

Presente y futuro de los biosensores microbianos electroquímicos

Susana Campuzano

Resumen: Los biosensores microbianos electroquímicos son dispositivos analíticos que, a través de la combinación de un microorganismo con un transductor adecuado, son capaces de generar una señal medible y proporcional a la concentración de analito en estudio. En este artículo se describen las características y aplicaciones de este tipo de biosensores, así como las tendencias y estrategias posibles que contribuirán a aprovechar en el futuro todo su potencial.

Palabras clave: Biosensores, microorganismos, electroquímica, análisis medioambiental, alimentos.

Abstract: Electrochemical microbial biosensors are analytical devices that, by means of the combination of a microorganism with an adequate transducer, are capable to generate a measurable signal which is proportional to the concentration of the analyte under study. This article describes the characteristics and applications of this type of biosensors, as well as the trends and possible strategies that will contribute in the future to explore all their potential.

Keywords: Biosensors, microorganisms, electrochemistry, environmental analysis, food.

Introducción

En los últimos años se ha desarrollado un gran número de biosensores microbianos para aplicaciones medioambientales, alimentarias y biomédicas. Estos biosensores (Figura 1) son dispositivos analíticos que surgen de la combinación de un microorganismo en contacto íntimo con un transductor físico adecuado, en el que se genera una señal medible proporcional a la concentración de analito/s. En ellos se utilizan, como sustitutos de las enzimas libres, tanto células no viables, preparadas por métodos diversos, p.ej. permeabilización, como células completas de las que se aprovechan las enzimas periplásmicas, pudiendo ser monitorizadas todas aquellas especies que actúen como sustratos o inhibidores de los procesos implicados en las funciones respiratoria y metabólica de la célula.¹

Los biosensores microbianos pueden clasificarse en *biosensores de medición de respiración o de metabolitos*. Los primeros se basan en la inmovilización de microorganismos aeróbicos sobre un electrodo de oxígeno. Cuando un sustrato, que puede ser metabolizado por el microorganismo, se encuentra en una disolución saturada de O₂, ocurre una reacción metabólica con consumo de oxígeno, por lo que puede llevarse a cabo la determinación de esa especie por la disminución de

la presión de este gas. Mediante el uso de estos biosensores pueden determinarse, por ejemplo, parámetros de calidad de las aguas, como la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), y llevar a cabo la cuantificación de diversas sustancias, como glucosa, ácido acético o alcoholes en alimentos.

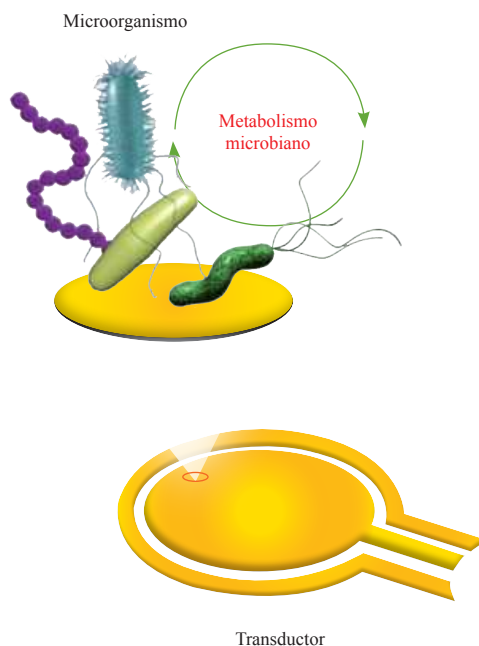


Figura 1. Esquema de un biosensor microbiano.

Los *biosensores microbianos de medición de metabolitos* son capaces de detectar el metabolito producido por una reacción catalizada por el microorganismo inmovilizado. Usando distintos tipos de sensores de gases o de iones, pueden monitorizarse los analitos de interés. Por ejemplo, se han utilizado electrodos de célula de H₂ para determinar ácido fórmico, electrodos de CO₂ para ácido glutámico y lisina, y electrodos de pH para cefalosporina y ácido nicotínico.

También existen *biosensores híbridos* basados en la combinación de un biosensor microbiano y una membrana



S. Campuzano

Universidad Complutense de Madrid.
Departamento de Química Analítica.
Avenida Complutense s/n, 28040 Madrid.
C-e: susanacr@quim.ucm.es

Recibido: 24/05/2011. Aceptado: 30/06/2011.

con enzimas inmovilizadas. Un ejemplo es el biosensor de urea basado en la combinación de una membrana de ureasa y un sensor microbiano de NH_3 usando bacterias que causan nitración. Este sensor resulta ventajoso frente al convencional potenciométrico de amonio ya que se minimizan interferencias iónicas o de compuestos volátiles como las aminas.

Ventajas de los biosensores microbianos

Desde un punto de vista general, los aspectos ventajosos que presentan los biosensores microbianos frente a los convencionales de enzimas aisladas derivan principalmente del empleo de microorganismos como elemento de reconocimiento.^{1,2} Por un lado, los microorganismos están presentes por todas partes y son capaces de metabolizar una amplia variedad de compuestos químicos. Por otro lado, el empleo de microorganismos como fuente de enzimas intracelulares evita los procesos caros y laboriosos que se requieren para su aislamiento y purificación, además de preservar las enzimas en su entorno natural, evitando los problemas de regeneración de cofactores o de disminución de la actividad enzimática al operar en ambientes *in vitro*.³ Así las enzimas quedan protegidas de la inactivación por tóxicos externos, como metales pesados, lo que mejora la estabilidad y el tiempo de vida útil de los biosensores resultantes. Además, los microorganismos, con una gran capacidad de adaptación a condiciones adversas, hacen posible la fabricación de biosensores menos susceptibles de inhibirse por solutos y más tolerantes a ambientes de pH subóptimo. Hay que tener en cuenta, también, que los microorganismos pueden producirse masivamente a través de cultivos celulares y que las células microbianas son fácilmente manipulables y tienen mejor viabilidad y estabilidad en ambientes *in vitro*, lo que simplifica enormemente la fabricación de estos biosensores y mejora su rendimiento.⁴ El progreso actual en técnicas de biología molecular y de ADN recombinante ofrece posibilidades ilimitadas para el diseño de microorganismos a la carta (altamente específicos o con actividades enzimáticas mejoradas, entre otras características).⁴ Por último, si un único microorganismo no contiene todas las enzimas necesarias para una serie secuencial de reacciones, es posible usar una mezcla de varias especies para el desarrollo del biosensor.

En cuanto a los inconvenientes, debe señalarse que los biosensores microbianos son inapropiados para mediciones *in vivo* y en ambientes biológicos complejos. Por otra parte, el gran número de enzimas y cofactores presente en los microorganismos puede dificultar las interpretaciones analíticas y comprometer la selectividad de la determinación en comparación con el empleo de enzimas puras. En la actualidad se están investigando varios enfoques para reducir al mínimo estas reacciones no específicas. Así por ejemplo, la permeabilización de las células hace que se pierda la mayoría de los cofactores de pequeño peso molecular, minimizándose de este modo reacciones secundarias indeseadas. También pueden evitarse reacciones secundarias debidas a la presencia de otras enzimas, inactivando las mismas por tratamientos físicos (calor) o químicos cuando se emplean células no viables, o bloqueando vías metabólicas o sistemas

de transporte no deseados cuando se trabaja con células viables. Finalmente, la difusión del sustrato y de los productos a través de la pared celular se traduce en una velocidad de respuesta lenta en comparación con los biosensores enzimáticos convencionales. No obstante, esta limitación puede superarse expresando la enzima de interés en la superficie celular por ingeniería genética o permeabilizando las células con tratamientos físicos (congelación y descongelación), químicos (disolventes orgánicos o detergentes) o enzimáticos (lisozima, papaína).

Técnicas de inmovilización

Con el fin de transformar de manera efectiva la respuesta bioquímica en una señal física, las células microbianas que sirven como elemento de reconocimiento en el biosensor, deben estar asociadas íntimamente con el transductor. Por lo tanto, la inmovilización de los microorganismos en los transductores tiene un papel esencial en la fabricación de los biosensores microbianos y condiciona de manera significativa su funcionamiento y estabilidad. La selección de la técnica y/o el soporte de inmovilización dependen de la naturaleza del biomaterial (células viables o no viables) y del sustrato y la configuración del transductor empleado. Por lo general, la *inmovilización covalente*, estrategia empleada frecuentemente para la inmovilización de enzimas y anticuerpos, no es útil para la inmovilización de células viables. Uno de los principales problemas de esta técnica es que las células estarían expuestas a potentes grupos reactivos y a otras condiciones de reacción severas que comprometen su viabilidad. Con este tipo de inmovilización también puede haber un deterioro de la integridad estructural de la célula durante el uso continuado, lo que conlleva a la pérdida de las enzimas intracelulares. Sin embargo, las técnicas de *entrecruzamiento con agentes bifuncionales*, utilizando reactivos como el glutaraldehído, se han empleado con éxito para la inmovilización de células en varios soportes (gelatina, albúmina, clara de huevo). A pesar de que esta metodología evita algunas de las limitaciones de la unión covalente, los reactivos químicos de entrecruzamiento utilizados frecuentemente, también afectan a la viabilidad celular. Así estas técnicas resultan útiles para la inmovilización de células no viables que contienen enzimas activas intracelulares. Por otro lado, las técnicas de *atrapamiento y adsorción* resultan más útiles cuando se emplean células viables. Un enfoque común consiste en retener las células en las proximidades de la superficie del transductor mediante membranas como las de diálisis. En general, dichas membranas deben ser química y mecánicamente estables, con un espesor de 10-15 μm y un tamaño de poro de 0,1-1,0 μm . Especialmente adecuadas para este propósito son las membranas porosas de policarbonato o polilactato. Se ha utilizado también una gran variedad de geles de polímeros sintéticos o naturales para la inmovilización de células microbianas para su aplicación en transformaciones industriales. Entre los polímeros sintéticos destacan la poliácridamida, los hidrogeles basados en poliuretano, las resinas fotoentrecruzables y el alcohol polivinílico; los naturales incluyen el alginato, el carragenano, la agarosa de bajo punto de fusión o el quitosano, entre otros. Las células

se han inmovilizado en estas membranas por atrapamiento, entrecruzamiento, congelación y descongelación, radiación- γ o fotoentrecruzamiento, entre otros procedimientos. Sin embargo, la mayor limitación del empleo de polímeros sintéticos es la posible pérdida de viabilidad de la célula, mientras que los polímeros naturales son muy útiles en la obtención de sistemas viables de células inmovilizadas.

La captura pasiva de células en los poros o la adhesión superficial de membranas de celulosa u otras membranas sintéticas ha sido también ampliamente utilizada. La principal ventaja de este método es que las células inmovilizadas por adhesión están en contacto directo con la fase líquida que contiene el sustrato, aunque la célula y la fase líquida están claramente separadas, por lo que se reducen los problemas de transferencia de masa asociados comúnmente con los métodos de atrapamiento en gel. Sin embargo, una limitación básica de la captura pasiva o de la adhesión es la posibilidad de la pérdida de la célula durante el lavado continuo.

Además de estos métodos, comunes también a otros tipos de biosensores, se han explorado otras estrategias novedosas de inmovilización de microorganismos, con objeto de mejorar el rendimiento analítico y la estabilidad de almacenamiento de los biosensores microbianos. Así por ejemplo, Song *et al.* desarrollaron una estrategia híbrida de atrapamiento-encapsulación que combina las ventajas de ambas metodologías.⁵ Yu *et al.* describieron un método totalmente acuoso para el atrapamiento de células de *Moraxella sp.* donde todos los procedimientos de inmovilización se llevan a cabo bajo condiciones suaves empleando como precursor silicato de sodio, evitándose de este modo la producción de alcohol que puede ser perjudicial para los microorganismos.⁶ Flemming *et al.* fabricaron un canal microfluídico para el empaquetamiento controlado y la inmovilización de células de levadura, proporcionando una mayor densidad de células activas y una menor resistencia a la difusión inherente a la técnica de compresión tradicional.⁷ También se ha propuesto el uso de una red de silicato preparada por la técnica sol-gel, que proporciona una prometedora plataforma para la inmovilización de microbios, permitiendo controlar el tamaño de los poros de los materiales de atrapamiento, lo que favorece la difusión de los analitos.⁸

En el caso de los biosensores microbianos electroquímicos, es muy interesante la inmovilización de los microorganismos en polímeros conductores electrónicos debido a las propiedades de estos materiales.⁹ En la Figura 2 se han representado varias micrografías electrónicas de barrido que muestran la inmovilización de células de *Brevibacterium ammoniagenes* sobre un polímero de sulfonato de poli(estireno)-polianilina (PSS-PANI).¹⁰ Se utiliza un electrodo de platino sumergido en una disolución de anilina en presencia del polímero y del material biológico, y se procede a su electrodeposición aplicando un potencial constante de +1,2 V vs SCE. En dicha figura se aprecian las células adsorbidas sobre la superficie del electrodo de platino (a), los primeros gránulos de polímero (b) y su crecimiento alrededor de las células (c y d), y sobre ellas (e y f). Se ha observado que las células se encuentran efectivamente atrapadas en el polímero y que pueden mantenerse vivas bajo ciertas condiciones experimentales.

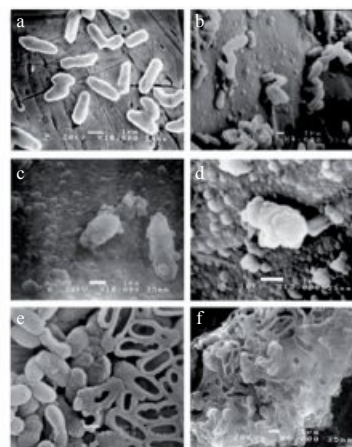


Figura 2. Micrografías electrónicas de barrido de *Brevibacterium ammoniagenes* atrapadas en un polímero de sulfonato de poli(estireno)-polianilina (PSS-PANI). Adaptado de la referencia 10.

Biosensores microbianos electroquímicos

La mayor parte de los biosensores microbianos electroquímicos son amperométricos, que operan a un potencial fijo aplicado entre un electrodo de trabajo que contiene las células del microorganismo, y uno de referencia. En estos biosensores, la variación de corriente generada por la reducción u oxidación de un producto electroactivo metabólico o un intermedio en la superficie del electrodo de trabajo se correlaciona con la concentración de los compuestos de interés.¹¹ Debido a la sensibilidad intrínseca de las medidas electroquímicas, es posible desarrollar fácilmente biosensores microbianos amperométricos ultrasensibles.

El uso de microorganismos como microrreactores para lograr la detección bioelectroquímica de compuestos de interés elimina la necesidad de aislar las enzimas individuales y permite a los biomateriales activos trabajar en condiciones muy próximas a su ambiente natural, logrando entonces una alta estabilidad. Sin embargo, el principal problema es la falta de eficiencia del proceso de transferencia electrónica entre el sistema biocatalítico microbiano y el electrodo.¹² Aunque la comunicación entre la célula y la superficie del electrodo no es fácil, algunos ejemplos ponen de manifiesto la existencia de transferencia electrónica directa entre ambos sistemas. Uno de ellos es el del microorganismo *Rhodospirillum rubrum*, capaz de transferir electrones a un electrodo de grafito durante la oxidación de la glucosa.¹³ Por otro lado, es posible facilitar el transporte de electrones utilizando especies capaces de actuar como “alambres” de comunicación entre las enzimas de los microorganismos y los electrodos. Por ejemplo, las deshidrogenasas dependientes de la pirroloquinolina quinona (PQQ) contenidas en la membrana periplásmica de la *Gluconobacter oxydans* son eficaces para lograr la oxidación de una gran variedad de sustratos, pero su eficacia bioelectroquímica mejora enormemente cuando se utilizan mediadores redox del tipo del ferricianuro, los viológenos o las quinonas. La Figura 3 muestra un modelo esquemático de la oxidación catalítica de un sustrato S en presencia de un aceptor de electrones M_{ox} por una enzima deshidrogenasa DH, en la membrana de un microorganismo.¹⁴

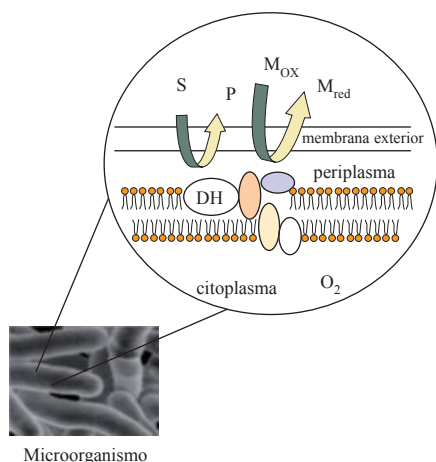


Figura 3. Esquema de la oxidación del sustrato S catalizada por la enzima DH en la membrana de un microorganismo. M_{ox} y M_{red} son las formas redox del mediador. Adaptado de la referencia 14.

La preparación de biosensores microbianos por combinación de los microorganismos con mediadores redox que faciliten las reacciones de transferencia electrónica entre el compuesto en estudio y la superficie del electrodo, ha sido una estrategia utilizada para la detección de diferentes analitos como glucosa o fenol, en ausencia de oxígeno. Debido a la eficiencia en el transporte de electrones, la sensibilidad que se alcanza es elevada. Las bacterias *Gluconobacter oxydans*, *Pseudomonas putida* ATCC 126633 y *Pseudomonas fluorescens* son algunas de las utilizadas en combinación con polímeros redox de osmio. En la Figura 4 se ha representado un esquema de la preparación de un biosensor microbiano basado en la fabricación de una monocapa de cisteamina sobre un electrodo de oro seguido de la incorporación de un polímero de osmio y del microorganismo, así como el mecanismo de la posible reacción enzimática y la obtención de la señal electroquímica en el caso de la detección de glucosa sobre el electrodo modificado.¹⁵

Más recientemente se han desarrollado configuraciones similares basadas en el empleo de electrodos de pasta de carbono preparados con una pequeña cantidad de nanotubos de carbono (CNTs). La adición de CNTs al material del electrodo amplifica el efecto del mediador, prolongando también la estabilidad del biosensor, aunque se observan corrientes de fondo elevadas debido al aumento de la corriente capacitiva. Esta estrategia fue seguida para la preparación de biosensores basados en el uso de *Pseudomonas putida* DSMZ 50026 como material biológico y del polímero [poli(1-vinilimidazol)]₁₂-[Os-(4,4'-dimetil-2,2'-dipiridil)₂Cl₂]^{2+/+} como mediador. La bacteria se cultiva en medios salinos ricos en glucosa o en fenol, con el fin de desarrollar, respectivamente, un biosensor de glucosa, con respuesta lineal en el intervalo de 0,05 a 2,0 mM, y un biosensor de fenol, con un intervalo lineal de 0,5–4,0 mM, que resultó adecuado para el análisis de aguas residuales.¹⁶

Se han descrito también diversos biosensores microbianos potenciométricos basados en la dependencia de la concentración de la especie en estudio con la diferencia de potencial medida entre un electrodo de trabajo y un electrodo de referencia. Los transductores empleados comúnmente para

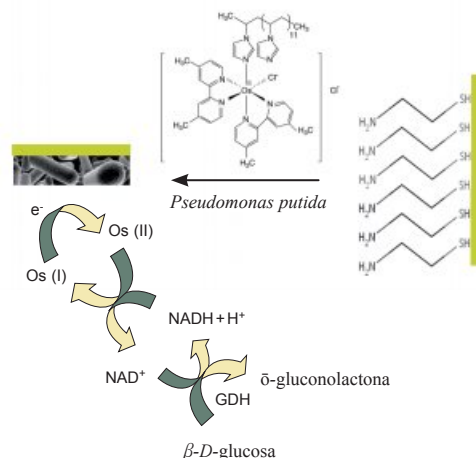


Figura 4. Configuración y funcionamiento de un biosensor microbiano para la detección de glucosa. Esquema basado en la referencia 15.

estos biosensores son electrodos sensibles a gases o a iones^{1,17} y condicionan la sensibilidad y selectividad del biosensor resultante. Estas configuraciones requieren un electrodo de referencia muy estable y preciso, a veces difícil de mantener, lo que puede limitar su aplicación.

En el grupo de los biosensores microbianos electroquímicos se suelen incluir también los dispositivos conductimétricos, en los que se relaciona la concentración del analito con los cambios de conductividad (o de resistividad) asociados a la producción o el consumo de especies iónicas durante la actividad metabólica de los microorganismos.¹⁸ Con los instrumentos sofisticados modernos, la medida de conductancia es extremadamente rápida y sensible, lo que hace que estos biosensores sean muy atractivos analíticamente. Además, se trata de dispositivos fácilmente miniaturizables, puesto que no se requiere la presencia de un electrodo de referencia en el sistema. Sin embargo, debido al carácter universal de las medidas, en muchos casos la selectividad de los biosensores conductimétricos es escasa.⁴

Finalmente, las células de combustible microbianas convierten la energía química en energía eléctrica por medio de las actividades metabólicas de los microorganismos.¹⁹ Puesto que tanto el consumo microbiano de los compuestos de interés como la inhibición de la actividad metabólica de los propios microorganismos por compuestos tóxicos, pueden alterar el funcionamiento de las células, éstas se pueden aplicar como biosensores para el análisis *in situ* y la determinación de analitos.

Aplicaciones

Análisis ambiental

El mayor campo de aplicación de los sensores microbianos electroquímicos es el análisis ambiental, utilizándose principalmente microorganismos con actividad enzimática para la detección de pesticidas, productos industriales y otros contaminantes de las aguas. Los nitrocompuestos aromáticos del tipo del nitrobenzeno, los nitrotoluenos y nitrofenoles se utilizan en la fabricación de explosivos, pesticidas, colorantes, plastificantes y productos farmacéuticos, y son contaminantes ambientales frecuentes de

las aguas naturales y la atmósfera. El uso de biosensores enzimáticos para la detección sensible e *in situ* de estos compuestos ha sido, desde hace algunos años, un objetivo prioritario de la Química Analítica, habiéndose descrito también varios diseños de biosensores microbianos basados en microorganismos modificados genéticamente con actividad organofosforo-hidrolasa, capaces de detectar tóxicos organofosforados como Paraoxón, Metil Paratión, Paratión, Fenitrotión y etil *p*-nitrofenol tiobenceno fosfonato.²⁰ Por ejemplo, la bacteria *Moraxella* sp. posee un complejo sistema enzimático capaz de degradar específicamente el *p*-nitrofenol a hidroquinona (HQ), y además es adecuada para estudios de degradación *in situ*, porque sobrevive en ambientes contaminados durante largos periodos de tiempo. Esta capacidad se ha aprovechado para la construcción de varios biosensores microbianos electroquímicos. Por ejemplo, se preparó un biosensor amperométrico para la detección altamente específica, sensible y rápida de *p*-nitrofenol, que se basa en la medida de la corriente de oxidación de la HQ sobre un electrodo de pasta de carbono que contiene las células, y que puede relacionarse con la concentración del fenol (Figura 5). Para preparar el electrodo, se mezclan 15 mg de células por cada gramo de pasta de carbono, y se utiliza un potencial de +0,3 V vs Ag/AgCl.²¹ Este mismo equipo diseñó un biosensor microbiano para la determinación de organofosforados *p*-nitrofenil sustituidos (PNPs-OPs), consistente en un electrodo de oxígeno disuelto modificado con la *Moraxella* sp. modificada genéticamente. Se utiliza la enzima organofósforo hidrolasa (OPH) en tándem con la maquinaria de oxidación que posee el microorganismo para degradar los PNPs-OPs, al tiempo que se monitoriza el consumo de oxígeno, que es proporcional a la concentración de analito. Las condiciones óptimas de trabajo se alcanzan para una cantidad de 0,35 mg de células, que son capaces de detectar hasta una concentración 0,1 μM de Paraoxón, con una excelente selectividad frente a triazinas, carbama-

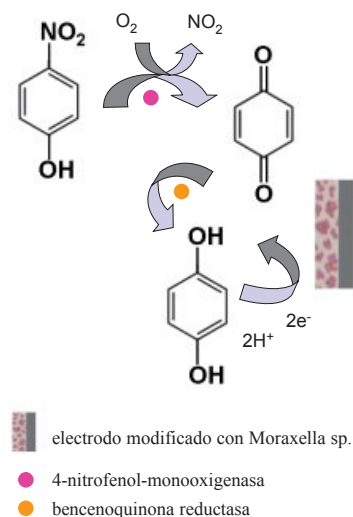


Figura 5. Esquema del proceso catalítico de la *Moraxella* sp. sobre el *p*-nitrofenol y la detección electroquímica sobre el electrodo modificado. Esquema basado en la referencia 21.

tos y otros insecticidas organofosforados sin sustituyentes PNP. Además, este biosensor es estable durante una semana cuando se almacena a 4^o C y su aplicabilidad se demostró analizando agua de lago.²²

Los biosensores microbianos también se han aplicado a la determinación de fenol y otros derivados fenólicos. La capacidad de degradación del fenol por parte de la bacteria *Pseudomonas putida* DSM 50026 es bien conocida. Esta propiedad la convierte en un interesante componente biológico de algunos biosensores basados en la medida de la actividad respiratoria de las células. La preparación del biosensor requiere que las células crezcan en presencia de fenol como única fuente de carbono. Para la construcción de un biosensor basado en un electrodo de grafito y resina epoxi (GECE) modificado con este microorganismo, las células crecidas durante 24 h se centrifugaron, y una capa del material biológico se depositó sobre la superficie del electrodo, inmovilizándola con ayuda de una membrana de gelatina y por entrecruzamiento con glutaraldehído. El biosensor microbiano proporcionó una respuesta lineal en el intervalo de 8 a 40 μM de fenol y fue aplicado con buenos resultados al análisis de aguas residuales.²³

Una de las tendencias más recientes en esta área es la basada en el empleo de microchips. Así, por ejemplo, usando una de estas plataformas se ha desarrollado un biosensor microbiano micro-fluidico para la determinación de la toxicidad del agua. Se basa en células bacterianas diseñadas para generar una secuencia de reacciones bioquímicas que en presencia de agentes genotóxicos suministran una señal eléctrica. El ensayo requiere un tiempo de inducción que oscila entre 30 y 120 min. Se añade un sustrato enzimático, *p*-aminofenilfosfato, que genera un material electroactivo, *p*-aminofenol, sólo cuando los tóxicos son detectados por la bacteria. Las células se integran en un microchip manufacturado por la tecnología MEMS que contiene varias microcámaras con volumen entre 2,5 y 157 nL y radios electródicos

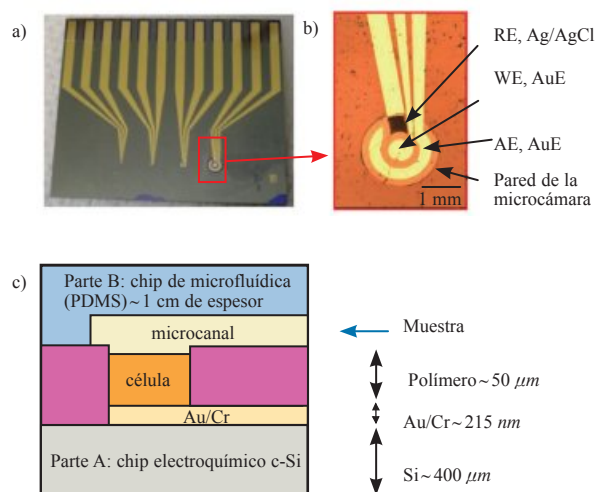


Figura 6. a) Microchip de silicio formado por cuatro microcámaras electroquímicas diferenciadas; b) vista interior de una microcámara de tres electrodos; c) diagrama esquemático de la unidad electroquímica. Adaptado de la referencia 24.

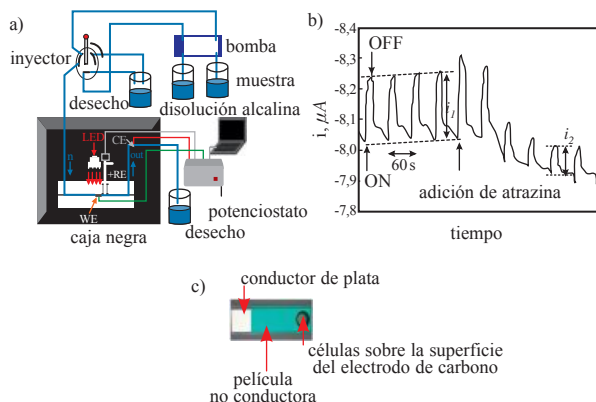


Figura 7. a) Sistema de flujo utilizado. La célula electroquímica está equipada con tres electrodos (WE, RE y CE). El electrodo de trabajo (WE) se irradia periódicamente con un LED rojo. b) Serie de señales obtenidas al iluminar durante 15 s (ON) seguido de oscuridad durante 45 s (OFF), y adición de atrazina; $E = 0,7$ V vs Ag/AgCl. c) Electrodo serigrafado modificado con células de *Chlorella vulgaris*. Adaptado de la referencia 28.

entre 37,5 y 300 μm (Figura 6). Este biosensor se ha probado con diferentes tóxicos: ácido nalidíxico (NA) y 2-amino-3-metilimidazo-[4,5-f]quinolina (IQ), detectándose una concentración mínima de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0,31 μM para IQ.²⁴

Otras aplicaciones medioambientales de estos biosensores incluyen la determinación de metales pesados. Como es sabido, estos metales, entre los que se encuentran Cu^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} y Pb^{2+} , están distribuidos en el ambiente y son la causa de uno de los problemas de contaminación más serios de nuestro tiempo. Proceden de fuentes antropogénicas particulares, que originan el aumento de la concentración de alguno o de varios de ellos. Generalmente su toxicidad deriva de la formación de enlaces con los grupos tiol de las proteínas.²⁵ Como ejemplo, puede citarse la preparación de un biosensor amperométrico basado en *Saccharomyces cerevisiae* para la determinación de Cu^{2+} . Las células utilizadas contenían un plásmido con el promotor inducible por el Cu^{2+} del gen *CUP1* de *S. cerevisiae* fusionado al gen *lacZ* de *E. coli*, respondiendo cuantitativamente a la presencia de Cu^{2+} mediante la síntesis de β -galactosidasa, el producto del gen *lacZ*. La β -galactosidasa transforma la lactosa en glucosa y galactosa, y el catabolismo de estos sustratos originan una disminución de la concentración de oxígeno, que se mide en un electrodo.²⁵

Basándose en la actividad metabólica de distintas bacterias adaptadas, también se han diseñado configuraciones para la detección de otros compuestos tóxicos. Entre ellos figuran benceno, tolueno y etilbenceno,²⁶ ácido 2,4-diclorofenoxiacético,²⁷ atrazina y 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea (DCMU).²⁸ En este último caso se utilizaron electrodos serigrafados sobre los que se inmovilizaba una mezcla de células de *Chlorella vulgaris*, nanotubos de carbono y alginato sódico, detectándose amperométricamente el oxígeno generado fotosintéticamente por la microalga. En la Figura 7 se ha representado un esquema de la configuración empleada, así como el electrodo y el tipo de señales obtenido. La respuesta del biosensor a la presencia de atrazina o de DCMU se mide como una señal de inhibición de la corriente de reducción del oxígeno.

Demanda bioquímica de oxígeno (DBO)

La demanda bioquímica de oxígeno (DBO) ha sido utilizada durante mucho tiempo como un índice de la contaminación orgánica en las aguas industriales o naturales. Con el fin de evitar el largo tiempo de espera (cinco días) que requiere su determinación por el método convencional (DBO_5), desde hace algún tiempo se vienen desarrollando biosensores microbianos de diversos tipos que permiten una estimación precisa aunque mucho más rápida de este parámetro de calidad de las aguas.

En una configuración reciente se empleó un sistema basado en la eucariota *Saccharomyces cerevisiae*, y un doble mediador, combinando el ferricianuro y la menadiona. El ferricianuro es un mediador muy eficiente para transportar electrones desde el centro redox de las enzimas bacterianas reducidas a la superficie del electrodo en presencia de compuestos orgánicos, mientras que la menadiona es un mediador lipofílico que puede penetrar a través de la membrana externa de la célula, formándose un radical que transfiere el electrón al ferricianuro. De este modo, el ferrocianuro formado alcanza el electrodo y es finalmente reoxidado, generando la respuesta electroquímica. En resumen, el ferrocianuro se forma a expensas de la materia orgánica que es asimilada por la célula en presencia de ferricianuro y menadiona, y su concentración puede relacionarse a través de la señal electroquímica generada, con la de la materia orgánica presente en la muestra. Se diseñó un sensor en la escala de los μL con un volumen de 560 μL y dos electrodos de carbono (Figura 8). La respuesta electroquímica se genera por cronoamperometría, aplicando un potencial de 900 mV al electrodo de trabajo durante 3 s y tomando la respuesta final del cronoamperograma como señal analítica. Este biosensor permite determinar DBO en el intervalo de 6,6 a 220 $\text{mg O}_2/\text{L}$ en 15 minutos, y es aplicable a distintos tipos de aguas dulces y marina.²⁹

Análisis de alimentos

Los biosensores microbianos han demostrado ser de gran utilidad en el campo del análisis de alimentos y en el seguimiento de procesos de fermentación. Se han descrito varios diseños basados en el consumo de oxígeno por la actividad respiratoria o metabólica de los microorganismos, para la determinación de glucosa³⁰ y de otros hidratos de carbono.³¹ Para preparar este último biosensor se utilizaron dos tipos diferentes de células: *P. fluorescens* y *P. putida* inmovilizadas sobre un electrodo de grafito modificado con una mezcla de quitosán y nanotubos de carbono. La respuesta se obtuvo midiendo la señal amperométrica de reducción del oxígeno a un potencial de -700 mV vs Ag/AgCl. Se alcanzaron buenos resultados para la determinación de galactosa, manosa y xilosa, sin interferencia de otros hidratos de carbono excepto la glucosa.³¹

Entre las configuraciones descritas en la literatura para la determinación de etanol, cabe destacar un biosensor amperométrico mediante inyección en flujo basado en un electrodo de carbono vitrificado modificado con la bacteria *Gluconobacter oxydans*, que permite la monitorización *off-line* del etanol producido en la fermentación alcohólica. La bacteria utilizada se caracteriza por poseer una elevada cantidad de deshidrogenasas en su membrana periplasmática, una de las cuales es la alcohol deshidrogenasa PQQ-dependiente (PQQ-ADH). Esta enzima es más selectiva al etanol que el

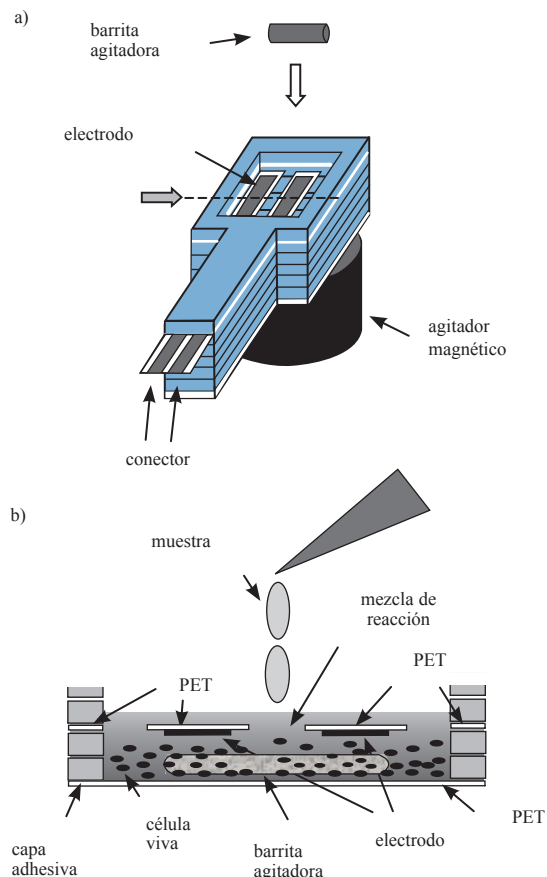


Figura 8. a) Esquema y b) sección transversal del biosensor microbiano utilizado para la determinación de DBO. PET, polietilentereftalato. Adaptado de la referencia 29.

sistema NAD-ADH o la alcohol oxidasa (AOX). Un inconveniente es que la bacteria también contiene una glucosa deshidrogenasa (PQQ-GDH), por lo que existe selectividad cruzada entre ambas especies cuando se analizan muestras que contienen etanol y glucosa. Es preciso, por tanto, realizar una determinación aparte de la concentración de glucosa. En estas condiciones la respuesta a etanol es lineal en el intervalo de $10 \mu\text{M}$ y $1,5 \text{ mM}$, con un tiempo de respuesta de 3 minutos. El tiempo de vida del biosensor se estimó en 72 h de trabajo continuado.³²

Los antibióticos de la familia de las β -lactamas se utilizan para el tratamiento de la mastitis en el ganado vacuno. Para la determinación de residuos de estos antibióticos en leche se desarrolló un biosensor microbiano basado en la medida de CO_2 cuya producción está relacionada con el crecimiento del microorganismo *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. La presencia del antibiótico inhibe el desarrollo de este microorganismo y, consecuentemente, la producción de CO_2 . La determinación se basa en la medida de la diferencia de concentración de CO_2 entre la muestra de leche contaminada con β -lactamas y una muestra de control conteniendo β -lactamas y una β -lactamasa de amplio espectro, que inactiva selectivamente a estos antibióticos. En este caso, la diferencia de potencial entre los dos electrodos dispuestos en el sensor de CO_2 es la que se relaciona con la concentración de analito.³³

Tendencias futuras

Aunque los biosensores microbianos se han estudiado ampliamente durante décadas, su comercialización se ha visto limitada por las desventajas intrínsecas de emplear microorganismos como elementos de reconocimiento (respuesta lenta, poca sensibilidad, pobre selectividad y escasa estabilidad). De ahí que las tendencias actuales y futuras vayan encaminadas al desarrollo de tecnologías que permitan superar o minimizar estas limitaciones y ampliar las aplicaciones de estos biosensores en el mercado. Afortunadamente, con el desarrollo en los últimos años de la biotecnología, la micro/nano-tecnología, y estrategias novedosas de inmovilización, los biosensores microbianos resultan cada vez más poderosos para la resolución de problemas analíticos prácticos. Con los avances en biología molecular y la disponibilidad de la secuencia genómica de más tipos de células, se ha abierto un sinfín de posibilidades de adaptar los microorganismos para mejorar la actividad de una enzima existente, expresar proteínas en organismos huésped distintos o en distintas localizaciones, sobreproducir enzimas microbianas de interés o desarrollar organismos capaces de trabajar en condiciones extremas de temperatura y resistentes a tóxicos. La ingeniería genética (metabólica) también puede aplicarse a la mejora de la selectividad de estos biosensores mediante la activación de ciertas vías metabólicas de interés y la absorción celular, a la vez que se desactivan otras rutas indeseables. Desde el punto de vista de la respuesta, otra manera de mejorar la selectividad es desarrollar redes de sensores microbianos. La introducción del analito de interés en estas redes genera un patrón de respuesta característico que, combinado con el análisis de redes artificiales, posibilita su identificación inequívoca. Por otra parte, con el desarrollo de la nanotecnología, los materiales nanoestructurados encuentran en estos biosensores una enorme utilidad, al objeto de mejorar su sensibilidad, debido a su buena biocompatibilidad, propiedades de transferencia electrónica mejoradas y mayor área superficial. Además, con el desarrollo de la técnica de Laboratorio-en-un-chip, la integración de microorganismos en un chip de microfluídica seguramente proporcionará en el futuro, no sólo aspectos novedosos en la investigación en el campo de los biosensores microbianos, sino también características analíticas mejoradas, ya que tales sistemas sólo requerirían cantidades mínimas de muestra y ofrecerían una mayor rapidez de respuesta y una buena sensibilidad.

Desde el punto de vista comercial, también es deseable la puesta a punto de nuevas estrategias de inmovilización sencillas que conduzcan a preparaciones de células inmovilizadas estables, con un mejor almacenamiento y estabilidad operacional. En este sentido, la inmovilización reversible bioespecífica de enzimas utilizando lectinas ofrece una alternativa prometedora para la inmovilización de células microbianas y, por tanto, para la fabricación de este tipo de biosensores. Sin duda alguna, una fusión fructífera entre las ciencias biológicas y otras disciplinas contribuirá a aprovechar todo el potencial de esta tecnología en el futuro.

Agradecimientos

S. Campuzano agradece la inestimable ayuda prestada por la Prof. P. Yáñez-Sedeño en la preparación de este artículo.

Bibliografía

1. S. F. Souza, *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 337–353.
2. Y. Lei, W. Chen, A. Mulchandani, *Anal. Chim. Acta* **2006**, *568*, 200–210.
3. M. P. Byfield, R. A. Abuknesha, *Biosens. Bioelectron.* **1994**, *9*, 373–400.
4. S. Liang, J. Wenzhao, H. Changjun, L. Yu, *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 1788–1799.
5. S. H. Song, S. S. Choi, K. Park, Y. J. Yoo, *Enzyme Microb. Technol.* **2005**, *37*, 567–573.
6. D. Yu, J. Volponi, S. Chhabra, C. J. Brinker, A. Mulchandani, A. K. Singh, *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 1433–1437.
7. J. H. Flemming, H. K. Baca, M. Werner-Washburne, S. M. Brozik, G. P. López, *Sens. Actuators, B* **2006**, *113*, 363–381.
8. J. Bjerketorp, S. Hakansson, S. Belkin, J. K. Jansson, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2006**, *17*, 43–49.
9. T. Ahuja, I. A. Mir, D. Kumar, D. Rajesh, *Biomaterials* **2007**, *28*, 791–805.
10. S. K. Jha, M. Kanungo, A. Nath, S. F. Souza, *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 2637–2642.
11. L. Ding, D. Du, X. J. Zhang, H. X. Ju, *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 3160–3170.
12. I. Vostiar, E. E. Ferapontova, L. Gorton, *Electrochem. Commun.* **2004**, *6*, 621–626.
13. S. K. Chaudhuri, D. R. Lovley, *Nature Biotechnol.* **2003**, *21*, 1229–1232.
14. T. Ikeda, T. Kurosaki, K. Takayama, K. Kano, K. Miki, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 192–198.
15. S. Timur, B. Haghighi, J. Tkac, N. Pazarlıoğlu, A. Telefoncu, L. Gorton, *Bioelectrochem.* **2007**, *71*, 38–45.
16. S. Timur, U. Anik, D. Odaci, L. Gorton, *Electrochem. Commun.* **2007**, *9*, 1810–1815.
17. J. Bobacka, A. Ivaska, A. Lewenstam, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 329–351.
18. S. R. Mikkelsen, G. A. Rechnitz, *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 1737–1742.
19. D. Paul, G. Pandey, J. Pandey, R. K. Jain, *Trends. Biotechnol.* **2005**, *23*, 135–142.
20. Y. Lei, P. Mulchandani, J. Wang, W. Chen, A. Mulchandani, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2007**, *136*, 243–250.
21. P. Mulchandani, C. M. Hangarter, Y. Lei, W. Chen, A. Mulchandani, *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *21*, 523–527.
22. P. Mulchandani, W. Chen, A. Mulchandani, *Anal. Chim. Acta* **2006**, *568*, 217–221.
23. U. A. Kirgoz, D. Odaci, S. Timur, A. Mercoçi, N. Pazarlıoğlu, A. Telefoncu, S. Alegret, *Bioelectrochem.* **2006**, *69*, 128–131.
24. H. Ben-Yoav, A. Biran, R. Pedahzur, S. Belkin, S. Buchinger, G. Reifferscheidm Y. Shacham-Diamond, *Electrochim. Acta* **2009**, *54*, 6113–6118.
25. K. Tag, K. Riedel, H. J. Bauer, G. Hanke, K. H. R. Baronian, G. Kunze, *Sens. Actuators B* **2007**, *122*, 403–409.
26. J. D. Rasinger, G. Marrazza, F. Briganti, A. Scozzafava, M. Mascini, A. P. F. Turner, *Anal. Lett.* **2005**, *38*, 1531–1547.
27. D. Odaci, M. K. Sezgentürk, S. Timur, N. Pazarlıoğlu, R. Pilloton, E. Dinçkaya, A. Telefoncu, *Prep. Biochem. Biotechnol.* **2009**, *39*, 11–19.
28. I. Shitanda, S. Takamatsu, K. Watanabe, M. Itagaki, *Electrochim. Acta* **2009**, *54*, 4933–4936.
29. H. Nakamura, K. Suzuki, H. Ishikuro, S. Kinoshita, R. Koizumi, S. Okuma, M. Gotoh, I. Karube, *Talanta* **2007**, *72*, 210–216.
30. D. Odaci, S. K. Kayahan, S. Timur, L. Toppare, *Electrochim. Acta* **2008**, *53*, 4104–4108.
31. D. Odaci, S. Timur, A. Telefoncu, *Sens. Actuators B* **2008**, *134*, 89–94.
32. M. Valach, J. Katrik, E. Šturdík, P. Gemeiner, *Sens. Actuators B* **2009**, *138*, 581–586.
33. A. M. Ferrini, V. Mannoni, G. Carpico, G. E. Pellegrini, *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 784–788.



"PREMIOS DE INVESTIGACIÓN UNIVERSIDAD DE SEVILLA-BRUKER"



Primer premio, de 2.500 €, destinado a recompensar los trabajos de investigación publicados de mayor impacto tecnológico en el campo de la **RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR APLICADA**.

Segundo premio, de 1.000 €, destinado a apoyar un proyecto de investigación de carácter aplicado y con impactotecnológico.

Ambos premios deberán involucrar el **uso de los equipos del Servicio General de Investigación de Resonancia Magnética Nuclear de la Universidad de Sevilla**.

Plazo abierto **hasta el 31 de diciembre de 2011**.

Bases e Impreso de Solicitud

<http://investigacion.us.es/scisi/sgi/anuncios-incidencias>

Para mayor información citius@us.es

Tlf: 954.55.01.24