



**Figura II-9 -Continuación- Fotografía de los biorreactores en funcionamiento durante la Etapa de Inmovilización.**  
 b) Biorreactores C50 y C200 funcionando en serie respecto del baño termostatizado.

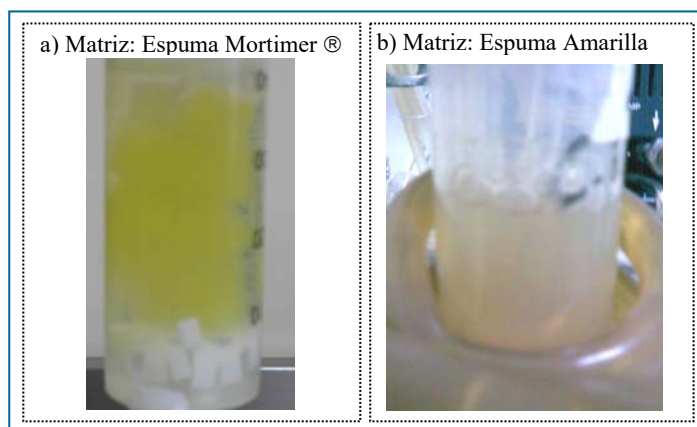
## 2.2- Etapa de Inmovilización Celular

### 2.2.a- Renovación del medio de cultivo

La Etapa de Inmovilización Celular tuvo una extensión variable en tiempo entre las diferentes experiencias realizadas, extendiéndose entre dos y tres meses de duración.

En cuanto al testeo de la matriz de inmovilización y turbidez del cultivo para el reactor C50, se debió apartar el sistema de termostatización de la columna (como podrá observarse en la Figura II-10). Durante la *Exp\_Piloto\_3-C50* se quitó completamente la manguera del baño termostatizado (ver Figura II-10.a), la simple inspección ocular no brindó demasiada información acerca del estado del sistema debido al material opaco de la columna. Se decidió analizar sólo la parte superior de la columna de tratamiento (ver Figura II-10.b) para no alterar la temperatura de trabajo. Se renovó el medio de cultivo a partir del seguimiento del estado del reactor C200.

En la Figura II-11 se registraron diferentes momentos de la Etapa de Inmovilización Celular del reactor C200 en el transcurso de las experiencias realizadas para realizar el seguimiento del crecimiento bacteriano bajos los diferentes medios de cultivos y matrices utilizadas. Como puede observarse en las imágenes, el material de construcción del reactor C200 permitió estudiar la evolución del sistema sin alterar las



**Figura II-10. Etapa de Inmovilización Celular del reactor C50.**

a) Matriz Espuma Mortimer®, *Exp\_Piloto\_3-C50*, y con medio de cultivo PcY-0,05%Glucosa.  
 b) Matriz Espuma Amarilla. Con medio de cultivo PcY-0,05%Glucosa.

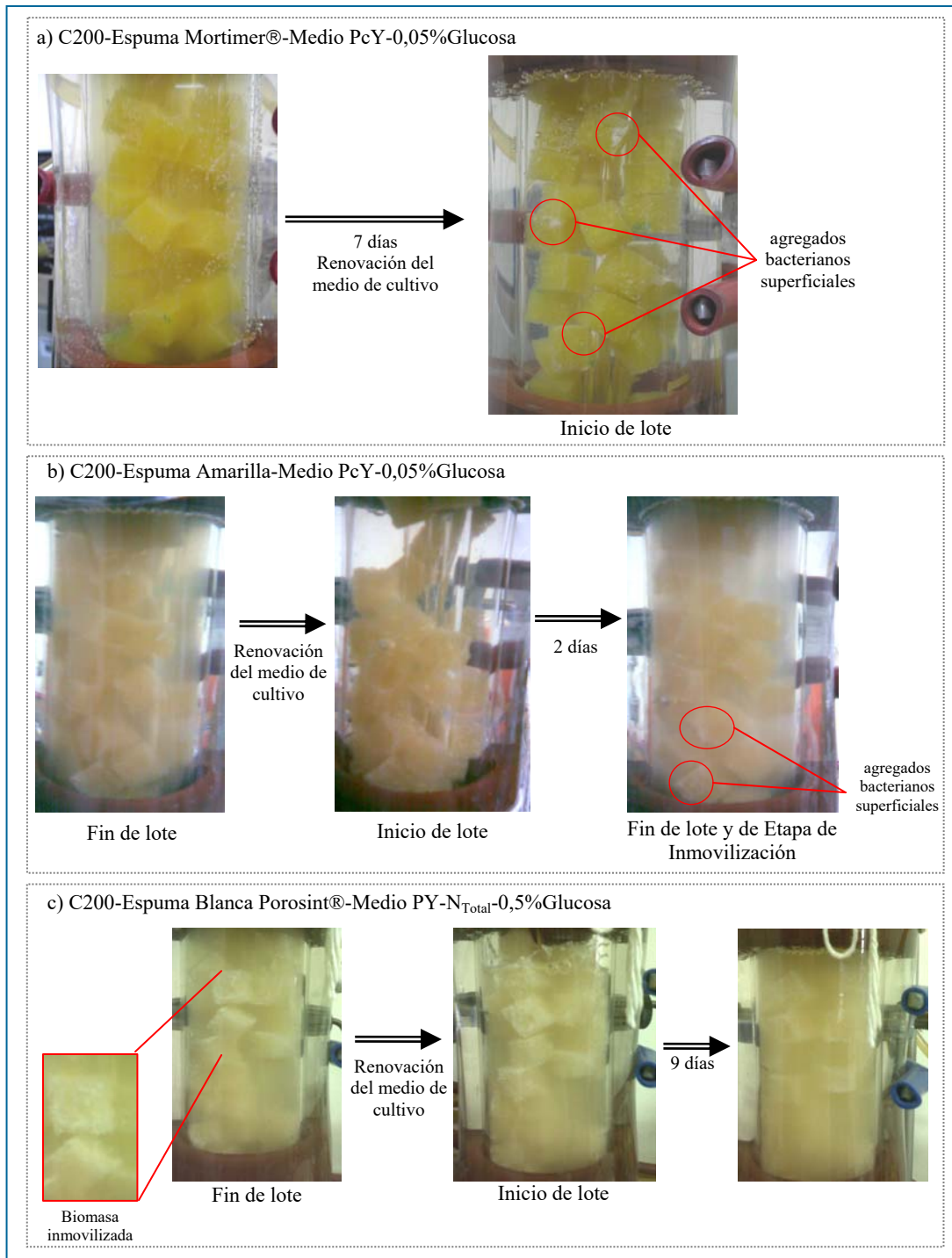
condiciones de trabajo, pudiendo realizar el seguimiento de la estructura de la matriz y la turbidez aparente del cultivo.

Para el caso de la matriz de Espuma Mortimer® se halló, con mayor frecuencia, la formación de agregados de color blanquecino sobre la superficie de los cubos de espuma débilmente adheridos (ver la Figura II-11.a en el inicio de lote de cultivo donde están destacados los agregados superficiales). Como así también, se puede observar el contraste entre la turbidez debida al alto crecimiento planctónico en el lote crecido (imagen de la izquierda) frente al medio con baja densidad óptica aparente tras la renovación por medio de cultivo fresco (imagen de la da, principio de lote de inmovilización). A lo largo del tiempo, incluso se observó el desprendimiento de los agregados superficiales más débilmente adheridos a la espuma de poliuretano quedando libres en el medio líquido circundante. Gracias a dichos desprendimientos, se registró el movimiento de forma descendente por las paredes de la columna de tratamiento al mantener el burbujeo de aire por el centro del reactor, simulando una homogeneización tipo *air-lift*.

Al cambiar la matriz de inmovilización por espumas de mayor porosidad (Espuma Amarilla y Espuma Blanca Porosint®) se observaron la formación de agregados blanquecinos adheridos al entretejido de la espuma a diferencia de la esponja Mortimer® que se registraban más sobre las aristas de los cubos de espuma.

En el caso particular de la Espuma Amarilla (ver Figura II-11.b), se registraron los cambios entre el fin de un lote de crecimiento y el inicio del lote siguiente al renovar por medio de cultivo, destacándose el cambio de turbidez entre el medio agotado y el medio fresco. Dando fin a la Etapa de Inmovilización al cabo de 48 h de acuerdo a la secuencia de imágenes. Mientras que en el caso de la Espuma Blanca Porosint® (ver Figura II-11.c), se muestra la secuencia de imágenes entre el fin de un lote y el inicio





**Figura II-11. Imágenes de la columna C200 durante el transcurso de la Etapa de Inmovilización Celular utilizando diferentes matrices y medios de cultivos.**

- a) C200-Espuma Mortimer®-Medio PcY-0,05%Glucosa.
  - b) C200-Espuma Amarilla-Medio PcY-0,05%Glucosa.
  - c) C200-Espuma Blanca Porosint®-Medio PY-N<sub>Total</sub>-0,5%Glucosa.
- Se han destacado en las imágenes los agregados bacterianos superficiales.

de un lote nuevo de cultivo. Luego de renovar el medio de cultivo, se presentó una alta turbidez inicial del lote y la formación de una biopelícula bacteriana adherida sobre la matriz rodeando la fibra del entramado.

Un aspecto registrado con las matrices de mayor porosidad, fue la renovación del medio de cultivo por medio fresco en el interior de cada cubo de espuma. Se observó que durante la renovación del medio de cultivo en cada lote, los cubos de espuma Mortimer® han retenido líquido. Una vez recargada la columna con medio fresco, la renovación hacia el interior de cada cubo se realizó por difusión simple de los nutrientes. En cambio, para las matrices de mayor porosidad (Espuma Amarilla y Espuma Blanca Porosint®), al desagotar la columna en cada renovación de medio, los cubos de espuma retuvieron menor cantidad de líquido y, tras recargar con medio fresco, los cubos han retenido burbujas de aire en su interior. Registrando así que flotaban los cubos de espuma del extremo superior del reactor al inicio de cada lote como consecuencia del aire retenido (como puede observarse en el inicio de lote de la Figura II-11.b).

A medida que aumentó la biomasa en los reactores, se registró un inicio de lote con mayor turbidez aparente (como puede verse en el caso del medio PY-N<sub>Total</sub>-0,5%Glucosa de la Figura II-11.c). Siendo el aumento de la turbidez aparente inicial una consecuencia directa de la renovación de medio líquido en el interior de cada cubo de espuma más efectiva al aumentar la porosidad de la matriz. Como así también, la maduración de la biopelícula inmovilizada y el desprendimiento de células o agregados celulares unidos más débilmente a la matriz aportaron a aumentar la turbidez inicial del lote.

### **2.2.b- Lavado del sistema**

Al finalizar la Etapa de Inmovilización Celular, las matrices fueron lavadas con agua bidestilada con objeto de arrastrar las células libres de los reactores, realizando tres lavados consecutivos. En cada lavado se observó cierta turbidez como consecuencia del arrastre del cultivo planctónico retenido en los cubos de espuma como así también debido al continuo desprendimiento de células y fragmentos de la biopelícula inmovilizada sobre la espuma. Se consideró suficiente realizar los tres lavados de la matriz a pesar de no haber registrado un agua de lavado límpida y se inició la Etapa de Biosorción.

### **2.2.c- Biomasa inmovilizada sobre la matriz soporte**

Al finalizar la Etapa de Inmovilización Celular, las matrices poliméricas cambiaron tanto su textura como su color a simple vista. En la Figura II-12 se registraron los cambios producidos en dos de las matrices utilizadas como soporte de inmovilización. En el caso de la Espuma Mortimer®, las imágenes fueron adquiridas una vez determinado el peso seco bacteriano inmovilizado (con posterioridad al proceso de



secado). Mientras que en el caso de la Espuma Blanca Porosint®, las imágenes se adquirieron inmediatamente a la extracción de las matrices de las columnas de tratamiento (previo al proceso de secado). Como puede verse en la matriz de C50 en la Figura II-12.c ha quedado adherido, sobre el exterior del cubo, un grumo blanquecino como los señalados anteriormente durante el seguimiento de la Etapa de Inmovilización Celular.

El cambio de color de la matriz fue consecuencia de la biomasa inmovilizada, siendo la biopelícula madura la que caracterizó el color amarronado adquirido por la espuma de poliuretano. En cuanto al proceso de secado de las matrices (2 h a 80 °C) no alteró las propiedades macroscópicas de la matriz utilizada como soporte, dado que las matrices utilizadas como control en todos los casos fueron matrices que habían pasado por el proceso de secado para determinar el peso seco inicial de la matriz.

En la Tabla II-3 se detalla la masa de espuma de poliuretano utilizada junto con la biomasa inmovilizada en diferentes biotratamientos realizados. Como así también, la relación entre masa bacteriana inmovilizada por gramo de matriz utilizada para las experiencias realizadas.

Al comparar las experiencias en las que se utilizó la Espuma Mortimer® como matriz



**Figura II-12. Imágenes de las matrices con la biomasa inmovilizada en Espuma Mortimer® (medio de cultivo PcY-0,05%Glucosa) y en Espuma Blanca Porosint® (PY-N<sub>Total</sub>-0,5%Glucosa) contrastadas con muestras control de cada matriz.**

- a) C50-Espuma Mortimer®. Matriz utilizada en el reactor C50 como soporte de inmovilización, luego de determinar el peso seco bacteriano inmovilizado.
- b) C200-Espuma Mortimer®. Fracción de la matriz utilizada en el reactor C200 (sólo 25 cubos de los 50 que se introducen en el reactor al inicio de las operaciones), luego de determinar el peso seco bacteriano inmovilizado.
- c) C50-Espuma Blanca Porosint®. Matriz utilizada como soporte de inmovilización del reactor C50, previamente al secado de la matriz para determinar el peso seco bacteriano inmovilizado.
- d) C200-Espuma Blanca Porosint®. Fracción de la matriz utilizada como soporte de inmovilización del reactor C200, previamente al secado de la matriz.

| Efluente Modelo  |        | Biorreactor | m <sub>Matriz</sub> (g) | m <sub>Bacteria</sub> (g) | m <sub>Bacteria</sub> /m <sub>Matriz</sub> |
|------------------|--------|-------------|-------------------------|---------------------------|--|
| Espuma Mortimer® | Cd(II) | C200        | 1,397                   | 0,174                     | <b>0,124</b>                               |
|                  |        | C50         | 0,372                   | 0,067                     | <b>0,180</b>                               |
|                  | Zn(II) | C200        | 1,489                   | 0,153                     | <b>0,103</b>                               |
|                  |        | C50         | 0,299                   | 0,044                     | <b>0,147</b>                               |
|                  |        | C200        | 1,492                   | 0,280                     | <b>0,187</b>                               |
|                  |        | C50         | 0,301                   | 0,065                     | <b>0,217</b>                               |
| Espuma Amarilla  | Zn(II) | C200        | 1,260                   | 0,167                     | <b>0,132</b>                               |
|                  |        | C50         | 0,242                   | 0,297                     | <b>1,230</b>                               |
| Espuma Blanca    | Zn(II) | C200        | 1,107                   | 0,158                     | <b>0,143</b>                               |
|                  |        | C50         | 0,215                   | 0,175                     | <b>0,814</b>                               |

**Tabla II-3. Relación entre la biomasa bacteriana inmovilizada por gramo de matriz utilizada en los diferentes tratamientos de Efluentes Modelos de Cd(II) o Zn(II) con medio PcY-0,05%Glucosa para el caso de Espuma Mortimer® y Espuma Amarilla y con el medio PY-N<sub>Total</sub>-0,5%Glucosa para el caso de la Espuma Blanca.**

soporte, la biomasa inmovilizada se incrementó a lo largo de las experiencias realizadas. Por efecto de extender el tiempo dedicado a cada renovación del medio de cultivo y extendiendo por mayor tiempo la Etapa de Inmovilización.

Para los casos de Espuma Amarilla o Espuma Blanca Porosint®, la masa de la matriz inicial fue menor debido a la menor densidad de la espuma consecuente al mayor tamaño de poro con respecto a la Espuma Mortimer®. En la experiencia realizada con la matriz Espuma Amarilla, donde se trató un Efluente Modelo con Zn(II), se halló la mejor cantidad de biomasa inmovilizada para el reactor C50 en cuanto a las diferentes inmovilizaciones realizadas.

Al comparar la biomasa inmovilizada por unidad de matriz, se registraron las mejores relaciones para el biorreactor C50 antes que para C200, determinando mayores eficiencias en la inmovilización en la columna de tratamiento de 50 mL. En el reactor C50, la homogeneización por agitación magnética aumentó la oxigenación de la columna de tratamiento, por un aumento del oxígeno disuelto y aumento de la distribución del mismo, mejorando así el crecimiento bacteriano en el reactor. A diferencia del sistema de homogeneización del reactor C200 que fue únicamente debido al movimiento impuesto por el flujo de aire ascendente.

### 2.3- Etapa de Biosorción

Para los Efluentes Modelos, se seleccionó el pH = 7,5 regulado con el buffer HEPES debido a que se ha registrado a dicho pH la máxima biosorción, tanto de Cd(II) y de Zn(II), por parte de la cepa bacteriana durante los trabajos previos (ver Tabla 8 del apartado 3 de la Introducción de la presente tesis). Se estudió, anteriormente, la biosorción de Cd(II) y Zn(II) (0,5 mM de concentración inicial) por parte de células libres de *P. veronii* 2E hallándose un 50% y 53% de metal biosorbido respectivamente para cada metal (Vullo, 2008).

#### 2.3.a- Concentración de metal en el Efluente Modelo

Como se ha mencionado anteriormente (apartado 8.3.b del Capítulo II-Metodología), se trabajó con la concentración teórica del Efluente Modelo al tratarse de Cd(II) como metal contaminante (0,5 mM), consistentemente con la preparación del Efluente Modelo al inicio de la etapa del biotratamiento. Sólo se consideró el cambio en la señal electroquímica dada entre las muestras, limitando, en estos casos, a hablar del porcentaje de metal retenido en los sistemas.

Para asegurar la cantidad de metal biosorbido en los reactores (expresada como moles de metal retenido por unidad de biomasa inmovilizada, al considerar que el volumen de trabajo del reactor se corresponde al volumen de efluente a remediar) se determinó la concentración de metal en el Efluente Modelo por el método de agregado patrón con la introducción del metal Zn(II) en el trabajo. Para el caso de la experiencia realizada con el soporte de Espuma Amarilla y medio de cultivo PcY-0,05%Glucosa (ver la curva de agregado patrón en la Figura II-6 del Capítulo II-Metodología), la concentración del Efluente Modelo fue 0,6344 mM ( $\pm 1.10^{-4}$  mM). Como puede verse en la Tabla II-4, las concentraciones iniciales de algunos Efluentes Modelos tratados fueron cercanas a la concentración 0,5 mM (concentración teórica). La incertidumbre en la concentración inicial determinada por esta metodología presentó una diferencia entre 3 y 4 órdenes, obteniendo una buena respuesta y determinación de la concentración inicial de metal en el Efluente Modelo.

| Matriz de inmovilización       | [Zn] <sub>Efluente Modelo</sub> (mM) |                   |         |                    |
|--------------------------------|--------------------------------------|-------------------|---------|--------------------|
|                                | C50                                  | C50 Incertidumbre | C200    | C200 Incertidumbre |
| Control Espuma Mortimer®       | 0,4304                               | $1.10^{-4}$       | 0,42352 | $4.10^{-5}$        |
| Esp. Amarilla PcY-0,05%Glucosa | 0,87048                              | $2.10^{-5}$       | 0,6344  | $1.10^{-4}$        |

Tabla II-4. Concentración de Zn(II) en el Efluente Modelo determinada por el método de agregado patrón para el medio de cultivo PcYG-0,05%Glucosa.

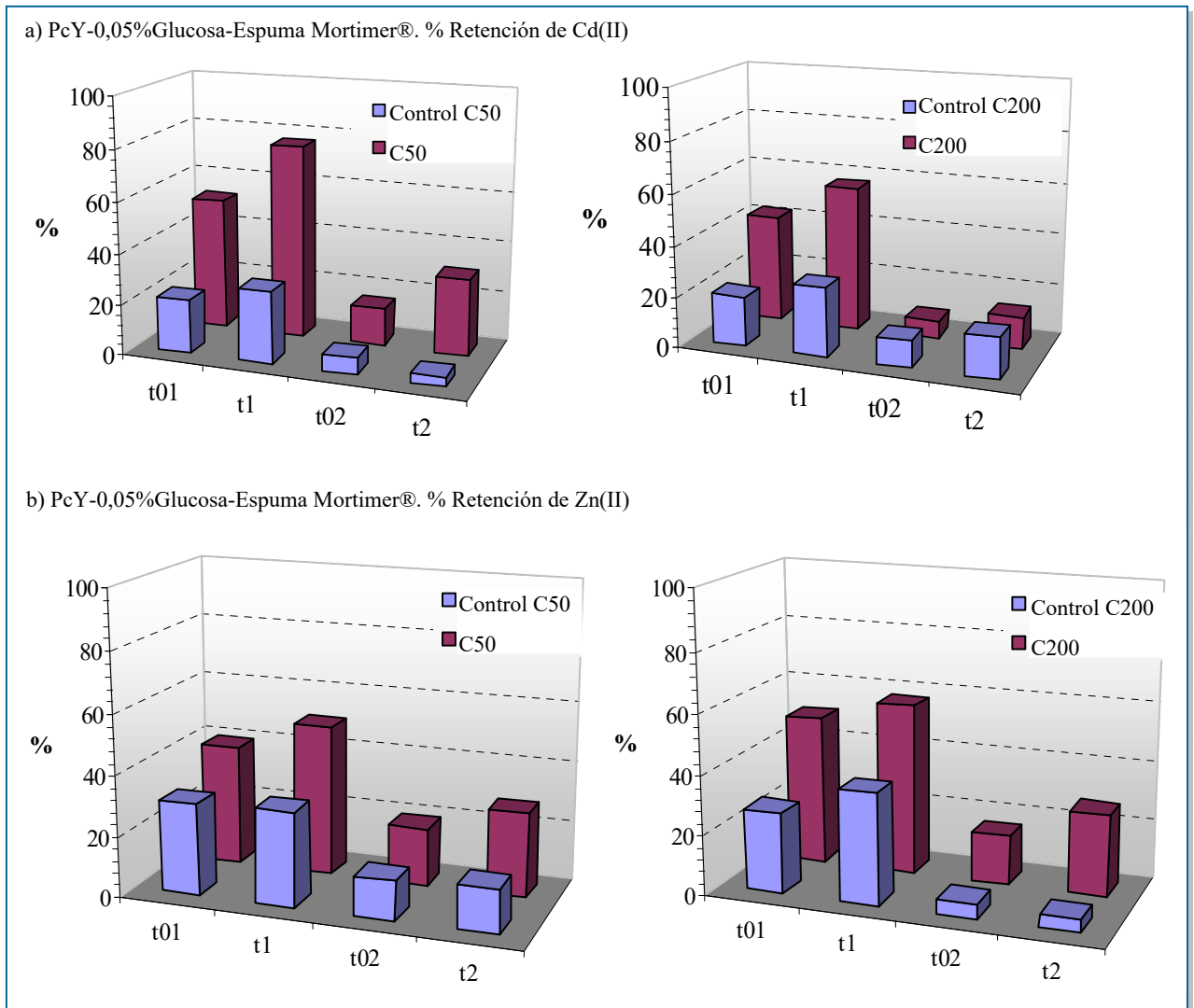
En el caso de C50 relleno con la Espuma Amarilla, se halló el caso de tener la mayor concentración inicial del Efluente Modelo (0,87048 mM, bastante superior a la concentración teórica). Los restantes casos, han dado valores similares a los presentados en la tabla.

### 2.3.b- Metal biosorbido y eficiencia de los reactores

El proceso de biosorción de metales se trata de un mecanismo de cinética rápida que no requiere un metabolismo microbiano activo. En cuanto a la biosorción de metales en las biopelículas desarrolladas por la *P. veronii* 2E, el catión metálico se biosorbió inicialmente sobre la superficie de la biopelícula por interacción con los diferentes componentes que conformaron la matriz de exopolímeros y con los componentes celulares expuestos al efluente. Una vez adsorbido el metal, comenzó el movimiento difusional hacia el interior de la biopelícula, liberando los sitios activos superficiales y posibilitando nuevas adsorciones de cationes presentes en el Efluente Modelo.

Como puede verse en los casos presentados en la Figura II-13, en general, se halló un incremento en la retención del metal al finalizar cada ciclo del biotratamiento tras 24 h de contacto del efluente con la biomasa (muestras  $t_1$  y  $t_2$ , respecto de las muestras a tiempo inicial,  $t_{01}$  y  $t_{02}$ ). No obstante, si se comparan los porcentajes de retención a cada tiempo, el mayor porcentaje de retención de metal se obtuvo a tiempo inicial de cada ciclo de biosorción (muestras  $t_{01}$  y  $t_{02}$ ). Resultando más eficiente el proceso de llenado de las columnas de tratamiento que el ciclo de biosorción por lote propuesto. En particular, para el Ciclo 1 de la experiencia de Cd(II) utilizando espuma Mortimer® como matriz soporte en C50, la concentración de metal disminuyó un 52,2% durante los primeros 10 min de contacto del efluente con la biomasa inmovilizada (llenado de la columna y extracción muestra  $t_{01}$ ). Transcurridas 24 h de contacto (extracción de la muestra  $t_1$ ) se biosorbió un 24,4% adicional de metal del Efluente Modelo biorremediado. La retención de metal hallada en el transcurso del segundo ciclo de biosorción evidenció que los sistemas no se saturaron al finalizar el primer ciclo de tratamiento, sino que fue capaz de continuar reteniendo metal durante la segunda exposición. No obstante, el %Retención de metal en el segundo ciclo fue inferior al %Retención del primer ciclo, resultando ser más eficiente el primer ciclo del biotratamiento.

Durante el llenado de los reactores, el sistema se comportó como si fuera un sistema continuo, en el cual el frente del efluente avanzó a lo largo de la columna de tratamiento forzando la renovación en el interior de cada cubo de matriz. Así se benefició el contacto del medio líquido con la biomasa inmovilizada en el interior de



**Figura II-13. % de Retención de metal (Cd(II) o Zn(II)) para cada muestra extraída de las experiencias realizadas con el medio PcYG-0,05%Glucosa.**

a) PcY-0,05%Glucosa-Espuma Mortimer®. %Retención de Cd(II).  
 b) PcY-0,05%Glucosa-Espuma Mortimer®. % Retención de Zn(II).

cada cubo. Una vez llegado al volumen de trabajo, el movimiento del medio líquido se rigió únicamente por el sistema de homogeneización de los reactores diseñados. Los resultados hallados entre  $t_{0i}$  y  $t_i$  pusieron de manifiesto que el sistema de homogeneización fue poco efectivo hacia el interior de los cubos de espuma de poliuretano en el transcurso de las 24 h de contacto.

Al comparar la retención de metal hallada entre ambos reactores, en general se encontró que la columna C50 presentó mayores porcentajes de retención. Vinculado directamente a la mayor biomasa inmovilizada por gramo de matriz en el reactor C50, resultando en una mayor cantidad de sitios activos para adsorber los cationes metálicos. La agitación magnética de la columna C50 benefició la homogeneización durante la etapa de inmovilización celular y fue uno de los factores determinantes en el aumento de la biomasa inmovilizada.

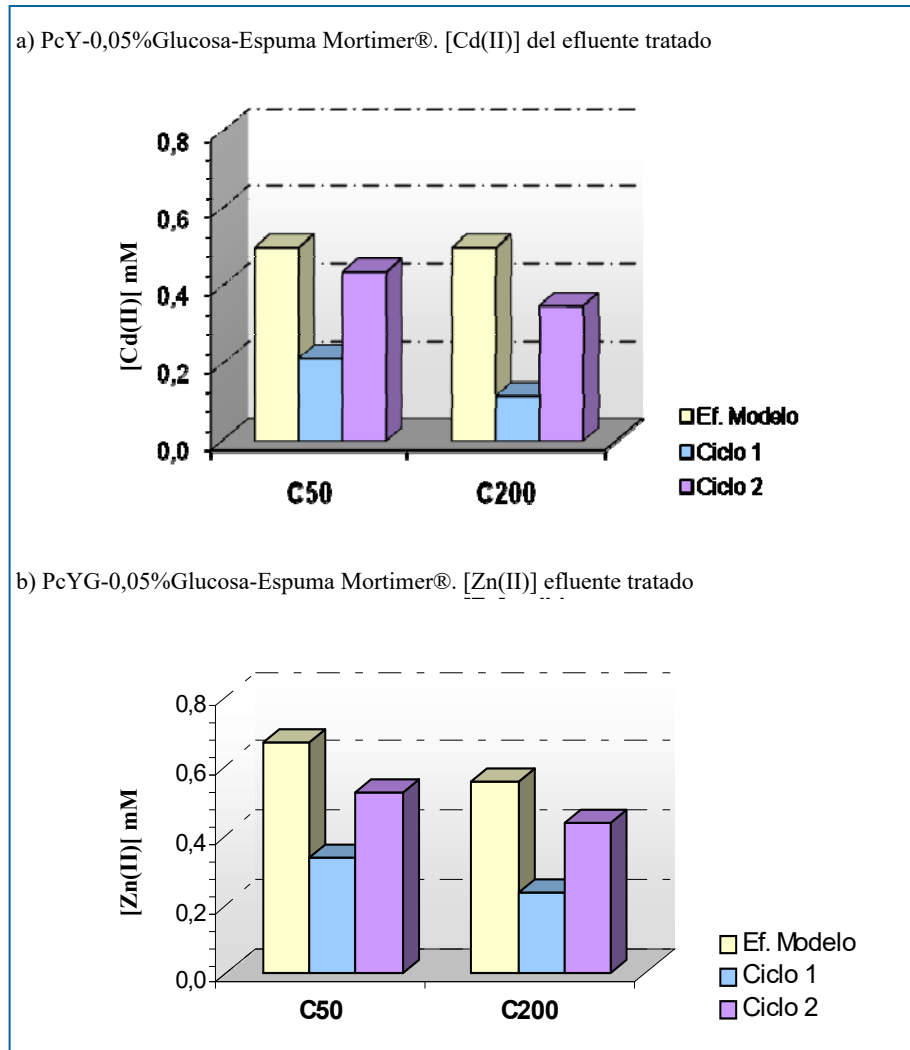
Si se comparan los resultados de C50 hallados en el %Retención para ambos metales biotratados, en el caso del Cd(II) se hallaron mejores %Retención de metal durante el Ciclo 1, siendo mayores a los porcentajes hallados para Zn(II). Como para el Cd(II) no se ha determinado la concentración inicial del efluente, no es posible hacer alguna otra comparación en referencia a la velocidad de retención o incluso comparar si la biopelícula tiene mayor afinidad por alguno de los cationes metálicos.

En referencia a los controles libres de células (o blancos) se halló una disminución de la concentración de metal en cada sistema a tiempo inicial, alcanzando en algunos casos un 30% de cambio con la señal del Efluente Modelo. Si bien en los sistemas no se descarta una adsorción inespecífica de los cationes sobre los diferentes componentes, la disminución de la concentración a tiempo inicial fue debida principalmente al proceso de dilución del efluente por el líquido retenido en los cubos de espuma de poliuretano. Este efecto fue más significativo en las matrices de mayor densidad (menor tamaño de poro), ya sea agua en el inicio del Ciclo 1, o bien efluente remanente en el inicio del Ciclo 2. El efecto de dilución del efluente fue menos marcado para el segundo ciclo ya que las esponjas retuvieron una fracción del efluente con metal tratado durante el transcurso del primer ciclo.

En cuanto a la concentración a la salida del efluente tratado se hallaron concentraciones que sobrepasan los límites de la regulación tanto para Cd(II) como para Zn(II). Como puede observarse en la Figura II-14 donde se graficaron la concentración de los Efluentes Modelos de los casos más importantes y la concentración de metal hallada al finalizar cada ciclo de biosorción realizado.

A grandes rasgos, los porcentajes de retención para Cd(II) y Zn(II) son similares y decaen cerca del 50% al finalizar el primer ciclo de biosorción la concentración de metal. Se destaca el reactor C50 de la Experiencia 1 donde la concentración de Cd(II) decae 77% al finalizar el primer período de retención.

Para los casos descritos en la Figura II-14, se han hallado las eficiencias de cada reactor y se resumen en la Tabla II-5. Cabe destacar, por un lado, que no se ha hallado la concentración real del Efluente Modelo con Cd(II) por medio de la técnica de agregado patrón. Por otro lado, para ambos metales, se ha considerado que el volumen del Efluente Modelo en el interior de los reactores era el volumen de trabajo de cada uno de ellos. Considerando cada componente en el interior de cada reactor (desde los tubos de vidrio de muestreo como el de aireación, como así también la matriz de inmovilización y el efecto de aumento de volumen debida a la aireación existente), el volumen de Efluente Modelo ingresado al interior de cada reactor es menor al volumen de trabajo de cada uno. Por lo descripto, se concluye que los valores hallados de eficiencia de los reactores de la tabla son valores teóricos.



**Figura II-14. Concentración de metal del efluente tratado al finalizar cada ciclo de biosorción.**

a) PcY-0,05%Glucosa-Espuma Mortimer®. [Cd(II)] del efluente tratado.

b) PcYG-0,05%Glucosa-Espuma Mortimer®. [Zn(II)] efluente tratado.

Al comparar las eficiencias halladas, se puede observar que la eficiencia entendida en moles de metal biosorbido por unidad de biomasa inmovilizada por gramo de matriz, para Zn(II) fue mayor que la eficiencia para Cd(II). La diferencia radica en que la concentración del Efluente Modelo para Zn(II) en la mayoría de los casos fue mayor a 0,5 mM, por tanto, la cantidad de metal inicial disponible fue mayor para el caso del Zn(II) ya que se asumió una concentración en Cd(II) igual a la teórica de 0,5 mM.

Otro punto a destacar, concordante con el %Retención hallado, la eficiencia a tiempo  $t_i$  es mayor que la eficiencia en  $t_{0i}$ . Debido a que al finalizar cada Ciclo de Biosorción, la cantidad de metal adsorbido fue mayor que la cantidad de metal biosorbido a tiempo inicial del ciclo.

De igual manera, la eficiencia del Ciclo 1 de biosorción fue mayor que la eficiencia del Ciclo 2, como se discutió anteriormente para el caso del %Retención.



| Biorreactor y Muestra |                 | Eficiencia de los Reactores |        |
|-----------------------|-----------------|-----------------------------|--------|
|                       |                 | Cd(II)                      | Zn(II) |
| C200                  | t <sub>01</sub> | 0,339                       | 0,540  |
|                       | t <sub>1</sub>  | 0,457                       | 0,618  |
|                       | t <sub>02</sub> | 0,057                       | 0,179  |
|                       | t <sub>2</sub>  | 0,101                       | 0,232  |
| C50                   | t <sub>01</sub> | 0,043                       | 0,090  |
|                       | t <sub>1</sub>  | 0,067                       | 0,113  |
|                       | t <sub>02</sub> | 0,011                       | 0,043  |
|                       | t <sub>2</sub>  | 0,037                       | 0,049  |

**Tabla II-5. Eficiencia de los reactores C50 y C200 para los casos de Espuma Mortimer® y medio PcY-0,05%Glucosa.**

Para el caso de Cd(II) se asume una concentración inicial del Efluente Modelo de 0,5 mM. Además, se asume que el volumen de Efluente Modelo para ambos metales coincide con el volumen de trabajo de cada reactor.

Mientras que la eficiencia del reactor C200 fue mayor que la eficiencia del reactor C50. Pudiendo deberse tal resultado a que el reactor C200 presentó un volumen mayor, mayor cantidad de metal inicial disponible para ser biosorbido y mayor biomasa inmovilizada.

Al comparar las eficiencias halladas, se puede observar que la eficiencia entendida en moles de metal biosorbido por unidad de biomasa inmovilizada por gramo de matriz, para Zn(II) fue mayor que la eficiencia para Cd(II). La diferencia radica en que la concentración del Efluente Modelo para Zn(II) en la mayoría de los casos fue mayor a 0,5 mM, por tanto, la cantidad de metal inicial disponible fue mayor para el caso del Zn(II) ya que se asumió una concentración en Cd(II) igual a la teórica de 0,5 mM.

Otro punto a destacar, concordante con el %Retención hallado, la eficiencia a tiempo t<sub>i</sub> es mayor que la eficiencia en t<sub>0j</sub>. Debido a que al finalizar cada Ciclo de Biosorción, la cantidad de metal adsorbido fue mayor que la cantidad de metal biosorbido a tiempo inicial del ciclo.

De igual manera, la eficiencia del Ciclo 1 de biosorción fue mayor que la eficiencia del Ciclo 2, como se discutió anteriormente para el caso del %Retención.

Mientras que la eficiencia del reactor C200 fue mayor que la eficiencia del reactor C50. Pudiendo deberse tal resultado a que el reactor C200 presentó un volumen mayor, mayor cantidad de metal inicial disponible para ser biosorbido y mayor biomasa inmovilizada.

### 2.3.c- Biomasa en suspensión

En las muestras extraídas de cada reactor a lo largo de las experiencias realizadas durante la Etapa de Biosorción se observó que el pH no se modificó en el transcurso del proceso de biorremediación. En todos los casos, el pH registrado con tiras indicadoras fue igual a 7, pH en el cual se había regulado la solución amortiguadora inicialmente (buffer HEPES), concordante con el hecho que el Efluente Modelo fue preparado libre de nutrientes necesarios para mantener un metabolismo celular activo capaz de modificar el pH.

Para la determinación de la biomasa bacteriana en suspensión por peso seco (a partir de la experiencia con el medio PcY-0,05%Glucosa-Cd(II)), la masa bacteriana suspendida en el volumen de efluente filtrado fue despreciable frente a la masa de cada membrana de ésteres de celulosa y frente a la masa de la tara seleccionada (caja de petri de vidrio). La biomasa en suspensión estuvo por debajo del límite de detección de pesada, siendo no adecuada la metodología implementada. Para la columna C50, se garantizó un volumen de extracción de muestra de la columna por debajo del 10% del volumen de trabajo del reactor. El aumento del volumen de muestreo a tiempo inicial de cada ciclo perturbaría las condiciones de trabajo, descartando la posibilidad de determinar el peso seco en suspensión y reduciendo el análisis al seguimiento de la densidad óptica aparente ( $DO_{600nm}$ ) del efluente.

Para las restantes experiencias realizadas, se detallan los valores de  $DO_{600nm}$  de cada muestra extraída de los biotratamientos en la Tabla II-6. En cuanto a la biomasa en suspensión, al comparar los ciclos de biotratamiento entre sí, se registró, en general, mayor turbidez en el Ciclo 1 de biosorción debido al arrastre de células desprendidas luego del lavado de la matriz con agua. Por otro lado, también se halló, en general, mayor turbidez presente en el reactor C50 como consecuencia de la mayor biomasa inmovilizada en el sistema en relación, siendo mayor el desprendimiento de células de las biopelículas en dichos casos.

Con el medio PcY-0,05%Glucosa se registró una biopelícula más estable al introducir el Efluente Modelo a biorremediar, hallándose una baja turbidez del medio líquido tras el proceso de biosorción. Se registró una disminución del desprendimiento de células al incorporar el Efluente Modelo a tratar, posiblemente debido a la estabilización de la biopelícula con los iones presentes en el efluente.

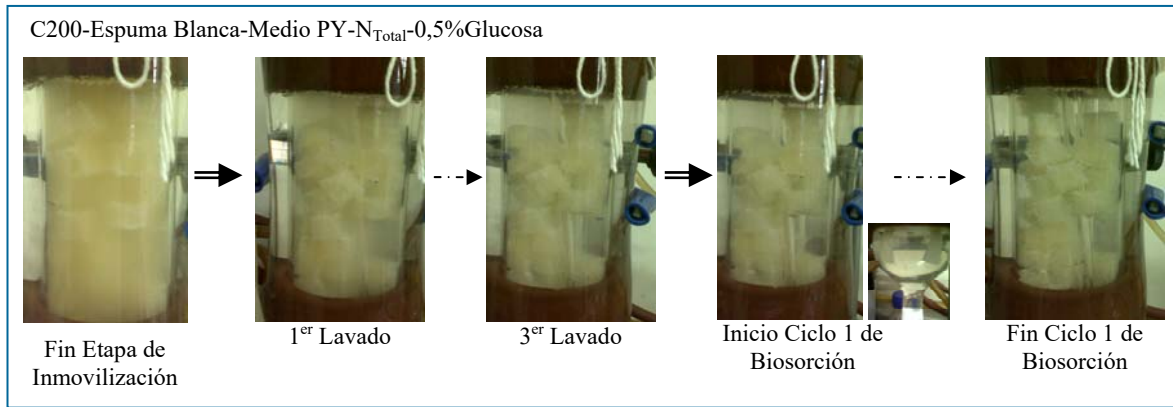
En cuanto a los medios M9-0,5%Glucosa-Fe(II) y PY- $N_{Total}$ -0,5%Glucosa, se ha registrado mayor turbidez del efluente tratado debido a continuos desprendimientos de la biomasa. La biopelícula desarrollada con dichos medios estuvo más débilmente adherida a la matriz de inmovilización respecto de la biopelícula desarrollada con el medio con peptona de caseína. La erosión continua de la biomasa inmovilizada con el

| Biorreactor y Muestra |                 | Espuma Mortimer® - PcY-<br>0,05%Glucosa |        |                 | Esp. Amarilla -<br>PcY-<br>0,05%Glucosa -<br>Zn(II) | Esp Blanca<br>Porosint®-<br>M9-<br>0,5%Glucosa-<br>Fe – Zn(II) | Esp Blanca<br>Porosint®-<br>PY-N <sub>Total</sub> -<br>0,5%Glucosa –<br>Zn(II) |
|-----------------------|-----------------|---|--------|-----------------|---|--|--|
|                       |                 | Cd(II)                                  | Zn(II) | Zn(II)          |   |  |  |
| C200                  | t <sub>01</sub> | 0,008                                   | 0,039  | 0,030           | 0,024   | 0,060  | 0,081  |
|                       | t <sub>1</sub>  | 0,035                                   | 0,030  | 0,017           | 0,078   | 0,076  | 0,081  |
|                       | t <sub>02</sub> | 0,009                                   | 0,010  | 0,013           | 0,028   | 0,050  | 0,038  |
|                       | t <sub>2</sub>  | 0,002                                   | 0,016  | 0,032           | 0,025   | 0,100  | 0,246  |
| C50                   | t <sub>01</sub> | 0,128                                   | 0,046  | 0,090           | 0,077   | 0,200  | 0,627  |
|                       | t <sub>1</sub>  | 0,100                                   | 0,050  | 0,006           | 0,058   | 0,273  | 0,706  |
|                       | t <sub>02</sub> | 0,038                                   | 0,007  | 0,015           | 0,031   | 0,159  | 0,295  |
|                       | t <sub>2</sub>  | 0,004                                   | 0,010  | (No detectable) | 0,017   | 0,198  | 0,280  |

Tabla II-6. Biomasa en suspensión (DO<sub>600nm</sub>) de cada muestra extraída en los ciclos de biosorción.

consecuente desprendimiento continuo de células reduce la eficiencia de los biorreactores, dado que aumentaría los costos del tratamiento posterior del efluente para reducir la carga bacteriana liberada al efluente biotratado. En la Figura II-15 se registró el estado del reactor C200 tras haber sido inmovilizada la cepa bacteriana con el medio PY-N<sub>Total</sub>-0,5%Glucosa, el estado de las aguas de lavado y la turbidez registrada en el transcurso del primer ciclo de biosorción de Zn(II). Evidenciando el desprendimiento de agregados celulares y células libres en el sistema de biotratamiento desarrollado. Con el medio PcYG-0,05%Glucosa no se registró este desprendimiento, por el contrario, una vez introducido el Efluente Modelo se registró la estabilización de la biopelícula con una baja erosión de la biopelícula y una baja densidad óptica aparente.

Por tal motivo, se decidió no analizar la cantidad de metal biosorbido en los tratamientos con los medios M9-0,5%Glucosa-Fe(II) ni PY-N<sub>Total</sub>-0,5%Glucosa ya que la biosorción de metal no sólo era debido a la biopelícula inmovilizada, sino que también era debida por la gran cantidad de biomasa en suspensión.



**Figura II-15. Biomasa en suspensión durante el lavado del biorreactor C200 y en el transcurso del Ciclo 1 de Biosorción para las condiciones Espuma Blanca Porosint®-Medio PY-N<sub>Total</sub>-0,5%Glucosa.**

## INTEGRACIÓN FINAL

### 1- La dura tarea de desarrollar biorreactores: Optimización de parámetros

Los microorganismos juegan un rol vital en el ciclo biogeoquímico de muchos metales y ayudan a remediar el ambiente. De hecho, hay varios reportes en bibliografía en el cual se utilizan bacterias para la remediación de metales tóxicos. Cepas bacterianas tales como *Pseudomonas putida*, *Klebsiella variicola*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella entérica*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* y *Escherichia coli* constituyen algunos ejemplos de microorganismos utilizados para la detoxificación de metales (Costa, 2017; Pani, 2017). Los sistemas de tratamiento del agua y aguas residuales se han utilizado con biopelículas desde principios del siglo pasado. Y la remoción de metales tóxicos presentes en solución acuosa por la adsorción mediada por biopelículas ha sido estudiada para una vasta selección de metales y microorganismos (Costa, 2017). En la Tabla II-7 se detallan algunos casos de aplicaciones de biopelículas en tratamientos de biorremediación ambiental para algunos metales (Costa, 2017).

| Metal contaminante      | Microorganismo                                    |
|-------------------------|---|
| Cr(III)                 | <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> |
| Cr(VI), Cd(II), Fe(III) | <i>Escherichia coli</i>                           |
| Ni(II)                  | <i>Pseudomonas putida</i>                         |
| Zn(II)                  | <i>Pseudomonas putida</i>                         |
| Cu(II), Zn(II), Cd(II)  | Barros activados                                  |
| Cu(II), Zn(II), Cd(II)  | <i>Pseudomonas sp.</i>                            |

Tabla II-7. Aplicaciones de sistemas de remediación ambiental de metales con biopelículas (Costa, 2017).

Comparado con los sistemas con células libres, los biorreactores con células inmovilizadas muestran mejores resultados, por un lado por las mayores productividades logradas por la alta densidad celular. Como así también, pueden ser operados por mayores tiempos, en general, por su estabilidad (Hadjiev, 2007).

Los reactores de biopelículas para reducir la carga de contaminantes de efluentes, constituyen aplicaciones comunes de las tecnologías en biorremediación. En particular, para el caso de metales tóxicos, pueden adsorber los iones metálicos y, eventualmente, modificar su especiación (Costa, 2017). Las cepas *Pseudomonas sp.*

son ampliamente utilizados en sistemas de biorremediación. Microorganismos fijados en medios porosos pueden ser utilizados como un potencial candidato para el tratamiento de grandes cantidades de efluentes contaminados, particularmente con  $Zn^{2+}$  (Majumder, 2016).

En particular, en este trabajo se han diseñado y optimizado dos biorreactores de volumen de trabajo de 50 mL y 200 mL inmovilizando la cepa *P. veronii* 2E, siendo las características generales de los reactores:

- forma de columna: ingreso del medio de cultivo y del efluente a remediar por el extremo superior de la columna de tratamiento y salida de residuos por el extremo inferior (medio de cultivo con biomasa no inmovilizada o efluente tratado), siendo C50 de material plástico y C200 de vidrio (con camisa de recirculación externa)
- lecho fijo: células bacterianas inmovilizadas sobre cubos de espuma de poliuretano de 1 cm de arista y efluente a tratar en fase líquida
- funcionamiento en lote y en esterilidad durante todo el tiempo de trabajo
- temperatura controlada a 32 °C (a través de baño de recirculación externa)
- aireación constante (con aireador convencional de pecera), esterilización del aire por filtración con membrana de teflón de 0,45  $\mu m$  de diámetro de poro
- homogeneización únicamente por flujo de aire ascendente en el caso de C200 y en C50 una combinación entre flujo de aire provisto por la aireación constante y agitación magnética

Los mismos fueron operados en dos etapas de trabajo, siendo la primer etapa la de mayor duración temporal (entre 2 y 3 meses de extensión) y donde se inmovilizó la *P. veronii* 2E por desarrollo de biopelícula sobre el soporte inerte de poliuretano. La segunda etapa, donde se trató un Efluente Modelo contaminado con 0,5 mM Cd(II) o con Zn(II) cuya extensión fue de 48 h totales de biotratamiento (dos ciclos sucesivos de 24 h cada uno).

Es frecuente hallar en la bibliografía reactores con sistemas operados bajo flujo continuo (Pani, 2017; Martinov, 2010; Goeres, 2009). No obstante, durante el período de diseño de los biorreactores, en el que se ha contado con una única bomba peristáltica y la forma de columna sin rebalse lateral, se ha impedido su operacionalidad en flujo continuo debido a la imposibilidad de mantener un volumen constante de trabajo. Razón por la cual se ha seleccionado la operación en lote. No se ha analizado el funcionamiento por recirculación del efluente, pudiendo ser una forma de trabajar a futuro.

Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que conforman a la biopelícula consisten en polisacáridos y mucopolisacáridos con varios grupos funcionales

ionizables con carga negativa (como fosfatos, carboxilatos, aminos y grupos hidróxidos) que pueden interactuar y formar complejos con los cationes metálicos, favoreciendo los procesos de adsorción y precipitación (Pani, 2017; Yang, S., 2013).

La arquitectura que adquiere la biopelícula depende de varios factores, tales como la disponibilidad de nutrientes, propiedades de la superficie y de la interfase, la composición de la comunidad microbiana y las fuerzas de corte (cizallamiento). (Costa, 2017).

## 2- Funcionamiento de los biorreactores

En cuanto al funcionamiento de los biorreactores, se encontró que ambos reactores han podido ser operados exitosamente durante las dos etapas de trabajo desarrolladas. Sea para la Etapa de Inmovilización Celular sobre el soporte inerte seleccionado y sea para la etapa del biotratamiento de los Efluentes Modelos preparados.

En el trabajo de Martinov (Marnitov, 2010), si bien utilizan un material fibroso como relleno de un reactor, hallaron que el aumento de la viscosidad del medio favorece la coalescencia de las burbujas de aire y promueve la generación de pequeñas burbujas. En esta tesis, a medida que aumentó el tiempo de cultivo durante la Etapa de Inmovilización, aumentó la cantidad de productos metabólicos liberados durante cada ciclo de renovación de medio y se registró un cambio en el burbujeo de aire de manera consistente a lo hallado por Marnitov (Marnitov, 2010). Por otro lado, se registró la formación de espuma por arriba del límite del líquido, aumentando así el volumen de trabajo por efecto del burbujeo constante. No se han agregado antiespumantes para no alterar el desarrollo de la biopelícula sobre la matriz de inmovilización.

En las técnicas desarrolladas de biorremediación por biosorción se ha hallado que dependen del pH de la solución, el biosorbente, la concentración inicial del ión metálico, el tiempo de contacto y la temperatura (Majmder, 2016). Siendo el control del pH importante en estos sistemas dado que debido a los sitios de intercambio iónico (Volesky, 2007), en medios cuya concentración de protones sea alta (bajo valores de pH), los sitios activos cargados negativamente se protonan y dejan de ser funcionales para adsorber cationes metálicos. En los sistemas en cuestión, se ha mantenido el pH con el buffer HEPES debido a que en los trabajos anteriores, *P. veronii* 2E ha biosorbido mayor cantidad de metal de soluciones acuosas a pH = 7,5 (ver Tabla 8 de la Introducción; Vullo, 2008).



### **3- ¿La porosidad de la matriz de inmovilización influye en la biomasa inmovilizada?**

Numerosos estudios muestran que el crecimiento de las biopelículas en medios porosos resulta en decrecimiento de la porosidad, velocidad de flujo y conductividad hidráulica (Yang, S., 2013). Concordante con lo hallado, a mayor porosidad de la espuma de poliuretano, mayor biomasa inmovilizada se ha hallado.

### **4- ¿El tipo de medio de cultivo impacta en el tipo de biopelícula formada sobre espuma de poliuretano?**

Las características fisicoquímicas de las biopelículas depende de la densidad celular crítica específica, del estado y la tasa de crecimiento celular y de las condiciones hidrodinámicas del medio (Costa, 2017). Como se ha visto en el Capítulo I, la composición del medio de cultivo impacta en la biopelícula inmovilizada sobre el soporte, en particular, sobre la matriz vidrio. En el caso de la matriz de espuma de poliuretano, se ha hallado con los medios de cultivo PY-N<sub>Total</sub>-0,5%Glucosa y M9-0,5%Glucosa-Fe(II) un desprendimiento constante de la biopelícula por efecto de la erosión continua provocada por el flujo de aire ascendente y el movimiento del medio líquido durante la Etapa de Biosorción. Dicho desprendimiento se evidenció en la DO<sub>600nm</sub> registrada a cada tiempo de muestreo en dicha etapa de trabajo. Como consecuencia de esto, los costos del proceso de biorremediación se elevan debido a la necesidad de filtrar el efluente biotratado para eliminar la biomasa en suspensión tras el desprendimiento celular. Al diagramar el escalado del proceso a escalas industriales, esto impactaría negativamente en el proceso de biorremediación, por lo que los medios antes mencionados no podrían considerarse para el desarrollo de biorreactores rellenos con espuma de poliuretano según el armado de los reactores desarrollados en esta tesis.

De los tres medios de cultivos ensayados, sólo con el medio PcY-0,05%Glucosa se llegó a una biopelícula estable frente al Efluente Modelo dado el bajo desprendimiento celular registrado en las experiencias realizadas con dicho medio.

Por otro lado, sobre las paredes de vidrio de C200 en contacto continuo con el medio de cultivo no se ha registrado un desarrollo de biopelícula observable a simple vista durante la Etapa de Inmovilización. Mientras que en la región sumergida por la presencia de espuma durante le Etapa de Inmovilización, se ha registrada la presencia de grandes agregados celulares en C200 (material de vidrio) observables a simple vista. De desarrollarse biorreactores rellenos con vidrio en vez de espumas de poliuretano, podría considerarse un reactor bañado con una lluvia o spray del medio

de cultivo antes que desarrollar un sistema en lote sumergido completamente en líquido.

### 5- ¿Fueron eficientes los reactores desarrollados?

En Majumder (Majumder, 2016), si bien se planteó un sistema de biofiltración por la cepa *Klebsiella pneumoniae* crecida sobre partículas de carbón, se halló el porcentaje de remoción como:

$$\text{Porcentaje}_{\text{remoción}} = \frac{M_0 - M_t}{M_0} 100$$

Donde  $M_0$  es la concentración inicial a tiempo 0 y  $M_t$  es la concentración final de metal determinado por espectrometría de absorción atómica. De manera similar a la hallada en la presente tesis pero con otra metodología de determinación de metal total.

A partir de los resultados hallados en la presente tesis, se puede ver que en ambos reactores se ha biosorbido metal de los Efluentes Modelos ensayados en ambos ciclos de biosorción planteados y es concordante con otros trabajos bibliográficos, la manera de hallar el %Remoción del metal por el biotratamiento implementado. En referencia a los %Remoción de metal, se ha hallado mayores %Retención para Zn(II) antes que para Cd(II). No obstante, la falta de la determinación por el método de agregado patrón de la concentración inicial del Efluente Modelo para Cd(II), no es posible determinar qué metal se biosorbe con mayor facilidad por la biomasa inmovilizada.

En cuanto a la Etapa de Biosorción desarrollada, la biosorción del Ciclo 2 fue menor que la biosorción del Ciclo 1. Indicando que los reactores no se han saturado al cabo de las primeras 24 h de tratamiento del efluente. Comparando con lo hallado para células libres de *P. veronii* 2E (ver Tabla 8 de la Introducción; Vullo, 2008), los reactores desarrollados han biosorbido una menor cantidad de metal (Cd(II) o Zn(II)) al descontar la caída de concentración de los controles. Por lo que deben mejorarse los reactores desarrollados.

En relación, se halló mayor porcentaje de retención de metal durante el llenado de las columnas de tratamiento (muestras  $t_{0i}$ ) antes que durante el transcurso de las 24 h de exposición del Efluente Modelo a la biomasa inmovilizada (muestras  $t_i$ ). Por lo que fue más eficiente el tiempo de carga del efluente antes que el ciclo de biotratamiento. Puede atribuirse este hecho a que durante la carga de cada columna de tratamiento, el líquido avanzaba sobre la matriz con las células inmovilizadas simulando un sistema de flujo continuo. Durante dicho momento, fue más efectivo el contacto del efluente con la biomasa inmovilizada capaz de biosorber metal del medio líquido. Mientras que durante el transcurso de las 24 h de cada ciclo, si bien cada reactor era homogeneizado, hacia el interior de cada cubo de espuma de poliuretano, el

movimiento del metal se realizó por difusión simple a través del medio líquido y hacia el interior de la biopelícula desarrollada.

En el trabajo de Pani (Pani, 2017) se desarrolló un biorreactor relleno con cáscara de pepino como soporte de inmovilización de la cepa *Pseudomonas veteli* en un sistema de recirculación de un efluente artificial de concentración 2.000 mg/L de Zn y de Mn (equivalente a 30,58 mM para Zn en especial). El sustrato de inmovilización, de origen biológico, tuvo una capacidad de retención de metal de 575 mg/L (8,79 mM) de Zn, en el transcurso de 25 minutos de recirculación del efluente artificial. Mientras que con la biomasa inmovilizada sobre el soporte, la retención total de metal se incrementó a 699 mg/L (10,7 mM), siendo 124 mg/L (1,90 mM) lo retenido por la biopelícula desarrollada en dicho período de tiempo.

Si comparamos estos resultados, con lo retenido a tiempo inicial en cada ciclo de biotratamiento (comparando sistemas de flujo del efluente), podemos apreciar que la caída en la concentración de Zn(II) para el caso de PcYG-0,05%Glucosa-Espuma\_Mortimer® pasó de una concentración inicial de 0,550 mM a 0,234 mM para C200 en  $t_{01}$  y de 0,662 mM a 0,330 mM para C50 en  $t_{01}$ . Se registró entonces una caída de la concentración total de 0,317 mM y 0,332 mM respectivamente para cada sistema, sumando el aporte de la biosorción por la biopelícula junto al aporte de caída de concentración debido al control (todo lo biosorbido inespecíficamente por cada sistema y por dilución del efluente debido al agua retenida por la espuma de poliuretano).

## **6- ¿La concentración de los efluentes tratados cumple con la normativa vigente para su descarga?**

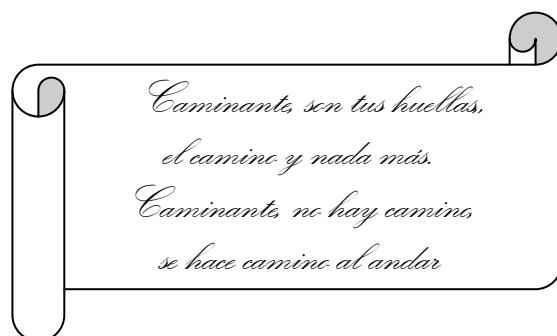
De acuerdo a la normativa vigente para la Provincia de Buenos Aires (ver Tabla 3.b de la Introducción de la presente tesis) los límites de descarga en colectora cloacal es 0,5 mg/L (0,0044 mM) para Cd(II) y 5,0 mg/L (0,076 mM) para Zn(II). Mientras que si la descarga se realiza en un conducto pluvial o cuerpo de agua superficial, los límites son de 0,1 mg/L (0,00089 mM) y 2,0 mg/L (0,030 mM), respectivamente.

En esta primera experiencia piloto, los Efluentes Modelos tratados con los reactores desarrollados (considerando las diferentes matrices y medios de cultivos ensayados) no cumplieron con los límites impuestos por la normativa presente. Resta entonces, ajustar el funcionamiento de los reactores para la mejora en sus eficiencias.



# CONCLUSIONES





## CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis doctoral se planteó trabajar sobre dos aspectos principales en torno a la cepa autóctona *Pseudomonas veronii* 2E. La selección de dicho microorganismo se fundó en que es capaz de adherirse por desarrollo de biopelículas a diferentes superficies y es capaz de biosorber metales de soluciones acuosas. A partir de dichas características se plantearon los objetivos generales de estudiar la cinética de colonización superficial de la cepa bacteriana sobre vidrio (seleccionando una superficie plana para facilitar el estudio como lo son los cubreobjetos). Y el desarrollo de biorreactores con la cepa inmovilizada sobre espuma de poliuretano para biosorber Cd(II) o Zn(II) de efluentes acuosos artificiales contaminados.

### 1- Desarrollo de biopelículas sobre vidrio

En referencia al estudio de la cinética de colonización bacteriana sobre vidrio se hallaron las mejores condiciones para el desarrollo de las biopelículas sobre vidrio:

- ☞ Siembra Directa o Siembra por Suspensión: el tipo de siembra influye en la colonización superficial del cubreobjeto, siendo la mejor opción la Siembra por Suspensión para los medios complejos, debido a que se disgregan los grumos formados por la cepa bacteriana aumentando el número de células libres iniciales capaces de colonizar la superficie. Si bien se halló un mejor cubrimiento para el medio salino M9-0,5%Glucosa con Siembra Directa, se seleccionó el tipo de siembra por suspensiones debido a los desarrollos de biopelículas de mayor espesor y complejidad con los medios PcY-0,05%Glucosa (y diluciones PcYG-1/2 y PcYG-1/4).
- ☞ naturaleza de la fuente de carbono: la calidad de la fuente de carbono influyó en el tapiz desarrollado, siendo la glucosa la mejor fuente para los medios complejos (PcY y PY) y el succinato para el medio mínimo (M9).
- ☞ concentración de la fuente de carbono: la mejor concentración fue 0,5 %m/V, tanto para los medios complejos como para el medio mínimo. La formulación original para los medios complejos era inicialmente 0,05 %m/V, mientras que para el medio salino era 0,5 %m/V. El aumento en la concentración de la fuente de carbono en los medios complejos favoreció el desarrollo de las biopelículas; mientras que en el medio mínimo, la variación de la concentración de la fuente de



carbono desbalanceó la proporción de nutrientes impactando negativamente en la colonización superficial

∞ naturaleza de fuente de nitrógeno en los medios complejos: la peptona de carne fue la fuente de nitrógeno favoreció la cobertura antes que la peptona de caseína utilizando la glucosa como fuente de carbono (tanto en concentración 0,05 %m/V como 0,5 %m/V)

∞ presencia de Fe(II): en los medios complejos, se oxida rápidamente y disminuye el pH del medio, ha beneficiado la colonización superficial a corto tiempo ( $t_1 = 7$  h), luego la película madura y se desprende, por lo que a largo tiempo ha afectado a la colonización. Mientras que en el medio M9, queda biodisponible en solución y favorece la colonización superficial con la glucosa como fuente de carbono (0,5 %m/V).

∞ temperatura de incubación: la temperatura de 32 °C favoreció la colonización del vidrio antes que la temperatura de 28 °C.

∞ tipo de medio de cultivo: con los medios complejos (fuente de nitrógeno orgánico) se hallaron arquitecturas más complejas, microcolonias densas, de mayor espesor, con presencia de pilares en forma de hongos (mushrooms) separados por canales gobernados por monocapas bacterianas. En general, se hallaron películas más rugosas y con mayores valores de DF. En los medios mínimos salinos (fuente de nitrógeno inorgánico) se encontró una biopelícula de apariencia de monocapa celular salpicada por pequeñas microcolonias dispersas por la superficie. En general, se hallaron películas más homogéneas, de menor rugosidad y menores valores de DF

∞ para un mejor análisis de la estructura y cuantificación de biopelículas sobre vidrio es necesario complementar diferentes técnicas de análisis.

## 2- Diseño de biorreactores para el tratamiento de efluentes con Cd y Zn

En referencia al desarrollo de los biorreactores, se han podido desarrollar y optimizar parámetros de funcionamiento de dos reactores de características:

∞ C50 de 50 mL de volumen de trabajo y C200 de 200 mL de volumen final de trabajo, siendo C50 de material plástico y C200 de vidrio (con camisa de recirculación externa)

∞ forma de columna: ingreso del medio de cultivo y del efluente a remediar por el extremo superior de la columna de tratamiento y salida de residuos por el extremo inferior

∞ lecho fijo: células bacterianas de la cepa *P. veronii* 2E inmovilizadas sobre cubos de espuma de poliuretano de 1 cm de arista (espuma Mortimer®, Espuma

Amarilla, y Espuma Blanca Porosint® de diferentes porosidades) y efluente a tratar en fase líquida

- ∞ funcionamiento en lote y en esterilidad durante todo el proceso
- ∞ temperatura controlada a 32 °C (a través de baño de recirculación externa)
- ∞ aireación constante (con aireador convencional de pecera), esterilización del aire por filtración con membrana de teflón de 0,45 µm
- ∞ homogeneización únicamente por flujo de aire ascendente en el caso de C200 y en C50 una combinación entre flujo de aire provisto por la aireación constante y agitación magnética
- ∞ medios de cultivos utilizados en la Etapa de Inmovilización Celular: PcY-0,05%Glucosa, M9-0,5%Glucosa-Fe(II) y PY-NTotal-0,5%Glucosa-Fe(II)
- ∞ efluente a remediar artificial: agua bidestilada, pH=7,5 (solución reguladora, HEPES) y 0,5 mM de Cd(II) o Zn(II)

En cuanto a las experiencias de funcionamiento desarrolladas se halló:

- ∞ a mayor porosidad de la espuma de poliuretano, se halló mayor biomasa inmovilizada por gramo de matriz
- ∞ el mejor medio de cultivo para la etapa de inmovilización fue el medio PcY-0,05%Glucosa dado que generó una biopelícula más estable al momento de biotratar el Efluente Modelo (se erosionó poco la biopelícula desarrollada). Mientras que con los restantes medios de cultivo (M9-0,5%Glucosa-Fe(II) y PY-NTotal-0,5%Glucosa), se halló una alta erosión, generando altos valores de  $DO_{600nm}$  provocando que el efluente biotratado presente una alta carga bacteriana suspendida haciendo más costoso el tratamiento de biorremediación debido a la consecuencia de tener que filtrar el efluente biotratado.
- ∞ en relación, se retiene mayor cantidad de metal durante la carga de las columnas antes que el tiempo que dura cada ciclo de biosorción (contacto de 24 h entre el efluente tratado y la biomasa inmovilizada).
- ∞ no se satura el sistema durante el Ciclo 1 de biosorción, durante el Ciclo 2 se continua adsorbiendo metal sobre la biomasa
- ∞ la eficiencia teórica es mayor para los casos de remediación de Zn(II) antes que de Cd(II), y el reactor C200 presenta una mayor eficiencia teórica antes que C50
- ∞ los Efluentes Modelos tratados aún no cumplen con los límites de descarga impuestos por la normativa de la Provincia de Buenos Aires.



# PERSPECTIVAS A FUTURO





## PERSPECTIVAS A FUTURO

Con el trabajo desarrollado se han abierto varias líneas para continuar con los estudios a futuro.

Por un lado, profundizar en el análisis de imágenes e introducirnos en el programa ImageJ® (software libre y ampliamente utilizado en el estudio de biopelículas) y comparar los resultados con lo hallado con el programa desarrollado en MATLAB®. La idea es poder analizar las imágenes por microscopía de campo claro, tanto con el programa MATLAB® como con el ImageJ®, para adquirir valores característicos de las biopelículas. Como así también, analizar con microscopía confocal los mejores cubrimientos hallados sobre vidrio.

Por otro lado, avanzar con el desarrollo y optimización de biorreactores. Probar como material soporte de inmovilización vidrio (vidrio molido) y acortar los tiempos de inmovilización celular, utilizando el medio PY-N<sub>Total</sub>-0,5%Glucosa en un sistema que introduzca el medio de cultivo en forma de espray.

En el último año se ha adquirido un biorreactor de 3,0 L de volumen de trabajo, por lo que se podría escalar el trabajo desarrollado hasta el momento. Se iniciarán las actividades de funcionamiento y optimización de parámetros para el desarrollo de la biopelícula de *Pseudomonas veronii* 2E sobre el soporte de espuma de poliuretano en el reactor mencionado.

Por último, remediar efluentes industriales provenientes de una galvanoplastia con los reactores que se desarrollen.



# ANEXOS







## A. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE “2E”

De acuerdo a la identificación molecular por la técnica de secuenciación de 500 pares de bases del gen que codifica al 16S rRNA, la cepa “2E” se identificó como *Pseudomonas veronii*, presentando un 0,10% de diferenciación genética (ver Figura A-1) de acuerdo con el banco de datos de Midi Labs.

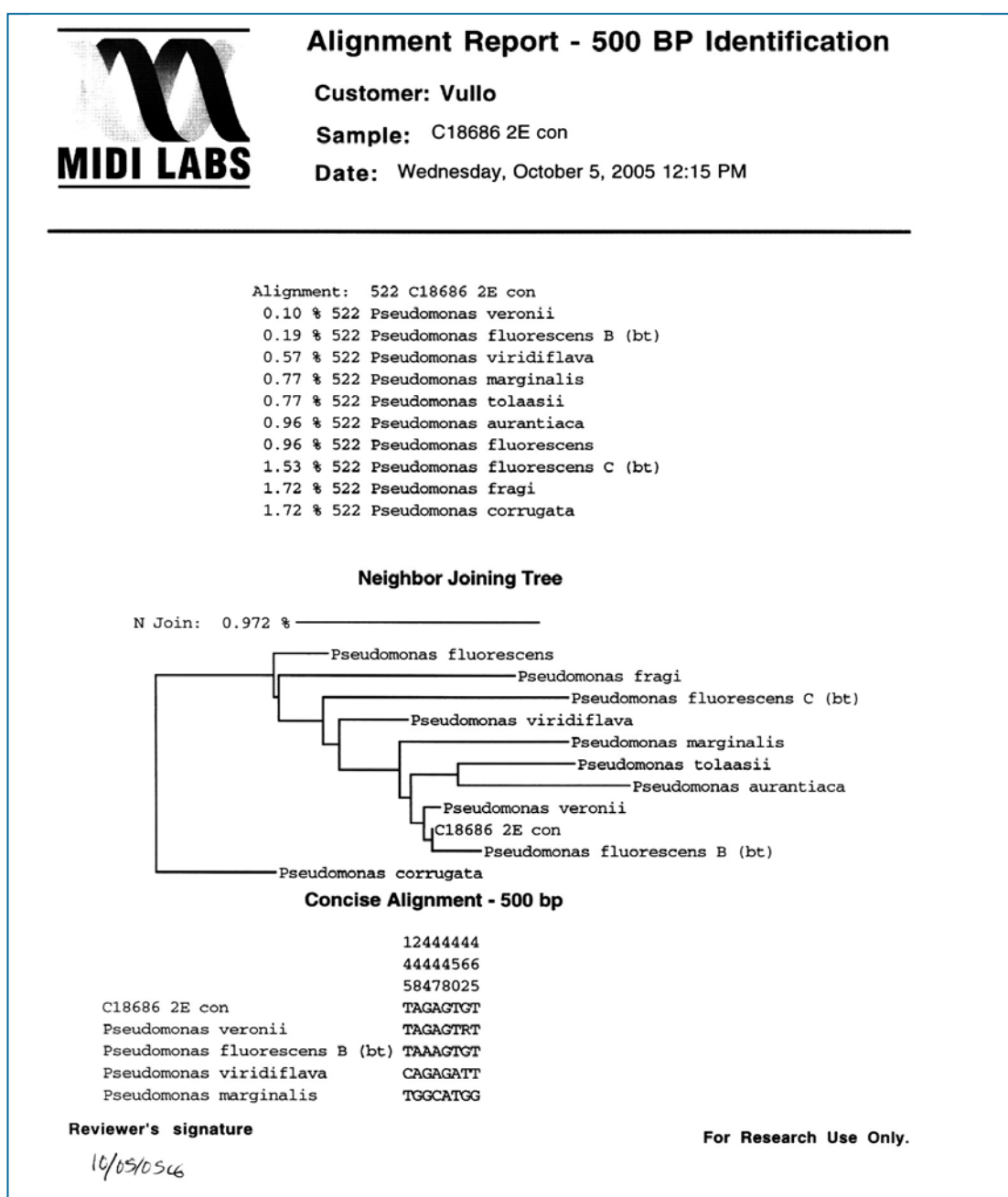


Figura A-1. Identificación molecular de 2E.

## B. VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE *Pseudomonas veronii* 2E

Se realizó un cultivo (100 mL) en lote por duplicado de la cepa bacteriana utilizando el medio complejo, PcY-0,05%Glucosa. Se extrajeron muestras a cada hora durante las primeras 8 horas de crecimiento celular hasta llegar al principio de la fase de latencia celular (o fase estacionaria).

En el gráfico de la Figura D-1 se encuentran los valores de  $DO_{600nm}$  medidos en espectrofotómetro UV-Visible Perkin-Elmer en función del tiempo, hallándose una velocidad de crecimiento igual a  $0,428 \text{ h}^{-1}$ .

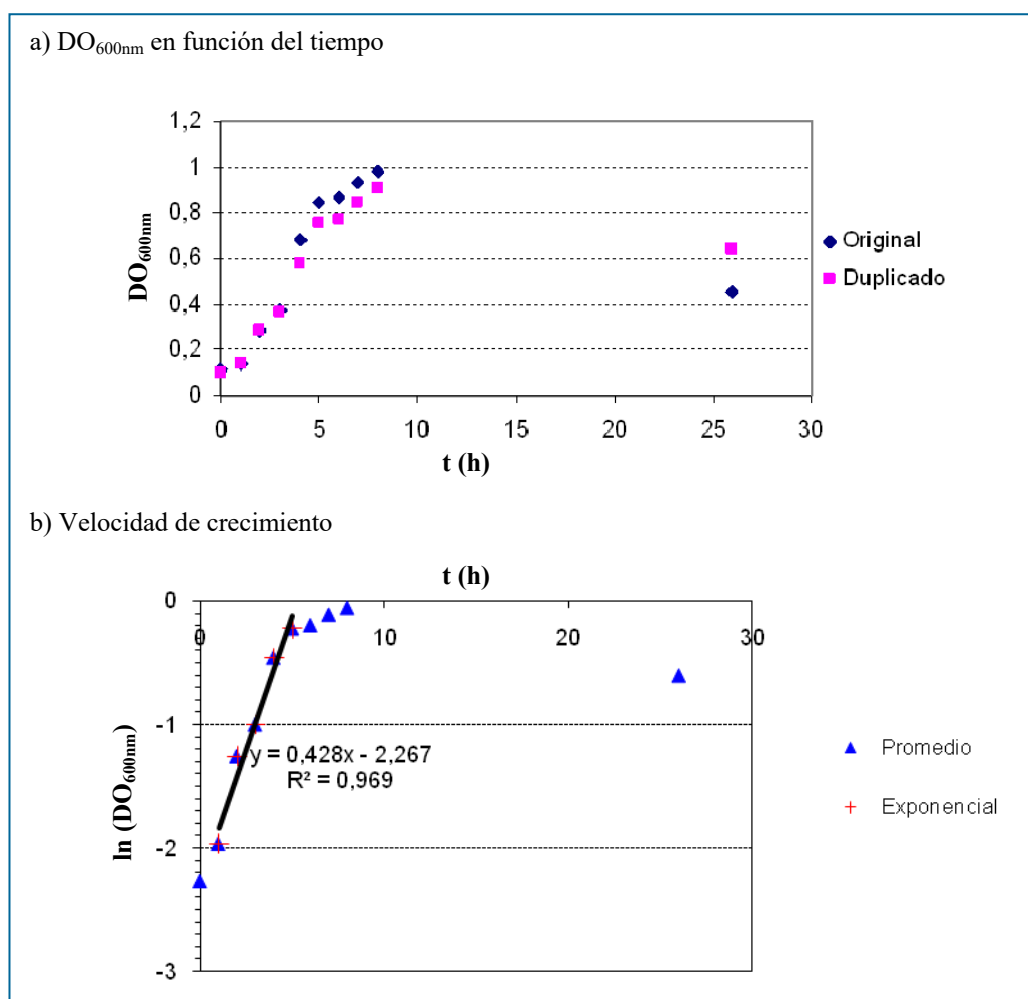


Figura B-1. Curva de crecimiento de *Pseudomonas veronii* 2E a  $32 \text{ }^{\circ}\text{C}$  en PcY-0,05%Glucosa.

a)  $DO_{600nm}$  en función del tiempo.

b) Velocidad de crecimiento.

## C.MACROESTRUCTURA DE LAS BIOPELÍCULAS - ANÁLISIS DIGITAL DE LAS IMÁGENES ESCANEADAS

### 1- Descripción del programa

El procesamiento de las imágenes digitales se realizó con un programa automatizado utilizando el programa MATLAB® (MATLAB r2009b, The Mathworks Inc.) desarrollado por el doctorando Lic. Santiago Doyle.

Las imágenes se capturaron por transmitancia, la muestra fue iluminada con la luz incidente del escáner (luz incidente,  $T_0$ ) y el detector registró la luz transmitida al atravesar la muestra (luz transmitida,  $T$ ). Se considera las imágenes digitales como matrices bidimensionales, ver Figura C-1.

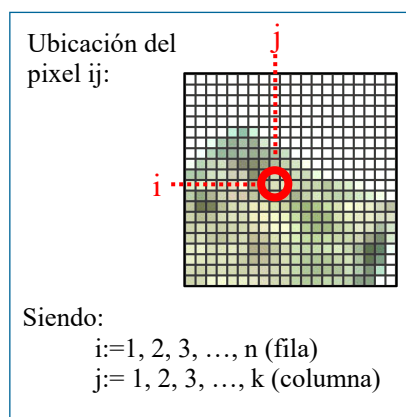


Figura C-1. La imagen bidimensional como una matriz.

El programa desarrollado consta de tres módulos diferentes:

- 1) Segmentación (localización de cada cubreobjeto sobre la cuadrícula escaneada – plantilla-)

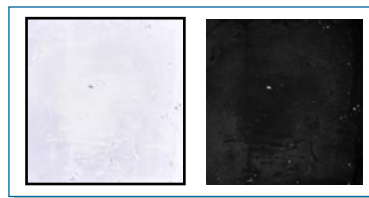
La lista de las imágenes escaneadas para ser analizadas se ingresó a partir de una planilla Excel®. Dicha planilla compiló la información necesaria de cada muestra de cubreobjeto (nombre del archivo de imagen, localización de la muestra de cubreobjeto -fila y columna de la cuadrícula-, número de triplicado y condiciones de cultivo). El programa localizó cada muestra en la plantilla a partir de un proceso de umbralización (por un valor fijo, en negro se observa la base de la placa de escaneo), se recortó el área de cada cubreobjeto al ubicar los extremos superior izquierdo e inferior derecho (ver Figura C-2).

- 2) Estimación de la abundancia de la biopelícula en cada pixel



**Figura C-2. Ubicación de los cubreobjetos en la planilla de escaneo por umbralización y segmentación.**

La imagen de cada cubreobjeto se transfiere a escala de grises, se calcula el negativo del logaritmo del nivel de gris de cada pixel obteniendo una imagen cuya intensidad de color es proporcional a la cantidad de bacterias que hay en cada pixel del cubreobjeto. Para hallar las áreas con presencia de bacterias, se generó una imagen binaria por umbralización a partir de las intensidades de color registrada en los triplicados de los controles (ver Figura C-3).



**Figura C-3. Imagen binaria para hallar el área cubierta por umbralización utilizando la intensidad de color de los controles como umbral.**

A partir de la Ley de Lambert-Beer se tiene que (1):

$$-\log_{10} \left( \frac{T}{T_0} \right) = \varepsilon cl$$

Siendo,  $T$  la luz transmitida,  $T_0$  la luz incidente en la muestra,  $\varepsilon$  la constante de absorptividad característica del CV,  $c$  la concentración de CV y  $l$  la altura de la biopelícula. A mayor espesor de la biopelícula, menor será la luz transmitida siendo mayor luz absorbida por la muestra. En el pixel<sub>ij</sub>, quedará (2):

$$\left( -\log T_{ij} + \log T_0 \right) = \varepsilon cl_{ij}$$

Considerando que la cantidad de colorante CV en cada pixel es constante y siendo  $s$  el área del pixel, la cantidad de colorante en el pixel,  $d_{ij}$ , será (3):

$$d_{ij} = scl_{ij}$$

Combinando las ecuaciones anteriores (2 y 3), al igualar el producto de la concentración por el espesor de la película en el pixel<sub>ij</sub> ( $cl_{ij}$ ), se tiene que la cantidad de colorante en el pixel será (4):

$$d_{ij} = \frac{S}{\varepsilon} \left( -\log T_{ij} + \log T_0 \right)$$

Sumando la cantidad de colorante para todos los píxeles de la imagen, se tiene que la cantidad total de colorante,  $D_T$ , será (5):

$$D_T = \frac{S}{\varepsilon} \sum_i \sum_j \left( -\log T_{ij} + \log T_0 \right)$$

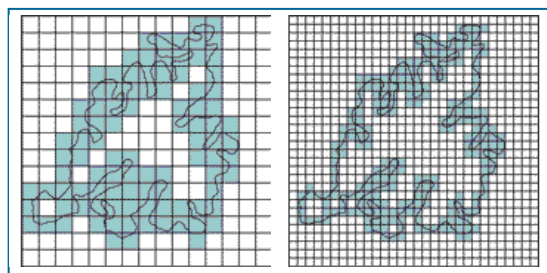
### 3) Distribución espacial y heterogeneidad de la biopelícula

La caracterización de la distribución espacial se realizó a partir del cálculo de la dimensión fractal de las imágenes adquiridas. Se considera la superficie tridimensional siendo en el eje-z la cantidad de colorante en el píxel de la imagen.

Se calculó la dimensión fractal del patrón de abundancia de bacterias considerando este como una superficie en un espacio tridimensional, con los valores del eje z dados por la abundancia píxel a píxel calculada en el módulo anterior. Se consideró además a la imagen resultante como una discretización de una superficie continua.

El método del *box-counting* se basa en el cálculo del número de porciones ocupadas por el objeto bajo estudio en función del tamaño de las porciones en que se divide la imagen. Se construyen cuadrados imaginarios de lado L y se cuentan la cantidad total de cuadrados que son necesarios para cubrir cada región colonizada por bacterias (Civit) (Figura C-4). La dimensión fractal ( $DF$ ) se estima como la pendiente de la recta que relaciona el logaritmo del número de porciones ocupadas ( $N$ ) con el logaritmo del inverso de la escala ( $\varepsilon$ ) (6):

$$\log N = DF \cdot \log \left( \frac{1}{\varepsilon} \right)$$



**Figura C-4. Método *box-counting* para calcular la dimensión fractal**  
([matap.dmaep.upm.es/cursofractales/capitulo8/1html](http://matap.dmaep.upm.es/cursofractales/capitulo8/1html)).

La dimensión fractal dio valores entre 2 y 3, siendo valores de 2 correspondientes a biopelículas delgadas y homogéneas. Mientras que valores de 3 para biopelículas complejas y de mayor densidad en la cobertura.

## 2- Código del programa

El código del programa desarrollado es:

```

function [] =
SRDoyle_aplicacion_microbiologia_con_3d(archdata,directorio,dirguardar,archresultad
os,par_input)
%Santiago R. Doyle 07/07/2010
% sdoyle@ungs.edu.ar
warning off all;
cd(directorio)
archresultados=[archresultados '.xls'];
mkdir(dirguardar);
%% PASO 1a: Leo archivo de excel donde se indica qu? imagenes y placas analizar
[~, ~, raw] =xlsread(archdata,'Placas en imagenes');
etiquetas=raw(1,:);
lista_placas= cell2struct(raw(2:end,:),etiquetas,2);
imagenes = unique(raw(2:end,1)); %lista de imagenes
%% PASO 1b (loop 1): Ubico las coordenadas de cada placa de cada imagen
ubicacion_placas={};
display('Ubicacion de coordenadas de las placas en las imagenes...')
for i = 1:size(imagenes,1)
    %% 1.1 : Cargo imagen submuestreada
    display(['Analizando imagen # ' mat2str(i) ' de ' mat2str(size(imagenes,1)) '
imagenes a analizar'])
    imagen=[ imagenes{i} '.tif'];
    infoim=imfinfo(imagen , 'tif');
    ROW=[1, par_input.downs, infoim.Height];
    COL=[1, par_input.downs, infoim.Width];
    imdowns=imread(imagen,'tif','PixelRegion', {ROW, COL});
    %% 1.2 Ubico coordenadas de las placas de las imagenes
    imbw=im2bw(rgb2gray(imdowns),0.50); % era .15
    regiones=bwareaopen(imbw,par_input.tam_min);
    regiones=bwlabel(regiones);
    NUM = max(regiones(:));
    [r,c,v]=find(regiones);
    for ii=1:NUM
        filasup(ii,1:2)=[min(r(v==ii)) ii]; %#ok<AGROW>
        colizq(ii,1:2)=[min(c(v==ii)) ii]; %#ok<AGROW>
        bordesdw(ii,1:4)=[min(r(v==ii)),max(r(v==ii)),min(c(v==ii)),max(c(v==ii))];
    %#ok<AGROW>
        % fila sup, fila inf, col izq, col derecha
    end
    % Determino numero de filas y columnas
    partes=strcmp(imagenes(i),raw(2:end,1));
    num_filas={};
    num_columnas={};
    [num_filas{1:sum(partes)}] = deal(lista_placas(partes).Fila); %#ok<AGROW>
    num_filas=cell2mat(num_filas);
    [num_columnas{1:sum(partes)}] = deal(lista_placas(partes).Columna);
    %#ok<AGROW>
    num_columnas=cell2mat(num_columnas);
    max_filas=max(num_filas);
    max_columnas=max(num_columnas);
    % Ubico la fila y columna de cada placa en la imagen
    ubicacion=zeros(NUM,7);
    ubicacion(:,1)=1:NUM;
    filas=sort(filasup,1);
    filas(:,3)=1:max_columnas:NUM;

```

```

filas=sort(filas,1);
ubicacion(:,2)=filas(:,3);
columnas=sort(colizq,1);
columnas(:,3)=1:max_filas:NUM;
columnas=sort(columnas,3);
ubicacion(:,3)=columnas(:,3);
% Guardo las coordenadas
ubicacion(:,4:7)=bordesdw;
%% 1.3 Anexo con informacion del resto de las imagenes
ubicacion_placas(i,1:3)={imagen , ubicacion , lista_placas(partes)}; %#ok<AGROW>
end % loop ubicaci?n de las placas en la im?gen
cd(dirguardar)
save paso1.mat
cd(directorio)
maximo_absoluto_absorbancia=-inf;
minimo_absoluto_absorbancia=inf;
%% Paso 2 (loop): Anlizo las placas
for n_placa=1:size(lista_placas,1) % LOOP DE CADA IMAGEN
    %% 2.1 Cargar imagen de la placa
    if strcmp(lista_placas(n_placa).Analizar,'NO')==0 % Chequeo si anlizo la placa
        display(['Generando imagen individual de la placa ' lista_placas(n_placa).ID])
        % Determino cual es la imagen de la placa
        i=strcmp([lista_placas(n_placa).Imagen '.tif'],ubicacion_placas(:,1));
        % Ubico la placa por su fila y columna dentro de los datos para esa imagen

lugar_placa=((ubicacion_placas{i,2}(:,2)==lista_placas(n_placa).Fila).*(ubicacion_placa
s{i,2}(:,3)==lista_placas(n_placa).Columna))==1;
        placa=ubicacion_placas{i,2}(lugar_placa,:); % Cargo coordenadas de la placa
        % Convierto a pixeles reales porque hab?a usado imagen submuestreada
        placa(4:end)=(placa(4:end)-1)*par_input.downs;
        placa(4:2:6)=placa(4:2:6)+par_input.borde; % Elimino borde de la imagen
        placa(5:2:7)=placa(5:2:7)-par_input.borde; % Elimino borde de la imagen
        ROW=[placa(4) , placa(5)];
        COL=[placa(6) , placa(7)];
        im=imread([lista_placas(n_placa).Imagen '.tif'],'tif','PixelRegion', {ROW,COL});
        if par_input.guardar==1 % Guardo imagen de cada placa
            nombre_archivo_placa{n_placa,1}=[lista_placas(n_placa).ID '-'
lista_placas(n_placa).Medio '-' lista_placas(n_placa).Tiempo '-'...
            num2str(lista_placas(n_placa).Triplicado) '- en imagen '
lista_placas(n_placa).Imagen '.tif' ...
            '- fila ' num2str(lista_placas(n_placa).Fila) '- col '
num2str(lista_placas(n_placa).Columna) '.tif'];
            imwrite(im,[dirguardar '\
nombre_archivo_placa{n_placa,1}], 'tif','Compression','lzw' );
        end % if
        nombre_placa{n_placa,1}=[ lista_placas(n_placa).ID '-'
lista_placas(n_placa).Medio '-' lista_placas(n_placa).Tiempo '-'...
            num2str(lista_placas(n_placa).Triplicado)]; %#ok<AGROW>
        im=-log(double(rgb2gray(im)));
        placas(n_placa).maxima_absorbancia=max(im(:));
        placas(n_placa).minima_absorbancia=min(im(:));

maximo_absoluto_absorbancia=max(maximo_absoluto_absorbancia,placas(n_placa).
maxima_absorbancia);

```



```

minimo_absoluto_absorbancia=min(minimo_absoluto_absorbancia,placas(n_placa).mi
nima_absorbancia);
clear im
end
end
cd(dirguardar)
save paso2.mat
%% Analisis de las imagenes de las placas
for n_placa=1:size(lista_placas,1) % LOOP DE CADA IMAGEN
if strcmp(lista_placas(n_placa).Analizar,'NO')==0 % Chequeo si analizo la placa
display(['Analizando placa ' nombre_placa{n_placa,1} ' ...'])
%2.2 Procesamiento de la imagen de cada placa
cd(dirguardar)
im=imread(nomre_archivo_placa{n_placa,1});
im=rgb2gray(im);
imu=-log(double(im)); % % Simil absorbancia
resultados(n_placa,1)=mean(imu(:)); %#ok<AGROW>
imu=imu-min(imu(:));
imu=imu/max(imu(:));
res=SRDoyle_boxcounting3d(imu,par_input);
resultados(n_placa,2:6)=[res.fd res.r2 res.p res.fd_int(2,1) res.fd_int(2,2)] ;
%#ok<AGROW>
% ESTANDARIZAR FIGURAS AL MAXIMO DE ABSORBANCIA DE LA SERIE
imu=-log(double(im)); % % Simil absorbancia
imu=imu-minimo_absoluto_absorbancia;
imu=imu/(maximo_absoluto_absorbancia-minimo_absoluto_absorbancia);
[alt,anc,c]=size(imu);
[X,Y] = meshgrid(1:anc,1:alt);
grafico=mesh(X,Y,imu(:,,:));
axis square
set(gcf,'Color',[0.8 0.8 0.8])
set(gca,'CameraViewAngle',10,'FontSize',1,'View',[45
45],'Projection','Perspective','Visible','off')
mapacolor=gray;
colormap(mapacolor)
%grid off
print ('-dtiff',[dirguardar '\3d_' lista_placas(n_placa).ID '-'
lista_placas(n_placa).Medio '-' lista_placas(n_placa).Tiempo '-'...
num2str(lista_placas(n_placa).Triplicado) '- en imagen '
lista_placas(n_placa).Imagen '.tif' ...
'- fila ' num2str(lista_placas(n_placa).Fila) '- col '
num2str(lista_placas(n_placa).Columna) '-color_gray-res_' int2str(par_input.resolucion)
'.tif'],[-r' int2str(par_input.resolucion)]);
mapacolor=jet;
colormap(mapacolor)
print ('-dtiff',[dirguardar '\3d_' lista_placas(n_placa).ID '-'
lista_placas(n_placa).Medio '-' lista_placas(n_placa).Tiempo '-'...
num2str(lista_placas(n_placa).Triplicado) '- en imagen '
lista_placas(n_placa).Imagen '.tif' ...
'- fila ' num2str(lista_placas(n_placa).Fila) '- col '
num2str(lista_placas(n_placa).Columna) '-color_jet-res_' int2str(par_input.resolucion)
'.tif'],[-r' int2str(par_input.resolucion)]);

end % if analizar placa

```

```

end %loop placas
resultados(:,1)=resultados(:,1)-min(resultados(:,1));
cd(dirguardar)
save paso3.mat
%% Paso 4: Escribo los resultados en un archivo de Excel
copyfile([directorio '\ archdata], [dirguardar '\ archresultados])
cd(dirguardar);
titulos={'Placa' 'Absorbancia' 'Dimensi?n fractal' 'r2' 'p' 'IC 95% Df' 'IC 95%
Df'};xlswrite(archresultados, titulos,'Placas en imagenes','I1') ;
xlswrite(archresultados, nombre_placa,'Placas en imagenes','I2') ;
xlswrite(archresultados, resultados,'Placas en imagenes','J2') ;
end

```

Siendo el código de la función desarrollada referente al método del *box-counting*:

```

function [res] = SRDoyle_boxcounting3d(imu,par_input)
% Santiago R. Doyle 07/07/2010
% sdoyle@ungs.edu.ar
conteo=0;
dif_esc_log=log10(par_input.esc_mayor-par_input.esc_menor)/par_input.iteraciones;
for i=0:par_input.iteraciones
    if i==0
        esc=par_input.esc_menor;
    else
        esc=round(par_input.esc_menor+10^(i*dif_esc_log));
    end
    conteo=conteo+1;
    im=imu(1:floor(size(imu,1)/esc)*esc,1:floor(size(imu,2)/esc)*esc);
    % Reacomodo los valores de la matriz
    I= repmat((1:size(im,1))',1,size(im,2));
    J= repmat(1:size(im,2),size(im,1),1);
    F=ceil(I/esc);
    C=ceil(J/esc);
    CUAD=F+(C-1)*esc;
    [~,~,v]=find(CUAD);
    [~,IX]=sort(v);
    IX=IX(1:(floor(size(im,1)*size(im,2)/(esc^2))*(esc^2)),1);
    imr=im(reshape(IX,esc^2,size(IX,1)/(esc^2)));
    X(conteo,1)=log10(1/esc); %#ok<*AGROW>
    Y(conteo,1)=log10(sum(range(imr,2)/esc));
    %%
end
X=[ones(size(X)) X];
if par_input.show==1
    plot(X(:,2),Y)
    pause(0.5)
end
[ab,bint,~,~,stats] = regress(Y,X);
res.fd=ab(2);
res.fd_int=bint;
res.r2=stats(1);
res.p=stats(4);

```

## D. CURVA DE CALIBRADO DE CRISTAL VIOLETA

Para la preparación de la curva de calibrado de violeta cristal (CV) en etanol, se preparó una solución concentrada del colorante en alcohol, la cual se diluyó para formar la solución madre con la que se prepararon las soluciones de la curva de calibrado utilizada.

Al preparar la solución concentrada, se disolvió una masa de 12,5 mg ( $\pm 0,2$  mg) de CV en 50 mL de solución, obteniendo una concentración  $6,1 \cdot 10^{-4}$  M ( $\pm 0,1 \cdot 10^{-4}$  M). La incertidumbre en la concentración de la solución original se halló como:

$$\sigma_c = [CV]_c \cdot \sqrt{\sum_i \left(\frac{\sigma}{v}\right)^2} = [CV]_c \cdot \sqrt{\left(\frac{0,01g/mol}{407,99g/mol}\right)^2 + \left(\frac{0,2mg}{12,5mg}\right)^2 + \left(\frac{0,01ml}{50,00ml}\right)^2}$$

La solución madre se preparó diluyendo 3,0 mL de la solución concentrada (pipeta volumétrica) hasta 100 mL, siendo de concentración  $1,84 \cdot 10^{-5}$  M ( $\pm 0,03 \cdot 10^{-5}$  M). La incertidumbre asociada a esta solución madre se halló:

$$\sigma_m = [CV]_m \cdot \sqrt{\sum_i \left(\frac{\sigma_i}{valor_i}\right)^2} = [CV]_m \cdot \sqrt{\left(\frac{0,1 \cdot 10^{-4} M}{6,1 \cdot 10^{-4} M}\right)^2 + \left(\frac{0,01ml}{3,00ml}\right)^2 + \left(\frac{0,1ml}{100,0ml}\right)^2}$$

Para la curva de calibración de CV, se prepararon 9 soluciones por duplicado a partir de la solución madre utilizando material volumétrico de vidrio y priorizando soluciones de baja concentración del colorante en etanol. En la Tabla D-1 se detallaron las soluciones preparadas especificando el material volumétrico utilizado, la concentración de cada solución y las absorbancias registradas para cada solución y su duplicado ( $Abs_{590nm1}$  y  $Abs_{590nm2}$ ).

| Sc | Pipeta (mL) | Matraz (mL) | Dilución | [CV] (M)             | $\sigma$ (M)          | $Abs_{590nm1}$ | $Abs_{590nm2}$ |
|----|-------------|-------------|----------|----------------------|-----------------------|----------------|----------------|
| 1  | 0,5         | 100         | 1:200    | $9,2 \cdot 10^{-8}$  | $\pm 2 \cdot 10^{-9}$ | 0,0080         | 0,0089         |
| 2  | 0,5         | 50          | 1:100    | $1,84 \cdot 10^{-7}$ | $\pm 3 \cdot 10^{-9}$ | 0,0173         | 0,0167         |
| 3  | 0,5         | 25          | 1:50     | $3,68 \cdot 10^{-7}$ | $\pm 6 \cdot 10^{-9}$ | 0,0338         | 0,0330         |
| 4  | 2,0         | 50          | 1:25     | $7,3 \cdot 10^{-7}$  | $\pm 1 \cdot 10^{-8}$ | 0,0650         | 0,0644         |
| 5  | 1,0         | 10          | 1:10     | $1,84 \cdot 10^{-6}$ | $\pm 4 \cdot 10^{-8}$ | 0,1638         | 0,1616         |
| 6  | 15,0        | 100         | 1:6,67   | $2,76 \cdot 10^{-6}$ | $\pm 5 \cdot 10^{-8}$ | 0,2405         | 0,2404         |
| 7  | 10,0        | 50          | 1:5      | $3,68 \cdot 10^{-6}$ | $\pm 7 \cdot 10^{-8}$ | 0,3287         | 0,3263         |
| 8  | 4,0         | 10          | 1:2,5    | $7,4 \cdot 10^{-6}$  | $\pm 1 \cdot 10^{-7}$ | 0,6487         | 0,6413         |
| 9  | 15,0        | 25          | 1:1,67   | $1,10 \cdot 10^{-5}$ | $\pm 2 \cdot 10^{-7}$ | 0,9625         | 0,9587         |

Tabla D-1. Curva de calibrado de CV en etanol.

La incertidumbre asociada a la concentración de la primera solución se determinó a partir de:

$$\sigma_1 = [CV]_1 \cdot \sqrt{\sum_i \left( \frac{\sigma_i}{valor_i} \right)^2} = [CV]_1 \cdot \sqrt{\left( \frac{0,03 \cdot 10^{-5} M}{1,84 \cdot 10^{-5} M} \right)^2 + \left( \frac{0,001 ml}{0,500 ml} \right)^2 + \left( \frac{0,1 ml}{100,0 ml} \right)^2}$$

De manera similar se hallaron las incertidumbres en las concentraciones de cada solución de la curva de calibrado. El rango lineal quedó determinado de  $9,2 \cdot 10^{-8} M (\pm 0,2 \cdot 10^{-8} M)$  a  $1,10 \cdot 10^{-5} M (\pm 0,02 \cdot 10^{-5} M)$ .

Del análisis estadístico de la serie de datos obtenidos, se hallaron los parámetros estadísticos para la regresión lineal, ver Tabla D-2.

| Parámetro          | Valores sin ajuste |              |                             | Valores ajustados                     |
|--------------------|--------------------|--------------|-----------------------------|---------------------------------------|
|                    | Coficiente         | Error típico | Confianza 95%<br>(t = 1,96) |                                       |
| Ordenada al origen | 0,00174125         | 0,00090861   | 0,001781                    | $2 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-3}$ |
| Pendiente          | 87185,188          | 192,293007   | 376,8943                    | $8,71 \cdot 10^4 \pm 0,04 \cdot 10^4$ |

Tabla D-2. Regresión lineal para la curva de calibrado de CV en etanol.

Se analizó la dispersión de valores medidos para el blanco de medición (cubeta con alcohol) en tres momentos diferentes de la construcción de la curva de calibración y se halló la desviación estándar, en la Tabla D-3 se detallan los valores hallados.

| Medición/Repetición  | Abs <sub>590nm</sub> Blanco | Abs <sub>Bco</sub><br>(Promedio) | S <sub>Bco</sub><br>(Desviación<br>estándar) | Abs <sub>Límite</sub><br>(Abs <sub>Bco</sub> +3S <sub>Bco</sub> ) | [CV] <sub>Límite</sub> (M) |                            |
|--|-----------------------------|----------------------------------|--|---|----------------------------|----------------------------|
| Previo a la medición de las soluciones de la curva de calibrado                              | 1                           | 0,0000                           | 4,12 · 10 <sup>-5</sup>                      | 5,0 · 10 <sup>-4</sup><br>(0,000491)                              | 15,4 · 10 <sup>-4</sup>    | -2,596 · 10 <sup>-09</sup> |
|  | 2                           | -0,0001                          |  |   |                            |                            |
|  | 3                           | 0,0000                           |  |   |                            |                            |
|  | 4                           | 0,0000                           |  |   |                            |                            |
|  | 5                           | 0,0000                           |  |   |                            |                            |
|  | 6                           | 0,0000                           |  |   |                            |                            |
| Posterior a la medición de la Abs <sub>590nm</sub> de la solución 5 de la curva de calibrado | 7                           | -0,0005                          |  |   |                            |                            |
|  | 8                           | -0,0006                          |  |   |                            |                            |
|  | 9                           | -0,0005                          |  |   |                            |                            |
|  | 10                          | -0,0006                          |  |   |                            |                            |
|  | 11                          | -0,0006                          |  |   |                            |                            |
| Al finalizar las mediciones de todas las soluciones de la curva de calibración               | 12                          | 0,0003                           |  |   |                            |                            |
|  | 13                          | 0,0008                           |  |   |                            |                            |
|  | 14                          | 0,0007                           |  |   |                            |                            |
|  | 15                          | 0,0006                           |  |   |                            |                            |
|  | 16                          | 0,0006                           |  |   |                            |                            |
|  | 17                          | 0,0006                           |  |   |                            |                            |

Tabla D-3. Desviación estándar del blanco de medición.

Por un lado, podemos ver en los resultados hallados, poca variación en la Abs del blanco de medición, siendo la Abs límite (significativamente diferente) igual a  $1,5 \cdot 10^{-3}$  con una concentración, en módulo, igual a  $2,596 \cdot 10^{-9}$  M.

## E. RELACIÓN C/N EN M9

La relación de carbono/nitrógeno (C/N) en el medio mínimo se puede hallar con mayor precisión, dado que en este medio sí se puede hallar la concentración en masa C/N, no así en los medios complejos.

Como es un medio mínimo, se puede hallar la relación en masa entre el nitrógeno provisto por la sal inorgánica y el carbono presente en cada fuente utilizada. Siendo las composiciones:

- ✓ 26 %m/m N en  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (siendo la masa molar 53,49146 g/mol y la composición porcentual en masa para el N de 26,1849 %m/m),
- ✓ 40 %m/m C en la glucosa (180,063388 g/mol, 40,02157285 %m/m C)
- ✓ 38 %m/m C en citrato (191,11558 g/mol-Anión, 37,70712989 %m/m C)
- ✓ 41 %m/m C en glutamato (146,121231 g/mol-Anión, 41,09840821 %m/m C)
- ✓ 41 %m/m C en succinato (116,07419 g/mol-Anión, 41,38976027 %m/m C).

Considerando la composición final en el medio de cultivo (1,0 g/L para la fuente de nitrógeno y 5,0 g/L de la fuente de carbono) quedarían las concentraciones:

- ✓ 0,2618 g/L N
- ✓ 2,001078642 g/L C para la glucosa
- ✓ 1,885356495 g/L C para el citrato
- ✓ 2,054920411g/L C para el glutamato
- ✓ 2,069488013 g/L C para el succinato

Desde este sentido la relación C/N considerando el cociente entre la concentración de carbono en el medio sobre la concentración de nitrógeno quedaría:

- ✓ 7,6 para la glucosa
- ✓ 7,2 para el citrato
- ✓ 7,8 para el glutamato
- ✓ 7,9 para el succinato.

En todos los casos prácticamente la relación C/N se mantuvo entre 7,2 y 7,9 para las fuentes estudiadas. Al variar la concentración de una de las fuentes nutricionales, se modificó la proporción en la condición nutricional que impactó negativamente en la colonización superficial.



# BIBLIOGRAFÍA







## BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, I., Moctezuma-Zárate, Ma. de G., Cárdenas, J.F., Gutiérrez C. (2007). "Bioadsorción de Cadmio (II) en solución acuosa por biomasas fúngicas", en *Información Tecnológica*, 18 (1), 09-14.
- Amann, R.; Snaidr, J.; Wagner, M. (1996). "In situ visualization of high genetic diversity in a natural microbial community", en *Journal of Bacteriology*, 178 (12), 3496–3500.
- Atlas, R.M.; Bartha, R. (2001). "Capítulo 6: Desarrollo de las comunidades microbianas" y "Capítulo 12: Aspectos ecológicos en el control del deterioro", en "Ecología microbiana y microbiología ambiental", 4ª Ed., Pearson Education, 178-170, 473-504. ISBN 8478290397 (eBook ISBN: 9788478291106).
- Bajpai, P. (2015) "Chapter 4: Factors affecting biofilm development" en "Pulp and Paper Industry: Microbiological Issues in Papermaking", Elsevier, Amsterdam, 53-65. ISBN 978-0-12-803409-5 (<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803409-5.00004-5>)
- Barken, K.B., Pamp, S.J., Yang, L., Gjermansen, M., Bertrand, M.K., Givskov, M., Whitchurch, C.B., Engel, J.N., Tolker-Nielsen, T. (2008). "Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms" en *Environmental Microbiology*, 10 (9), 2331-2343 (doi:10.1111/j.1462-2910.2008.01658.x)
- Bar-Zeev, E.; Zodrow, K.R.; Kwan, S.E.; Elimelech, M. (2014). "The importance of microscopic characterization of membrane biofilms in an unconfined environment", en *Desalination*, 348, 8–15
- Chen H., Pan S-s. (2005). "Bioremediation potencial of pirulina: toxicity and biosorption studies of lead", en *Journal of Zhejiang University SCIENCE*, 6B (3), 171-174
- Civit, E.M.; Iuretig, M.G.; Segura, M.; Foppoli A.M. (2000). "Tratamiento biológico de efluentes líquidos: propiedades geométricas de la biopelícula", en *Tecnología, Ciencia, Educación*, Instituto Mexicano de Ingenieros Químicos (IMIQU), 15 (1), 5-11.
- Costa, F.; Silva, B.; Tavares, T. (2017). "Chapter 6. Biofilm bioprocesses", en "Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Bioprocesses, Bioreactors and Controls", Elsevier, 143-175. (<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63663-8.00006-9>)
- De Beer, D.; Stoodley, P. (2006). "Chapter 3.10: Microbial biofilms", en "The Prokaryotes", editado por M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H Schleifer y Stacke-brand, Springer, Nueva York, 1, 904–937. (doi: 10.1007/0-387-30741-9\_28).
- Diels, L., Spaans, P.H., Van Roy, S., Hooyberghs, L., Ryngaert, A., Wouters, H., Walter, E., Winters, J., Macaskie, L., Finlay, J., Pernfuss, B., Woebking, H., Pümpel, T., Tsezos, M. (2003). "Heavy metals removal by sand filters inoculated with metal sorbing and precipitating bacteria", en *Hidrometallurgy*, 71, 235-241.
- Duffus, J.H. (2002). "“Heavy metals” – A meaningless term?. (IUPAC Technical report)". *Pure and Applied Chemistry*, 74 (5), 793-807
- Dunne, W.M. (2002). "Focus. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?", en *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (2, abril), 155-166.

- Ferreira, M.L. (2016). "Estudios de las interacciones entre metales de relevancia ambiental y componentes celulares bacterianos, involucrados en procesos de biotratamiento de aguas residuales", tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad Nacional de Buenos Aires en el Área de Química Biológica.
- Ferreira, M.L., Lazzarini Behrmann, I.C., Ceretti, H.M., Zalts, A., Vullo, D.L., Ramirez, S.A. (2013). "Chapter 6. Towards understanding the influence of cadmium on microbial behavior" en Cadmium, editado por Hasanuzzaman M. y Fujita M., Nova Science Publishers, Inc, 151-169.
- Fomina, M., Gadd, G.M. (2014). "Biosorption: current perspectives on concept, definition and application", en Biosource Technology, 160, 3-14.
- Gadd, G.M. (2009). "Review. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment", en Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 84 (1), 13-28.
- Goeres, D.M.; Hamilton, M.A.; Beck, N.A.; Buckingham-Meyer, K.; Hilyard, J.D.; Loetterle, L.R.; Lorenz, L.A.; Walker, D.K.; Stewart, P.S. (2009). "A method for growing a biofilm under low shear at the air-liquid interface using the drip flow biofilm reactor" en Nature Protocols, 4, 783 – 788. (doi: 10.1038/nprot.2009.59)
- Green-Ruiz, C., Rodríguez-Tirado, V., Gómez-Gil, B. (2007). "Cadmium and zinc removal from aqueous solutions by *Bacillus jeotgali*: pH, salinity and temperature effects", en Bioresource Technology, 99 (9), 3864-3870. (doi: 10.1016/j.biortech.2007.06.047).
- Guítton, P.S.; Hung, C.S.; Kline, K.A.; Roth, R.; Kau, A.L.; Hayes, E.; Heuser, J.; Dodson, K.W.; Caparon, M.G.; Hultgren, S.J. (2009). "Contribution of autolysin and sortase A during *Enterococcus faecalis* DNA-dependent biofilm development", en Infection and Immunity, American Society for Microbiology (ASM), 77 (9), 3626–3638 (doi:10.1128/IAI.00219-09)
- Hadjiev, D.; Dimitrov, D.; Martinov, M.; Sire, O. (2007). "Enhancement of the biofilm formation on polymeric supports by surface conditioning", en Enzyme and Microbial Technology, 40, 840-848.
- Harmsen, M., Yang, L., Pamp, S.J., Tolker-Nielsen, T. (2010). "Minireview. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal". Immunology and Medical Microbiology, Federation of European Microbiological Societies (FEMS), Vol 59, 253-268.
- Herrera Mendoza, M.T. (2004). "Biofilm, infección, resistencia y tratamiento", en Nova, Publicación Científica; 2 (2), 1-10.
- Hodson, M.E. (2004). "Heavy metals- geochemical bogey men?". Environmental Pollution 129, 341-343
- Hölscher, T.; Bartels, B.; Lin, Y-C., Gallegos-Monterrosa, G.; Price-Whelan, A.; Kolter, R.; Dietrich, L.E.P.; Kovács, A.T.; (2015). "Motility, chemotaxis and aerotaxis contribute to competitiveness during bacterial pellicle biofilm development", en Journal Molecular Biology, 427, 3695–3708
- Le Cloirec, P., Andres, Y. (2005). "Bioremediation of heavy metals using microorganisms", en Bioremediation of Aquatic and Terrestrial Ecosystems, editado por Fingerman M. y Nagabhushanam R., Enfield, NH, USA, Science Publishers, 97-126.
- Li, C.; Felz, F.; Wagner, M.; Lackner, S.; Horn, H. (2016). "Investigating biofilm structure developing on carriers from lab-scale moving bed biofilm reactors based on light microscopy and optical coherence tomography", en Bioresource Technology, (200), 128–136

- Li, Y.; Yang, S.; Sun, C.; Wang, L.; Wang, Q.X. (2016). "Aqueous photofate of crystal violet under simulated and natural solar irradiation: Kinetics, products, and pathways", en *Water Research*, 88, 173-183
- Liu, J.; Wang, F.; Wu, W.; Wan, J.; Yang, J.; Xiang, S. (2017). "Biosorption of high-concentration Cu(II) by periphytic biofilms and the development of a fiber periphyton bioreactor (FPBR)". *Biosource Technology*. (doi: 10.1016/j.biortech.2017.06.037) (En Prensa)
- Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M.R., Bayles, K., Wozniak, D.J. (2009). "Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix". *Public Library of Science (PLOS) Pathogens*, Open Access, 5 (3), e1000354
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Parker, J. (2003). "19.3 Crecimiento microbiano en superficies y biofilmes", en Sección I: Ecosistemas microbianos, del Capítulo 19: Hábitat microbianos, ciclos de nutrientes e interacciones con plantas y animales, perteneciente a Brock\_Biología de los microorganismos, 10ª Edición, Pearson Educación, 628-630
- Majumder, S.; Raghuvanshi, S.; Gupta, S. (2016) "Sequestration of Zn<sup>2+</sup> from aqueous solution using *Klebsiella pneumoniae*: Batch kinetics and continuous studies". *Journal of Water Process Engineering*, 12, 89-104
- Malik, A. (2004). "Metal bioremediation through growing cells". *Environmental international*, 30, 261-278
- Martinov, M., Hadjiev, D., Vlaev, S. (2010). "Gas-liquid dispersion in a fibrous fixed bed biofilm reactor at growth and non-growth conditions". *Process Biochemistry*, 45, 1.023-1.029.
- Méndez, N.; Ramírez, S.A.M.; Ceretti, H.M.; Zalts, A.; Candal, R.; Vullo, D.L.. (2011). "*Pseudomonas veronii* 2E surface interactions with Zn(II) and Cd(II)", en *Global Journal Environmental Science and Technology*, 1, 3
- Mullen, M.D., Wolf, D.C., Ferris, F.G., Beveridge, T.J., Flemming, C.A., Bayley, G.W. (1989). "Bacterial sorption of heavy metals", en *Applied and Environmental Microbiology*, 55 (12), 3143-3149
- OMS (2006). "Guías para la calidad del agua potable. Primer apéndice a la tercera edición", 1, Recomendaciones. ISBN 92 4 154696 4. (Versión electrónica para la web, [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/gdwq3\\_es\\_full\\_lowres.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_full_lowres.pdf))
- O'Toole, G.A.; Kolter, R. (1998). "Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis", en *Molecular Microbiology*, 28 (3), 449-461.
- Pani, T.; Das, A.; Osborne, J.W. (2017). "Bioremoval of zinc and manganese by bacterial biofilm: A bioreactor-based", en *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 175, 211-218.
- Parsek, M.R.; Fuqua, C. (2004). "Meeting Review. Biofilms 2003: Emerging themes and challenges in studie of surface-associated microbial life", en *Journal of Bacteriology*, 186 (14, Julio), 4427-4440.
- Pavissich, J.P.; Aybar, M.; Martin, K.J., Nerenberg, R. (2014). "A methodology to asses the effects of biofilm roughness on substrate fluxes using image analisis, substrate profiling, and mathematical modelling", en *Water Science & Technology*, 69 (9), 1932-1941.
- Peyton, B.M. (1996). "Effects of shear stress and substrate loading rate on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm thickness and density", en *Water Research*. Elsevier Science Ltd, 30 (1), 29-36.

- Qureshi, F.M., Badar, U., Ahmed, N. (2001). "Biosorption of copper by bacterial biofilm on a flexible polyvinyl chloride conduit", en *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (9), 4349-4352.
- Qureshi, N.; Annous, B.A.; Ezeji, T.C.; Karcher, P.; Maddox, I.S. (2005). "Review. Biofilm reactors for industrial bioconversion process: employing potential of enhanced reaction rates", en *Microbial Cell Factories*, 4:24 (<https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-24>).
- Rajarao, G.K. (2016). "Chapter 6: Modern methods in microscopy for the assessment of biofilms and ioremediation", en "Biofilms in Bioremediation, Current research and emerging technologies" editado por Gavin Lear, Caister Academic, Nueva Zelanda, 93-104.
- Ruhal, R.; Antti, H.; Rzhepishevskaya, O.; Boulanger, N.; Barbero, D.R.; Wai, S.N.; Uhlin, B.E.; Ramstedt, M. (2015). "A multivariate approach to correlate bacterial surface properties to biofilm formation by lipopolysaccharide mutants of *Pseudomonas aeruginosa*", en *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 127, 182-91, (doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.01.030).
- Saur, T.; Escudie, R.; Santa-Catalina, G.; Bernet, N.; Milferstedt, K. (2016). "Conservation of acquired morphology and community structure in aged biofilms after facing environmental stress", en *Water Research*, 88, 164-172
- Sheikh, J., Hicks, S., Dall'Agnol, M., Phillipis, A.D., Nataro, J.P. (2001). "Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*", en *Molecular Microbiology*, 41 (5), 983-997.
- Singh, R.; Debarati, P.; Rakesh, K.J. (2006). "Biofilms: implications in bioremediation", en *TRENDS in Microbiology*, Elsevier, 14 (9), 389-397. (<https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.07.001>).
- Sutherland, I.W. (2001). "Review: The biofilm matrix-an immobilized but dynamic microbial environment". *TRENDS in Microbiology*, 9 (5), 222-227
- Vlamakis, H.; Kolter, R. (2011). "Capítulo 21: Biofilm", en "Bacterial Stress Responses", 2ª Ed., editado por Gisela Storz y Regina Hengge, ASM, Washington, DC.
- Volesky, B. (2007). "Review. Biosorption and me", en *Water Research*, Elsevier, 41, 4017-4019.
- Vullo, D.L., Wachsmann, M.B., Alche, L.E. (2000). "Capítulo 13: Cultivos bacterianos en medio líquido", en "Microbiología en Práctica. Manual de técnicas de laboratorio para la enseñanza de microbiología básica aplicada", Atlante S.R.L., Buenos Aires, Argentina.
- Vullo, D.L. (2003). "Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente", en *Revista Química Viva*, 2 (3).
- Vullo, D.L. (2006). "Capítulo 9: Cinética del crecimiento bacteriano. Capítulo 10: procesos industriales" y "Capítulo 11: Inmovilización de células y enzimas" en "Cultivos celulares: qué saber y cómo hacer" editado por Nélide Candurra y Celia Coto. Suplemento del Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires, 69-88 (ISSN: 0325-2957).
- Vullo, D.L.; Ceretti, H.M.; Daniel, M.A.; Ramírez, S.A.M.; Zalts, A. (2008). "Cadmium, zinc and copper biosorption mediated by *Pseudomonas veronii* 2E", en *Bioresource Technology*, Elsevier Science, 99 (13), 5574-5581.
- Walker, J.N.; Horswill, A.R. (2012) "A coverslip-based technique for evaluating *Staphylococcus aureus* biofilm formation on human plasma", en *Frontiers Cellular and Infection Microbiology*, 2; artículo 39, (doi: 10.3389/fcimb.2012.00039)

Yang, S.; Ngwenya, B.T.; Butler, I.B.; Kurlanda, H.; Elphick, S.C. (2013). "Coupled interactions between metals and bacterial biofilms in porous media: Implications for biofilm stability, fluid flow and metal transport", en *Chemical Geology*, 337-338, 20-29.

Zouboulis, A.I., Loukidou, M.X., Matis, K.A. (2004). "Biosorption of metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils", en *Process Biochemistry*, Elsevier, 39, 909-916.