

Inmovilización de *Pseudomonas aeruginosa* CAZ-033 en monolitos de UVM-7

Marisela Belandria^{1*}, Ysmael Hernández², Jorge Guiñez², Eric Plaza³,
Miguel Ángel Ramos³ y Lenin Huerta Morillo^{1*}

¹Laboratorio de Nuevos Materiales, ²Laboratorio de Antígenos Bacterianos, Facultad
Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Maracaibo, CP 526, Venezuela.

³Instituto Zuliano de Investigaciones Tecnológicas, Km 15 Vía carretera a la Cañada, Sector
Palmarejo Viejo, Maracaibo Venezuela

Recibido: 17-03-12 Aceptado: 25-07-12

Resumen

Se logró inmovilizar la *Pseudomonas aeruginosa*, por un tiempo de hasta 5 días logrando el intercambio libre de las moléculas necesarias para la supervivencia y funcionalidad de estas bacterias. El soporte utilizado fue el sólido mesoporoso bimodal tipo UVM-7, con el cual se obtuvieron monolitos utilizando silatrano-agua como agente cohesionante, los cuales presentan una adecuada resistencia mecánica que permitió su manipulación, y con características morfológicas y texturales similares al UVM-7 en polvo, a saber, el patrón de DRX mostró un pico a $2,27^\circ$ de 2θ correspondiente al plano $d(100)$; $38,65 \text{ \AA}$, área superficial de $864 \text{ m}^2/\text{g}$, mesoporos de $3,5 \text{ nm}$ y macroporos de $75,9 \text{ nm}$.

Palabras clave: silatrano, monolito, inmovilización, *Pseudomonas aeruginosa*, UVM-7.

Pseudomonas aeruginosa CAZ-003, immobilization on UVM-7 monoliths

Abstract

Immobilization of *Pseudomonas aeruginosa* was achieved as long as 5 days, allowing the free exchange of molecules necessary for her survival and functionality. Bimodal mesoporous solid UVM-7 was used as a support, obtaining monoliths with silatrane-water as cohesion agent, which exhibit a adequate mechanical strength for his manipulation. Morphological and textural characteristics were similar to the UVM-7 powder. XRD pattern showed a peak at 2.27° 2θ corresponding to $d(100)$ plane, $38.65 \text{ \AA}$, surface area $864 \text{ m}^2/\text{g}$, meso and macropores of 3.5 and 75.9 nm respectively.

Keywords: silatrane, monoliths, immobilization, *Pseudomonas aeruginosa*, UVM-7.

* Autor para la correspondencia: ljhuerta@gmail.com

Introducción

Las ventajas de la inmovilización en biotecnología han impulsado a generaciones enteras de científicos a buscar métodos adecuados para la obtención de beneficios económicos. Existen diferentes medios para la inmovilización como son: gel de alginato (1), perlas de alginato (2), espuma de poliuretano (1, 3), zeolita natural (clinoptilolita) (4), entre otros.

Los materiales porosos tienen ciertas características que favorecen la inmovilización, en comparación con los materiales no porosos, debido a su tamaño de poro, elevada área superficial y volumen de poro (5). Los resultados de la inmovilización incluyendo el funcionamiento de las enzimas inmovilizadas, dependen en gran medida de las características del soporte, hasta ahora diversos materiales nanoestructurados se han utilizado, tales como, sílices mesoporosas, nanotubos, nanopartículas y nanofibras (6).

Las ventajas que se obtienen al inmovilizar la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* en comparación con otros agentes (enzimas) que se han inmovilizado, es la obtención de los productos que ésta sintetiza, como lo son, la piocianina y fluoresceína, con aplicaciones antibacterial y en medicina oftalmológica, respectivamente. Además de evitar las etapas de extracción y purificación necesarias como es el caso de las enzimas aisladas.

Se ha propuesto la inmovilización de microorganismos en matrices sólidas, para asegurar la separación de la biomasa microbiana, extracción de los productos y mejorar la resistencia y el manejo de la propia biomasa. Más aún, si tales biomasas están inmovilizadas aumentarían su estabilidad, fuerza mecánica y reutilización, facilitando además la manipulación.

La *Pseudomonas aeruginosa* pertenece a la subdivisión (16SrRNA) de las gamas Proteobacterias (7). Presenta una distribución cosmopolita, aislándose de tierra, agua, plantas, animales y seres humanos (8). Se caracteriza en especial por producir dos pig-

mentos: uno amarillo verdoso fluorescente (fluoresceína) y otro azul claro llamado piociani, la mezcla de pigmentos amarillo y azul da a los cultivos en el que prolifera este microorganismo un color azul verdoso (9).

La búsqueda de nuevos materiales empleados en diferentes reacciones químicas, llevó a los investigadores de la Mobil Oil Corporation, a sintetizar una nueva familia de materiales mesoporosos, llamados M41S, cuya estructura puede ser hexagonal, cúbica o laminar. Muchos de estos materiales presentan un alto potencial en aplicaciones como la catálisis, técnicas de separación, entre otras (10, 11). En esta rama de la ciencia, se ha desarrollado un nuevo material de la familia M41S, denominado UVM-7, el cual presenta dos sistemas de poro. La síntesis del UVM-7 parte de un complejo de silicio, que permite un efectivo control del proceso de hidrólisis y condensación (12). Estudios recientes han demostrado que estos materiales contienen abundantes grupos silanoles en la superficie que favorecen la inmovilización de material biológico (13).

En tal sentido, el presente trabajo de investigación tuvo por objetivo elaborar un monolito adecuado del material mesoporoso-bimodal UVM-7 y probarlo para una eficaz inmovilización de *Pseudomonas aeruginosa*.

Materiales y métodos

Elaboración de los monolitos/soporte

El sólido UVM-7 se preparó mediante el proceso Sol-Gel, con una relación molar 2Si: 7TEA: 0,52CTAB: 180H₂O descrita por Huerta y col. (14), para la elaboración de los monolitos se tomaron 0,8 g del sólido y se mezcló con agua (M1) para obtener una pasta la cual fue moldeada con un troquel y una prensa a 0,5 TM por 1 min. Posteriormente, se realizaron las pruebas de temperatura de secado a 25, 60 y 120°C. El mismo procedimiento se repitió para otros agentes cohesivos: n-propanol (M2), pega vinílica-agua (M3), y silatrano-agua (M4). Los monolitos

se perforaron con un taladro de alta velocidad. La materia orgánica se eliminó por calcinación, sometiendo al monolito a una temperatura de 540°C por 4 h, a una velocidad de calentamiento de 1°C/min.

Caracterizaciones del soporte

Los patrones de Difracción de Rayos X (DRX) se registraron entre 1,5 y 20 grados de 2θ , con un paso de 0,02° (2θ) y tiempos de adquisición de 3 s/paso utilizando un equipo modelo D8FOCUS marca Bruker con una fuente de radiación de $\text{CuK}\alpha$ y un detector LynxEye tipo PSD (Position Sensitive Detector). Las isotermas de adsorción – desorción de nitrógeno se realizaron en un ASAP 2010, desgasificando previamente la muestra a 200°C en vacío hasta alcanzar una presión residual de 0,04 torr. El cálculo de la Distribución de Tamaño de Poro (DTP) se realizó utilizando las ecuaciones de Barret, Joyner y Halenda (BJH) (15). El área superficial específica de los sólidos se determinó aplicando las ecuaciones de Brunauer, Emmet y Teller (BET) (16). Los volúmenes de poro se determinaron por el método (BJH). Para la Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), se utilizó un equipo FEI Quanta 200, trabajando a 30,00 kV.

Microorganismo y medio de cultivo

Se seleccionó un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* (CAZ-033), suministrada por la colección de bacterias del Dr. Anibal Zaidenberg, adscrita a la federación mundial de colecciones de cultivos (WFCC).

La incubación del microorganismo tuvo lugar en aerobiosis en placas de agar Mueller-Hinton (BBL-DIFCO), a 37°C durante 48 horas. La bacteria se cosechó con buffer TB (Tris Base) (pH 7,4). La biomasa celular se centrifugó a 3.148xg durante 15 min, descartándose el sobrenadante.

Inmovilización en monolitos de UVM-7

El monolito fue inoculado con 200 μL de la suspensión bacteriana cosechada en

búffer TB (Tris base 20 mM pH 7,4). Después del sellado definitivo, el monolito fue introducido estérilmente en un kitasato de 500 mL de capacidad, conteniendo 250 mL de Caldo Nutriente (BBL-DIFCO) estéril. La incubación en aerobiosis del sistema en agitación se realizó a 37°C durante 120 horas.

Determinación de la viabilidad celular en el soporte

La viabilidad celular se evaluó a través de un método enzimático. Este consistió en poner en contacto a las bacterias inmovilizadas en el soporte con una solución de un sustrato SIGMA FASTTM, BCIP/NBT específico para la enzima fosfatasa alcalina. Esta enzima está presente en el citoplasma de las células viables en el sistema. La reacción fosfatasa alcalina-sustrato produce un precipitado coloreado que indica la actividad enzimática intracelular y por ende el potencial de viabilidad bacteriana.

Resultados y discusión

Se sintetizó el material UVM-7 mesoestructurado, obteniéndose un sólido blanco de aspecto pastoso. Para el proceso de elaboración de los monolitos se realizaron diferentes ensayos evitando obtener monolitos con fracturas y que no se dispersaran las partículas en el medio líquido, variando para ello el medio cohesivo. Estos resultados se presentan en la tabla 1, donde se observa que los mejores materiales se obtuvieron al emplear la mezcla de silatrano-agua y el sólido mesoestructurado seco.

La figura 1 muestra el material M4 calcinado y sin calcinar, donde es posible observar que están libres de fractura. La eficiencia en la cohesión de los granos se debe a los grupos silanoles que se encuentran en la superficie de la partícula (14) mesoestructurada y en las partículas que se están formando al mezclar silatrano y agua, se enlazan (condensan formando puentes de oxígeno) aportando una fuerte unión entre ellas, evitando la fractura de los monolitos, De igual manera fueron rea-

Tabla 1
Materiales empleados para los diferentes ensayos en la elaboración de los monolitos

Sólido	Medio cohesivo	Resistencia a la Manipulación
M1* Mesoestructurado	Agua	Poca resistencia
M2* Mesoestructurado	n-propanol	Poca resistencia
M3* Mesoestructurado	Pega vinilica-agua	Poca resistencia
M4* Mesoestructurado	Silatrano-agua	Sin fractura y alta resistencia

* Nomenclatura para los monolitos.

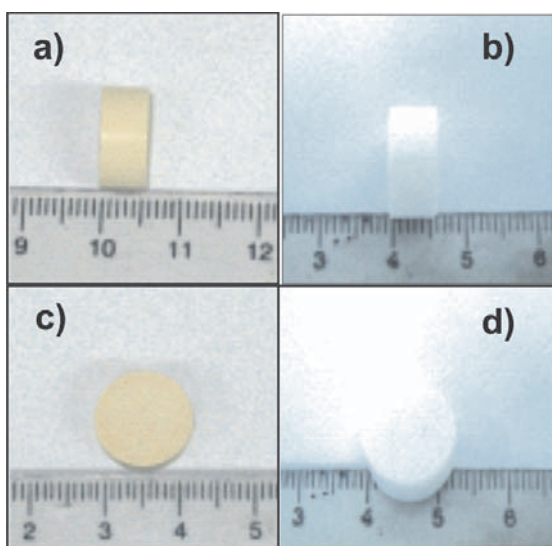


Figura 1. Variación del tamaño. a) y c) altura y diámetro de M4, b) y d) altura y diámetro de M4 calcinado.

lizadas diferentes pruebas de secado para el M4, el cual consistió en someter el monolito a diferentes temperaturas para eliminar la humedad, observándose que su estructura se conservaba estable (sin fracturas) y sin disminuir su tamaño.

Caracterizaciones del monolito de UVM-7

La isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno para el material M4 calcinado, se presenta en la figura 2, donde se observa una isoterma tipo IV característica de materiales mesoporosos bimodales (14), mostrando dos incrementos bien definidos de volumen en 0,4 y 0,9 P/P_0 , correspondiente

a los mesoporos y macroporos respectivamente, indicando la presencia de un sistema bimodal. Esta isoterma también muestra la histéresis del tipo H1 (IUPAC) característico de los sólidos mesoporosos en la zona de los macroporos. La figura 3 muestra la distribución del tamaño de los poros indicando que el material posee dos sistemas de poros (mesoporos de 3,5 nm y macroporos de 75,9 nm). También se puede observar con poca intensidad poros definidos de 11 nm, que pueden ser originados por la manipulación del sólido en el momento de la elaboración del monolito.

La figura 4 muestra los difractogramas del sólido UVM-7 mesoestructurado, UVM-7 calcinado y el monolito M4 calcinado. Aquí se observan los máximos de los picos a aproximadamente $2,27^\circ$ de 2θ que corresponden a la reflexión $d(100)$, y un hombro a $4,25^\circ$ de 2θ que corresponde a los planos solapados $d(110)$ y $d(200)$. Estos patrones son característicos de un ordenamiento hexagonal desordenado o pseudohexagonal (14). Una vez que el agente director de estructura se elimina por calcinación el material pierde orden lo cual se evidencia por el desplazamiento de $2,14^\circ$ a $2,27^\circ$ de 2θ del pico que corresponde al plano $d(100)$ hacia ángulos mayores, debido a que en el proceso de calcinación se produce una contracción de la estructura que modifica el orden encontrado en el material mesoestructurado.

La tabla 2 resume las principales características del UVM-7 (monolito M4 calcinado), esta disminución de m^2/g del área

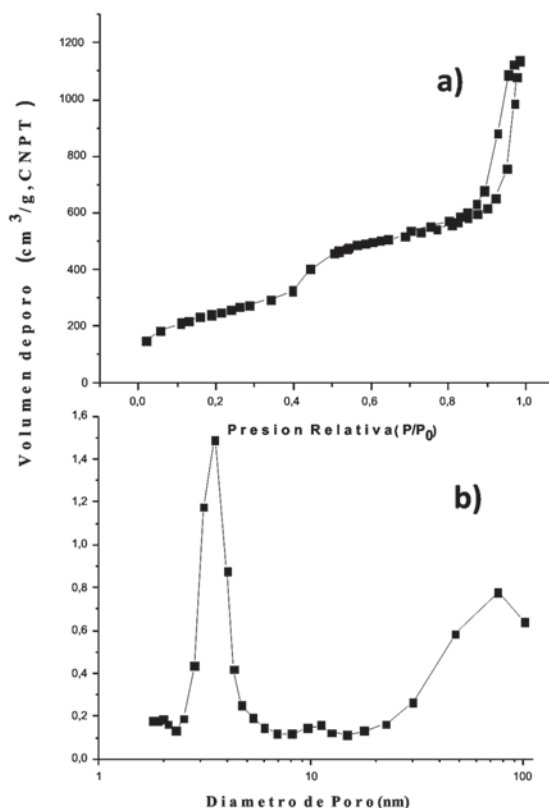


Figura 2. Isoterma de adsorción-desorción de N_2 (a) y Distribución del Tamaño de Poro (DTP) (b) del monolito M4 calcinado.

superficial puede ser debido a que ahora las partículas originalmente sueltas del UVM-7, se encuentran unidas por puentes de oxígeno, excluyendo esta área de unión de la superficie que puede ser accesible al gas sonda utilizado (N_2).

La microscopía electrónica de barrido (MEB) se utilizó como una poderosa herramienta que permitió la caracterización morfológica del sólido. En la figura 5 se muestra como los granos formados por la aglomeración de partículas se han compactado dándole forma al monolito, también se puede observar (figura 6) como el grano del sólido UVM-7 está formado por la aglomeración de partículas, originando intersticios que dan origen a los macroporos.

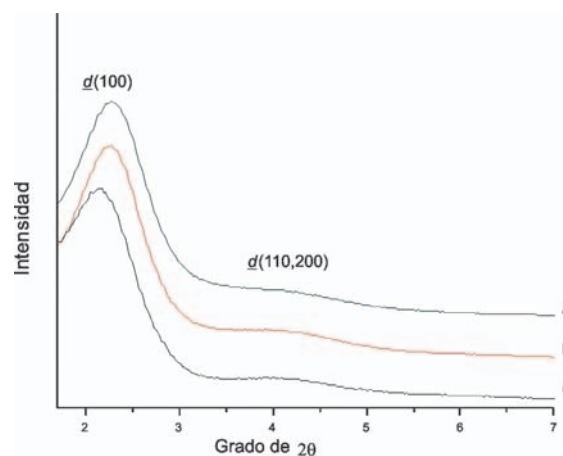


Figura 3. Difracción de rayos X normalizados para el material M4 calcinado. (A), UVM-7 calcinado (B) y Mesoestructurado (C).

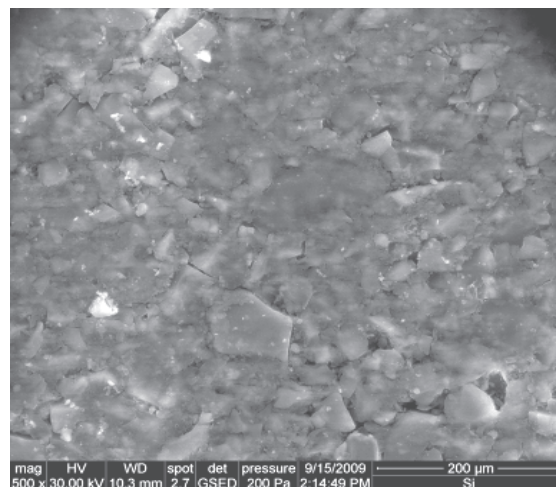


Figura 4. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) del M4 calcinado.

Inmovilización de *Pseudomonas aeruginosa* CAZ-033 en el monolito de UVM-7

La bacteria permaneció inmovilizada en el monolito por un tiempo máximo de 5 días (figura 7). Transcurrido ese período, las *Pseudomonas* se exteriorizaron hacia el medio de cultivo, presumiblemente por la pre-

Tabla 2
Características generales del M4 calcinado.

Material	d ₍₁₀₀₎ (nm)	a _o (nm)	Pared (nm)	Área BET (m ² /g)	Pico Meso (nm)	Pico Macro (nm)	Vol. Tot (cm ³ /g)	Vol. meso (cm ³ /g)	Vol. macro (cm ³ /g)
UVM-7 (Monolito M4 calcinado)	3,86	4,63	0,9	864	3,5	75,9	1,76	0,60	1,11
Meso estructurado	4,44	5,13	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Calcinado	4,25	4,9	2	1050	3,0	~ 60	nd	0,77	1,03

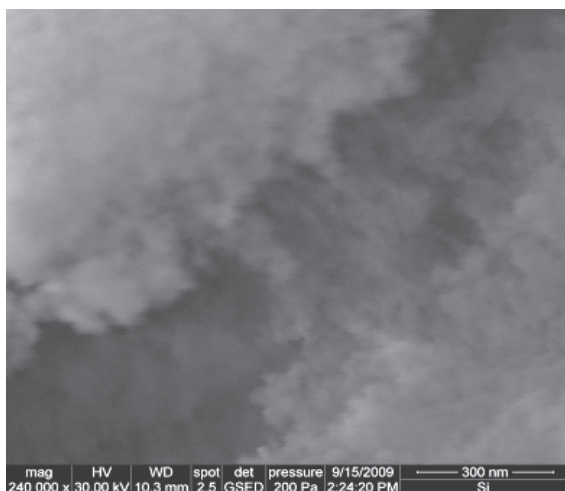


Figura 5. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) ampliada del M4 calcinado.

sencia de intersticios en la estructura del sólido mesoporoso, a través de los cuales esta bacteria móvil se desplazó hacia un gradiente positivo de disponibilidad de nutrientes en el medio líquido exterior. En otros estudios realizados donde la superficie de la matriz contiene muchos grupos -OH, se reporta información sobre la interacción que existe entre los grupos silanoles (-OH) y la pared celular de la cepa, lo cual favorece la inmovilización (17).

Entre las ventajas que se pueden obtener empleando el sólido UVM-7 como soporte de las *Pseudomonas aeruginosa* es que dicha bacteria se caracteriza principalmente

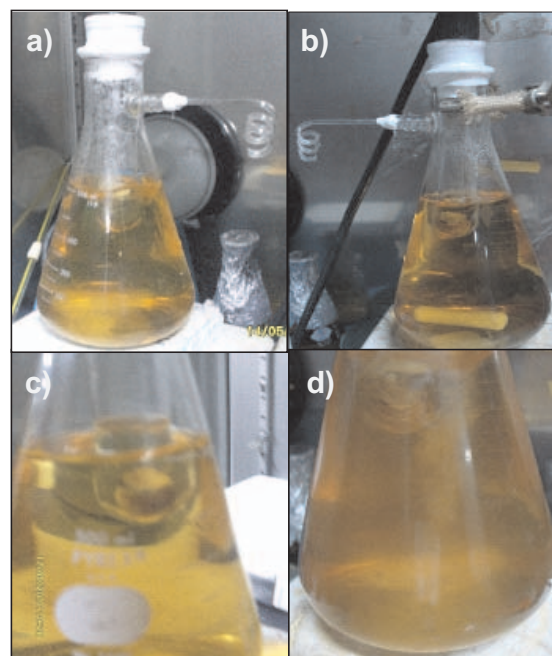


Figura 6. Inoculación de *Pseudomonas aeruginosa* en M4 calcinado. a) inicio, b) 24 h., c) 72 h, d) 5 días.

por sintetizar dos pigmentos uno llamado piocianina de color azul-verdoso con propiedades antibacterial (18), y otra sustancia llamada fluoresceína de color amarillo-verdoso que tiene aplicaciones en el área de oftalmología, también se puede identificar la presencia de la bacteria a través de sus pigmentos en enfermedades como dermatitis, úlceras, fibrosis quística, entre otros (19).

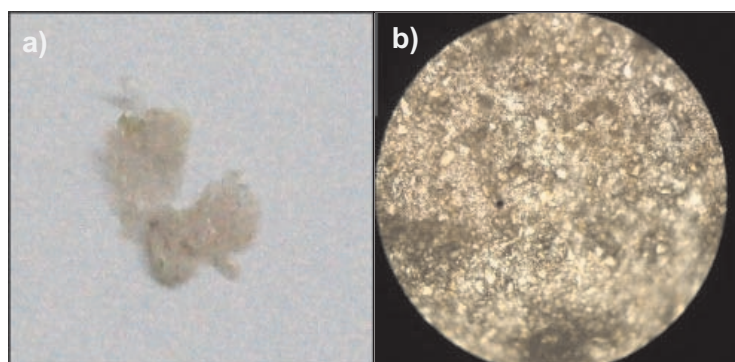


Figura 7. Biopelícula de la *Pseudomonas aeruginosa*. a) biopelícula y b) vista en el microscopio a 400 x.

Dichos pigmentos pueden salir del monolito, quedando la bacteria inmovilizada.

Adicionalmente, se observó al examinar el interior del monolito la presencia de biopelícula bacteriana. Esta biopelícula es permeable por ende no impidió el acceso de los nutrientes desde exterior, ni la exteriorización del microorganismo hacia el medio de cultivo, fue observada a través de un microscopio óptico a 400X, como se muestra en la figura 8. En este caso la bacteria produce la biopelícula con la finalidad de aumentar la superficie de absorción de nutrientes. La producción de esta superestructura biológica fue facilitada por el sistema de inmovilización que ofreció a la población bacteriana utilizada una fase sólida de adherencia en la cara interna del monolito.

Determinación de la viabilidad celular en el soporte

Se realizó dicho ensayo con la finalidad de observar si las bacterias se encontraban vivas dentro de la estructura contenedora. En la figura 8 se muestran los controles (figura 8a bacteria suspendida en agua, y 8b agua esterilizada), donde se puede observar la aparición del precipitado coloreado (8a) originada por la actividad enzimática asociada a la viabilidad celular. En la Figura 8 d se observa el ensayo realizado con el monolito 48 h después de la inoculación, evidenciando que la *Pseudomonas aeruginosa* permanece viable y activa en el interior del monolito a través del tiempo.

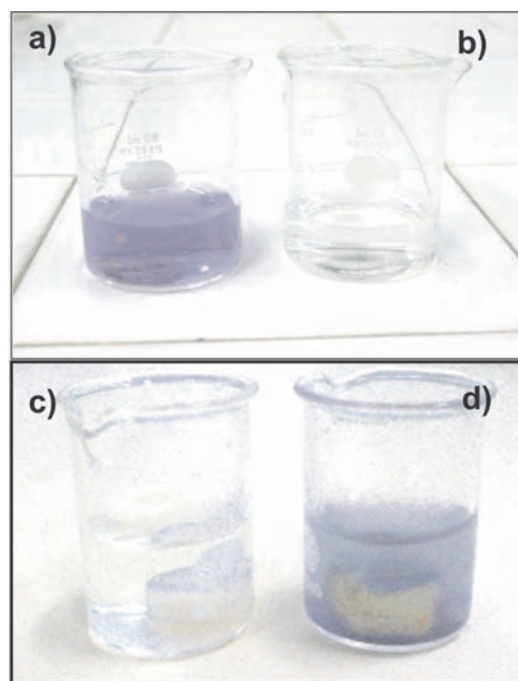


Figura 8. Viabilidad celular en el Soporte para verificar la actividad enzimática. a) agua con bacterias b) agua esterilizada, c) agua con monolito sin inocular, d) agua con monolito inoculado (todos contienen sustrato).

Conclusiones

Se logró sintetizar monolitos de UVM-7 como soporte para la inmovilización, sin fracturas y con alta resistencia a la manipu-

lación, con el uso de la mezcla de silatrano-agua para cohesionar el material mesoestructurado. La bacteria *Pseudomonas aeruginosa* permaneció inmovilizada en el monolito por un período de tiempo máximo de 5 días. Se demostró la viabilidad del UVM-7 como soporte para la inmovilización de la *Pseudomonas aeruginosa*.

El sistema de inmovilización bacteriana en UVM-7 permitió la producción de biopelícula.

Agradecimientos

Los autores de este trabajo expresan sus agradecimientos a la colaboración brindada por el INSUC, Laboratorio de Ambiente (FEC-LUZ), y al CONDES -LUZ.

Referencias bibliográficas

1. GUISAN, J.M. *Immobilization of Enzymes and Cells* Editorial Humana Press. Segunda Edición. Madrid, España. 333-357. 2006.
2. KORGEL, B.A.; ROTEM, A.; MONBOUQUETTE, H.G. *Biotechnol Prog* 8 (2). 111. 1992.
3. OH, S.Y.; MAENG, J.; KIM, S.J. *Appl Microbiol Biotechnol* 54. 418-423. 2000.
4. MONGE, O.; VALENZUELA, J.; ACEDO, E.; CERTUCHA, M.T.; ALMENDARIZ, F.J. *Rev Int Contam Ambiente* 24. 107-115. 2008.
5. MACEDO, J.S.; OTUBO, L.; FERREIRA O.P.; GIMENEZ, I.F.; MAZALI, I.O.; BARRETO, L.S. *Microporous and Mesoporous Mater* 107. 276-285. 2008.
6. KIM, J.; GRATE, J.W.; WANG, P. *Chem Eng Sci* 61. 1017-1026. 2006.
7. WOSE, Bacterial Evolution Microbiological Rev. 51 (2), 221, 271. 1987.
8. POLLACK, M. *Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 2217-2242. 1997.
9. FUERST, R. *Microbiología de Frobisher y Fuerst*. Nueva editorial interamericana. Decimo cuarta edición. México. 312. 1981.
10. KRESGE, C.T.; LEONOWICZ, M.E.; ROTH, W.J.; VARTULI y BECK, J.S. *Nature* 359 (6397). 710-712. 1992.
11. BECK, J.S.; VARTULI, J.C.; ROTH, W.J.; LEONOWICZ, M.E.; KRESGE, C.T.; SCHMITT, K.D.; CHU, C.T.-W.; OLSON, D.H.; SHEPPARD, E.W.; MCCULLEN, S.B.; HIGGINS, J.B.; y SCHLENKERT, J.L. *J Am Chem Soc* 114. 10834-10843. 1992.
12. EL HASKOURI, J.; ORTIZ DE ZÁRATE, D.; GUILLEM, C.; LATORRE, J.; CALDÉS, M.; BELTRÁN, A.; BELTRÁN, D.; DESCALZO A.B.; RODRÍGUEZ, G.; MARTÍNEZ, R.; DOLORES, M. y AMORÓS, P. *Chem Commun* 4. 330-331. 2002.
13. HE, J.; LI, X.; EVANS, D.G.; DUAN, X.; LI, C.; MOL, J. *Catal* 11. 45-53. 2000.
14. HUERTA, L.; GUILLEM, C.; LATORRE, J.; BELTRÁN A.; MARTÍNEZ-MÁÑEZ, R.; DOLORES, M.M.; BELTRÁN, D.; AMORÓS, P. *Solid State Sci* 8. 940-951. 2006.
15. BARRETT, E.; JOYNER, L y HALENDA, P. Mellons Institute. *J Am Chem Soc* 73. (1) 373-380. 1951.
16. BRUNAUER, S; EMMETT, P.H y TELLER, E. *J Am Chem Soc* 60. (2) 309-319. 1938.
17. CHITIVA, L.U; DUSSÁN, J. *Rev colomb biotecnol* 2. 5-10. 2003.
18. PUMAROLA, A. *Microbiología y parasitología médica* Masson. Segunda edición. España. 76. 1987.
19. CASTILLO, J; RIBAS, R.M; OSORIO, L; APARICIO, G. *Bioquímica* 31 (2). 41-48. 2006.