



Revista de la Facultad de Agronomía.
Vol. 2. Nº 4. Enero-Junio 1974.
Universidad del Zulia-Maracaibo-Venezuela.

Cultivo Continuo de Microorganismos *

Eovaldo Hernández**

RESUMEN

Se presentan los fundamentos teóricos del cultivo continuo de microorganismos, señalándose las aplicaciones prácticas de este tipo de cultivo, particularmente en la producción de proteína unicelular, producción de enzimas, cultivo de células animales y vegetales, estudios de purificación de efluentes y de la ecología de ambientes naturales y estudios de procesos ruminales.

ABSTRACT

The theoretical basis of chemostat culture is presented. Practical applications are indicated, mainly production of single cell protein, production of enzymes, culture of animal and plant cells, studies of effluent treatment, studies of the ecology of natural environments and of rumen processes.

INTRODUCCION

El interés en el cultivo continuo de microorganismos comenzó a desarrollarse a partir de 1950. Fue en ese año cuando se hicieron los primeros aná-

* Recibido para su publicación el 9-1-74.

** Ph. D., Departamento de Química, Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, Apartado 526, Maracaibo, Venezuela.

lisis teóricos de este tipo de fermentación. La teoría del quimostato fue desarrollada por Monod⁹, Novick y Szilard¹⁰ y Herbert et al.⁴.

Existen varios tipos de cultivo continuo, todos ellos derivados de dos tipos básicos: 1) el quimostato y 2) el cultivo en flujo de pistón (plug-flow culture). En el quimostato ideal, el cultivo está completamente mezclado, mientras que en el flujo de pistón, el cultivo fluye dentro de un recipiente tubular sin mezclarse. Pirt¹¹ ha propuesto la expresión "cultivo en flujo continuo" para abarcar todos los métodos de cultivo continuo, ya que la expresión "cultivo continuo" es aplicada, en particular, al cultivo de células de tejidos con un significado completamente diferente al empleado cuando se cultivan microorganismos.

SISTEMAS ABIERTOS Y CERRADOS

Herbert³ introdujo el concepto de sistemas de cultivo abiertos y cerrados. Un sistema de cultivo es abierto cuando hay entrada (sustratos) y salida (biomasa y productos) de material. Un sistema cerrado es aquel donde no hay entrada ni salida de materiales. En teoría, en los sistemas abiertos se llega a un equilibrio entre la producción de biomasa y la formación de productos, alcanzándose un estado de flujo estacionario (steady-state) en el cual las condiciones del sistema se pueden mantener indefinidamente. En un sistema cerrado solamente son posibles estados transitorios, en los cuales las condiciones del sistema van cambiando continuamente hasta alcanzar un estado final estático. La expresión "cultivo por cargas" es sinónimo de cultivo en un sistema cerrado. El quimostato y el cultivo en flujo de pistón son sistemas abiertos que difieren fundamentalmente en las condiciones del cultivo y en la naturaleza de los estados de flujo estacionario que en ellos se alcanza.

CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS (CULTIVO POR CARGAS)

Antes de discutir la teoría del cultivo continuo de microorganismos es conveniente revisar algunos conceptos del cultivo por cargas, ya que estos conceptos son importantes para entender lo que sucede en un cultivo continuo.

El ciclo de crecimiento microbiano

Si un número de microorganismos vivos (bacterias, levaduras, etc.) se inocula en un volumen determinado de una solución (medio) conteniendo: a) C, H, O, N, S, P, K, Mg y elementos traza (Fe, Mn, Zn, Cu); b) una fuente de energía; c) condiciones físico-químicas adecuadas (pH, temperatura, concentración de CO₂, O₂) y d) en ausencia de inhibidores, los microorganismos crecerán en el medio, de tal modo que pasarán por las siguientes etapas:

1) Una fase de latencia, antes de que las células comiencen a dividirse (Fig. 1a).

2) Una fase de crecimiento exponencial o logarítmico, durante la cual las células se dividen a una velocidad constante (Fig. 1b).

3) Una fase estacionaria, donde la división celular cesa (Fig. 1c).

La secuencia de cambios (fases de latencia, exponencial y estacionaria) ha sido analizada en detalle^{7,8} y se conoce, en conjunto, como ciclo de crecimiento microbiano, el cual se representa en la Fig. 1.

Fase de crecimiento exponencial

En la fase de crecimiento exponencial, los microorganismos aumentan de tamaño hasta alcanzar un tamaño al cual se dividen, originando dos nuevos microorganismos que, a su vez, crecen y se dividen de nuevo. En lugar de hablar de microorganismos individuales, se puede hablar de aumento de biomasa. La velocidad de crecimiento o aumento de biomasa, dx , en un intervalo de tiempo infinitamente pequeño, dt , es proporcional a la cantidad de biomasa existente en el sistema

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (1)$$

La constante de proporcionalidad, μ , es la velocidad o rata específica de crecimiento. Integrando la ecuación 1:

$$\frac{dx}{x} = \mu dt \quad \int_{x_0}^x \frac{dx}{x} = \mu \int_0^t dt$$

$$\ln x - \ln x_0 = \mu t \quad \ln x = \mu t + \ln x_0 \quad (2)$$

expresión que es la ecuación de una línea recta (Fig. 2). La ecuación 2 puede escribirse de las siguientes maneras:

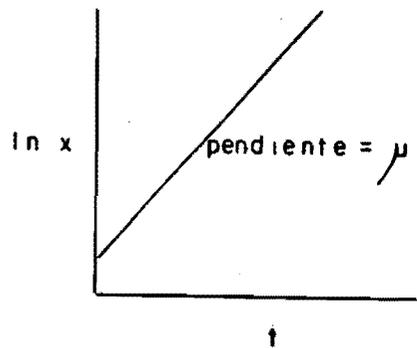
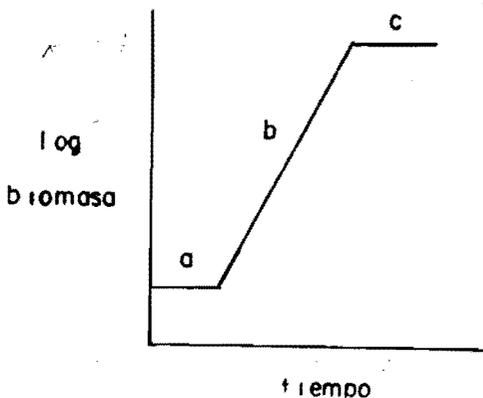


Fig. 1. Ciclo de crecimiento microbiano.

Fig. 2. Fase exponencial de crecimiento microbiano.

$$\ln \frac{x}{x_0} = \mu t \quad (3)$$

es decir,

$$\frac{x}{x_0} = e^{\mu t} \quad (4)$$

La expresión 4 se conoce como grado de multiplicación.

El tiempo necesario para que la población microbiana se duplique,

$$x = 2 x_0,$$

se conoce como tiempo de duplicación, t_d , y se puede calcular sustituyendo en la ecuación 3:

$$\ln \frac{2 x_0}{x_0} = \mu t_d ; t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,693}{\mu} \quad (5)$$

expresión que relaciona la velocidad específica de crecimiento, μ , con el tiempo de duplicación, t_d , usado en la microbiología tradicional. Generalmente, μ y t_d son constantes, pero las condiciones del medio de cultivo, particularmente la concentración de varios nutrientes esenciales, afecta sus valores. Si la concentración de uno de esos nutrientes esenciales decrece a un nivel bajo, la velocidad específica de crecimiento decrece igualmente.

Monod⁷ demostró que la relación entre la velocidad específica de crecimiento, μ , y la concentración de sustrato limitante, s , puede expresarse mediante una función del tipo de Michaelis-Menten, característica de las reacciones enzimáticas:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{s}{s + K_s}$$

donde,

μ = velocidad específica de crecimiento

μ_{\max} = máxima velocidad específica de crecimiento

s = concentración de sustrato limitante

K_s = constante de saturación (concentración de sustrato cuando

$$\mu = \frac{\mu_{\max}}{2}$$

En un cultivo por cargas, todos los nutrientes se encuentran inicialmente en exceso, de modo que durante la fase de crecimiento exponencial, la velocidad de crecimiento es generalmente igual a μ_{\max} .

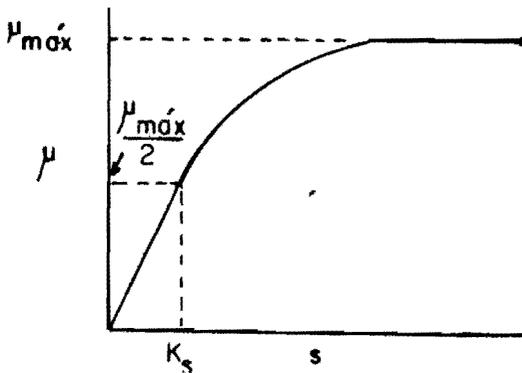


Fig. 3. Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad específica de crecimiento.

Monod⁷ también observó que, si las condiciones del medio se mantienen constantes, las velocidades de crecimiento de los microorganismos y de consumo de sustrato son proporcionales:

$$\frac{dx}{dt} = Y \frac{ds}{dt} \quad (7)$$

la constante de proporcionalidad, Y, se conoce como rendimiento y se expresa en gramos de células producidas por gramo de sustrato consumido o en gramos de células producidas por mol de sustrato consumido.

El conocimiento de $\mu_{\text{máx}}$, K_s e Y permite una descripción cuantitativa del crecimiento exponencial en un cultivo por cargas^{4 7}.

CULTIVO CONTINUO

Veamos a continuación los dos tipos básicos de cultivo continuo: 1) el cultivo en flujo de pistón y 2) el quimostato.

SISTEMA DE CULTIVO EN FLUJO DE PISTON

En el sistema de flujo de pistón, el sustrato, los demás componentes del medio y el inóculo se mezclan a la entrada de un recipiente tubular y viajan luego a lo largo del tubo sin mezclarse con otras porciones del medio contenido en el recipiente (Fig. 4). El sistema es esencialmente un cultivo por cargas, pero la secuencia de condiciones, que en un sistema cerrado están separadas en el tiempo, aquí están separadas espacialmente. La biomasa en un cultivo en flujo de pistón está sujeta a condiciones cambiantes a medida que viaja a lo largo del tubo.

Idealmente, en este tipo de cultivo se deben cumplir las siguientes condiciones: 1) el sustrato que limita el crecimiento no es agotado durante el recorrido del pistón y por el recipiente tubular; 2) $s \gg K_s$ (ver pág. 98) y 3) $\mu \cong \mu_{\text{máx}}$ (ver pág. 98).

El tiempo que tarda el pistón en recorrer el tubo, conocido como tiempo de residencia o tiempo de reemplazo, t_r , del cultivo en el fermentador,

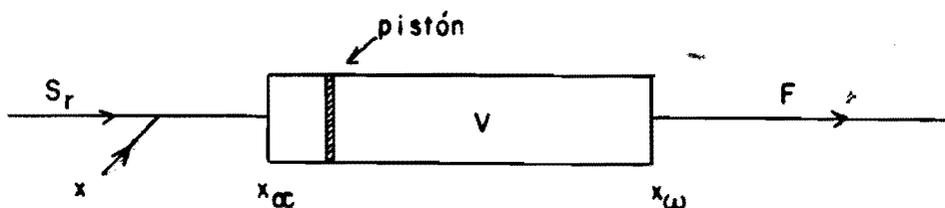


Fig. 4. Esquema de un sistema de cultivo en flujo de pistón. V es el volumen del recipiente tubular (usualmente, en litros); F es la rata de flujo del cultivo a través del fermentador (usualmente, en litros/hora); S_r es la concentración inicial del sustrato que limita el crecimiento; x_α y x_ω son las concentraciones de biomasa a la entrada y a la salida del recipiente tubular, respectivamente.

viene dado por la expresión

$$t_r = V/F,$$

donde V es el volumen del recipiente y F la rata de flujo del cultivo (Fig. 4). La cantidad de biomasa producida durante el tiempo de residencia del cultivo en el fermentador viene expresada por el grado de multiplicación (ecuación 4):

$$\frac{x_\omega}{x_\alpha} = e^{\mu_{\max} t_r}$$

Este sistema, provisto de recirculación (feed-back), Fig. 5, tiene la ventaja sobre el sistema por cargas de no necesitar subcultivos para pasar de un cultivo a otro.

El sistema presenta dificultades de aireación y en la práctica el medio del pistón siempre se mezcla algo con porciones adyacentes de medio en el recipiente. Además, la velocidad de flujo varía en las diferentes partes del fermentador. Se puede lograr una aproximación al tipo ideal de cultivo en flujo de pistón cuando se emplean una serie de compartimientos tubulares, en lugar de utilizar un solo recipiente.

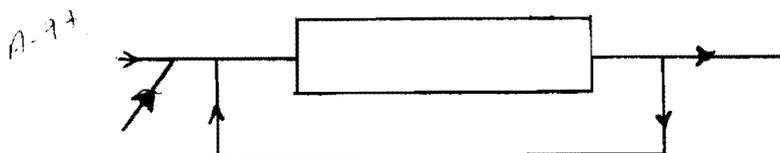


Fig. 5. Esquema de un sistema de cultivo en flujo de pistón con recirculación.

El principal uso de este sistema es la purificación de efluentes (tratamiento de aguas negras, etc.).

QUIMOSTATO

Teoría

En un sistema de fermentación continua, la parte más interesante, desde el punto de vista teórico, es el fermentador o reactor. En la Fig. 6 se pre-

senta el esquema de un quimostato. El recipiente ideal debe satisfacer las siguientes condiciones:

1. El volumen del cultivo en el fermentador y la rata de flujo de nutriente deben permanecer constantes.
2. El mezclado debe ser "perfecto", lo que requiere agitación vigorosa.
3. En cultivos aeróbicos, la concentración de oxígeno disuelto no debe limitar el crecimiento. Debe ser lo bastante elevada para evitar que tenga lugar una mezcla de respiración oxidativa y fermentativa.

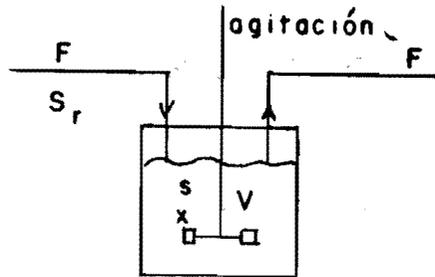


Fig. 6. Quimostato. V , volumen del cultivo; F , rata de flujo; V/F , tiempo promedio de residencia; x , concentración de biomasa; S_r , concentración de sustrato limitante en el medio fresco; s , concentración de sustrato limitante en el cultivo.

Todos los cultivos continuos comienzan como cultivos por cargas, ya que el medio contenido en el fermentador es inoculado con microorganismos, que crecen tal como se ha descrito anteriormente (págs. 96, 97, 98 y 99). Sin embargo, si durante la fase de crecimiento exponencial se añade medio fresco al fermentador a una velocidad tal que la densidad de microorganismos en el recipiente se mantenga constante, el crecimiento continuará indefinidamente. Obviamente, se hace necesario añadir un dispositivo para mantener constante el volumen del fermentador, ya que, si no se hace, la velocidad de entrada de medio fresco y el volumen del cultivo aumentarían exponencialmente con la biomasa. El volumen se mantiene constante mediante un dispositivo adecuado (usualmente, un tubo de rebose) y el medio fresco es bombeado a una rata de flujo constante.

La población microbiana en el fermentador es controlada por la entrada de medio conteniendo un nutriente que limita el crecimiento; es decir, el medio contiene en exceso todas las sustancias esenciales para el crecimiento de los microorganismos, excepto una que se encuentra a una concentración suficiente para soportar un crecimiento limitado.

Si en el quimostato, el cultivo se deja crecer como si fuera por cargas, el crecimiento cesará cuando se agote el nutriente limitante. Si en ese instante

se bombea medio fresco a baja velocidad, los microorganismos continuarán creciendo. Pero lo harán a una velocidad proporcional a la velocidad de entrada de medio fresco; es decir, a una velocidad proporcional a la rata de entrada del nutriente que limita el crecimiento. Es obvio que la velocidad de crecimiento no depende únicamente de la rata de flujo del medio, sino que depende realmente de la rata de dilución, D , es decir, del número de volúmenes, V , de medio que pasan por el fermentador en la unidad de tiempo, $D = F/V$ (D tiene las dimensiones de tiempo⁻¹, usualmente horas⁻¹). En otras palabras, dos quimostatos de diferentes dimensiones contendrían organismos creciendo a ratas iguales, si las ratas de dilución de los dos quimostatos fueran iguales, aunque sus ratas de flujo de nutriente sean diferentes. De modo análogo, los organismos cultivados en un quimostato de 1 litro de capacidad, con medio fluyendo a una rata de 1 litro/hora, crecerán 10 veces más rápidamente que los organismos cultivados en un quimostato de 10 litros de capacidad, con medio fluyendo a la misma rata de 1 litro/hora¹².

Balance de Biomasa

Para comprender la cinética del crecimiento microbiano en el quimostato, es esencial entender la relación existente entre la rata de dilución, D , y la rata de crecimiento. En el quimostato, los microorganismos crecen y son, simultáneamente, lavados. El aumento neto de biomasa estará determinado por las velocidades relativas de cada proceso.

Aumento neto de biomasa = Crecimiento - Lavado

$$V dx = V \mu x dt - F x dt$$

dividiendo por $V dt$,

$$\frac{dx}{dt} = \mu x - \frac{F}{V} x$$

sustituyendo $F/V = D$ (rata de dilución, en hr⁻¹),

$$\frac{dx}{dt} = (\mu - D) x \quad (8)$$

sustituyendo μ por su valor (ecuación 6), la ecuación 8 se convierte en:

$$\frac{dx}{dt} = x \left[\mu_{\text{max}} \left(\frac{s}{K_s + s} \right) - D \right] \quad (9)$$

De la ecuación 8, se deduce que si $\mu > D$, dx/dt será positivo y la concentración de microorganismos en el fermentador aumentará con el tiempo. Por el contrario, si $\mu < D$, dx/dt será negativo, es decir, la concentración de microorganismos disminuirá con el tiempo, a medida que el cultivo es "lavado" del fermentador. Cuando no haya cambio de biomasa (estado de flujo estacionario, "steady-state"),

$$\frac{dx}{dt} = 0 ; (\mu - D) \bar{x} = 0 ; \mu = D \quad (10)$$

donde \bar{x} es la concentración de biomasa en el estado de flujo estacionario.

Es decir, en el quimostato la velocidad de crecimiento de los microorganismos se controla automáticamente, con tal que la rata de dilución se mantenga constante.

Como la velocidad de crecimiento está controlada por la rata de dilución, la velocidad o rata de crecimiento puede ajustarse, dentro de ciertos límites, a cualquier valor que se desee. Sin embargo, la velocidad específica de crecimiento, μ , no puede ser superior a μ_{\max} (ecuación 6), por lo que no se

pueden lograr condiciones de flujo estacionario a ratas de dilución superiores a un valor de D , denominado valor crítico, D_c , casi igual al valor de μ_{\max} . Si se

usa una rata de dilución mayor que D_c , el cultivo es lavado del fermentador. En el otro extremo, en la zona de las bajas ratas de dilución, la existencia de una mínima velocidad de crecimiento es especulativa. Aunque, para microorganismos creciendo a temperatura y pH óptimos, el valor de esta rata mínima de crecimiento es probablemente inferior a $0.05 \mu_{\max}$ ¹².

Balance de Sustrato Limitante del Crecimiento

Para entender cuantitativamente lo que sucede en el quimostato, se debe considerar también el efecto de la rata de dilución sobre la concentración del sustrato que limita el crecimiento. El sustrato entra al fermentador a una concentración S_r ; es consumido por los microorganismos y sale del fermentador, mezclado con células, a una concentración s (Fig. 6). La variación neta en la concentración de sustrato, como consecuencia de su paso por el quimostato, viene dada por la siguiente expresión:

Aumento neto = Entrada — Salida — Sustrato utilizado para el crecimiento microbiano.

$$V ds = F S_r dt - F s dt - \frac{V \mu x dt}{Y}$$

Dividiendo por $V dt$,

$$\frac{ds}{dt} = \frac{F}{V} (S_r - s) - \frac{\mu x}{Y}$$

sustituyendo μ por su valor (ecuación 6) y F/V por D ,

$$\frac{ds}{dt} = D (S_r - s) - \frac{\mu_{\max} x}{Y} \left(\frac{s}{K_s + s} \right) \quad (11)$$

Las ecuaciones 5, 6, 9 y 11 definen cuantitativamente el comportamiento de un cultivo en el quimostato. Cualquiera que sea el estado inicial del cultivo, siempre se alcanzará un estado de flujo estacionario. Consideremos, por ejemplo, la situación existente un instante después de inocular el medio contenido en el fermentador con una suspensión de microorganismos. En ese momento, x es pequeña y s es grande (casi igual a S_r); suponiendo que $S_r \gg K_s$ y que el microorganismo responde instantáneamente, la rata específica de crecimiento será entonces casi igual a μ_{\max} , y la ecuación 9 toma la forma siguiente:

$$\frac{dx}{dt} \cong x (\mu_{\max} - D)$$

Si se usa una rata de dilución que sea baja en relación con μ_{\max} , la concentración de microorganismos en el quimostato aumentará rápidamente y s decrecerá también rápidamente. Cuando s decrece, también decrece μ (ecuación 6). Finalmente, el valor de μ se acercará al valor de D y en ese momento la rata de consumo de sustrato (más la cantidad que sale del fermentador) será igual a la rata de entrada de sustrato con el medio fresco. Cualquier fluctuación que pueda ocurrir en el flujo estacionario (debida, por ejemplo, a fallas en el funcionamiento del quimostato) inicia una serie de acontecimientos opuestos que tienden a volver el sistema al flujo estacionario. Supongamos que F decrece temporalmente. La población microbiana aumentará (Fig. 7, punto A) y, como consecuencia, la concentración de sustrato disminuirá. Al bajar la concentración de sustrato, disminuirá la concentración de microorganismos, recobrándose los niveles de \bar{x} y \bar{s} iniciales. Una situación similar se presenta cuando F aumenta temporalmente (Fig. 7, punto B).

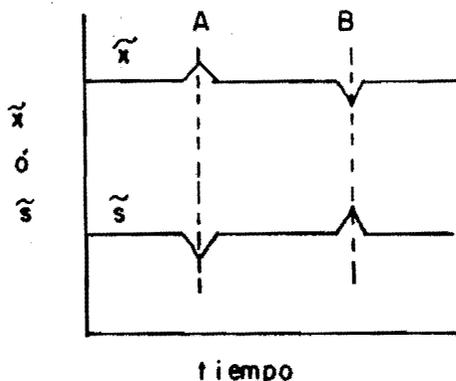


Fig. 7. Autorregulación en el quimostato.

Es decir, en el quimostato las fluctuaciones temporales que pueden ocurrir son corregidas automáticamente.

En el estado de flujo estacionario $ds/dt = 0$, y la ecuación 11 se convierte en

$$D (S_r - \tilde{s}) - \frac{\mu_{\max} \tilde{x}}{Y} \left(\frac{s}{K_s + s} \right) = 0$$

como en el estado de flujo estacionario

$$\mu = \mu_{\max} \frac{s}{K_s + s} = D$$

$$(S_r - \tilde{s}) = \frac{\tilde{x}}{Y}, \text{ es decir, } \tilde{x} = Y (S_r - \tilde{s}) \quad (12)$$

De la ecuación 9 (en el estado de flujo estacionario $dx/dt = 0$) resulta

$$\mu_{\max} \frac{\tilde{s}}{K_s + \tilde{s}} - D = 0 \text{ y } \tilde{s} = K_s \frac{D}{\mu_{\max} - D} \quad (13)$$

sustituyendo el valor de \tilde{s} en la ecuación 12

$$\tilde{x} = Y \left[S_r - K_s \left(\frac{D}{\mu_{\max} - D} \right) \right] \quad (14)$$

La variación de \tilde{x} ó \tilde{s} con la rata de dilución se representa en la Fig. 8. A medida que aumenta la rata de dilución, D , el sustrato, s , es completamente usado para mantener una población microbiana, \tilde{x} , constante. Cuando D alcanza el valor crítico, D_c , $\tilde{s} = S_r$, es decir,

$$D_c = \mu_{\max} \frac{S_r}{K_s + S_r}$$

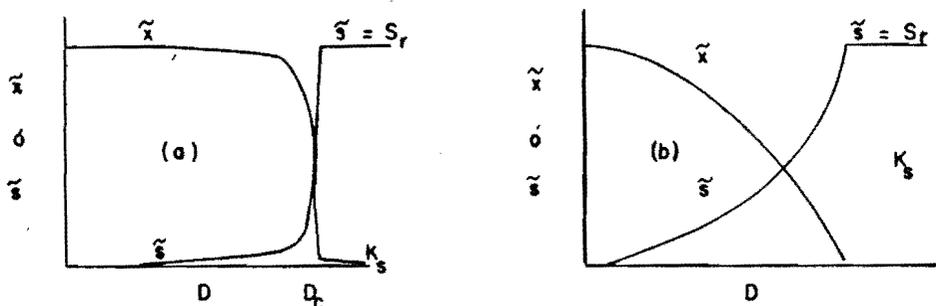


Fig. 8. Efecto de la rata de dilución, D , sobre la concentración de microorganismos, \tilde{x} , y de sustrato limitante, \tilde{s} , en el estado de flujo estacionario en el quimostato: (a) cuando $K_s \ll S_r$, y (b) cuando K_s es grande en relación con S_r .

y el cultivo es lavado del fermentador. Siempre que $S_r \gg K_s$ este valor de D_c es aproximadamente igual a μ_{\max}

$$D_c \cong \mu_{\max}$$

de tal modo que, realizando experimentos a D cada vez mayores, se puede obtener experimentalmente la máxima velocidad específica de crecimiento, μ_{\max}

Cuando K_s es grande con respecto a S_r , la variación de \bar{x} y \bar{s} con la rata de dilución es del tipo representado en la Fig. 8 b.

Producción de biomasa

Un aspecto importante en la operación de un quimostato es la rata de producción de biomasa y de sustancias celulares. La rata de producción de biomasa por unidad de volumen es el producto de la concentración de células por la rata de dilución

$$\text{Biomasa producida} = D\bar{x}$$

sustituyendo el valor de \bar{x} (ecuación 14),

$$\text{Biomasa producida} = D\bar{x} = D Y \left[S_r - K_s \left(\frac{D}{\mu_{\max} - D} \right) \right] \quad (15)$$

Usualmente K_s es pequeño comparado con S_r y a ratas de dilución inferiores al valor crítico, D_c , la biomasa producida es aproximadamente igual a $D Y S_r$. Pero para valores de D cercanos al valor crítico, donde $D = \mu_{\max}$,

la expresión

$$K_s \left(\frac{D}{\mu_{\max} - D} \right)$$

tiende a infinito y la biomasa producida, $D\bar{x}$, desciende a cero. Estos cambios en la producción de biomasa con la rata de dilución se muestran gráficamente en la Fig. 9. Para la producción de proteína microbiana se debe operar el quimostato a una rata de dilución que produzca el máximo de biomasa (Fig. 9, punto A).

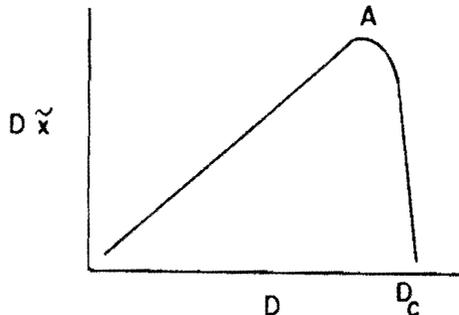


Fig. 9. Efecto de la rata de dilución sobre la producción de biomasa.

Aspectos prácticos

Todo cultivo continuo debe cumplir las siguientes condiciones:

- 1) El cultivo debe estar contenido en un recipiente protegido de organismos contaminantes.
- 2) La rata de flujo de nutriente fresco estéril debe mantenerse constante y poder modificarse cuando se desee.
- 3) El volumen del cultivo debe mantenerse constante.
- 4) El mezclado gas-líquido debe ser lo más perfecto posible.
- 5) La aireación debe ser tal que el oxígeno no sea limitante, a menos que se desee así.
- 6) La temperatura del cultivo debe ser controlable.
- 7) Si el cultivo lo requiere, deben existir controles de pH, oxígeno disuelto y antiespumante.

Estos requerimientos básicos se cumplen en el aparato esquematizado en la Fig. 10.

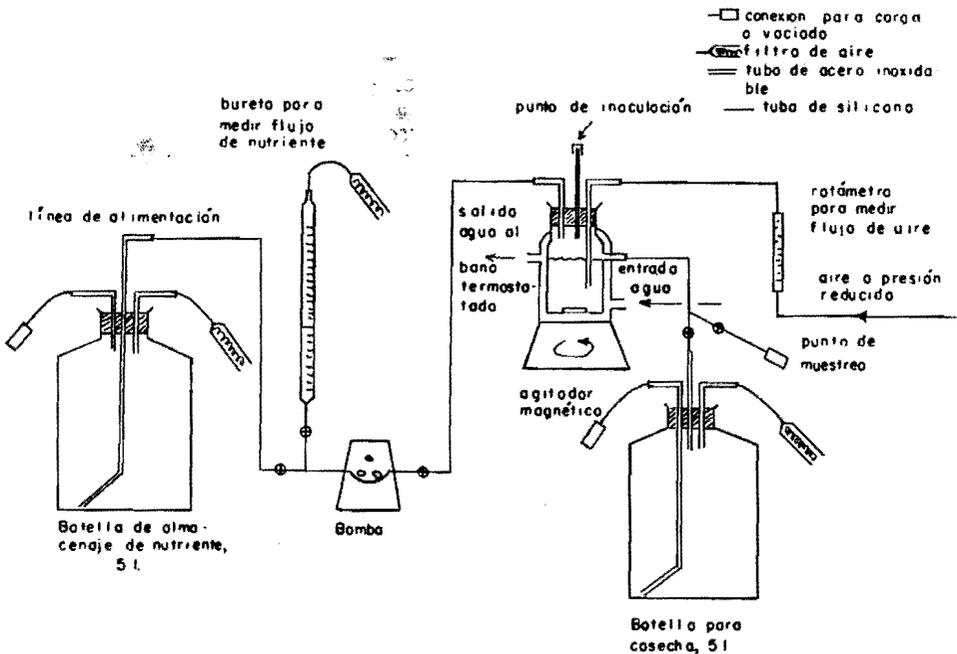


Fig. 10. Aparato para el cultivo continuo de microorganismos a escala de laboratorio (fermentador de 100 ml).

Según el instrumento sea para trabajar a escala de laboratorio (fermentadores con volúmenes desde 100 ml hasta 8 a 10 litros) o para trabajar a nivel de planta piloto o industrial, el diseño del equipo y el tipo de material a emplear en su construcción varía.

Tanto a escala de laboratorio, como a escalas mayores, la construcción de un quimostato comprende dos partes. Una es el fermentador con sus accesorios, la otra es la "unidad de control". La primera parte está constituida por el fermentador, agitador, recipientes de nutriente fresco y cosecha de células, bombas o válvulas operadas por solenoides, recipientes de antiespumante, recipientes de ácido y base para el control de pH. La segunda unidad contiene los controles de temperatura, pH, flujo de aire, oxígeno disuelto, antiespumante y otros controles que se consideren necesarios (por ejemplo, CO₂).

Diseños y detalles de construcción de quimostatos de 0.5 y 1 litro, indicando materiales a utilizar, controles y datos operacionales, se consiguen en la literatura^{2 5}.

Ventajas y aplicaciones del quimostato

El quimostato tiene las siguientes ventajas sobre otros tipos de cultivo de microorganismos:

- 1) Permite controlar la rata de crecimiento en un ambiente constante. Usando el quimostato se ha estudiado el efecto de la rata de crecimiento sobre la síntesis de ADN y ARN, sobre el tamaño de las células y sobre la actividad de las enzimas respiratorias en cultivos de bacterias.
- 2) La rata de crecimiento puede mantenerse constante, mientras las condiciones físicas y nutricionales varían. Así se ha elucidado el efecto de la temperatura sobre la síntesis de ARN.
- 3) Permite cultivar microorganismos bajo condiciones de limitación del crecimiento por un sustrato. Así se encontró que cultivando bacterias Gram-positivas bajo condiciones de limitación del crecimiento por fosfato, la composición de su pared celular es diferente que cuando hay exceso de fosfato; la pared celular contiene ácido teicoico cuando las células crecen en exceso de fosfato y ácido teicurónico cuando el fosfato es limitante.
- 4) Permite ajustar la biomasa de un cultivo a un estado de flujo estacionario en un ambiente definido. De este modo se pueden separar los efectos del ambiente de la historia del microorganismo, es decir, se pueden lograr estados del cultivo independientes del tiempo.
- 5) Permite la conversión rápida de sustrato en biomasa y productos. Por esta razón, el quimostato es el instrumento a usar para la producción de biomasa en gran escala.

Las aplicaciones del quimostato se pueden resumir en los siguientes puntos:

1) Estudio de la fisiología de microorganismos y células animales y vegetales en condiciones constantes.

2) Producción de biomasa.

La producción de biomasa es la base de la producción de proteína microbiana.

3) Transformación de sustratos: fermentación de metabolitos secundarios e intermediarios.

Los microbios pueden usarse para convertir un sustrato en otro compuesto. Así, por ejemplo, la glucosa puede ser oxidada a ácido glucónico, los hidrocarburos parafínicos a ácidos grasos, los sulfatos pueden ser reducidos a sulfuros. El quimostato puede ser usado ventajosamente para estudiar este tipo de transformaciones. Igualmente, los efectos de la rata de crecimiento y de diferentes sustratos sobre la síntesis de antibióticos y aminoácidos pueden estudiarse en el quimostato.

4) Producción de enzimas.

La actividad enzimática de los microorganismos dependen grandemente de la rata de crecimiento y del tipo de sustrato limitante. Para controlar completamente estas condiciones se hace necesario el empleo del quimostato.

5) Producción de vacunas.

El quimostato puede usarse para elucidar los efectos del medio sobre la producción de antígenos y, por consiguiente, sobre la calidad de las vacunas.

6) Cultivo de células de tejidos.

Tanto células animales, como vegetales, pueden ser cultivadas en el quimostato.

7) Producción de cerveza y vino.

El uso del quimostato con recirculación es ventajoso para la fabricación continua de cerveza y vino, ya que así se aumenta la rata de producción.

8) Fermentaciones de la leche.

Cultivos de quimostato pueden ser usados para la producción de "iniciadores" para la fabricación de quesos y leches fermentadas, tal como el yogurt.

9) Purificación de efluentes.

El quimostato con recirculación puede utilizarse en el estudio de la microbiología de la purificación de efluentes y de la dinámica de los procesos que tienen lugar.

10) Ecología y contaminación.

En muchos ambientes naturales (ríos, lagos, mares, suelo) el crecimiento de los microorganismos está limitado por la tasa de suministro de nutrientes. La simulación de estos ambientes para efectuar estudios ecológicos se puede realizar en el quimostato.

11) Rumen.

El quimostato es ventajoso para estudiar los procesos que tienen lugar durante la fermentación ruminal.

Problemas futuros

La mayor parte de los estudios realizados con el quimostato se han hecho con bacterias, probablemente porque son los organismos más fáciles de manejar y porque tienen requerimientos nutritivos definidos. Se han efectuado pocos trabajos en el quimostato con hongos, protozoos, algas y células animales y vegetales. Muchos problemas relacionados con estos organismos pueden ser estudiados ventajosamente en el quimostato. No existen estudios sobre el efecto de los aminoácidos y vitaminas como sustratos limitantes del crecimiento. Tales estudios podrían contribuir al conocimiento de la regulación metabólica¹¹. Las fermentaciones con mezclas de sustratos y mezclas de microorganismos también podrían ser estudiadas con ventaja en el quimostato.

El objetivo de estos estudios es descubrir todos los mecanismos de funcionamiento de las células vivas y las propiedades de las poblaciones de microorganismos y de células e inventar nuevos comportamientos celulares mediante el uso de organismos mutantes y de la explotación de la regulación metabólica.

TURBIDOSTATO

A valores de D próximos a D_c el quimostato no es estable. Es en esta región donde otro aparato de cultivo continuo, el turbidostato, es útil para mantener concentraciones constantes de biomasa (Fig. 11). El turbidostato (Fig. 12) es un aparato donde la población microbiana se mantiene a nivel constante mediante un dispositivo que mide la turbidez del cultivo (fotocélula). Este dispositivo controla la entrada de medio fresco a través de una válvula, de modo que cuando la turbidez del cultivo aumenta, excediendo al valor fijado, la fotocélula acciona, por mecanismos eléctricos adecuados, la apertura de la válvula, permitiendo la entrada de medio fresco. Cuando el cultivo se

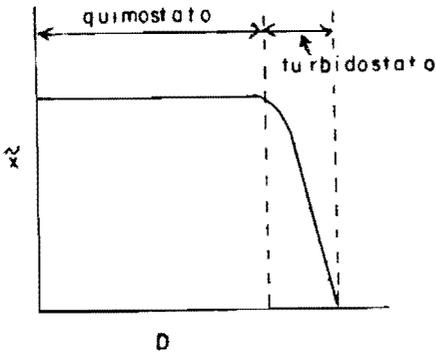


Fig. 11. Zonas prácticas de operación del quimostato y del turbidostato.

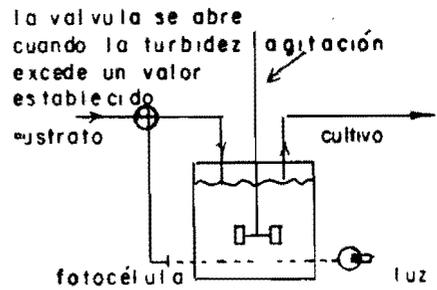


Fig. 12. Turbidostato.

diluye, debido a la entrada de medio, la turbidez decrece y la fotocélula hace que se interrumpa la entrada de medio.

En lugar de usar la turbidez como señal de control, podría usarse la producción de CO_2 , de modo que un dispositivo para medir CO_2 en los gases de salida accionará el control de flujo de nutriente para mantener un nivel constante de producción de CO_2 ¹³.

Un problema del turbidostato es el crecimiento de células en las paredes del recipiente. Este crecimiento dificulta el paso de la luz, afectando la señal recibida por la fotocélula y, por consiguiente, el control de flujo de nutriente.

LITERATURA CITADA

- 1 — EVANS, C. G. T. (1965). The industrial application of continuous culture. *Laboratory Practice* 14: 1168-1174.
- 2 — EVANS, C. G. T., Herbert, D. y Tempest, D. W. (1970). The continuous cultivation of microorganisms. 2. Construction of a chemostat. En "Methods in Microbiology", Eds. Norris, J. R. y Ribbons, D. W., Academic Press, London & New York. Vol. 2, p. 277-327.
- 3 — HERBERT, D. (1961). Continuous culture of microorganisms. Society of Chemical Industry Monograph N° 12, p. 21. London.
- 4 — HERBERT, D., Elsworth, R. y Telling, R. C. (1956). The continuous culture of bacteria: a theoretical and experimental study. *J. Gen. Microbiol.* 14: 601-622.
- 5 — HERBERT, D., Phipps, P. J. y Tempest, D. W. (1965). The chemostat: design and instrumentation. *Laboratory Practice* 14: 1150-1161.
- 6 — JANNASCH, H. W. (1965). Continuous culture in microbial ecology. *Laboratory Practice* 14: 1162-1167.

- 7 — MONOD, J. (1942). "Recherches sur la Croissance Bacterienne", Masson, Paris.
- 8 — MONOD, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *A. Rev. Microbiol.* 3: 371-394.
- 9 — MONOD, J. (1950). La technique de culture continue: theorie et applications. *Ann. Inst. Pasteur* 79: 390-410.
- 10 — NOVICK, A. y Szilard, L. (1950). Experiments with the chemostat on spontaneous mutation of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. Wash.* 36: 708-719.
- 11 — PIRT, S. J. (1972). Prospects and problems in continuous flow culture of microorganisms *J. Appl. Chem. Biotechnol.* 22: 55-64.
- 12 — TEMPEST, D. W. (1970). The continuous cultivation of microorganisms. 1. Theory of the chemostat. En "Methods in Microbiology", Eds. Norris, J. R. y Ribbons, D. W., Academic Press, London & New York. Vol. 2, p. 259-276.
- 13 — WATSON, T. G. (1969). Steady state operation of a continuous culture at maximum growth rate by control of carbon dioxide production. *J. Gen. Microbiol.* 59, 83.