



ESTABLECIMIENTO DEL TIEMPO ÓPTIMO DE CULTIVO PARA LA BACTERIA *Pseudomonas putida* 12633 CON FINES DE ALMACENAMIENTO Y/O CONSTRUCCIÓN DE BIOSENSORES

Ing. Edgar Cubedo, Dr. Iram Mondaca, Dr. Luciano Castro, Dr. Pablo Gortares, 5 de Febrero 818 Sur, Cd. Obregón, Sonora, México, fax 644 4100910, imondaca@itson.mx.

Palabras clave: Estado fisiológico, biosensor, respiración microbiana

Introducción. Los biosensores microbianos poseen un alto potencial para detectar un amplio espectro de sustancias, en tres diferentes campos: el análisis de sustratos, el monitoreo del medio ambiente y el monitoreo en línea de procesos industriales. Sin embargo, existen otras posibilidades de uso para este tipo de biosensores y una de ellas es que se puede caracterizar el estado fisiológico de un microorganismo (1)(2).

El objetivo del presente estudio es establecer el tiempo de cosecha en el proceso de reproducción de la bacteria *Pseudomonas putida* 12633 para la obtención de biomasa en condiciones adecuadas para su conservación y/o construcción de biosensores microbianos a través de la evaluación de su velocidad de respiración.

Metodología. Primeramente se realizó una curva de calibración entre el peso seco del microorganismo contra la absorbancia de suspensiones microbianas, para eliminar el efecto de esta variable al utilizar la misma concentración de biomasa en los diferentes experimentos realizados. El crecimiento del microorganismo se inició al descongelar la cepa contenida en un vial, sembrando en agar TSA. Posteriormente se transfirió una asada del microorganismo a un matraz de 100 ml con caldo TSB, incubándose a 27 °C, con agitación a 175 RPM hasta alcanzar una absorbancia de 0.9. Posteriormente se transfirió con una proporción del 3% V/V a un matraz con 250 ml de TSB y se incubó en las mismas condiciones. Después de iniciado el crecimiento se extrajo una pequeña cantidad de biomasa cada cuatro horas hasta la hora 28. En cada caso la biomasa se centrifugó y se le realizaron tres lavados con buffer de fosfatos para eliminar cualquier residuo de nutrientes. Se diluyó la biomasa a una absorbancia de 0.6, para filtrar 1 ml. a través de una membrana estéril de nitrato de celulosa. Ésta membrana se fijó a un electrodo de oxígeno disuelto tipo Clark utilizando una membrana de acetato de celulosa, después de lo cual el biosensor se puso en contacto con una solución de 0.5 g/l de glucosa en buffer de fosfatos, sometida a aireación y agitación, para determinar la pendiente inicial de reducción de oxígeno disuelto para cada muestra.

Resultados y discusión. El consumo de oxígeno fue evaluado cada cuatro horas y el tiempo en el que la bacteria presentó una mayor velocidad en el consumo de

oxígeno fue a las 20 horas después de que se inició la incubación, como se muestra en la Figura 1.

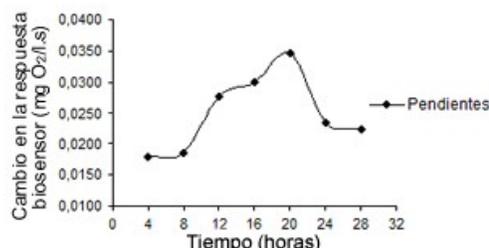


Figura 1. Cambio en la respuesta del biosensor con respecto al tiempo de crecimiento de la bacteria *Pseudomonas putida* 12633.

Lo anterior es atribuido a que la bacteria se encuentra en la parte final de su fase exponencial de crecimiento (3) y en general, los cultivos que se encuentran en esta etapa de reproducción deben estar en condiciones óptimas para su preservación y/o construcción de biosensores.

Conclusión. Es posible estimar el tiempo de cosecha de un microorganismo en base a la determinación de su actividad respiratoria, para evaluar su actividad fisiológica y asegurar que el microorganismo se encontrará en el mejor estado fisiológico para ser almacenado y/o utilizado en la construcción de biosensores microbianos.

Agradecimiento. Se agradece el apoyo del Dr. Kevin Fitzimmons y del Dr. Mark Riley, de la Universidad de Arizona, del Dr. Luciano Castro y el Dr. Fernando Lares del ITSON, por su apoyo con los materiales y equipos utilizados en esta investigación.

Bibliografía.

- Mulchandani, A., Rogers, K. (1988). *Enzyme and Microbial Biosensors. Techniques and Protocols*. Humana Press. USA. 203-207.
- Riedel, K., Renneberg, R., Liebs, P. (1988) Biochemical Basis of a Kinetically Controlled Microbial Sensor. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. 19:137-144.
- Kumar, R., A. Kumar, S. Rastogi, N. Mehra, S. Makhijani, A. Monoharan. (2003). Development and characterization of a novel immobilized microbial membrane for rapid determination of biochemical oxygen demand load in industrial waste-water. *Biosensors and Bioelectronics*. 18: 23-29.