

04-012

STUDY OF THE BIOMACHINING PROCESS. PRESERVATION OF THE GENUS ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS.

Díaz-Tena, Estíbaliz ¹; Rojo Azaceta, Naiara ¹; Elías Sáenz, Ana ¹; Gurtubay
Bustinduy, Luis ¹; Oyanguren García, Iñigo ²; Barbero, Francisca ²

¹ UPV-EHU, ² Guserbiot S.L.

Green Machining has emerged as an alternative to the cost-intensive shaping tools. In previous studies, a biomachining process of oxygen-free copper at laboratory scale was design and successfully operated in continuous mode, using the mesophilic and acidophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. In this study, the use of several preservation techniques was tested, in order to maintain backups and reserves of active cells for further use. Thus, freeze drying, freezing and desiccation were tested for the preservation of the ferrous ion-oxidizing bacterium *A. ferrooxidans*, evaluating cell viability after each preservation procedure. Regarding freeze drying, the influence of the primary drying duration (12 vs. 35 hours) and the addition of four different cryoprotectants on the process were studied. Freezing was carried out both in commercial cyovials and in Eppendorf tubes, and the influence of adding a cryoprotactant was tested. In addition, cell viability after short (4 days) and middle-term (28 days) storage was evaluated. Finally, desiccation was carried out at 30 °C for 24 hours. It was concluded that freezing is the preservation technique that ensures higher *Acidithiobacillus ferrooxidans* viability after storage.

Keywords: *biomachining; Acidithiobacillus ferrooxidans; preservation; freeze drying; freezing; dessication*

ESTUDIO DEL PROCESO DE BIOMECHANIZADO. PRESERVACIÓN DE LA CEPA ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS

La evolución de las tecnologías de mecanizado existentes nos lleva hacia el denominado Mecanizado Ecológico. Las primeras etapas del presente trabajo se han orientado al desarrollo de un proceso de biomecanizado en continuo sobre piezas de cobre libre de oxígeno, mediante la bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans*, con vistas a su posible aplicación industrial. Para completar el análisis, se han evaluado tres técnicas para preservar las bacterias empleadas en el citado bioproceso: liofilización, congelación y desecado. En el caso de la liofilización, se ha estudiado la influencia de la duración del secado primario (12 vs. 35 horas) y el empleo de cuatro crioprotectores en la viabilidad de las células tras el proceso. La congelación se ha llevado a cabo en crioviales comerciales y en crioviales Eppendorf, con la finalidad de comparar los resultados obtenidos siguiendo ambos procedimientos. Asimismo, se ha estudiado la influencia de la adición de un crioprotector y la influencia del tiempo de congelación en la viabilidad final. Finalmente, el desecado se ha realizado bajo condiciones de temperatura 30 °C y duración 24 horas. Los resultados obtenidos han llevado a concluir que la congelación de las muestras es la técnica más adecuada para la preservación de las bacterias *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Palabras clave: *biomecanizado; Acidithiobacillus ferrooxidans; preservación; liofilización; congelación; desecado*

Correspondencia: Estíbaliz Díaz-Tena estibaliz.diaz@ehu.eus

Agradecimientos: Los autores de este trabajo quieren dar las gracias a la empresa GUSERBIOT S.L. por su colaboración y el apoyo técnico aportado y en especial, la autora Estíbaliz Díaz-Tena agradece la ayuda financiera recibida por parte del Gobierno Vasco (BFI 2011-119) para la realización de su tesis doctoral. Este estudio ha sido posible gracias a la ayuda económica recibida por parte de la UPV/EHU bajo el programa UFI 11/29.

1. Introducción

La mejora de la calidad de los componentes, así como la optimización de los procesos de producción, son imprescindibles para que las empresas se mantengan en el mercado de la tecnología. Cumplir con las expectativas en cuanto a precisión, tolerancia y acabado superficial que un cliente desea, con el menor gasto, son las claves para el éxito.

Por otro lado, el número de empresas que se suman al cuidado del planeta Tierra, impulsadas por el afán de reducir el impacto ambiental generado mediante el ecodiseño, va en aumento. El ecodiseño implica la obligación de incorporar e integrar criterios específicos medioambientales en todo el ciclo de vida de un componente: producción, distribución, utilización, reciclaje y tratamiento final. En el ámbito de fabricación este hecho se relaciona con el denominado 'Green Machining', debido al cual las empresas se ven obligadas a apostar por nuevos procesos de mecanizado o por la mejora de procesos ya existentes para cumplir con la normativa medioambiental y mantenerse a la vanguardia en la innovación tecnológica (Masoumik, Hanim y Udoncy, 2015).

Los avances recientes en el ámbito de la biotecnología, así como la creciente apuesta hacia procesos más sostenibles, hacen que hoy en día sea posible entender procesos en los que se hace uso de microorganismos para la fabricación de piezas metálicas, como por ejemplo el biomecanizado. Definido como la posibilidad de remoción de metal mediante organismos vivos, el biomecanizado fue presentado por primera vez en el año 1993 por Uno, Kaneeda y Yokomizo (1993). La ventaja más destacable de este proceso innovador es la de poder fabricar piezas de geometría compleja a escala micrométrica con un bajo impacto ambiental pudiendo llegar a competir en un futuro cercano con tecnologías de fabricación ya consolidadas, bien sustituyéndolas o bien complementándolas.

Actualmente, los procesos biológicos como el biomecanizado se limitan, en la mayoría de los casos, al ámbito de la investigación. Sin embargo, debido a su rápida evolución, en un futuro próximo podrían llegar a ser alternativas a procesos físico-químicos de fabricación consolidados (Saragih y Jo Ko 2013), ya que presentan ventajas frente a procesos como el mecanizado químico, entre otros (Eskandarian, Karimi y Shabgard 2013; Hocheng y Jadhav, 2015).

La naturaleza biológica de este tipo de procesos hace que sea fundamental conocer y entender el metabolismo de los microorganismos implicados en la eliminación del metal de interés, así como conocer las condiciones óptimas de cultivo, mantenimiento y preservación.

Por lo general, los estudios basados en el mecanizado biológico emplean bacterias del tipo *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Yang et al., 2009; Suwandi, Whulanza e Istiyanto 2014) y *Acidithiobacillus thiooxidans* (Chang et al., 2008; Hocheng, Jadhav y Chang 2012). No obstante, en los estudios llevados a cabo por Shikata et al. (2009) y Jadhav y Hocheng (2014), el biomecanizado se llevó a cabo mediante las bacterias del género *Staphylococcus* sp. y el hongo *Aspergillus niger* 34770, respectivamente.

La posibilidad de almacenar un cultivo activo para su posterior reutilización, empleando algún método de preservación, es un aspecto relevante en procesos biológicos a escala industrial, ya que permite aumentar el rendimiento de la operación, reduciendo costes de adquisición

de los organismos. Los procesos de conservación permiten mantener las especies microbianas en un estado genético inactivo, conservando las características fenotípicas, genotípicas y una alta viabilidad, de manera que se asegure el mantenimiento del gran potencial biotecnológico que las bacterias guardan en sus genomas. Otro ámbito en el que se emplean este tipo de procesos es en los Biological Resource Centers (BRC), principales suministradores de cultivos microbianos para la investigación y desarrollo de la medicina, agricultura y biotecnología (Kurtzman y Labeda 2009).

No existe un método de conservación universal, sino que existe una gran variedad, estando su elección influenciada principalmente por el tipo de microorganismo a emplear, así como por los medios técnicos y la infraestructura de laboratorio a la que se tiene acceso. Asimismo, existe la posibilidad de realizar la conservación a corto, medio o largo plazo (García López et al. 2011). Independiente del método de conservación seleccionado, García López et al. (2011) indicaron en su estudio que para la correcta preservación de los microorganismos es necesario tomar en consideración tres recomendaciones: evitar posibles contaminaciones durante el proceso de conservación, intentar que los microorganismos sobrevivan en números elevados durante el tiempo que permanecen conservados (70-80% de supervivencia) y que genéticamente permanezcan estables.

El principal objetivo de este trabajo es estudiar la posibilidad de conservar la cepa *A. ferrooxidans* empleada en procesos de biomecanizado tanto a medio como a largo plazo. Para ello, se ha estudiado la liofilización, la congelación y la desecación como alternativas de la conservación.

2. Metodología

2.1 Medio de cultivo y separación de la biomasa

Se testearon tres medios de cultivo para la cepa *A. ferrooxidans*, con el fin de poner a punto un medio que permita hacer recuentos de viabilidad de la cepa. Estos medios fueron los recogidos en la Tabla 1. Los microorganismos fueron cultivados en placas con medio sólido a 28 °C, llevando un seguimiento del crecimiento de los mismos.

Tabla 1: Composición de los tres medios de cultivos empleados

Medio	Composición	Autores
A	Solución A: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 g·L ⁻¹ ; $\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g·L ⁻¹ ; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g·L ⁻¹ ; H_2SO_4 (15 N) 5.0 mL Solución B: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 167 g; H_2SO_4 (15 N) 50 mL Mezcla de las soluciones A:B en proporción 4:1	Robertson & Gijs-Kuenen (2006)
B (FeTSB)	Solución A: 20% (p/v) de FeSO_4 (36,57 g·L ⁻¹ de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) Solución B: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,8 g·L ⁻¹ ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,7 g·L ⁻¹ ; TSB 0,35 g·L ⁻¹ Solución C: Agarosa 0,7% Mezcla de las soluciones A:B:C en proporción 1:14:5	Johnson, Macvicar & Rolfe (1987)
C	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,0 g·L ⁻¹ ; KCl 0,1 g·L ⁻¹ ; K_2HPO_4 0,5 g·L ⁻¹ ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g·L ⁻¹ ; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,01 g·L ⁻¹ ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 16,5 g·L ⁻¹	Sugio et al. (1984)

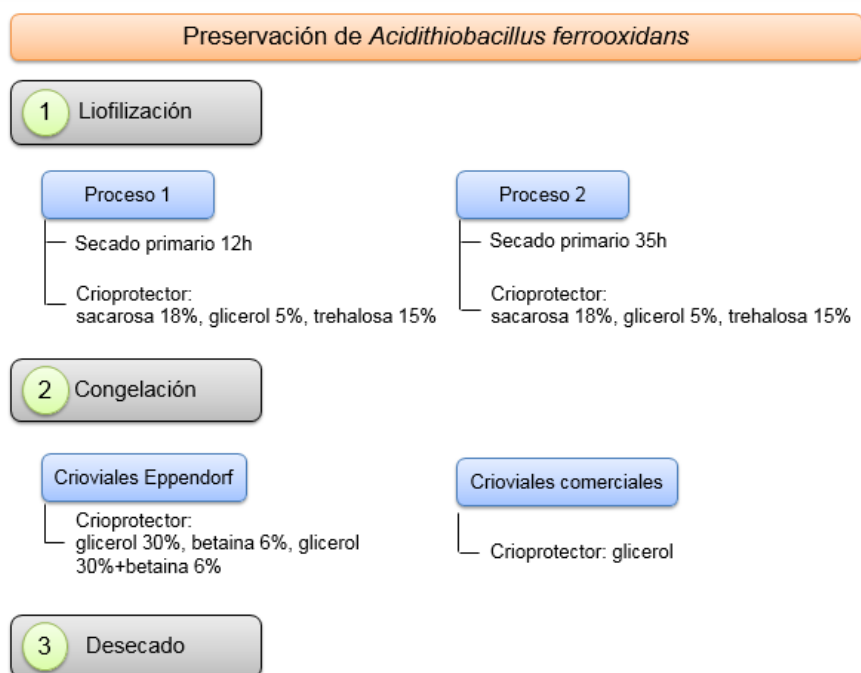
Asimismo, se estudió la filtración como metodología más adecuada para separar la biomasa y obtener un filtrado estéril, en base al tipo de microorganismo empleado y el medio de cultivo a recuperar. El estudio de filtración se llevó a cabo empleando un cultivo de 3 días,

previamente centrifugado a 10000 rpm y 4 °C durante 20 minutos (Eppendorf 5810-R) . Se emplearon dos tipos de filtros: a) filtros de acetato con un diámetro de poro de 0,45 micras y b) filtros de filtración por vacío de nitrocelulosa de 0,22 micras.

2.2 Conservación de la cepa *A. ferrooxidans*

Se estudiaron tres estrategias de conservación de la cepa *A. ferrooxidans*: a) liofilización, b) congelación y c) desecado. En la Figura 1 se recoge un esquema con las principales especificaciones de cada proceso de preservación empleado.

Figura 1: principales especificaciones de los procesos de preservación evaluados.



2.2.1 Liofilización

Se estudió la liofilización como alternativa para mantener la cepa *A. ferrooxidans* en condiciones adecuadas para su posterior utilización, una vez separada del sobrenadante. El proceso se llevó a cabo en un liofilizador Telstar LyoBeta 20, y consistió en una secuencia de tres etapas: congelación (-40 °C), secado primario (5 °C) y secado secundario (30 °C), realizándose las dos últimas bajo condiciones de vacío (0.250)

Inicialmente, se incubó el cultivo a temperatura ambiente y sin agitación durante aproximadamente 10 minutos, con el fin de depositar los posibles residuos sólidos férricos que pudieran existir en la disolución. A continuación, se centrifugaron 200-400 mL de muestra en alícuotas de 65 mL durante 20 minutos a 4 °C y a 10000 rpm (Eppendorf 5810-R). Se eliminó el sobrenadante y se procedió al lavado del pellet de cada alícuota empleando 10-15 mL del Medio B (Tabla 1). Resuspendidos los pellets, se mezclaron en un único tubo, trabajando a partir de este punto con una única muestra. Se volvió a centrifugar la muestra bajo las condiciones descritas anteriormente, resuspendiendo finalmente el pellet en 10 mL de agua destilada estéril.

Se prepararon alícuotas de 1.5 mL en tubos Eppendorf a partir de la muestra de bacterias resuspendidas. Se centrifugaron durante 20 minutos (10000 rpm, 4 °C, Microcentrífuga

Eppendorf, 5415-R) y, tras eliminar el sobrenadante, cada uno de los pellets se resuspendió en 0.5 mL de uno de los siguientes crioprotectores: sacarosa (18%, p/v), glicerol (5%, p/v) y trehalosa (15%, p/v). Asimismo, dos muestras se resuspendieron en agua destilada (control negativo). Todas las muestras se incubaron durante 1 hora a 30 °C.

Se evaluó la influencia del tiempo de secado primario en la viabilidad de las células tras la liofilización. Para ello, se emplearon dos tiempos de secado primario: 12 y 35 horas, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2: Ensayos de liofilización

	Proceso 1	Proceso 2
Tiempo del cultivo	14 días	18 días
Viabilidad inicial	$1,8 \cdot 10^9$ UFC·mL ⁻¹	$5,2 \cdot 10^8$ UFC·mL ⁻¹
Secado primario	5 °C, 12 horas	5 °C, 35 horas
Secado secundario	30 °C, 3 horas	30 °C, 3 horas
Crioprotector	Muestra 1: glicerol Muestra 2: sacarosa Muestra 3: trehalosa	Muestra 4: glicerol Muestra 5: sacarosa Muestra 6: trehalosa

La concentración celular se midió antes y después del proceso de liofilización. La concentración celular inicial (considerada común para todas las muestras a liofilizar) se determinó empleando uno de los controles negativos, mientras que tras el proceso las muestras liofilizadas se resuspendieron en 1mL de agua destilada estéril. En ambos casos se realizaron diluciones seriadas y siembra en Medio B (Tabla 1) solidificado en agarosa, y se incubaron las placas a 30 °C durante 12-14 días.

2.2.2 Congelación

Se llevó a cabo un ensayo de congelación a -20 °C y a -80 °C para determinar el efecto de esta técnica de conservación en la viabilidad de las muestras tras 14 y 28 días de congelación.

La congelación se realizó en dos formatos (Figura 1): a) criocongelación en viales Eppendorf, empleando un crioprotector en base a glicerol, otro en base a betaina y un último en base a una mezcla glicerol-betaina; b) congelación en crioviales comerciales que contienen glicerol (crioprotector) y unas perlas tipo rocalla (Cryoinstant, Scharlab).

2.2.2.1 Criocongelación en viales Eppendorf

Se centrifugaron durante 15 minutos (10000 rpm, 4 °C, Eppendorf 5810-R) 325 mL de cultivo distribuidos en cinco alícuotas de 65 mL. Eliminado el sobrenadante, cada pellet se lavó empleando 10-15 mL de agua destilada, se mezclaron las tres muestras resuspendidas en un único tubo, y la muestra resultante se centrifugó bajo las mismas condiciones previamente descritas. El pellet resultante fue resuspendido en 15 mL de agua destilada y se alícuotó en 13 viales estériles de 1.5 mL de volumen (Eppendorf), concretamente a 1 mL de pellet por vial.

Las alícuotas se centrifugaron (15 min, 10000 rpm, 4 °C, Eppendorf, 5415-R) y, por último, cada uno de los pellets obtenidos se resuspendió en 1 mL del correspondiente crioprotector: glicerol al 30% (p/v) esterilizado por autoclave (3 alícuotas), betaina al 6% (p/v) esterilizada

por filtración (3 alícuotas) y glicerol 30% (p/v) + betaina 6% (p/v) (3 alícuotas). Para este último caso, se prepararon por separado glicerol al 60% (p/v) esterilizado por autoclave y betaina al 12% (p/v) esterilizada por filtración, mezclándose en proporción 1:1. Asimismo, 4 alícuotas se resuspendieron empleando agua destilada (control negativo).

Las alícuotas (excepto una muestra control) se congelaron según la siguiente secuencia: incubación a 4 °C durante 30-40 minutos; incubación a -20 °C durante 1 hora; almacenamiento a -80 °C.

Se estudió la viabilidad de las células tras 14 y 28 días de congelación. La recuperación de los crioviales Eppendorf comenzó con la descongelación de las alícuotas correspondientes a 37 °C en un baño de agua. Para la eliminación de los restos de crioprotector se centrifugaron los crioviales a 10000 rpm y 4 °C durante 10 minutos. Se procedió al lavado del pellet con 1mL de medio de cultivo fresco para, a continuación, centrifugar el criovial de nuevo bajo mismas condiciones. Este proceso de lavado se realizó dos veces consecutivas, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet en 1 mL de agua destilada finalizado el proceso de lavado.

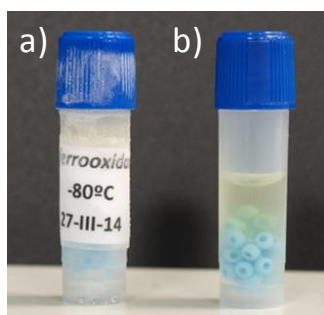
Se determinó la viabilidad del cultivo antes y después de la congelación mediante diluciones seriadas y recuentos celulares en Medio B solidificado en agarosa. La incubación se llevó a cabo a 30 °C durante 12 días aproximadamente. Para la determinación de la concentración celular inicial de las muestras se empleó uno de los controles negativos, considerándose este valor común para todas las muestras.

2.2.2.2 Congelación en crioviales comerciales

Al igual que en el caso del estudio de la congelación en viales Eppendorf, y bajo las mismas condiciones, el protocolo de congelación comenzó con un doble proceso de centrifugación-eliminación del sobrenadante, pasando a alícuotar el pellet resuspendido. En este caso se procedió a adicionar 1 ml de la muestra resuspendida en dos crioviales comerciales (Cryoinstant, Scharlab) (Figura 2), pasando entonces a ser congelados.

En el periodo de congelación, para cada criovial se escogió una temperatura diferente. Uno de ellos se congeló a -20 °C, mientras que el segundo criovial fue congelado hasta -80 °C con una secuencia diferente, congelándose primero durante 1 hora a -20 °C y pasando posteriormente a ser congelado hasta -80 °C.

Figura 2. Crioviales comerciales: a) criovial con cultivo de *A. ferrooxidans*, b) criovial comercial sin inocular.



Las muestras congeladas en ambos crioviales comerciales fueron descongeladas a temperatura ambiente tras 14 y 28 días de conservación. De cada criovial se extrajeron 2 perlas que fueron sembradas en Medio B solidificado en agarosa e incubadas a 30 °C hasta

el desarrollo de las colonias, obteniendo así la influencia tanto de la temperatura como del tiempo de congelación en la viabilidad final.

2.2.3 Secado

Se filtraron 200 mL de un cultivo de *A. ferrooxidans* con una viabilidad inicial de $3,5 \times 10^9$ UFC·mL⁻¹, empleando un filtro de 0,22 micras. El filtro se introdujo en una placa Petri estéril vacía y se incubó durante 24 horas a 30 °C, con el objetivo de secar la biomasa retenida en el mismo. Transcurrido el tiempo de secado se determinó la viabilidad de las células tras el proceso de preservación. Para ello, el filtrado seco fue resuspendido en 10 mL de agua destilada y se prepararon diluciones seriadas de la muestra, las cuales se sembraron en Medio B y se incubaron a 30 °C durante 12 días.

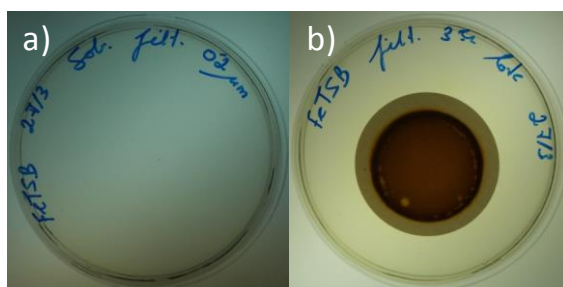
3. Resultados

3.1 Medio de cultivo y separación de la biomasa

Los medios de cultivo B y C permitieron desarrollar colonias en medio sólido en un plazo de 6-7 días de incubación a 28 °C. Por el contrario, no se observó desarrollo microbiano alguno en las placas con Medio A, incluso tras 11 días de incubación. El Medio B (FeTSB) fue el seleccionado para la realización de los recuentos de viabilidad del microorganismo, dada su menor complejidad.

La filtración del cultivo empleando filtros de 0,45 micras no permitió separar la biomasa del sobrenadante. A los 7-8 días de cultivo a 30 °C, se observó desarrollo microbiano tanto en el sobrenadante no filtrado como en el sobrenadante filtrado mediante los filtros de 0,45 micras. Por el contrario, el empleo de filtros de 0,22 micras, permitió la filtración efectiva del sobrenadante. A los 7 días de incubación a 30 °C se observó desarrollo microbiano únicamente en el caso de los microorganismos retenidos en el filtro, mientras que el sobrenadante no presentó crecimiento bacteriano alguno (Figuras 3a y 3b, respectivamente). De esta manera, se confirmó la posibilidad de usar filtros de 0,22 micras para la separación de la biomasa presente en los sobrenadantes.

Figura 3. Filtrado de un cultivo de 3 días: a) sobrenadante filtrado mediante un filtro de 0,22 micras, b) biomasa obtenida de la filtración del sobrenadante mediante un filtro de 0,22 micras.



3.2 Conservación de la cepa *A. ferrooxidans*

3.2.1 Liofilización

La única muestra completamente liofilizada cuando se estableció un tiempo de secado primario de 12 horas (Proceso 1) resultó ser el control negativo. Por el contrario, las muestras

procesadas en presencia de glicerol (5% p/v), sacarosa (18% p/v) ó trehalosa (15% p/v) presentaron restos de humedad, indicativo de que la duración del secado primario no fue suficiente.

En cuanto a la viabilidad obtenida inmediatamente tras el Proceso 1 (12 h de secado primario), solo el control negativo presentó una viabilidad superior a 10^5 UFC·mL⁻¹ (Tabla 3). A pesar de que en este primer ensayo el control negativo presentó entre 13 y 375 veces mejor viabilidad que las muestras tratadas con alguno de los crioprotectores, la viabilidad cayó 4 órdenes de magnitud respecto al valor inicial.

Tabla 3. Viabilidades de las muestras antes (UFC inicial) y después de ser liofilizadas (UFC liof.) en el primer ensayo de liofilización.

	Secado primario: 12 horas			Secado primario: 35 horas		
	UFC ₀	UFC _{liof}	% recup	UFC ₀	UFC _{liof}	% recup
Control negativo	$1,8 \cdot 10^9$	$1,0 \cdot 10^5$	$5,0 \cdot 10^{-3}$	$5,2 \cdot 10^8$	$9,0 \cdot 10^6$	1,7
Glicerol (5 %)	$1,8 \cdot 10^9$	$2,8 \cdot 10^2$	$2,0 \cdot 10^{-5}$	$5,2 \cdot 10^8$	$8,8 \cdot 10^6$	1,7
Sacarosa (18 %)	$1,8 \cdot 10^9$	$3,4 \cdot 10^3$	$2,0 \cdot 10^{-4}$	$5,2 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^6$	0,9
Trehalosa (15 %)	$1,8 \cdot 10^9$	$8,1 \cdot 10^3$	$4,0 \cdot 10^{-4}$	$5,2 \cdot 10^8$	$5,2 \cdot 10^6$	1,0

El incremento del tiempo de secado primario a 35 horas (Proceso 2) permitió que tanto el control negativo como la muestra tratada con trehalosa (15% p/v) quedaran completamente liofilizadas. Las muestras tratadas con glicerol (5% p/v) y sacarosa (18% p/v) siguieron presentando restos de humedad, indicativo de un liofilizado incompleto.

Tras el Proceso 2, la viabilidad de las muestras finales mejoró notablemente respecto a la liofilización en la que se empleó un tiempo de secado primario de 12 horas, a pesar de partir con una muestra con menor recuento celular inicial ($5,2 \cdot 10^8$ frente a $1,8 \cdot 10^9$ UFC·mL⁻¹). En este segundo caso, todas las muestras presentaron una viabilidad superior 10^6 UFC·mL⁻¹, cuando en el ensayo anterior solamente el control negativo presentó valores superiores a 10^5 UFC·mL⁻¹.

3.2.2. Congelación

3.2.2.1. Criocongelación en viales Eppendorf

La presencia de los diferentes crioprotectores empleados tuvo en efecto similar en las muestras independientemente del tiempo de congelación. Tanto tras 14 como 28 días de almacenamiento, las muestras que mejor viabilidad presentaron fueron aquellas congeladas en presencia de betaína y de agua destilada, tal y como se recoge en la Tabla 4. A pesar de que los otros dos crioprotectores empleados también permitieron recuperar el microorganismo tras la congelación, la viabilidad de las muestras fue mucho menor (Tabla 4).

Tabla 4. Viabilidades de las muestras congeladas, antes y recuperadas a los 14 y 28 días de haber sido congeladas.

	0 días	14 días	28 días	Viabilidad 28 vs. 0 días (%)
Control negativo	$1,3 \cdot 10^9$	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	15,2
Glicerol (5 %)	$1,3 \cdot 10^9$	$2,1 \cdot 10^4$	$4,4 \cdot 10^5$	0,03
Betaína (6 %)	$1,3 \cdot 10^9$	$5,0 \cdot 10^8$	$5,1 \cdot 10^8$	37,8
Betaína (6 %) + Glicerol (30 %)	$1,3 \cdot 10^9$	$1,2 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^7$	1,6

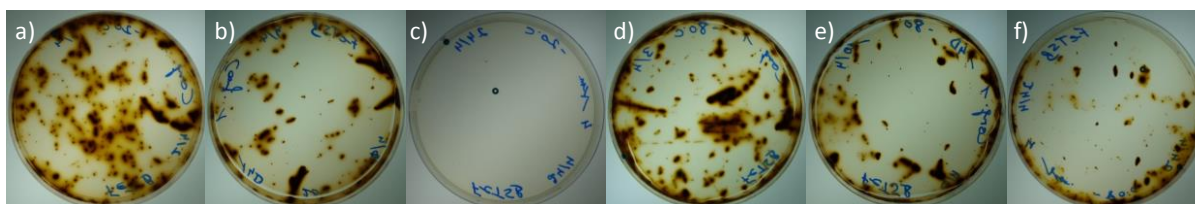
Las muestras almacenadas en presencia de betaína presentaron una viabilidad de $5,1 \times 10^8$ UFC·mL⁻¹ tras 28 días, lo cual implica que este método de conservación permite mantener una viabilidad del 37,8 % respecto al valor inicial. A pesar de que la adición de betaína permitió conservar hasta casi un 40% de la viabilidad original de la muestra, la muestra congelada en agua destilada mantuvo una viabilidad del 15% respecto a la inicial. Por lo tanto, la congelación en agua destilada permitiría recuperar eficientemente el microorganismo (recuentos superiores a 10^8 a los 28 días de la congelación), abaratando costes al no necesitar ningún tipo de agente crioprotector en el proceso.

Respecto al tiempo de congelación, se determinó que este parámetro (hasta 28 días) no tuvo una influencia apreciable en la viabilidad final de las muestras. Independientemente del crioprotector empleado, la viabilidad final fue muy similar tras 14 y 28 días de congelación (Tabla 4).

3.2.2.2 Congelación en crioviales comerciales

Respecto a las muestras congeladas y almacenadas en crioviales comerciales, la viabilidad de estas varió con el tiempo y con la temperatura de congelación testada. Tal y como se puede observar en la Figura 4, independientemente de la temperatura de congelación, la viabilidad fue disminuyendo a lo largo del tiempo. Sin embargo, en el caso de la muestra almacenada a -20 °C (Figuras 4a-4c), la caída en la viabilidad fue más acusada que en el caso de la muestra almacenada a -80 °C (Figuras 4d-4f). Si con la muestra almacenada a -80 °C, a los 28 días todavía fue posible recuperar el microorganismo (Figura 4f), a -20 °C no creció ninguna colonia (Figura 4c).

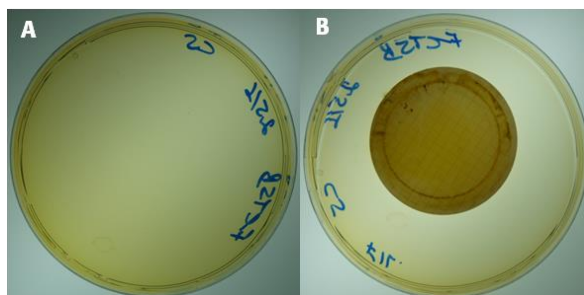
Figura 4. Viabilidad del microorganismo congelado a -20 °C (A, B, C) y -80 °C (D, E, F) en crioviales comerciales: a) criovial -20 °C recuperado a los 7 días de congelación, b) criovial -20 °C recuperado a los 14 días de congelación, c) criovial -20 °C recuperado a los 28 días de congelación, d) criovial -80 °C recuperado a los 7 días de congelación, e) criovial -80 °C recuperado a los 14 días de congelación, f) criovial -80 °C recuperado a los 28 días de congelación.



3.3 Secado

En cuanto a los resultados obtenidos tras el secado del filtro a 30 °C durante 24 horas, se concluyó que el secado del mismo afectaba negativamente a la viabilidad del mismo (Figura 5), cayendo hasta un valor de cero. A los 12 días de incubación a 30 °C, en ninguna de las diluciones se observó crecimiento microbiano. Asimismo, la muestra sembrada sin diluir (Figura 5a), así como la siembra directa del filtro lavado en Medio B (Figura 5b), tampoco presentaron crecimiento microbiano.

Figura 5. Biomasa seca durante 24 horas a 30 °C: a) biomasa seca y resuspendida en agua destilada estéril, b) siembra del filtro después de haber resuspendido la biomasa retenida en el filtro seco.



4. Conclusiones

El medio FeTSB (Medio B) resultó ser el más adecuado de los tres testeados para el cultivo de *A. ferrooxidans*, debido a su simplicidad. El empleo de filtros de 0,22 micras permitió obtener un filtrado completamente estéril.

La liofilización afectó negativamente a la viabilidad de la cepa estudiada, ya que el porcentaje de recuperación tras el proceso de liofilización no superó el 2% en ninguno de los casos. Un incremento del tiempo de secado primario de 12 a 35 horas permitió mejorar el secado de algunas de las muestras liofilizadas, si bien aún tras ese incremento las muestras resuspendidas en glicerol (5% p/v) y sacarosa (18% p/v) todavía presentaban un grado de humedad notable.

El secado resultó ser un proceso no apto para la preservación de *A. ferrooxidans*, ya que anuló toda posibilidad de crecimiento microbiano tras el proceso.

El proceso de criocongelación en viales Eppendorf mostró una alta dependencia del tipo de crioprotector empleado, obteniendo los porcentajes de recuperación más elevados para el caso del control negativo y la betaína (un 15% y un 40%, respectivamente). Sin embargo, el tiempo de congelación, hasta 28 días, no tuvo influencia en la viabilidad celular. Por el contrario, la viabilidad de las muestras disminuyó de manera apreciable con el tiempo de congelación en las muestras congeladas en los crioviales comerciales. La temperatura también resultó ser un factor importante, habiéndose obtenido mejores resultados almacenando las muestras a -80 °C.

Por tanto, la congelación a -80 °C empleando crioviales Eppendorf o crioviales comerciales es el procedimiento que proporciona los mejores resultados respecto de la viabilidad para los microorganismos del tipo *A. ferrooxidans* estudiados en este trabajo.

5. Referencias

- Chang, J.H., Hocheng, H., Chang, H.Y., & Shih, A., (2008). Metal removal rate of *Thiobacillus thiooxidans* without pre-secreted metabolite. *Journal of Materials Processing Technology*, 201, 560-564.
- Eskandarian, M., Karimi, A., & Shabgard, M., (2013). Studies on enzymatic biomachining of copper by glucose oxidase. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44, 331-335.

- García López, M.D., López-Coronado, J.M., López-Ocaña, L., & Uruburu Fernández, F., (2011). Preservation of microbial strains in the wine industry. *Molecular Wine Microbiology*, 303-318.
- Hocheng, H., Jadhav, U.U., & Chang, J.H., (2012). Biomachining rates of various metals by *Acidithiobacillus thiooxidans*. *International Journal of Surface Science and Engineering*, 6 (1/2), 101-111.
- Hocheng, H., & Jadhav, U., (2015). Process of biological machining. A.Y.C. Nee (Ed.). *Handbook of manufacturing Engineering and Technology* (pp. 1687-1713). London: Springer-Verlag.
- Jadhav, U., & Hocheng, H., (2014). Use of *Aspergillus niger* 34770 culture supernatant for tin metal removal. *Corrosion science*, 82, 248-254.
- Johnson, D.B., Macvicar, J.H.M., & Rolfe, S., (1987). A new solid medium for the isolation and enumeration of *Thiobacillus ferrooxidans* and acidophilic heterotrophic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 7, 9-18.
- Kurtzman, C.P., & Labeda, D.P., (2009). Type culture collections and their databases. Third Edition. *Encyclopedia of Microbiology* (pp. 306-312). Elsevier Inc.
- Masoumik, S.M., Hanim Abdul-Rashid S., & Udoncy Olugu, E., (2015). Importance-Performance analysis of green strategy adoption within the Malaysian manufacturing industry. *Procedia CIRP*, 26, 646-652.
- Robertson, L.A., & Gijs-Kuenen, J., (2006). The genus *Thiobacillus*. *Prokaryotes*, 5, 812-827.
- Saragih, A.S., & Jo Ko, T., (2013). Development of digital lithography masking method with focusing mechanism for fabrication of micro-feature on biomachining process. *Journal of Mechanical Science and Technology*, 27 (10), 3017-3022.
- Shikata, S., Sreekumari, K.R., Nandakumar, K., Ozawa, M., & Kikuchi, Y., (2009). Laboratory studies on biomachining of copper using *Staphylococcus* sp. *Biofouling*, 25 (9), 557-562.
- Sugio, T., Domatsu, C., Tano, T., & Imai K., (1984). Role of ferrous ions in synthetic cobaltous sulfide leaching of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 48 (3), 461-467.
- Suwandi, D., Whulanza, Y., & Istiyanto, J., (2014). Visible light maskless photolithography for biomachining application. *Applied Mechanics and Materials*, 493, 552-557.
- Uno, Y., Kaneeda, T., & Yokomizo, S., (1993). Bio-machining of metals by bacteria *Thiobacillus ferrooxidans*. *Proceedings of the 7th International Precision Engineering Seminar*, 290-301.
- Yang, Y., Wang, X., Liu, Y., Wang, S., & Wen, W., (2009). Techniques for micromachining using *Thiobacillus ferrooxidans* based on different culture medium. *Applied Mechanics and Materials*, 16-19, 1053-1057.

