**MEMORIA FINAL DEL PROYECTO TITULADO**

# Captura de $CO_2$ Mediante Microorganismos Inmovilizados en Soportes


**INVESTIGADOR RESPONSABLE DEL PROYECTO:**

**Dr. Francisco del Monte Muñoz de la Peña**

**Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid (ICMM)**

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Campus Universitario de Cantoblanco.

28049, Madrid

**Tfo.:** 91 334 9033

**Fax:** 91 372 0623

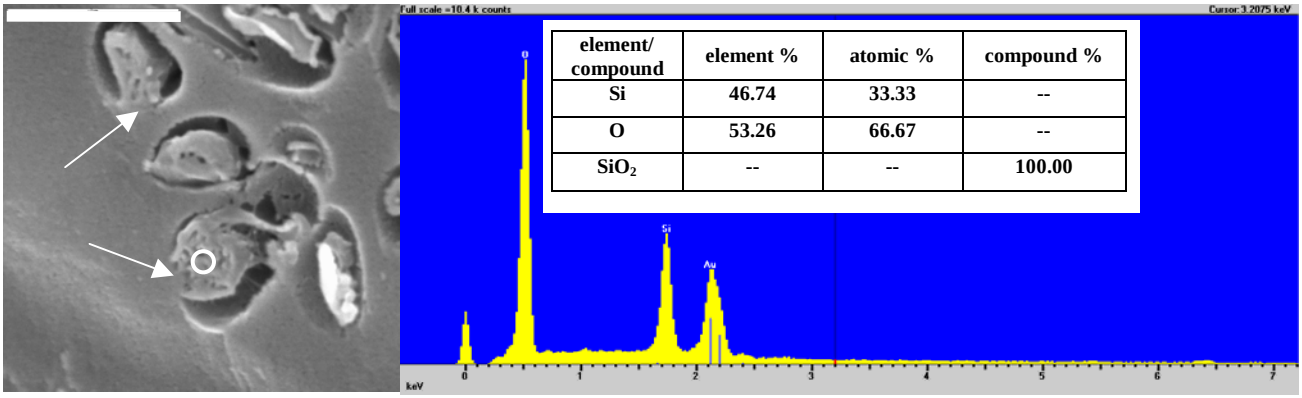
**e-mail:** delmonte@icmm.csic.es

El objetivo principal del proyecto ha sido la inmovilización de microorganismos capaces de captar $CO_2$ (por ejemplo, la *chlorella*) en soportes tridimensionales (3D). Para alcanzar este objetivo global, en la memoria presentada el año pasado planteábamos dos objetivos concretos:

**1.** Preparación de soportes 3D con poros interconectados por ventanas de dimensiones micrométricas (5-10 μm) y composición química biocompatible con los microorganismos captadores de $CO_2$.
**2.** Promoción de la colonización del interior del soporte 3D por parte de los microorganismos estudiados en este proyecto, de manera que la actividad metabólica implicada en el proceso de crecimiento resulte en un elevado consumo de $CO_2$.

La consecución del **objetivo 1** ha necesitado del estudio de dos aspectos bien diferenciados; por un lado, el estudio de las composiciones químicas que son biocompatibles con los microorganismos y por otro, el estudio de cuales de las posibles morfologías con las que los soportes se pueden preparar favorece el crecimiento de los microorganismos. Como ya se mencionaba en la memoria presentada el año pasado, esta parte del trabajo se ha realizado con bacterias del tipo *E coli* modificadas genéticamente para expresar una proteína fluorescente. De este modo, podemos correlacionar una medida simple de obtener, como es la intensidad de fluorescencia, con la actividad metabólica de la bacteria, y así determinar la cantidad de bacterias que permanecen vivas en función del proceso de preparación, de la composición química del soporte o de la morfología de éste.

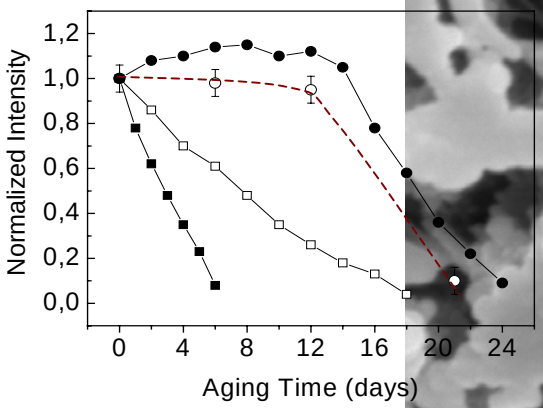
En lo que a la composición química se refiere, hemos publicado recientemente en la revista *Chemistry of Materials* un trabajo donde se estudian varios aspectos importantes para mantener las bacterias con vida tanto durante el proceso de preparación como una vez que están introducidas en el soporte. El proceso de preparación utilizado en esta ocasión fue el proceso *sol-gel*. La denominación de este método de preparación de materiales como proceso *sol-gel* se debe a que se inicia en disolución donde la hidrólisis de un precursor da lugar a la formación de unas partículas primarias (*sol*), que por reacciones de condensación, se agregan y crecen formando una red tridimensional que finalmente constituye una matriz porosa (*gel*). Los precursores son habitualmente alcóxidos metálicos, en nuestro caso concreto, alcóxidos de silicio. La hidrólisis de estos alcóxidos tiene un efecto altamente dañino para las bacterias en particular y para un gran número de células y microorganismos en general, por la elevada cantidad de alcohol que se libera (Figura 1).




| element/ compound | element % | atomic % | compound % |
|---|---|---|---|
| Si | 46.74 | 33.33 | -- |
| O | 53.26 | 66.67 | -- |
| $SiO_2$ | -- | -- | 100.00 |

**Figura 1:** Micrografía SEM mostrando bacterias atrapadas en un gel de sílice (barra = 2 micras). La membrana de las bacterias está rota y la sílice (los precursores de sílice utilizados para la preparación del material, tales como alcóxidos de silicio) ha penetrado en su interior, tal y como muestra el EDX realizado en el círculo blanco.

Otro aspecto de interés estudiado en este trabajo, es como la composición química del soporte afecta a la viabilidad de las bacterias. Se ha observado que, en el caso concreto de trabajar con soportes de sílice, la acidez de los grupos Si-OH hace que las bacterias en el interior del soporte mueran en (aproximadamente) una semana después de su encapsulación, es decir, tan solo un 25 % de la viabilidad que muestran estas mismas bacterias en suspensión. La utilización de soportes de naturaleza híbrida organo-inorgánica mejora estos resultados, obteniéndose viabilidades semejantes a las obtenidas en suspensión en el mejor de los casos estudiados, este es, uno donde el grupo orgánico que introduce el carácter híbrido a la matriz tiene una composición tipo azúcar, semejante a alg
celular. La utilización de estos precursore
hidrólisis ha posibilitado obtener viabilida
(Figura 2).



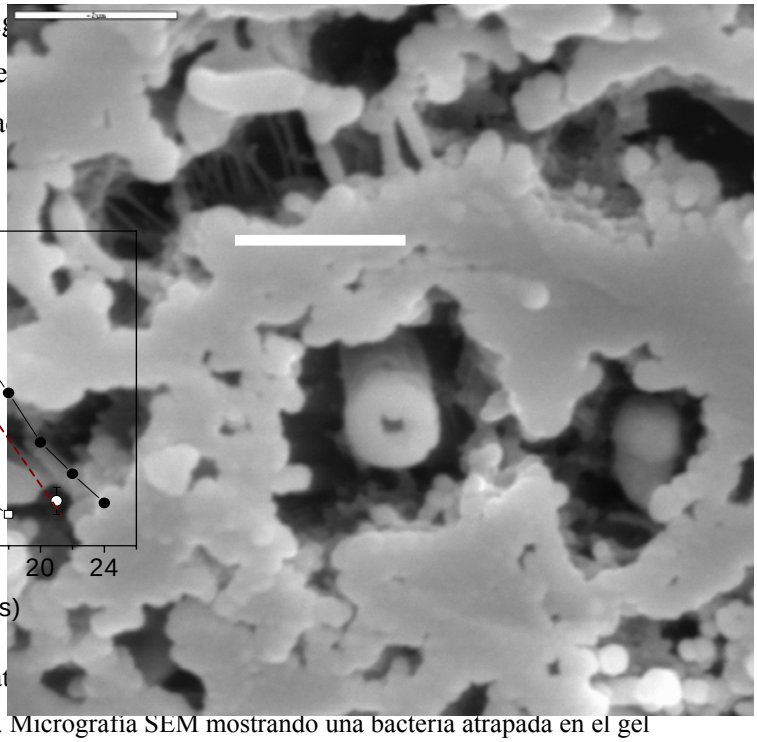



**Figura 2:** Viabilidad mostrada por bacterias at
con viabilidad de bacterias en suspensión (●). Micrografía SEM mostrando una bacteria atrapada en el gel híbrido de sílice (○) que proporciona mayor viabilidad a las bacterias (barra = 2 micras).

Con respecto al **objetivo 2**, una buena parte del trabajo se ha centrado en el estudio de diversas rutas de preparación que conduzcan a materiales cuya estructura sea la más adecuada para la proliferación celular en su interior. De manera previa a la utilización de microorganismos captadores de $CO_2$, el trabajo se ha realizado con *E coli* fluorescente por la facilidad que proporciona esta propiedad para la caracterización de los materiales.

Uno de las rutas de preparación que se ha estudiado es la de utilizar moldes, de manera que el material resultante presenta una estructura réplica de la del molde. El molde que hemos utilizado en nuestro caso es un ópalo formado por sedimentación de esferas de poliestireno. La infiltración de estos ópalos y la posterior eliminación de las esferas de poliestireno, da lugar a una estructura réplica del ópalo original, tipo FCC y conocida como ópalo inverso donde cada cavidad creada por una esfera de poliestireno esta conectada con hasta doce cavidades análogas, seis en el mismo plano, tres en el plano superior y otras tres en el inferior (Figura 3).

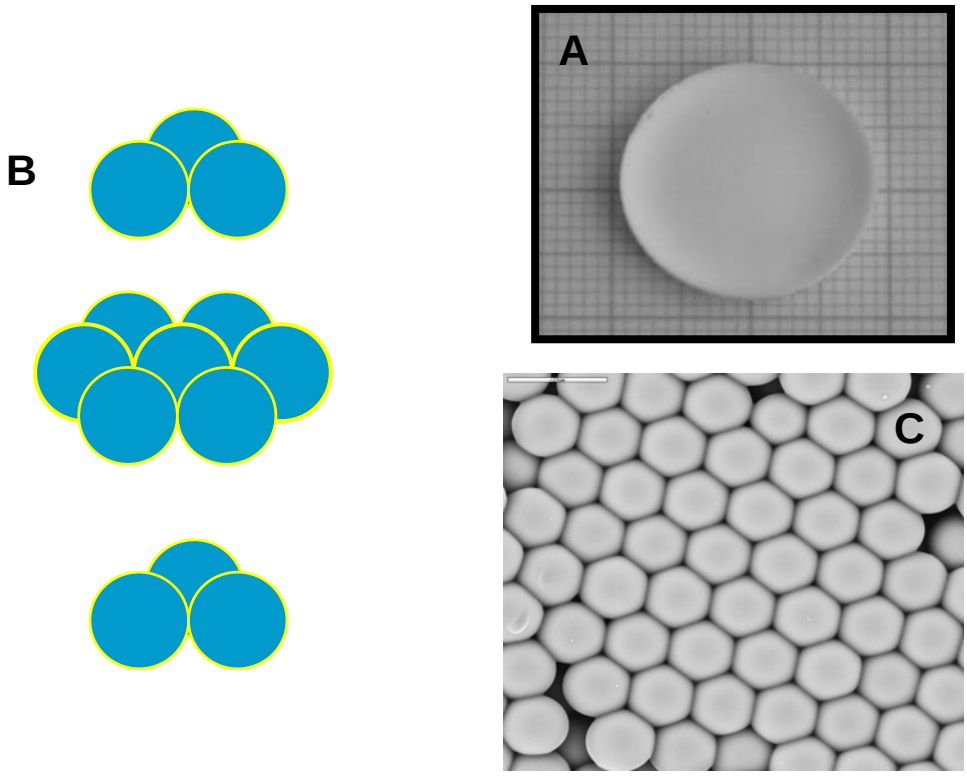



**Figura 3:** Pastilla obtenida por sedimentación de esferas de poliestireno (A). La micrografía SEM muestra el ordenamiento tipo FCC (B) que se obtiene mediante este tipo de procesos de sedimentación (C). En la micrografía se muestra tan solo una capa, pero la estructura se reproduce según se muestra en esquema para toda la estructura tridimensional, tal y como puede observarse con mayor claridad en la figura 4.

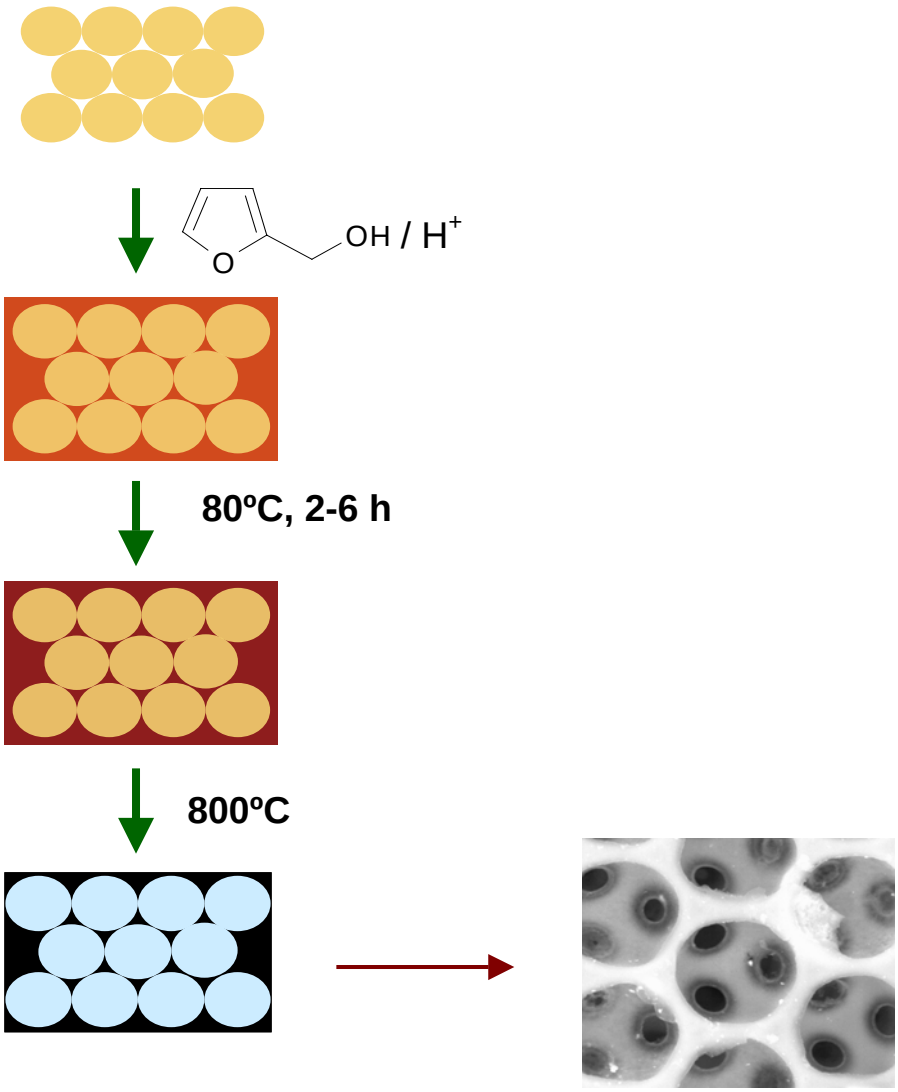



**Figura 4:** Esquema que muestra el proceso seguido para infiltrar una estructura tipo ópalo, y obtener una estructura tipo ópalo inverso. La micrografía SEM muestra un detalle de este tipo de estructura. En primer plano se observan los huecos dejados por las esferas de poliestireno. Estos se conectan a través de ventanas (en concreto, tres) con los huecos dejados por las esferas de poliestireno de la capa adyacente (figura 3).

El crecimiento de células sobre este tipo de estructuras ha sido bastante estudiado en los últimos dos años pero se había observado que la colonización de las partes internas de la macroestructura era difícil. El procedimiento habitual que se sigue para promover el crecimiento celular en un soporte tridimensional consiste en mojar el soporte en un medio de cultivo que contiene bacterias. En estas condiciones, las zonas más superficiales del soporte se impregnan fácilmente, pero la proliferación de las bacterias hacia zonas más internas del soporte no se produce. Este hecho se debe a que todos los nutrientes y el oxígeno no difunden hasta el interior dado que son consumidos por las bacterias de las zonas externas. Para solucionar este problema, nosotros hemos introducido una pequeña variación en la metodología que se sigue para inducir el crecimiento celular en el soporte. Esta variación consiste en introducir un cierto número de

bacterias en el interior del soporte, mediante el dispositivo mostrado en la figura. Una vez que el soporte contiene alguna bacteria, se procede tal y como se describía anteriormente, es decir, colocando en soporte en un medio de cultivo. El resultado ha sido satisfactorio y hemos conseguido colonizar las zonas internas del soporte, con lo que cualquier dispositivo basado en la colonización de un soporte por células va a ser más eficiente que en el caso donde sólo las zonas externas del soporte eran colonizadas.

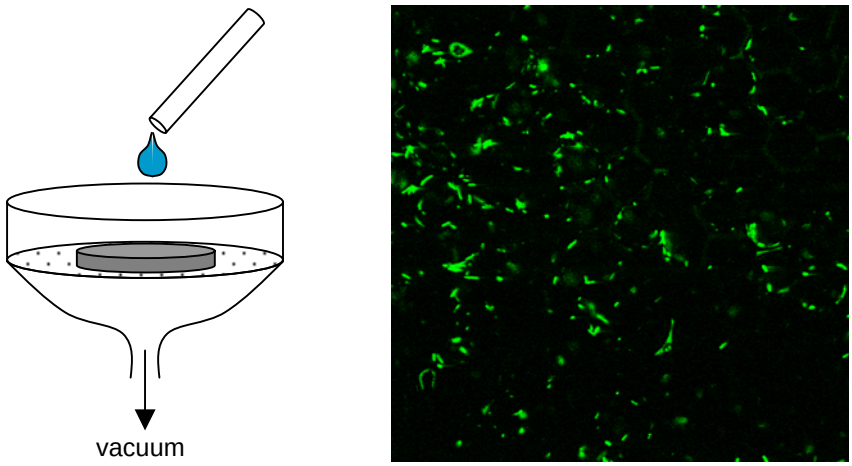
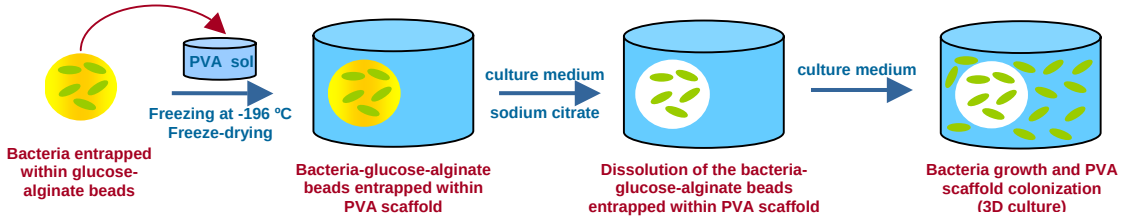



**Figura 5:** La fotografía de la izquierda está tomada en un microscopio confocal óptico de fluorescencia y muestra bacterias que han crecido en el interior de la estructura después de haber sido introducidas en la estructura tipo ópalo inverso tal y como muestra el esquema de la derecha.

No obstante, y a pesar de haber mejorado el problema de la colonización en las zonas internas de estructuras tipo ópalo inverso por filtración (utilizando técnicas de vacío moderado), el conjunto resultante (preparación de la estructura tipo ópalo inverso y posterior incorporación de las bacterias) es tremendamente laborioso en cuanto a su preparación por lo que decidimos explorar otras rutas de preparación que permitan la incorporación de bacterias *in-situ*, es decir, durante el mismo proceso de preparación del soporte. La principal ruta a explorar, tal y como ya se planteaba en la memoria, va a ser la preparación de materiales por técnicas de liofilizado (*freeze-drying*). Los soportes se obtienen a partir de suspensiones coloidales y geles acuosos que son sometidos a un proceso de congelación. Durante la formación de los cristales de hielo, los solutos que hay en disolución son expulsados y se acumulan en las fronteras entre distintos cristales de hielo. El hielo se elimina a vacio (sublimación) y deja una estructura macroporosa, que está soportada por ese acumulo de materia que se ha concentrado entra los cristales de hielo en el proceso de congelación y cuyos macroporos son los huecos dejados por el hielo. Este proceso ha sido objeto de estudio en nuestro grupo en este año, y hemos demostrado su viabilidad para preparar soportes macroporosos con proteínas/enzimas incorporadas en su macroestructura (trabajo publicado en *Advanced Materials*). Más adelante, y con vistas de introducir células, hemos probado a introducir liposomas, cuya estructura de bicapa lipídica es

análoga a la membrana de una célula (trabajo publicado en *Chemistry of Materials*). La complejidad que conlleva la incorporación de liposomas o células utilizando un proceso que implica la congelación de agua reside en el característico aumento de volumen que este proceso conlleva (la densidad de los cristales de hielo en menor que la del agua) lo que puede provocar la ruptura de la estructura de membrana. Para evitar la ruptura de la membrana, lo habitual es utilizar crioprotectores. En nuestro caso, estos crioprotectores han sido varios, desde la misma materia que forma la macroestructura del soporte hasta esferas de alginato de calcio donde las bacterias son introducidas antes del proceso de congelación, tal y como se muestra en el esquema.



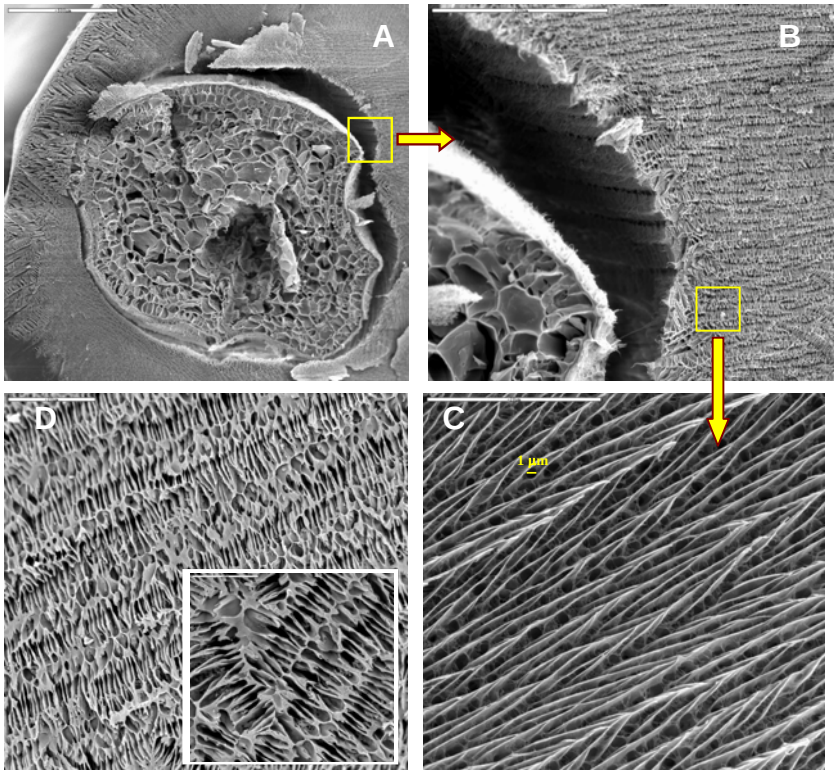




**Figura 6:** Micrografías SEM que muestran una esfera de alginato atrapada en un soporte macroporoso (A) según el esquema mostrado. Detalle de la interfase entre la esfera y la macroestructura del soporte (B). Detalle de la macroestructura del soporte (C e inset de C). Detalle de la macroestructura del soporte en un corte longitudinal (D).

bacte , las

micr ra de

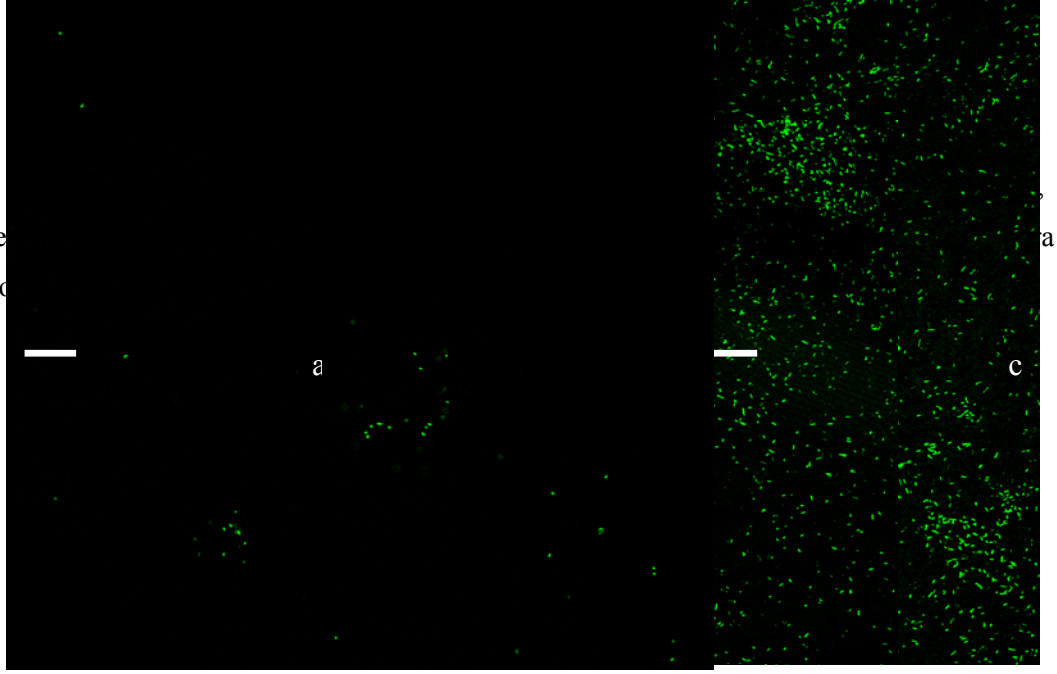



**Figura 7:** La fotografías están tomadas en un microscopio confocal óptico de fluorescencia y muestran el crecimiento de las bacterias en el interior de un soporte 3D antes (a) y después de estar sumergidas en un medio de cultivo e incubadas a 37 ºC por 12 (b) y 24 horas (c).

Por último, hemos sembrado microorganismos captadores de $CO_2$ en el soporte poroso 3D. Dado que la optimización de la composición química y de la morfología del soporte, así como de la ruta de preparación que mejor favorezca la colonización celular del soporte, ha consumido buena parte del tiempo de duración de este proyecto (1 año), hemos realizado este estudio con un único microorganismo de los que se mencionaban en la memoria; la *Chlorella*. Para el estudio de captación de $CO_2$ en el soporte poroso 3D se ha utilizado un gasómetro equipado con un electrodo para la lectura directa de $pCO_2$. La gráfica muestra la concentración de $CO_2$ consumida por el microorganismo que crece en el interior del soporte en comparación con la consumida por el microorganismo creciendo en un medio de cultivo normal (en suspensión).

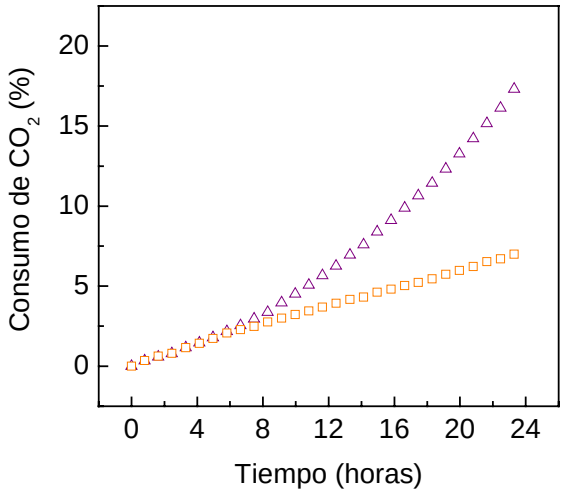



**Figura 8:** Eliminación de $CO_2$ del medio por parte de microorganismos en suspensión (triángulos violetas) y atrapados en un soporte poroso 3D (cuadrados naranjas).

En resumen, creemos que los resultados obtenidos en este año han sido altamente satisfactorios. Hemos avanzado notablemente en el diseño y preparación de soportes que favorezcan los cultivos tridimensionales siendo este tema, por si mismo, de gran interés y complejidad. Esto último se demuestra en la calidad de las publicaciones que han salido como resultado de este trabajo, publicaciones donde la aportación de la Fundación Domingo Martínez es agradecida (ver copias de las publicaciones que se adjuntan, primera página del *Adv. Mater.* y últimas páginas de los *Chem. Mater.*). La importancia de estos trabajos reside en el hecho de que disponer de soportes que puedan ser colonizados por células es un tema de investigación de gran repercusión social, tanto desde el punto de vista de la biotecnología (el tema de captación $CO_2$ pero también para el desarrollo de energías limpias, como las pilas de combustible microbianas) como de la biomedicina (por ejemplo, la regeneración de tejidos). En el tema concreto de captación de $CO_2$ creemos que los resultados son prometedores, aunque creemos que aún pueden mejorarse. Por ello, nuestra idea es continuar este trabajo estudiando con más detalle el crecimiento de la *Chlorella* e introduciendo alguna de las bacterias que mencionábamos en la memoria como *Rhodobacter sphaeroides* y *Synechocystis* PCC 6803.