Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Desarrollo de biosensores/bioensayos para la determinación rápida de parámetros indicadores de calidad de agua : Técnicas electroquímicas, BOD y toxicidad

Bonetto, María Celina

2013-12-03

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Bonetto, María Celina. (2013-12-03). Desarrollo de biosensores/bioensayos para la determinación rápida de parámetros indicadores de calidad de agua : Técnicas electroquímicas, BOD y toxicidad. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Bonetto, María Celina. "Desarrollo de biosensores/bioensayos para la determinación rápida de parámetros indicadores de calidad de agua : Técnicas electroquímicas, BOD y toxicidad". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-12-03.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Desarrollo de biosensores/bioensayos para la determinación rápida de parámetros indicadores de calidad de agua. Técnicas electroquímicas, BOD y toxicidad

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Lic. María Celina Bonetto

Director de Tesis: Dr. Eduardo Cortón

Consejero de Estudios: Dra. Valeria Levi

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biosensores y Bioanálisis, Departamento de Química Biológica e IQUIBICEN, FCEN, UBA.

Buenos Aires, 3 de diciembre de 2013.

Desarrollo de biosensores/bioensayos para la determinación rápida de parámetros indicadores de calidad de agua. Técnicas electroquímicas, BOD y toxicidad

RESUMEN

En esta Tesis se presenta un bioensayo microbiano amperométrico para la determinación rápida de BOD (demanda bioquímica de oxígeno) en muestras de agua basado en la utilización de ferricianuro como aceptor de electrones del metabolismo bacteriano. Se logró simplificar la metodología generalmente utilizada en este tipo de bioensayos y el rango lineal obtenido representa una gran mejora frente al rango lineal que presenta el ensayo BOD_5. Mediante este bioensayo se determinó la BOD de varias muestras de agua obteniéndose una buena correlación con los resultados del test BOD_5 y un RSD ≤ 10%. De manera de diseñar un sistema portátil a partir de este bioensayo amperométrico, se obtuvieron cultivos liofilizados de *K. pneumoniae* metabólicamente activos, hasta 35 días después de realizar la liofilización y se estudió la posibilidad de utilizar electrodos de tinta de Au descartables realizados por *screen-printing*, en ensayos de convección forzada.

Otra alternativa analizada para la determinación rápida de BOD de muestras reales fue el desarrollo de un biosensor potenciométrico basado en el empleo de un electrodo potenciométrico sensible a CO_2 y la inmovilización en membrana de distintos microorganismos. Este biosensor también permitió determinar la BOD de muestras de agua reales obteniéndose una buena correlación con los resultados del test BOD_5.

Como último trabajo de esta Tesis, se desarrolló un bioensayo para la determinación de toxicidad aguda de nanopartículas de Ag, basado en la técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica, empleando electrodos interdigitados de Au y células NHDF (*normal human dermal fibroblasts*) como material biológico. Este trabajo se realizó en parte en el Austrian Institute of Technology (AIT) bajo la dirección del Dr. Peter Ertl.

Palabras claves: respirometría de ferricianuro, bioensayo, biosensor, BOD, toxicidad de nanopartículas, electroquímica

Development of biosensors/bioassays for the rapid determination of parameters water quality indicators. Electrochemical techniques, BOD and toxicity

ABSTRACT

In this Thesis, we propose an amperometric microbial bioassay for the rapid determination of BOD (biochemical oxygen demand) in water samples based on the use of ferricyanide as electron acceptor of bacterial metabolism. The methodology generally used in this type of bioassays has been successfully simplified and the linear range obtained represents a great improvement over the linear range that the BOD_5 test presents. Through this bioassay, the BOD of real wastewater samples was determined, obtaining a good correlation with the results of the BOD_5 test and a RSD $\leq$ 10%. In order to design a portable system from this amperometric bioassay, freeze-dried cultures from *K. pneumoniae*, metabolically active, were obtained up to 35 days after freeze drying and it was studied the possibility of using disposable ink electrodes of gold made by screen-printing in forced convection assays.

Another alternative analyzed for the rapid determination of BOD of real wastewater samples was the development of a potentiometric biosensor, based on the employment of a potentiometric electrode sensitive to CO_2, and the immobilization of diverse microorganisms in membrane. This biosensor has also allowed us to determine the BOD of real wastewater samples obtaining a good correlation with the results of the BOD_5 test.

The last work of this Thesis has been the development of a bioassay for the determination of acute toxicity of Ag nanoparticles, based on the technique of electrochemical impedance spectroscopy, using interdigitated electrodes of Au and NHDF cells (normal human dermal fibroblasts) as biological material. This work was carried out in part, at the Austrian Institute of Technology (AIT) under the direction of Dr. Peter Ertl.

Keywords: ferricyanide respirometry, bioassay, biosensor, BOD, toxicity of nanoparticles, electrochemistry

AGRADECIMIENTOS

Al Jefe, por darme la oportunidad de participar en sus proyectos, de aprender a mi manera y de poder hacer una pasantía en el Austrian Institute of Technology.
Yo opino, no sé él, que logramos hacer una buena combinación de ideas, experimentos y resultados, gracias a mi ansiedad por abarcar mucho y variado y a su paciencia e interés por que uno aprenda y pueda integrarse en el sistema académico. Considero que ha sido el mejor director de Tesis que pude haber tenido.

A las autoridades del departamento de Química Biológica que permitieron la realización de este trabajo, especialmente a los excelentes secretarios Ayelén y Martín.

A la Dra. Sandra Ruzal y su grupo de trabajo.

Al Dr Peter Ertl y a todo su equipo (Drago, Verena, Mario, Jan y Michaela)… un placer.

Al Centro de Procesos Superficiales del Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI), especialmente a la Lic. Anahí Weinstock, al Dr. Gabriel Ybarra y a la Dra. Liliana Fraigi que colaboraron con este proyecto.

A Leo, Leonardo Cantoni, por su gran, gran, GRAN ayuda con la electrónica, los distintos equipamientos, las explicaciones y las charlas académicas reflexivas.

Al *staff* del laboratorio de Biosensores y Bioanálisis, especialmente a Naty y As, no sólo mis compañeras de trabajo sin las cuales los experimentos no hubieran tenido tan buena interpretación, sino además mis amigas, que hicieron que el ambiente laboral sea GENIAL. A Mer, sumada un tiempo más tarde a este grupo de amigas con las cuales trabajar es realmente un placer.

A mis viejos, que esperaron 7 años hasta que encontrara la famosa vocación! Esta interfaz entre la biología, la ingeniería, el diseño y… la música.

A todos los que participaron en el proceso de que encontrara mi lugar en el mundo.

Esta tesis se realizó con el aporte económico del CONICET, AGENCIA y la UBA.

Para mamá y papá…

“La verdadera ciencia enseña, por encima de todo, a dudar y a ser ignorante”

Miguel de Unamuno

RESUMEN i
ABSTRACT ii
AGRADECIMIENTOS iii
INDICE vi
INDICE DE FIGURAS xiii
INDICE DE TABLAS xxii
INDICE DE ECUACIONES xxiv
TRABAJOS PUBLICADOS xxvi
LISTA DE ABREVIATURAS xxvii

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1.-BIOSENSORES 1

1.1.1.-Definiciones, características y clasificación 1
1.1.2.-Transductores 3
1.1.2.1.-Transductores electroquímicos 3
1.1.2.2.-Otros transductores 4
1.1.3.-Material biológico. Células y enzimas 6
1.1.3.1.-El uso de enzimas como material biológico 6
1.1.3.2.-El uso de células como material biológico 7
1.1.4.-Inmovilización y preparación del material biológico 10

1.2.-CONCEPTOS BÁSICOS DE ELECTROQUÍMICA 15

1.2.1.-Celda electroquímica 18
1.2.2.-Procesos faradaicos y no-faradaicos 18
1.2.3.-Sistema de tres electrodos 19
1.2.4.-Sistema de dos electrodos 21
1.2.5.-Instrumentación empleada 22

1.3.-BIOSENSORES BASADOS EN TRANSDUCTORES ELECTROQUÍMICOS 23

1.3.1.-Biosensores amperométricos 24
1.3.1.1.-Fundamentos teóricos 24

1.3.1.2.-Técnicas amperométricas empleadas 25
1.3.1.2.i.-Cronoamperometría 25
1.3.1.2.ii.-Voltametría cíclica (CV) 26
1.3.2.-Biosensores potenciométricos 28
1.3.2.1.-Fundamentos teóricos y funcionamiento 28
1.3.2.2.-ISE de membrana de vidrio 29
1.3.3.-Biosensores impedimétricos 30
1.3.3.1.-Fundamentos teóricos 30
1.3.3.2.-Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) 32
1.3.3.3.-Electrodos interdigitados (IDES) 33
1.3.3.4.-Análisis de los datos obtenidos mediante EIS 34

1.4.-PARÁMETROS GENERALES DE CALIDAD DE AGUA 37

1.4.1.-Demanda bioquímica de oxígeno (BOD) y Test BOD_5 38
1.4.2.-Técnicas alternativas y respirometría de ferricianuro 39
1.4.3.-Toxicidad 41
1.4.3.1.-Ensayo MICROTOX® 42
1.4.3.2.-Ensayo de citotoxicidad MTT 43

1.5.-USO DE BIOSENSORES EN APLICACIONES AMBIENTALES, INDUSTRIALES Y CLÍNICAS 43

1.5.1.-Aplicaciones de biosensores amperométricos 43
1.5.2.-Aplicaciones de biosensores potenciométricos 44
1.5.3.-Aplicaciones de biosensores impedimétricos 45

1.6.-REFERENCIAS 46

CAPÍTULO 2: DESARROLLO DE UN BIOENSAYO METABÓLICO BASADO EN RESPIROMETRÍA DE FERRICIANURO PARA LA DETERMINACIÓN RÁPIDA DE BOD

2.1.-INTRODUCCIÓN 59

2.2.-MATERIALES Y MÉTODOS 61

2.2.1.-Soluciones y medios de cultivo 61

2.2.2.-Aislamiento de cepas e identificación de *Klebsiella pneumoniae* y *Bacillus cereus* 62

2.2.3.-Condiciones de cultivo del consorcio bacteriano BODSEED 63

2.2.4.-Condiciones de mantenimiento y cultivo de *K. pneumoniae* y otras cepas de BODSEED 64

2.2.5.-Fabricación y manipulación de los electrodos 64

2.2.6.-Ensayos de voltametría cíclica, CV 65

2.2.7.-Ensayos de cronoamperometría, CA 65

2.2.8.-Curva de calibración de ferrocianuro 65

2.2.9.-Consideraciones generales de las muestras con bacterias 65

2.2.10.-Preparación e incubación de muestras burbujeadas con N_2 66

2.2.11.-Preparación de muestras para la elección de un inhibidor adecuado de *K. pneumoniae* 66

2.2.12.-Efecto de diferentes fuentes de carbono en la producción de corriente 67

2.2.13.-Construcción de curvas de calibración con soluciones estándar, GGA y $OECD_{std}$ 67

2.2.14.-Determinación de BOD_5 68

2.2.15.-Medición de BOD de muestras de agua, simuladas o reales, empleando el bioensayo desarrollado en este trabajo, $BOD_{K.\ pneumoniae}$ 68

2.2.16.-Equipamiento utilizado 69

2.2.17.-Análisis estadístico 69

2.3.-RESULTADOS 70

2.3.1.-Capacidad de reducción de ferricianuro de las cepas aisladas empleándolas individualmente y del consorcio BODSEED 70

2.3.2.-Voltametrías cíclicas de muestras con ferricianuro incubado en presencia o ausencia de *K. pneumoniae* 73

2.3.3.-Curva de calibración de ferrocianuro 74

2.3.4.-Búsqueda de un inhibidor del metabolismo de *K. pneumoniae* 74

2.3.5.-Efecto de distintas concentraciones de ferricianuro en la producción de corriente y la DO de *K. pneumoniae* 78
2.3.6.-Efecto de la concentración de *K. pneumoniae* y la des-aireación de las muestras en la producción de corriente 80
2.3.7.-Comparación entre el uso de *K. pneumoniae* o de un consorcio bacteriano, BODSEED, con patrones de GGA 82
2.3.8.-Calibración del bioensayo empleando *K. pneumoniae* y patrones de $OECD_{std}$ 84
2.3.9.-Aplicación del bioensayo para la determinación de BOD en muestras reales de agua ($BOD_{K.\ pneumoniae}$) y comparación con los valores de BOD_5 86

2.4.-DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES 88

2.5.-REFERENCIAS 89

CAPÍTULO 3: AVANCES PARA EL DESARROLLO DE EQUIPAMIENTO. USO DE LIOFILIZADOS Y CONVECCIÓN FORZADA

3.1.-INTRODUCCIÓN 93

3.2.-MATERIALES Y MÉTODOS 96

3.2.1.-Soluciones y medios de cultivo 96
3.2.2.-Proceso de liofilización de *Klebsiella pneumoniae* 96
3.2.3.-Tasas de supervivencia luego de la liofilización 98
3.2.4.-Fabricación y manipulación de los electrodos 99
3.2.5.-Ensayos de cronoamperometría, CA 100
3.2.6.-Consideraciones generales de las muestras con *K. pneumoniae* 101
3.2.7.-Actividad metabólica de *K. pneumoniae* luego de la liofilización. Curvas de calibración con patrones de GGA y $OECD_{std}$ 101
3.2.8.-Ensayos de voltametría cíclica, CV 102
3.2.9.-Curva de calibración de ferrocianuro 102
3.2.10.-Equipamiento utilizado 102
3.2.11.-Análisis estadístico 103

3.3.-RESULTADOS 103

3.3.1.-Supervivencia de *K. pneumoniae* luego de la liofilización 103

3.3.2.-Actividad metabólica de *K. pneumoniae* luego de la liofilización 105

3.3.3.-Ensayos con convección forzada 110

3.4.-DISCUSIONES Y CONCLUSIONES 121

3.5.-REFERENCIAS 122

CAPÍTULO 4: DESARROLLO DE UN BIOSENSOR POTENCIOMÉTRICO SENSIBLE AL CO_2 BASADO EN LA INMOVILIZACIÓN DE MICROORGANISMOS PARA LA DETERMINACIÓN RÁPIDA DE BOD

4.1.-INTRODUCCIÓN 125

4.2.-MATERIALES Y MÉTODOS 128

4.2.1.-Soluciones y medios de cultivo 128

4.2.2.-Ensamblado del electrodo potenciométrico de CO_2 128

4.2.3.-Inmovilización de BODSEED o *Saccharomyces cerevisiae* en membrana de filtración y ensamblado del biosensor 128

4.2.4.-Procedimiento experimental, estabilización de la señal 130

4.2.5.-Calibración del biosensor usando *S. cerevisiae* y soluciones estándar de GGA. Efectos del pH o NaCl en el funcionamiento del biosensor 130

4.2.6.-Calibración del biosensor usando BODSEED y soluciones estándar de GGA 131

4.2.7.-Determinación de BOD_{CO2} en muestras de agua, reales o simuladas, utilizando como material biológico un consorcio microbiano, BODSEED 131

4.2.8.- Determinación de BOD_5 de muestras de aguas cloacales reales o muestras simuladas 132

4.2.9.-Equipamiento utilizado 132

4.3.-RESULTADOS 132

4.3.1.-Calibración del biosensor 132
4.3.2.-Efectos del pH y el NaCl en el funcionamiento del biosensor 134
4.3.3.- Medición de muestras de aguas cloacales (BOD_{CO2}) y comparación con los valores de BOD_5 137

4.4.-DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES 138

4.5.-REFERENCIAS 139

CAPÍTULO 5: CARACTERIZACIÓN DE IDES Y ESTUDIOS DE TOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN CÉLULAS NHDF

5.1.-INTRODUCCIÓN 141

5.2.-MATERIALES Y MÉTODOS 144

5.2.1.-Soluciones empleadas y medios de cultivo 144
5.2.2.-Electrodos interdigitados (IDES) utilizados 144
5.2.3.-Protocolo de medición utilizado en los ensayos con $IDES_p$ 146
5.2.4.-Cultivo de células NHDF 147
5.2.5.-Preparación de células NHDF para su uso en los experimentos de EIS 147
5.2.6.-Incubación de células NHDF en agitación 147
5.2.7.-Ensayos de EIS con $IDES_p$ 148
5.2.8.-*Setup* experimental utilizado en los ensayos con células NHDF 148
5.2.9.-Ensayos de EIS con $IDES_m$ y soluciones de KCl 149
5.2.10.-*Setup* experimental utilizado en la caracterización de $IDES_m$ 149
5.2.11.-Equipamiento empleado 150

5.3.-RESULTADOS 150

5.3.1.-Resultados preliminares: Frecuencias (ω) y dimensiones de $IDES_p$ óptimas para el monitoreo electroquímico del cultivo de NHDF 150
5.3.2.-Efectos en la adhesión celular de NHDF luego de ser incubadas con NPs de Ag 153

5.3.3.-Caracterización de $IDES_m$ mediante ensayos de EIS, utilizando soluciones de distinta conductividad 159

5.4.-DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES 161

5.5.-REFERENCIAS 162

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES GENERALES

6.1.-CONCLUSIONES GENERALES 165

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Esquema de un biosensor. El reconocimiento biológico provee de especificidad a la técnica, permitiendo cuantificar el analito aún en presencia de otras sustancias. 2

Figura 1.2: Esquema de un biosensor enzimático basado en la utilización de un transductor electroquímico. Un electrodo registra la transferencia de carga producida cuando la enzima, el bioreceptor, interactúa con el analito de interés produciendo una señal. En este biosensor amperométrico, la señal es la corriente faradaica. 4

Figura 1.3: Esquema básico del funcionamiento de un biosensor óptico basado en el uso de GEMs (Belkin, 2003). En el esquema se muestra en a) que si el analito no está presente, no interacciona con el receptor y no se detecta la señal óptica. En b) el analito es detectado por la célula y se produce el fenómeno que dará lugar a la señal óptica, en este caso la síntesis de una proteína fluorescente. 5

Figura 1.4: Diagrama del concepto tri-modular de una célula. 8

Figura 1.5: A) Esquema general del transporte de masa que debería permitir el soporte físico de inmovilización, en este caso, una membrana de filtración (intercambio de nutrientes, analitos y oxígeno), en el diseño de un biosensor, en este caso basado en el uso de ferricianuro como mediador. B) Microfotografía de células bacterianas inmovilizadas en una membrana de filtración de tamaño de poro adecuado para retenerlas, pero que permitiría el intercambio de gases y compuestos entre las células y la muestra. 14

Figura 1.6: Algunas de las variables que afectan las reacciones en un electrodo. 16

Figura 1.7: Modelo propuesto de la estructura de la doble capa iónica que se forma en la interfaz electrodo/solución. 17

Figura 1.8: Esquema de un sistema de tres electrodos: WE, RE y CE, y el circuito eléctrico que se genera entre ellos al conectarlos a una fuente de poder de alta impedancia. 20

Figura 1.9: Esquema de un sistema de dos electrodos, WE y pseudoreferencia, y sus relaciones dentro del circuito eléctrico generado al conectarlos a una fuente de poder de alta impedancia. 22

Figura 1.10: Voltamograma cíclico típico de un proceso rédox reversible, en donde se transfiere 1 electrón. 27

Figura 1.11: Esquema de un ISE de membrana de vidrio, electrodo de pH combinado. 30

Figura 1.12: Diagrama de relaciones entre corriente y voltaje alternantes a ω y ϕ distintas de 0. 32

Figura 1.13: Diagrama de fasores que presenta las relaciones entre la Z_{im}, Z_{re}, Z y ϕ. 32

Figura 1.14: Vista planar de un IDES en donde se muestra el ancho del dedo, W, distancia entre electrodos, G, el largo de cada dedo, L y el alto total de los electrodos, H_{total}. 33

Figura 1.15: Diagrama del campo eléctrico que se produciría al utilizar IDES para la técnica de EIS (Ertl y Heer, 2009). 34

Figura 1.16: *Bode plot* de una EIS generada usando datos simulados. La línea entera representa la Z no-faradaica y la punteada, la Z faradaica (Daniels, 2010). 35

Figura 1.17: *Nyquist plot* de una EIS generada usando datos simulados. La línea entera representa la Z no-faradaica y la punteada, la Z faradaica (Daniels, 2010). 35

Figura 2.1: Curva de crecimiento de *Klebsiella pneumoniae*, cultivo realizado sin agitación (n = 2). 71

Figura 2.2: Valores de corriente, proporcionales a la actividad microbiana de reducción de ferricianuro, obtenidos por cronoamperometría (CA), incubando durante 2 h las cepas *Klebsiella pneumoniae* (★), *Bacillus cereus* (▲), BO8 (►), BO10 (◄), BO366 (▼), BO367 (◆) y BO368 (●), al terminar la incubación se agregó formol. Los valores representan $\bar{x} \pm DS_{(n-1)}$ del metabolismo total (n = 2). 72

Figura 2.3: CV de muestras conteniendo ferricianuro (6,25 g/L) y glucosa (5 g/L) en MM y en ausencia (negro) o presencia (rojo) de *K. pneumoniae* (n = 2). Una rampa de potencial entre -600 y +700 mV a 50 mV/s fue aplicada a un WE de Pt. 73

Figura 2.4: Curva de calibración de ferrocianuro (n = 2) realizada por cronoamperometría, CA. y = -0,00417 + 0,14715 x, r^2: 0,99964. 74

Figura 2.5: Efecto de los inhibidores en la reducción bacteriana del ferricianuro. Las mediciones de CA (a +500 mV *vs* $Ag/AgCl_{sat}$) fueron realizadas en controles CP (□), etanol (△), formaldehido (◊), iodo povidona 5 g/L (◁), iodo povidona 0,5 g/L (▷), isopropanol (▽), NaOH (x), hipoclorito de sodio (+), o timol (○) luego de t = 75, 120 y 180 min (en la figura insertada se incluye el H_2O_2 (⋆)). La flecha indica el tiempo de agregado de los inhibidores. Los valores representan $\bar{x} \pm DS_{(n-1)}$ del metabolismo total (n = 4). 76

Figura 2.6: Diferencia del efecto de los inhibidores en la reducción bacteriana del ferricianuro. Las mediciones de CA fueron realizadas en muestras controles CP (□), con formaldehido (◊), con iodo povidona 0,5 g/L (▷), con isopropanol (▽), con NaOH (x) o con timol (○) a t = 4, 25, 49, y 74 h (o 3, 24, 48 y 73 h luego de agregar cada inhibidor). La flecha indica el tiempo de agregado de los inhibidores. Los valores representan $\bar{x} \pm DS_{(n-1)}$ del metabolismo total (n = 4). 77

Figura 2.7: Efecto de la concentración de ferricianuro en la producción de corriente (□ y línea entera) y en el crecimiento microbiano, medido de acuerdo a la DO de las muestras (○ y línea punteada) luego de incubar a *K. pneumoniae* durante 2 h en presencia de 5 g/L de glucosa. Los valores representan $\bar{x} \pm DS_{(n-1)}$ (n = 2) de ensayos de CA. 79

Figura 2.8: Efectos de la concentración bacteriana y la des-aireación de las muestras en la producción de corrientes. Ensayos de CA en los que distintas concentraciones de *K. pneumoniae* fueron incubadas en presencia de 6,25 g/L de ferricianuro y 5 g/L de glucosa en la condición A (△, □, ○) o B (▲, ■, ●) durante 1,5 h; 2 g/L de formaldehido fueron agregados luego de la incubación. Los metabolismos totales (△, ▲ y línea de guiones), exógenos (□, ■ y línea entera) y endógenos (○, ● y línea de puntos) han sido incluidos y los valores representan $\bar{x} \pm DS_{(n-1)}$ (n = 4). 81

Figura 2.9: Curvas de calibración de GGA, realizadas mediante CA, utilizando *K. pneumoniae* (□) o BODSEED (▲) como material biológico. Los valores representan $\bar{x} \pm DS_{(n-1)}$ (n = 4). 83

Figura 2.10: Regresión lineal obtenida al realizar la curva de calibración de GGA utilizando *K. pneumoniae* como biocatalizador. En la figura insertada se observa el rango lineal obtenido con BODSEED y la pendiente, muy similar a la obtenida con *K. pneumoniae*. 84

Figura 2.11: Curva de calibración utilizando $OECD_{std}$ luego de centrifugar (□) y luego de agregar formol (○) a las muestras, después de incubar a *K. pneumoniae* durante 2 h en presencia de ferricianuro. Los valores representan $\bar{x} \pm DS_{(n-1)}$ (n = 4). En las figuras insertadas, superior e inferior, se observan las regresiones lineales de la curva de calibración luego de centrifugar o agregar formol, respectivamente. 85

Figura 3.1: Curva de crecimiento de *K. pneumoniae* cultivada en agitación a 29 °C. 97

Figura 3.2: Diferentes WE utilizados en este trabajo. A) Pt de 0,196 mm^2; B) Tinta de carbón, por *screen-printing*, de 4 mm^2; C) Tinta de Au, por *screen-printing*, de 0,785 mm^2. 100

Figura 3.3: Curvas de calibración utilizando GGA como única fuente de carbono. Los ensayos de CA fueron realizados utilizando un WE de Pt (sistema Es_1) y distintos cultivos liofilizados de *K. pneumoniae*, A_1 (△), A_2 (▽), A_3 (◁), A_4 (▷), A_5 (◐), A_6 (◑), B_2 (□), o un cultivo líquido (★). Los valores representan $\bar{x} \pm DS_{(n-1)}$ del metabolismo exógeno (n = 3). 106

Figura 3.4: Curvas de calibración utilizando $OECD_{std}$ como fuente de carbono. Ensayos cronoamperométricos medidos con un WE de Pt, sistema Es_1, utilizando distintos cultivos liofilizados de *K. pneumoniae*, A_2 (▽), A_3 (◁), A_4 (▷), A_5 (◐), o un cultivo líquido (★). Los valores representan $\bar{x} \pm DS_{(n-1)}$ del metabolismo exógeno (n = 3). 107

Figura 3.5: Esquema del electrodo vibratorio realizado por el INTI (y descripto en la Sección 3.2.4). Se indican las posiciones de fijación que se estudiaron (la distancia de las posiciones 1, 2 y 3, calculadas hasta el centro del WE, fueron de 10, 9 y 8 cm, respectivamente). 111

Figura 3.6: Voltametrías cíclicas de una solución conteniendo 6,25 g/L de ferricianuro y 8 g/L de ferrocianuro (ferricianuro/ferrocianuro 19/19 mM). Medición en condiciones hidrodinámicas empleando el sistema Di_1 (■), o Di_2 fijando el electrodo en distintas posiciones: posición 1 (●), posición 2 (▲), posición 3 (▼) según se detalla en la Figura 3.5 (rampa de potencial entre -500 y +500 mV, aplicada a una velocidad de barrido de 25 mV/s). 112

Figura 3.7: Curva de calibración utilizando GGA como fuente de carbono, el sistema electroquímico Di_2 fijo en posición 3 y el cultivo liofilizado de *K. pneumoniae* A_5. 113

Figura 3.8: CV realizadas con los sistemas de medición estática, Es_1 (□ y ■), Es_3 (○ y ●), o Es_4 (△ y ▲), de muestras conteniendo ferricianuro, *K. pneumoniae* liofilizada, A_5, en ausencia (□, ○ y △) o presencia (■, ● y ▲) de $OECD_{std}$. 114

Figura 3.9: Curva de calibración de ferrocianuro realizada mediante CA hidrodinámica con el sistema Di_3 (r^2 = 0,999). 115

Figura 3.10: Curva de calibración realizada mediante CA, utilizando $OECD_{std}$ como fuente de carbono del liofilizado A_5, empleando el sistema electroquímico Di_3. 116

Figura 3.11: Esquema del sistema electroquímico Di_4. 117

Figura 3.12: CV realizada con el sistema Di_4 de una muestra conteniendo 2,5 g/L de ferrocianuro y 13,2 g/L de ferricianuro en MM a distintas velocidades, 0 (■), 4750 rpm (●), 6500 rpm (▲), o 10000 rpm (▼). 118

Figura 3.13: CV hidrodinámicas utilizando el sistema Di_4 de muestras conteniendo 13,2 g/L de ferricianuro y distintas concentraciones ferrocianuro 0 (■ y ●), 2,5 (▲ y ▼), o 8,5 (◆) g/L realizadas por duplicado, con excepción de la de 8,5 g/L. 119

Figura 3.14: Curva de calibración de ferrocianuro realizada mediante CA hidrodinámica (aplicando +500 mV) con el sistema Di_4 ($y = 0,09054 + 13,6343 x$. $r^2 = 0,9999$). 120

Figura 4.1: Detalle del área sensible de un electrodo de CO_2 basado en la modificación de un electrodo combinado de pH con una membrana permeable a gases y una solución electrolítica. 126

Figura 4.2: *Setup* utilizado para la determinación de BOD de muestras cloacales y simuladas, utilizando un biosensor microbiano basado en el uso de un electrodo potenciométrico de pH modificado, sensible a CO_2. 127

Figura 4.3: Esquema del armado del biosensor de BOD basado en un transductor potenciométrico sensible al CO_2. 130

Figura 4.4: Respuesta del biosensor potenciométrico basado en el uso de *S. cerevisiae* inmovilizada (5 mg de peso seco por cm^2) luego de sucesivas adiciones de GGA. Las flechas indican el momento del agregado de cada alícuota de GGA. 133

Figura 4.5: Curva de calibración obtenida con el biosensor potenciométrico basado en *S. cerevisiae* inmovilizada en membrana. $y = -69,5 + 0,0257 x$; $r^2 = 0,996$. 134

Figura 4.6: Efectos del pH en la respuesta del biosensor potenciométrico basado en *S. cerevisiae* inmovilizada sobre membrana. Pendientes obtenidas de curvas de calibración con 3 puntos de GGA a cada pH, normalizadas con las pendientes de curvas a pH 7. 135

Figura 4.7: Efectos de muestras con concentraciones crecientes de NaCl en la sensibilidad del biosensor basado en *S. cerevisiae*. Se realizaron curvas de calibración utilizando GGA a distintas concentraciones de NaCl y las pendientes obtenidas en cada curva se normalizaron respecto a la pendiente de una curva sin agregado de NaCl. 136

Figura 5.1: Interacción hipotética entre las NPs y una célula (Donaldson y Tran, 2002; Oberdörster et al., 2005). La inflamación y el estrés oxidativo pueden estar mediados por distintas vías: a) que la superficie de la NP produzca el estrés oxidativo celular, produciendo un aumento del calcio intracelular y la activación de genes; b) que los metales de transición liberados por las NPs produzcan el estrés oxidativo celular; c) que los metales de transición producidos por las NPs activen los receptores de la superficie celular y se produzca una activación de genes; o d) que las NPs se distribuyan intracelularmente y alcancen la mitocondria produciendo estrés oxidativo. 142

Figura 5.2: Chips conteniendo cada uno 4 estructuras de $IDES_p$ de distintas dimensiones. En el chip de la izquierda se puede observar la celda de PDMS (polímero translúcido), a la derecha se observa la conexión eléctrica realizada mediante soldadura. 145

Figura 5.3: Microfotografía de una estructura de $IDES_m$ utilizada en la caracterización de estos IDES de Au (aumento 40X). 145

Figura 5.4: Analizador de espectroscopía de impedancia, EIS, fabricado en el AIT. En cada plaqueta se conectó un chip de los mostrados en la Figura 5.2. 149

Figura 5.5: *Setup* experimental utilizado para las mediciones de EIS (arriba) y detalle de la conexión eléctrica de los $IDES_m$ (debajo). 150

Figura 5.6: Espectro de impedancia obtenido al realizar EIS con la estructura S2 de chips conteniendo $DMEM_{hg}$ como blanco (negro) o células NHDF en medio $DMEM_{hg}$ (rojo) al realizar un escaneo de frecuencias entre 10 y 100 kHz. Se muestran las ω de 60 (■, ■), 70 (●, ●), 80 (▲, ▲), 90 (▼, ▼) o 100 (◄, ◄) kHz. 151

Figura 5.7: Microfotografía de la estructura S1 de un chip con $IDES_p$ luego de incubar durante 1000 min células NHDF. La foto se realizó con microscopio invertido y contraste de fase (G = W de 150 μm). 152

Figura 5.8: Espectros de impedancia realizados con las estructuras S1 (azul), S2 (rojo), y S3 (verde) a frecuencias de 70 (●, ●, ●), 80 (▲, ▲, ▲), 90(▼, ▼, ▼) y 100 (◄, ◄, ◄) kHz del chip conteniendo células NHDF en medio $DMEM_{hg}$. 153

Figura 5.9: Microfotografía de un cuadrante de una cámara de Neubauer (compuesta por 4 cuadrantes y 16 cuadrados/cuadrante) sembrada con células NHDF luego de ser incubadas en agitación por 60 min y el agregado de Trypan Blue. Las flechas blancas indican las células muertas encontradas. 154

Figura 5.10: Impedancia obtenida al aplicar 70 kHz a la estructura S2 de chips conteniendo células NHDF en medio $DMEM_{hg}$ previamente incubadas en tubos anti-adherentes durante 60 min en agitación (○, denominado chip A) o sin agitar (□, denominado chip B). Las flechas muestran el tiempo al que se agregaron las células. 155

Figura 5.11: Microfotografías (microscopio invertido, 100x) tomadas luego de incubar los chips durante 12 h (como referencia se muestra la estructura S2 de $IDES_p$, W = G = 30 μm). A la derecha se muestra un sector del chip conteniendo células NHDF incubadas en agitación durante 20 min en presencia de NPs de Ag; a la izquierda un sector del chip conteniendo células NHDF incubadas durante 20 min en agitación en ausencia de NPs. 157

Figura 5.12: Microfotografías (microscopio invertido, 100x) tomadas luego de incubar los chips durante 2 h (como referencia se muestra la estructura S1 de $IDES_p$, W = G = 150 μm). A la derecha se muestra un sector del chip conteniendo células NHDF incubadas en agitación durante 60 min en presencia de NPs de Ag; a la izquierda un sector del chip conteniendo células NHDF incubadas durante 60 min en agitación en ausencia de NPs. 158

Figura 5.13: Ejemplo de rango de linealidad obtenido con los $IDES_m$ a 60 (□), 80 (○), y 100 (△) kHz. 159

Figura 5.14: *Bode plot* de un espectro de impedancia obtenido con un $IDES_m$ al realizar un barrido de frecuencias, ω, a muestras conteniendo concentraciones de KCl de conductividad 0,010 (□); 0,070 (○); 0,250 (△); 0,7 (▽); 1,2 (◇); 1,4 (◁); 5,5 (▷) y 10 (⌂) mS. 160

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1: Métodos de inmovilización de células para su empleo en biosensores. 11

Tabla 1.2: Métodos de preparación del material biológico para su uso en bioensayos. 15

Tabla 1.3: Clasificación de transductores electroquímicos basados en la técnica de medición empleada (Thévenot et al., 2001). 23

Tabla 2.1: Comparación entre los valores de BOD obtenidos en el ensayo de BOD_5 y por el bioensayo $BOD_{K.\ pneumoniae}$ de 4 muestras de agua reales y 2 muestras simuladas. La calibración del $BOD_{K.\ pneumoniae}$ fue realizada utilizando $OECD_{std}$ y los valores informados representan $\bar{x} \pm DS_{(n-1)}$ (n = 4) y el %RSD fue calculado como 100 x $DS/\bar{x}$. 87

Tabla 3.1: Diferentes condiciones de cultivo estudiadas para obtener cultivos liofilizados de *K. pneumoniae* metabólicamente activos. 98

Tabla 3.2: Electrodos (WE, RE y CE) de diferentes materiales empleados en este capítulo. La combinación de los distintos electrodos más la condición de medición, estática o hidrodinámica, dió lugar a distintos sistemas electroquímicos. 99

Tabla 3.3: Tasas de supervivencia aritmética y logarítmica (como se encuentran definidas en la Sección 3.2.3) de diferentes cultivos liofilizados de *K. pneumoniae* (n = 3). Los valores de ASR se han informado como $\bar{x} \pm DS_{(n-1)}$. Sólo se informa la media de los LSR. Los valores informados fueron calculados luego de [a]1, [b]20 o [c]35 días de liofilizar (ver también Tabla 3.1). ND: no determinado. NC: no concluyente. 104

Tabla 3.4: Índice M/C utilizando GGA u $OECD_{std}$ como fuentes de carbono. Entre paréntesis se presenta el rango lineal obtenido al realizar las curvas de calibración para cada liofilizado, en mg BOD_5/L. ND: no determinado. 108

Tabla 3.5: Sensibilidades normalizadas de los cultivos liofilizados A_4 y A_5 utilizando GGA u $OECD_{std}$ como fuentes de carbono (n = 3). 109

Tabla 4.1: Comparación de las determinaciones de BOD de 6 muestras de agua mediante el ensayo tradicional BOD_5 y el biosensor diseñado aquí, BOD_{CO_2}. La calibración del biosensor fue realizada por adición sucesiva de patrón, utilizando una solución madre concentrada de GGA. 137

Tabla 5.1: Dimensiones y parámetros geométricos de las distintas estructuras de IDES utilizadas. A: área; G: distancia entre electrodos W: ancho de dedo; N: cantidad de dedos/electrodo; H_{total}: alto total de los electrodos (calculado como: [2x(W+G)xN]-W); L: largo de cada dedo (ver también Figura 1.14). 146

INDICE DE ECUACIONES

Ecuación n°		Página
[1.1]	$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_O^*}{C_R^*}$	17
[1.2]	$i(t) = nFAC \sqrt{\frac{D}{\pi t}}$	26
[1.3]	$E_m = -\frac{RT}{z_x F} \ln \frac{a_x^\beta}{a_x^\alpha}$	28
[1.4]	$Z = \frac{V(t)}{i(t)}$	31
[1.5]	$Z(\omega) = Z_{re} - jZ_{im}$	31
[1.6]	$Z_{im} = \frac{1}{\omega C_B}$	31
[1.7]	$i = E\omega C_B \sin(\omega t + \phi)$	31
[1.8]	$[Fe(CN)_6]^{4-} \xrightleftharpoons{400\text{-}600\ mV} [Fe(CN)_6]^{3-} + e^-$ Ferrocianuro — Ferricianuro *Metabolismo microbiano*	40
[2.1]	$CH_2O + O_2 \longrightarrow H_2O + CO_2$	59
[2.2]	$CH_2O + H_2O \longrightarrow CO_2 + 4\,H^+ + 4\,e^-$	60
[2.3]	$4\,[Fe(CN_6)]^{3-} + 4\,e^- \longrightarrow 4\,[Fe(CN_6)]^{4-}$	60
[2.4]	$CH_2O + H_2O + 4\,[Fe(CN_6)]^{3-} \longrightarrow CO_2 + 4\,H^+ + 4\,[Fe(CN_6)]^{4-}$	60

[2.5] $$DS = \sqrt{\frac{\sum(x - x)^2}{(n - 1)}}$$ 69

[2.6] $$t = \frac{\overline{x_1} - \overline{x_2}}{S_{12} \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}}$$ 69

[2.7] $$F = \frac{{S_1}^2}{{S_2}^2}$$ 69

[2.8] $$S_{12} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) {S_1}^2 + (n_2 - 1) {S_2}^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$ 70

[3.1] $$ASR = \frac{(UFC/mL)_{lf}}{(UFC/mL)_{cl}} \times 100$$ 98

[3.2] $$LRS = \frac{[\log_{10}(UFC/mL)]_{lf}}{[\log_{10}(UFC/mL)]_{cl}} \times 100$$ 99

[3.3] $$M/C = \frac{[\mu g \text{ ferrocianuro} / (UFC * mgBOD_5)]_{lf}}{[\mu g \text{ ferrocianuro} / (UFC * mgBOD_5)]_{cl}}$$ 108

TRABAJOS PUBLICADOS

Los resultados de esta Tesis han dado lugar a:

Patente solicitada por el CONICET al INPI: *Biosensor para la medición de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (BOD) mediante la medición de CO_2 y procedimiento para elaborar una matriz de microorganismos utilizada en el ensamblado del biosensor*. Inventores: Cortón E., Chiappini S.A., Kormes D.J., Sacco N., **Bonetto M.C**. Patente N° 20110101506, presentada el 02/05/2011.

Publicaciones en revistas con referato:

1.-**Bonetto M.C** †, Weinstock A.†, Fraigi L., Cortón E., Moina C., Ybarra G. Microfabricated biosensors for the determination of biochemical oxygen demand in water. En preparación para ser enviado a Electrochemistry Communications.

2.-**Bonetto M.C.,** Sacco N.J., Hilding Ohlsson A., Cortón E. (2012) Metabolism of *Klebsiella pneumoniae* freeze-dried cultures for the design of BOD bioassays. Letters in Applied Microbiology 55, 370-375. doi:10.1111/j.1472-765X.2012.03302.x

3.-**Bonetto M.C.**, Sacco N.J., Hilding Ohlsson A., Cortón E. (2011) Assessing the effect of oxygen and microbial inhibitors to optimize ferricyanide-mediated BOD assay. Talanta 85, 455-462. doi:10.1016/j.talanta.2011.04.007.

4.-Chiappini S.A., Kormes D.J., **Bonetto M.C.**, Sacco N., Cortón E. (2010) A new microbial biosensor for organic water pollution based on measurement of carbon dioxide production. Sensors and Actuators B 148, 103-109. doi:10.1016/j.snb.2010.04.039.

Publicaciones científicas electrónicas:

1.-**Bonetto M.C.**, Sacco N., Cortón E. (2010) Study of operational factors affecting versatile implementation of ferricyanide-mediated rapid-assay for biochemical oxygen demand. IBERSENSOR Revista Iberoamericana de Sensores 7, N° 2 IB061.
http://www.inaoep.mx/revista_electronica/volumen/?idnumero=a5bfc9e07964f8dddeb95fc584cd965d.

2.-**Bonetto M.C.**, Weinstock A., Fraigi L., Sacco N., Cortón E. (2008) Microbial based electrochemical bioassay for water quality analysis. One step towards a disposable biosensor system. IBERSENSOR Revista Iberoamericana de Sensores 6, N° 2 362-367.
http://www.inaoep.mx/revista_electronica/volumen/sumario.php.

3. - Weinstock A., Fraigi L., Ybarra G., **Bonetto C.,** Cortón E., Moina C. (2008) Microfabricated biosensors for the determination of biochemical oxygen demand (BOD) in water. IBERSENSOR Revista Iberoamericana de Sensores 6, N° 2 323-326.
http://www.inaoep.mx/revista_electronica/volumen/sumario.php.

LISTA DE ABREVIATURAS

%RSD	desvío estándar relativo x 100
16S rRNA	componente 16S de la subunidad pequeña del ribosoma
a	actividad de un ión en solución
A	área
A_1	cultivo liofilizado obtenido a partir del pellet sin lavar, de un cultivo líquido en LB, y sin agregado de crioprotector
A_2	cultivo liofilizado obtenido a partir del pellet lavado, de un cultivo líquido en LB, y sin agregado de crioprotector
A_3	cultivo liofilizado obtenido a partir del pellet sin lavar, de un cultivo líquido en LB, con agregado de leche-MSG
A_4	cultivo liofilizado obtenido a partir del pellet lavado, de un cultivo líquido en LB, con agregado de leche-MSG
A_5	cultivo liofilizado obtenido a partir del pellet sin lavar, de un cultivo líquido en LB, con agregado de trehalosa
A_6	cultivo liofilizado obtenido a partir del pellet lavado, de un cultivo líquido en LB, con agregado de trehalosa
AC	corriente alterna
$Ag/AgCl_{sat}$	RE de plata/cloruro de plata (KCl) saturado
AIT	Austrian Institute of Technology
AM	*bacto antibiotic medium*
ASR	tasa aritmética de supervivencia
B_1	cultivo liofilizado obtenido a partir del pellet sin lavar, de un cultivo líquido en LB con 20% de glicerol, y sin agregado de crioprotector
B_2	cultivo liofilizado obtenido a partir del pellet lavado, de un cultivo líquido en LB con 20% de glicerol, y sin agregado de crioprotector
BOD	demanda bioquímica de oxígeno
BOD_5	ensayo tradicional de determinación de BOD, luego de 5 días de incubación
BOD_{FM}	determinación de BOD mediada por ferricianuro
$BOD_{K.\ pneumoniae}$	bioensayo amperométrico para la determinación de BOD desarrollado en esta Tesis
BOODSEED	producto liofilizado, comercializado por Bio-systems International, compuesto por un *blend* de microorganismos no patogénicos

C	concentración de una especie electoactiva
CA	cronoamperometría
C_{dl}	capacitancia de la doble capa iónica
CE	electrodo auxiliar o contraelectrodo
cl	cultivo líquido previo al proceso de liofilización
COD	demanda química de oxígeno
CP	control positivo
C_{surf}	capacitancia entre el electrodo de metal y los iones de la solución
CV	voltametría cíclica
D	difusión
DC	corriente continua
Di	sistema electroquímico de medición en condiciones hidrodinámicas
DMEM	medio de cultivo de células NHDF
$DMEM_{hg}$	medio DMEM adicionado con 2% v/v de Hepes y 1% v/v de gentamicina
DO	densidad óptica
DS	desvío estándar
E	potencial
E_f	potencial final
E_i	potencial inicial
EIS	espectroscopía de impedancia
E_{pa}	potencial de pico anódico
E_{pc}	potencial de pico catódico
Es	sistema electroquímico de medición en condiciones estáticas
F	constante de Faraday
FCS	suero fetal bovino
G	distancia entre electrodos, en IDES
GGA	solución de 150 mg de glucosa + 150 mg de ácido glutámico por litro de agua destilada. Utilizada como patrón en la determinación de BOD
h	horas
H_{total}	alto total de los electrodos IDES
i	corriente
IDES	electrodos interdigitados
$IDES_m$	electrodos interdigitados no pasivados con Si_3N_4
$IDES_p$	electrodos interdigitados pasivados con Si_3N_4

i_{pa}	corriente del pico anódico
i_{pc}	corriente del pico catódico
ISE	electrodo ión-selectivo
L	largo de dedo de los electrodos IDES
LB	Luria Bertoni, medio rico de cultivo bacteriano
lf	cultivo liofilizado
LSR	tasa logarítmica de supervivencia
M/C	metabolismo/colonias
min	minutos
MM	medio mínimo
MSG	glutamato monosódico
N	cantidad de dedos/electrodo en un electrodo IDES
NC	no concluyente
ND	no determinado
NHDF	*normal human dermal fibroblasts*
NHE	electrodo normal de hidrógeno
NPs	nanopartículas
OD	oxígeno disuelto
$OECD_{std}$	patrón estándar propuesto por la OECD, organización para la cooperación económica y el desarrollo
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
R_{ct}	resistencia de la transferencia de carga entre la solución y el electrodo
RE	electrodo de referencia
ROS	especies reactivas de oxígeno
rpm	revoluciones por minuto
R_{sol}	resistencia de una solución
s	segundos
SCE_{sat}	RE de calomel ($Hg/Hg_2Cl_2/KCl$) saturado
Sim-1	agua residual simulada
Sim-2	dilución al medio (1:2) de la Sim-1
UFC	unidades formadoras de colonias
W	ancho de dedo de los electrodos IDES
WE	electrodo de trabajo o indicador
x	analito al cual es selectivo la membrana de un electrodo potenciométrico

Z	impedancia
z_I	carga del ión
Z_{im}	parte imaginaria de la impedancia
Z_{re}	parte real de la impedancia
Z_w	impedancia de Warburg
α y β	fases separadas por la membrana de un electrodo potenciométrico
κ	conductividad
μTAS	micro sistemas de análisis total
ω	frecuencia

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1.-BIOSENSORES

1.1.1.-Definiciones, características y clasificación

Un sensor químico es un dispositivo que transforma información química, como la concentración de una muestra, en una señal analítica útil. Contiene 2 componentes básicos interconectados: un sistema de reconocimiento químico, el receptor, y un transductor físico-químico. Los biosensores son sensores químicos en los que el sistema de reconocimiento es un mecanismo bioquímico (Cammann, 1977; Eggins, 2002).

Varias definiciones se han planteado acerca de los biosensores y a medida que el campo se ha ido desarrollado, las definiciones se han diversificado. Por ejemplo, según Eggins (2002) un biosensor puede ser definido como un dispositivo en el cual el elemento sensor es un componente biológico conectado a un transductor. Belkin (2003) amplía el concepto definiendo un biosensor como un dispositivo analítico que integra un elemento biológico de reconocimiento con un transductor físico para generar una señal medible proporcional a la concentración de los analitos (Farré et al., 2005; Wilson, 2005; Lei et al., 2006).

Para este trabajo vamos a utilizar las definiciones de bioensayo y biosensor realizadas por la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) que definió un bioensayo como un procedimiento para la determinación de la concentración o actividad biológica de alguna sustancia (por ejemplo vitamina, hormona, factor de crecimiento vegetal o antibiótico, entre otros) midiendo su efecto en un organismo o tejido, comparado contra una muestra estándar (Nagel et al. 1992) y un biosensor como un dispositivo integrado (receptor-transductor) capaz de proveer de información analítica específica, cuantitativa o semicuantitativa, utilizando un elemento de reconocimiento biológico (receptor biológico) retenido, en contacto espacial directo, con un elemento transductor (Thévenot et el., 2001). La diferencia entre ambas herramientas consiste en la disposición del material biológico de reconocimiento que, en el caso de los biosensores, se encuentra inmovilizado en el transductor (Farré et al., 2005) (Figura 1.1).

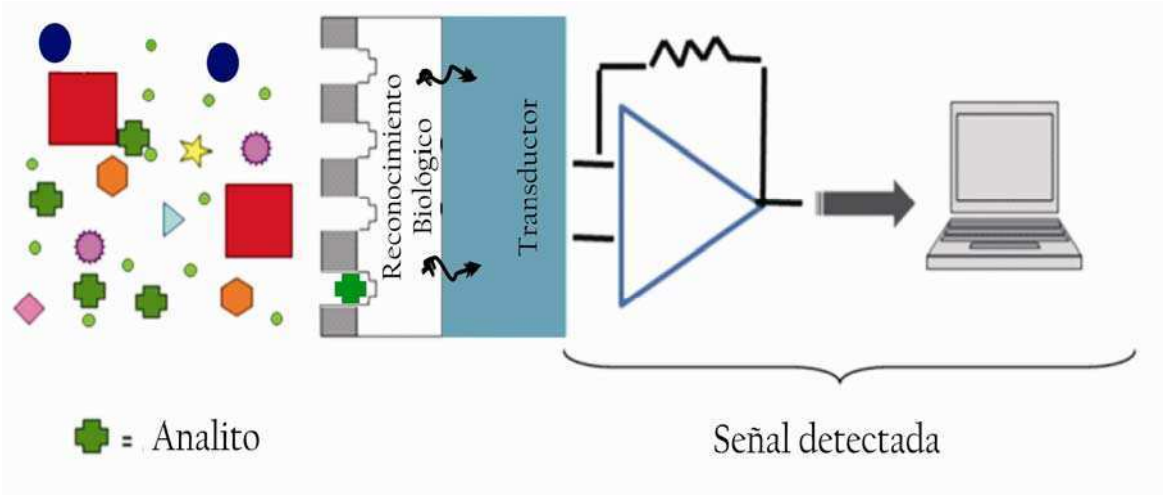


Figura 1.1: Esquema de un biosensor. El reconocimiento biológico provee de especificidad a la técnica, permitiendo cuantificar el analito aún en presencia de otras sustancias.

Por lo tanto, en el esquema general de un biosensor el elemento biológico de reconocimiento reconoce específicamente a un compuesto blanco (el analito) y el transductor convierte la respuesta biológica en una señal detectable. Los transductores pueden ser electroquímicos, ópticos, acústicos, mecánicos, calorimétricos o de alguna otro tipo. La señal obtenida podrá luego correlacionarse con la concentración del analito, dentro de un cierto rango de concentraciones.

Diversos elementos biológicos de reconocimiento, incluyendo ácidos nucleicos, enzimas, receptores, anticuerpos, microorganismos, organelas, tejidos, órganos sensoriales de insectos y células eucariotas, han sido utilizados para el desarrollo de biosensores. Entre estos elementos, las enzimas han sido muy empleadas debido a su selectividad y a que permiten diseñar sistemas analíticos muy sensibles, dada su alta actividad catalítica (D'Souza, 2001; Lei et al., 2006; Borisov y Wolfbeis, 2008; Jaffrezic-Renault y Dzyadevych, 2008). El mayor propósito del uso de un sistema de reconocimiento es otorgar al sensor un alto grado de selectividad por el analito que se desea medir. El uso de la selectividad de materiales biológicos (en especial ácidos nucleicos y anticuerpos) permite el desarrollo de sensores altamente específicos para el análisis de muestras (Higgins et al., 1987; Ghindilis et al., 1998; D'Souza, 1999; Karube y Nomura, 2000; Chen et al., 2012; Kergaravat et al., 2012).

Muchos biosensores presentan baja selectividad (no son específicos) para un analito en particular como es el caso, en general, de los biosensores basados en células enteras. Sin embargo, se han desarrollado biosensores basados en células enteras altamente específicos,

utilizando microorganismos genéticamente modificados (GEMs), como por ejemplo en el caso de biosensores para la detección de compuestos fenólicos (Franklin et al., 1981; Sharp et al., 1998).

La clasificación de los biosensores puede realizarse basándose en el elemento biológico de reconocimiento (células enteras, DNA, enzimas, o anticuerpos, por ejemplo), pero también puede realizarse teniendo en cuenta el transductor utilizado, ya sea éste electroquímico, óptico o térmico, por nombrar algunos (Rodríguez-Mozaz et al., 2005).

1.1.2.-Transductores

El transductor es el responsable de convertir la señal biológica en una señal eléctrica que podrá ser posteriormente amplificada, almacenada y procesada de la manera deseada. El tipo de transductor que se elija dependerá de la naturaleza del material biológico que se utilice y del analito que se desea monitorear. Su respuesta debería ser rápida produciendo una señal que pueda ser procesada adecuadamente y, para muchas aplicaciones, el transductor debería ser miniaturizable, como en el caso de los biosensores implantables para el monitoreo de glucosa en diabéticos (Turner y Pickup, 1985; Kotanen et al., 2012) o para el desarrollo de biosensores ambientales portátiles.

1.1.2.1.-Transductores electroquímicos

Los biosensores electroquímicos involucran un biocatalizador o receptor biológico en conjunto con un sistema de electrodos. Un amplio rango de biocatalizadores puede ser empleado, desde enzimas, anticuerpos, células microbianas, o DNA hasta aptámeros. En general, una señal eléctrica es producida debido a la interacción entre los electrodos y las especies electroactivas, y es proporcional a la concentración del analito (Higgins et al., 1987; Thévenot et al., 2001). En la Figura 1.2 se esquematiza un biosensor electroquímico enzimático.

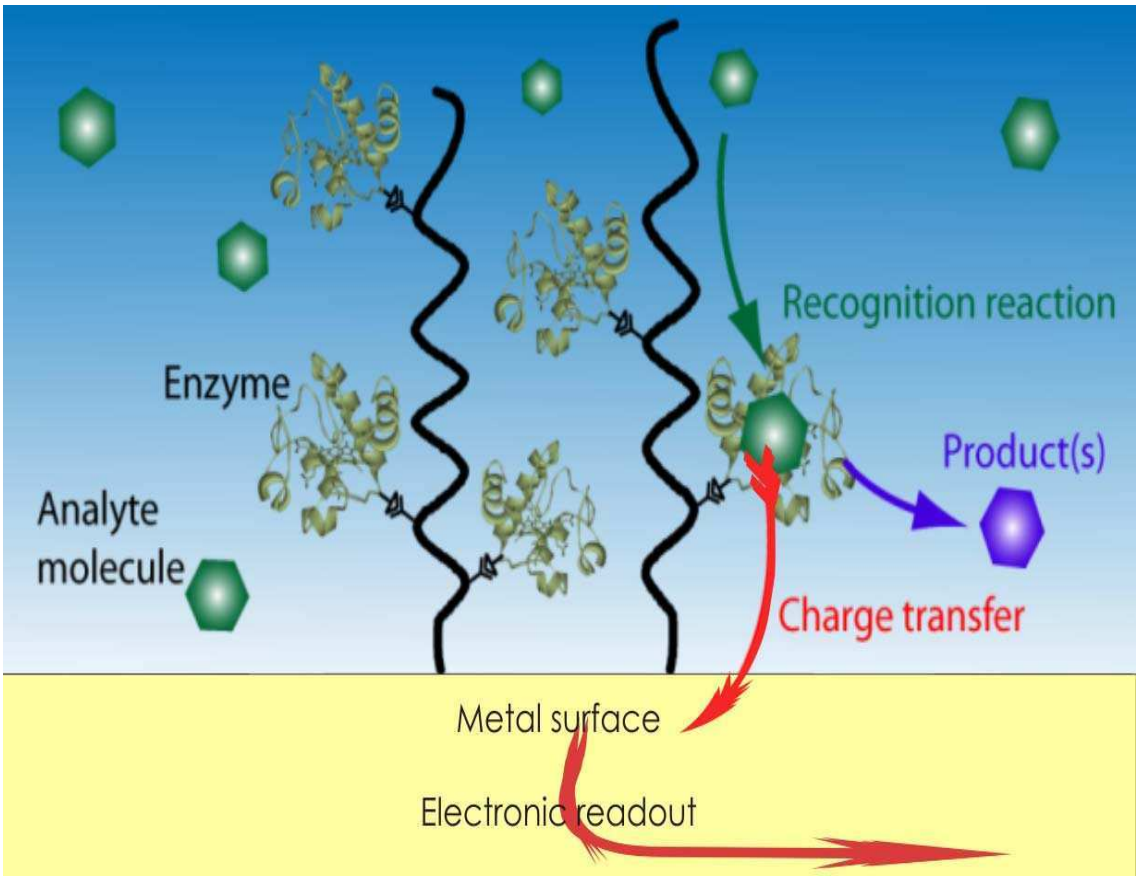


Figura 1.2: Esquema de un biosensor enzimático basado en la utilización de un transductor electroquímico. Un electrodo registra la transferencia de carga producida cuando la enzima (bioreceptor) interactúa con el analito de interés produciendo una señal. En este biosensor amperométrico, la señal es la corriente faradaica.

Los biosensores electroquímicos combinan la ventaja de ser rápidos, simples y susceptibles de ser miniaturizados (Justino et al., 2010). Suelen utilizarse como electrodos materiales nobles e inertes, generalmente Pt, Au u otros. Eventualmente, los electrodos suelen modificarse con membranas poliméricas o monocapas autoensambladas (SAMs) de manera de evitar las interferencias y mejorar la estabilidad y el desempeño de los biosensores (Zhang et al., 2000).

1.1.2.2.-Otros transductores

Un transductor óptico permite detectar el cambio en las propiedades ópticas de un sistema. Dentro de los parámetros ópticos se incluyen la absorbancia, la fluorescencia y la luminiscencia. Los dispositivos optoelectrónicos y de fibra óptica son transductores a los cuales se pueden acoplar componentes biológicos de manera de desarrollar biosensores

ópticos (Brogan y Walt, 2005; Borisov y Wolfbeis, 2008). Se puede observar un esquema básico de un biosensor óptico en la Figura 1.3.

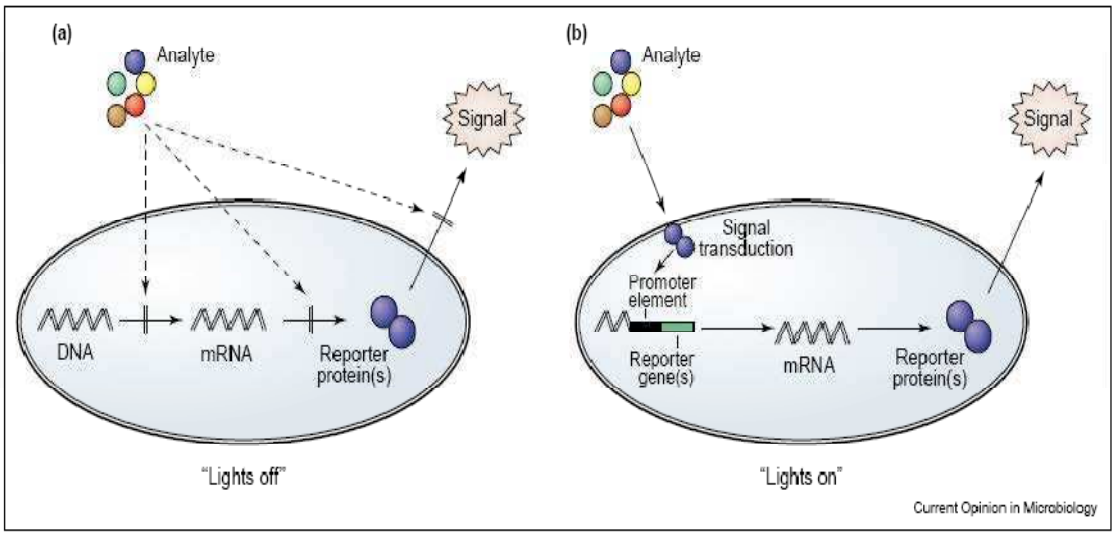


Figura 1.3: Esquema básico del funcionamiento de un biosensor óptico basado en el uso de GEMs (Belkin, 2003). En el esquema se muestra en a) que si el analito no está presente, no interacciona con el receptor y no se detecta la señal óptica. En b) el analito es detectado por la célula y se produce el fenómeno que dará lugar a la señal óptica, en este caso la síntesis de una proteína fluorescente.

Muchos tipos de transductores pueden ser utilizados, pero la detección de propiedades ópticas ofrece varias ventajas con respecto a la detección electroquímica para algunas aplicaciones, y por ello los transductores ópticos son muy utilizados. Por ejemplo, no requieren de un electrodo de referencia y no son susceptibles a interferencias eléctricas. El sensado mediante técnicas ópticas es especialmente atractivo en el monitoreo de alto rendimiento dado que permite determinar múltiples analitos simultáneamente (Borisov y Wolfbeis, 2008). Sin embargo, la luz ambiente suele producir interferencias en los transductores ópticos; además, suelen presentar problemas de estabilidad de las mediciones si hay componentes que emiten luz (fluorescencia) en las muestras (Higgins et al., 1987).

Como un ejemplo de los desarrollos precursores en esta área se puede nombrar el biosensor óptico desarrollado por Freeman y Seitz (1978) en donde la inmovilización de peroxidasa y luminol en un gel al final de una fibra óptica, permite cuantificar peróxido de hidrógeno mediante la detección de la luz emitida por quimioluminiscencia, producida al oxidarse el luminol. El uso de GEMs con un gen reportero, fusionado a un gen inducible, que se activará en presencia de un analito, como se muestra en la Figura 1.3, es la base de varios biosensores ópticos (Belkin et al., 2003; Borisov y Wolfbeis, 2008).

1.1.3.-Material biológico. Células y enzimas

La elección del elemento biológico de sensado (receptor) a usar en un biosensor depende del analito que se quiere analizar (sean compuestos químicos, antígenos, hormonas, ácidos nucleicos, virus, microorganismos u otros) así como de la estabilidad ambiental y operacional que presente el receptor. El material biológico debe ser estable frente a diversas condiciones como variaciones de pH, temperatura u otras. Se han utilizado como elementos biológicos de sensado DNA, enzimas, anticuerpos, receptores, organelas, tejidos, órganos de insectos o células (Clark y Lyons, 1962; Ghindilis et al., 1998; Nakamura et al., 2007; Bohrn et al., 2012; Chen et al., 2012; Du et al., 2013; Kafi et al., 2013; Ludwig et al., 2013).

Algunos de los mayores atributos de un buen sistema de sensado son la especificidad, sensibilidad, confiabilidad, portabilidad, habilidad de funcionar en soluciones ópticamente opacas, capacidad de ser utilizado para realizar mediciones en tiempo real y la simpleza de su operación (D'Souza, 2001; Farré y Barceló, 2003). Esto, en gran parte, dependerá del material biológico elegido.

1.1.3.1.-El uso de enzimas como material biológico

Las enzimas purificadas han sido utilizadas comúnmente para la construcción de biosensores dada su alta especificidad respecto a su sustrato, además de la acción catalítica de las mismas que permite tener una amplificación de la señal y por lo tanto, una elevada sensibilidad (Bickerstaff, 1997; D'Souza, 1999; D'Souza, 2001). En los biosensores enzimáticos se emplean diferentes clases de enzimas como óxido-reductasas, hidrolasas o liasas como receptor biológico, pero la gran mayoría de los trabajos científicos y desarrollos tecnológicos están basados en óxido-reductasas y, en especial, en la glucosa oxidasa.

En los sistemas más estudiados basados en enzimas rédox, es común la medición amperométrica de las corrientes producidas por la reducción u oxidación de un electrodo de trabajo modificado debido a la catálisis enzimática, como sistema de detección.

Los biosensores pueden ser diseñados empleando varias enzimas de manera de obtener una secuencia de reacciones que permita, o bien amplificar la señal o bien llegar a una reacción enzimática que pueda ser detectada fácilmente. Esto también puede ser usado como estrategia para eliminar ciertos compuestos que podrían generar interferencias en las mediciones (Schmid y Künnecke, 1990; Sarath Babu et al., 2004; Vojinovic et al., 2006; Alhadeff et al., 2008).

Los biosensores enzimáticos han sido muy empleados principalmente en el área de diagnóstico clínico, pero también en las áreas de alimentos, fermentaciones y aplicaciones ambientales. Tienen la capacidad de reconocer compuestos derivados de la fermentación como azúcares, alcoholes, aminoácidos, antibióticos y macromoléculas (Karube y Nomura, 2000; Koide et al., 2007; Hildebrandt et al., 2008; Singh y Satyanarayana, 2008; Gopalan et al., 2009; Connelly y Baeumner, 2012; Kergaravat et al., 2012; Apetreia y Apetre, 2013).

La respuesta de estos biosensores es dependiente de factores como la actividad enzimática, la concentración del sustrato y su difusión dentro de la capa enzimática, la formación del producto y el proceso de conversión en una señal eléctrica en el transductor. Las condiciones microambientales como el pH, la temperatura, la fuerza iónica, etc. también afectan la respuesta del biosensor. A veces la técnica empleada para la detección puede no ser la adecuada para el sistema a utilizar. Por ejemplo, en los biosensores enzimáticos, las técnicas que consisten en un sistema fluídico podrían no dar tiempo a que la enzima reconozca su sustrato y/o se ubique en el sitio de acción, si la reacción fuera relativamente lenta (Schmid y Künnecke, 1990).

Pero la obtención de enzimas purificadas es costosa y lleva tiempo, además de que la sensibilidad de algunas enzimas a diversos inhibidores, como los metales pesados,q puede ser un obstáculo para su manejo en condiciones *in-vitro* y por lo tanto limitar su utilización en el desarrollo de biosensores (Byfield y Abuknesha, 1994; Bickerstaff, 1997; D'Souza, 1999; D'Souza, 2001).

1.1.3.2.-El uso de células como material biológico

De manera análoga a un sensor electromecánico, la red de señalización celular puede considerarse como compuesta por 3 módulos interconectados: El "sensor" de la señal de entrada o *input* (proteínas de membrana, canales, etc.), el procesamiento interno y circuito regulatorio (replicación, transcripción, traducción), y la señal de salida luego de la adaptación celular (expresión proteica, producción de reporteros, toxinas, electrones, movimiento, cambios en la morfología o el crecimiento celular, etc.), como se muestra en la Figura 1.4 (Lim, 2010; Wang y Buck, 2012; Wang et al., 2013).

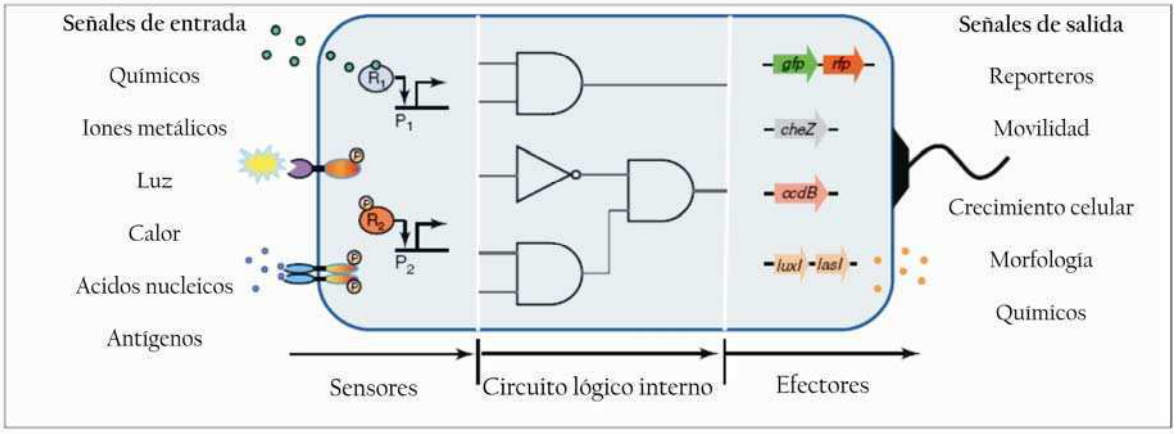


Figura 1.4: Diagrama del concepto tri-modular de una célula.

El empleo de células (microbianas, de mamífero u otras) en el diseño de biosensores permite la detección de parámetros químicos relativamente inespecíficos, que muchas veces son la suma de varios analitos o familias de analitos. Las células microbianas son particularmente interesantes dado que se puede utilizar tanto su mecanismo respiratorio como sus funciones metabólicas para el sensado del analito y el estudio de los potenciales efectos que podrían tener algunos analitos en otros organismos. Además los biosensores microbianos pueden ser empleados en condiciones relativamente amplias de pH, temperatura y presencia de posibles inhibidores (si se los compara por ejemplo, con las enzimas), siendo altamente estables y confiables para aplicaciones *in-situ*, o en campo, además de permitir obtener mediciones en tiempo real de una gran variedad de sustancias (Riedel et al., 1989; Bousse, 1996; D'Souza, 2001; Belkin, 2003; Paitan et al., 2003; Lei et al., 2006; Sarath Babu et al., 2007).

Los microorganismos, ya sean procariotas (arqueas, bacterias) o eucariotas (levaduras, algas) ofrecen una alternativa en la fabricación de biosensores dado que pueden ser producidos en gran cantidad utilizando tecnología sencilla. Son además fácilmente manipulables y presentan mayor probabilidad de viabilidad y estabilidad *in-vitro* que las células de plantas o animales, facilitando el desarrollo de biosensores y mejorando su desempeño. Los microorganismos se encuentran presentes en casi cualquier tipo de sustrato natural o artificial, son rápidamente adaptables a cambios en el ambiente y pueden metabolizar un amplio rango de compuestos, crecen rápidamente y en gran cantidad, y muchos de ellos son fáciles de mantener a bajo costo (Byfield y Abuknesha, 1994; D'Souza, 2001).

Los microorganismos pueden además, modificarse genéticamente sea por mutación o por recombinación, de manera de obtener descendencia viable fácilmente. Bloqueando ciertas rutas metabólicas, de manera de adaptar al microorganismo a un sustrato particular

a través de condiciones selectivas de cultivo, pueden lograrse biosensores relativamente específicos y muy interesantes. La construcción de GEMs ha permitido el desarrollo de biosensores microbianos específicos manipulando la selectividad y sensibilidad del microorganismo a partir de modificaciones en su DNA (D'Souza, 2001; Belkin, 2003; Paul et al., 2005; Urgun-Demirtas et al., 2006; Pfleger et al., 2007). Sus potenciales aplicaciones incluyen monitoreo ambiental (Karube et al., 1977; Rastogi et al., 2003), mediciones en industrias de alimentos y fermentaciones (Riedel et al., 1989; Reshetilov et al., 1996; Sarath Babu et al., 2007) y análisis clínicos (Komori et al., 2009).

Gran cantidad de los biosensores basados en el empleo de células han sido descriptos para la detección de contaminantes ambientales. En la mayoría de ellos, los microorganismos se encuentran inmovilizados sobre la membrana permeable a gases de electrodos amperométricos de oxígeno (elecrodo de Clark), o bien incluyen detección amperométrica basada en la transferencia de electrones debido al empleo de un mediador, por ejemplo ferricianuro o p-benzoquinona (Karube et al., 1977; Marty et al., 1997; Pasco et al., 2000; Wang et al., 2013).

En general, los biosensores microbianos son más adecuados que los enzimáticos para la determinación de muestras en las que se pretende medir un conjunto de condiciones o de analitos que están sólo parcialmente identificados, por ejemplo la determinación de BOD o de toxicidad; en este caso, su baja especificidad se convierte en una ventaja analítica (Pasco et al., 2000; Belkin, 2003). Aunque los biosensores microbianos han probado tener gran estabilidad, alta actividad catalítica y bajo costo como ventajas, su reutilización (dependiendo de la aplicación) no es en general una opción dado que necesitan largos períodos de recuperación si se los compara con los biosensores enzimáticos.

Las técnicas analíticas estándar de determinación de contaminantes son más sensibles y precisas que los biosensores microbianos, sin embargo estos últimos permiten determinar la concentración biodisponible de los contaminantes en lugar de determinar su concentración total (Belkin, 2003). Otras ventajas del uso de células microbianas como material biológico tienen que ver con la capacidad que tiene el metabolismo microbiano para integrar los efectos tóxicos de todos los compuestos disponibles en el ambiente o muestra, y su inespecificidad para detectar inclusive compuestos tóxicos xenobióticos. Debido a esto, han sido ampliamente utilizados en aplicaciones medioambientales para la determinación de la presencia de algún compuesto o grupo de compuestos potencialmente tóxicos, de manera de generar una señal de alarma ante aguas contaminadas (Gäberlein et al., 2000; Belkin, 2003).

Aunque el metabolismo microbiano no es específico, se pueden lograr biosensores específicos utilizando bacterias capaces de crecer y hasta multiplicarse en presencia de componentes inusuales, por ejemplo *Pseudomonas multivorans* puede utilizar hasta 150 compuestos como única fuente de carbono y energía (Stanier et al., 1970) o capaces de degradar compuestos xenobióticos como los sulfonatos de alquilbenceno (por ejemplo, el dodecilbenceno sulfonato de sodio, SDS) propiedad que ha sido demostrada en varias bacterias, la mayoría perteneciente al género *Pseudomonas* (Franklin et al., 1981).

Sin embargo, existe la necesidad operativa y comercial de contar con biosensores que puedan conservar su funcionalidad por períodos de semanas o meses (un "tiempo de estantería" extenso, en inglés, *long shelf life time*), dado que el uso de cultivos líquidos requiere mucho tiempo y preparación del material biológico (esterilidad, centrifugación, frecuentemente agitación u otros métodos) (Kintzios et al., 2001). Por ello se han realizado varios estudios para evaluar la posibilidad de utilizar materiales biológicos preservados, de manera que puedan ser empacados formando parte del biosensor directamente, para ser utilizados de manera inmediata luego de una simple rehidratación. MICROTOX®, un reconocido bioensayo para la estimación de toxicidad de muestras, emplea en algunos de sus formatos comerciales células liofilizadas de la cepa *Vibrio fischeri* (Bulich, 1982; APHA "8050", 1995).

Para que los biosensores puedan funcionar como dispositivos de monitoreo continuo informando respuestas en tiempo real, deben incorporar una gran cantidad de material biológico de manera de asegurar una señal claramente detectable y tener la capacidad de operar de manera remota requiriendo poco mantenimiento (Baeumner, 2003). La selección de un procedimiento adecuado de inmovilización celular es uno de los puntos fundamentales para lograr una solución integral a ambos problemas.

1.1.4.-Inmovilización y preparación del material biológico

Luego de elegir el material biológico a utilizar, el siguiente paso podría ser la inmovilización del mismo, o su preparación para utilizarlo en el desarrollo de un dispositivo portátil, de manera que se pueda reutilizar o, al menos, utilizar fácilmente *in-situ*, pero manteniendo la sensibilidad, reproducibilidad y rapidez en su respuesta (D'Souza, 2001). Muchas veces, la inmovilización o preparación del material dependerá del analito a determinar, pero también de las condiciones de empleo del mismo.

Los métodos de inmovilización de células más utilizados en el área de los biosensores se detallan en la Tabla 1.1 (Zhang et al., 2000; Bjerketorp et al., 2006; Lei et al., 2006; Sua et al., 2011)

Tabla 1.1: Métodos de inmovilización de células para su empleo en biosensores.

Método de inmovilización	Características	Ventajas	Desventajas
Adsorción	Los microorganismos se adsorben al sustrato por interacciones iónicas, polares, uniones puente de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas.	Perturbación pequeña del microorganismo dado que las estructuras y funciones se mantienen. Puede realizarse directamente sobre el electrodo, o en soportes físicos como alumina o esferas de vidrio	Baja estabilidad durante tiempos prolongados debido a la desorción de las células
Inmovilización covalente	Unión entre grupos funcionales de la pared celular de microorganismos (aminos, carboxilo, sulfidrilo) y el transductor (amino, carboxilo, sulfidril, epoxi, tosil)	Permite controlar la cantidad de células unidas al transductor Se obtienen capas homogéneas sobre el electrodo.	Las células son expuestas a condiciones agresivas que pueden dañar la pared celular y hacer que decrezca su actividad biológica
Entrecruzamiento	Uso de reactivos multifuncionales como el glutaraldehido, 1,6-diisocianatohexano y el cloruro de cianuro que producen el entrecruzamiento de proteínas.	Método rápido y simple de inmovilización. Las células pueden ser directamente inmovilizadas sobre el electrodo o en un soporte físico (ubicado luego sobre el transductor).	Puede perderse o afectarse la actividad y/o viabilidad celular
Entrampamiento	La inmovilización por entrampamiento se logra por retención de las células en la superficie del transductor utilizando membranas (de filtro o diálisis).	Producen relativamente baja perturbación de las estructuras y funciones de las células.	Adicional resistencia difusional que otorga la membrana, dando como resultado una disminución de la sensibilidad y el límite de detección.

(continúa en la siguiente página)

Método de inmovilización	Características	Ventajas	Desventajas
Encapsulación en polímeros biológicos	Uso de alginato, carragenanos, agarosa, quitosan, colágeno	Inmovilización, anclaje físico y protección Permite la difusión de solutos	Biodegradable Puede haber crecimiento bacteriano Opacidad puede impedir detección óptica
Encapsulación en polímeros no biológicos	Uso de polivinilalcohol (PVA), poliacrilamida, poliuretano, tetra etil/metil ortosilicato (TEOS/TMOS)	Inmovilización, anclaje físico, protección Rigidez mecánica Buenas propiedades ópticas Permite la difusión de solutos Limita el crecimiento bacteriano	Técnica probada para unos pocos microorganismos Puede liberar compuestos tóxicos para las células (etanol, metanol)
Biofilm	Formación del bioflim directamente sobre el transductor	Método simple Capacidad natural de algunas cepas bacterianas	Variaciones en la composición del biofilm con el tiempo Puede haber resistencia difusional

Los esquemas o procedimientos de inmovilización deben ser diseñados de acuerdo a la geometría del soporte físico, la estabilidad estructural, biológica y química en el campo, y de manera de facilitar la rápida difusión a través del soporte físico de inmovilización, con el objetivo de obtener respuestas rápidas (Lei et al., 2006). La inmovilización de células por ejemplo, asegura una cercanía del material biológico al transductor, pero si el analito a determinar no puede difundir a través del material utilizado como soporte físico de inmovilización (membranas, geles, etc.) la célula no podrá detectarlo (Premkumar et al., 2002). La inmovilización del material biológico ha sido muy estudiada para su aplicación en biosensores, así como el uso de la capacidad natural de algunas bacterias de formar biofilms.

Un material ideal para la inmovilización celular debe ser estable en el rango de temperaturas y pH que se utilizará el biosensor, resistir a condiciones que podrían desestabilizarlo (como por ejemplo, alta concentración de fosfatos para un gel de alginato), y permitir que los nutrientes necesarios para la supervivencia celular, el analito y el oxígeno (de ser necesario) difundan a través de él, así como también los productos metabólicos y los productos o fenómenos que dan lugar a la señal a ser capturada por el transductor. En la Figura 1.5 se muestra un esquema del intercambio de masa que debería darse a través del soporte físico de inmovilización.

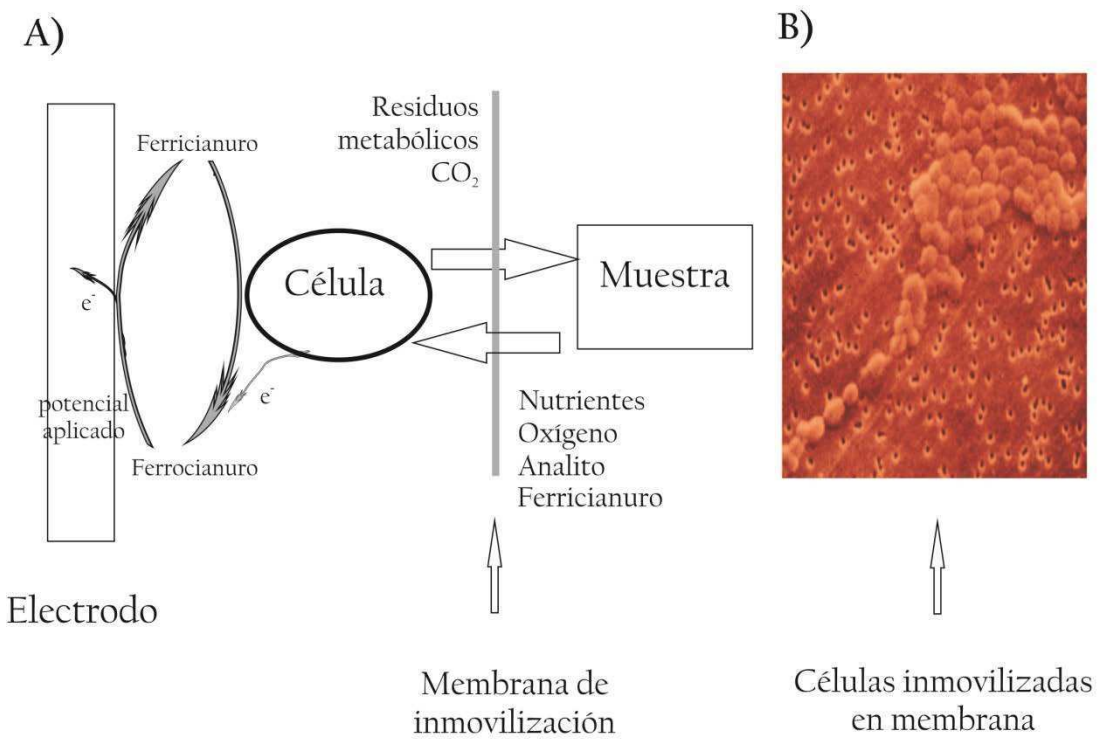


Figura 1.5: A) Esquema general del transporte de masa que debería permitir el soporte físico de inmovilización, en este caso, una membrana de filtración (intercambio de nutrientes, analitos y oxígeno), en el diseño de un biosensor, en este caso basado en el uso de ferricianuro como mediador. B) Microfotografía de células bacterianas inmovilizadas en una membrana de filtración de tamaño de poro adecuado para retenerlas, pero que permitiría el intercambio de gases y compuestos entre las células y la muestra.

Pero la inmovilización del material biológico puede no ser la mejor opción para el desarrollo de ciertos dispositivos. La inmovilización suele emplearse en dispositivos que se quieren reutilizar, pero se ha comprobado que la concentración celular cambia en el tiempo, y el almacenado de este tipo de dispositivos ha sido hasta el momento ineficiente para preservar las cualidades del mismo (Chan et al., 1999).

Se han propuesto por lo tanto varias opciones alternativas para mejorar la estabilización, conservación y almacenamiento del material biológico, sobre todo de células, en el desarrollo de bioensayos como ser el uso de esporas bacterianas (Thomulka et al., 1993; Date et al., 2007) o material biológico liofilizado (Gu et al., 2001; Bonetto et al., 2012). En la Tabla 1.2 se presentan los métodos de preparación del material biológico que suelen utilizarse en el desarrollo de bioensayos (Bjerketorp et al., 2006; Date et al., 2007).

Tabla 1.2: Métodos de preparación del material biológico para su uso en bioensayos.

Método de preparación	Ventajas	Desventajas
Cultivos continuos	Provee de un ambiente relativamente estático, biocompatible y con provisión de medio de cultivo fresco	Mantenimiento complejo, laborioso y costoso Riesgo de deriva genética Riesgo de contaminación
Secado al vacío	Potencialmente permitiría alcanzar altas tasas de supervivencia y estabilidad por largos períodos de tiempo Relativamente bajo costo de producción Posible alternativa para microorganismos sensibles al congelamiento	Performance poco probada Condiciones de congelamiento más severas que en la liofilización
Liofilización	Record de performance probado industrialmente Producto fácilmente rehidratable	Técnica relativamente compleja y costosa Producto sensible a la humedad
Esporas	Permite obtener en cada bioensayo microorganismos completamente viables Fácilmente utilizable	Tiempos prolongados de rehidratación que requieren de condiciones de esterilidad

1.2.-CONCEPTOS BÁSICOS DE ELECTROQUÍMICA

Las mediciones electroquímicas permiten estudiar la termodinámica de una reacción, estudiar la tasa de decaimiento o las propiedades espectroscópicas de intermediarios inestables como radicales iónicos, o analizar la cantidad de trazas de iones metálicos o especies orgánicas en una solución. En alguno de estos ejemplos, los métodos electroquímicos son utilizados como herramientas analíticas. Las aplicaciones de los distintos métodos electroquímicos requieren de la comprensión de los principios fundamentales de las reacciones de electrodo y las propiedades eléctricas de la interfaz electrodo/solución (Bard y Faulkner, 2001). Las variables que afectan la reacción en un electrodo se hallan resumidas en la Figura 1.6.

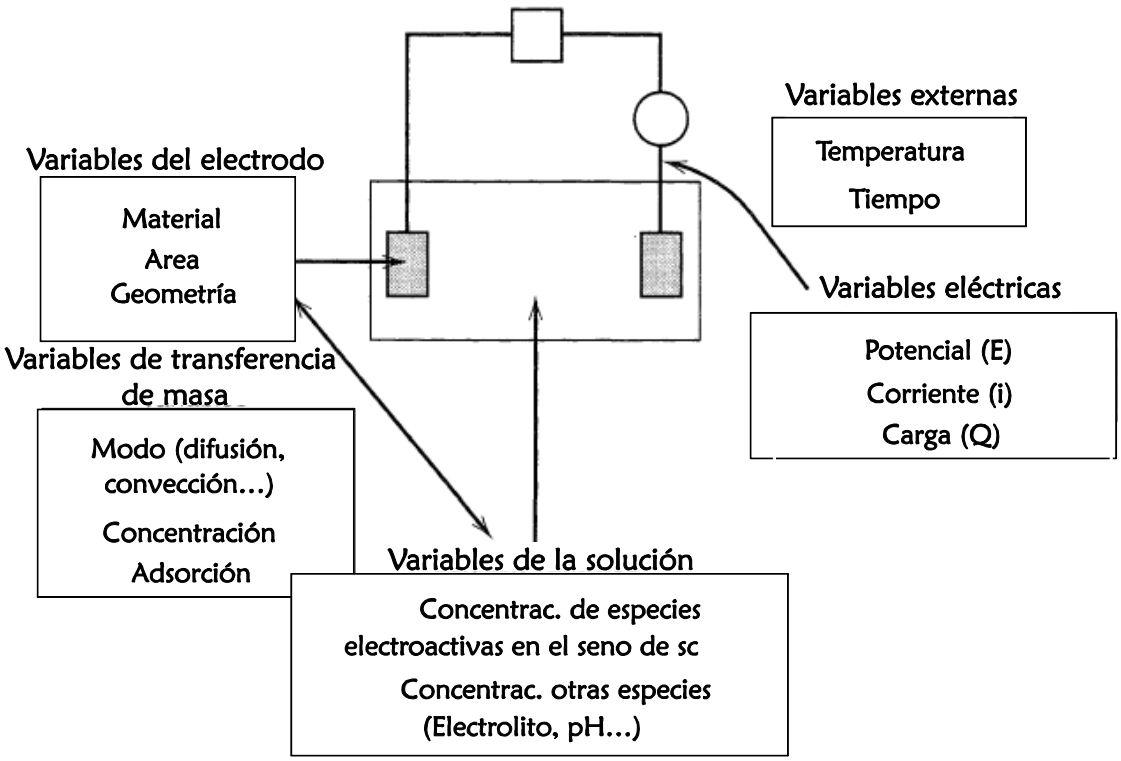


Figura 1.6: Algunas de las variables que afectan las reacciones en un electrodo.

La interfaz electrodo/solución se caracteriza por presentar características diferentes del seno de la solución debido a la formación de lo que se conoce como la doble capa iónica y surge de la atracción electrostática de los iones de una solución hacia un electrodo cargado (Figura 1.7).

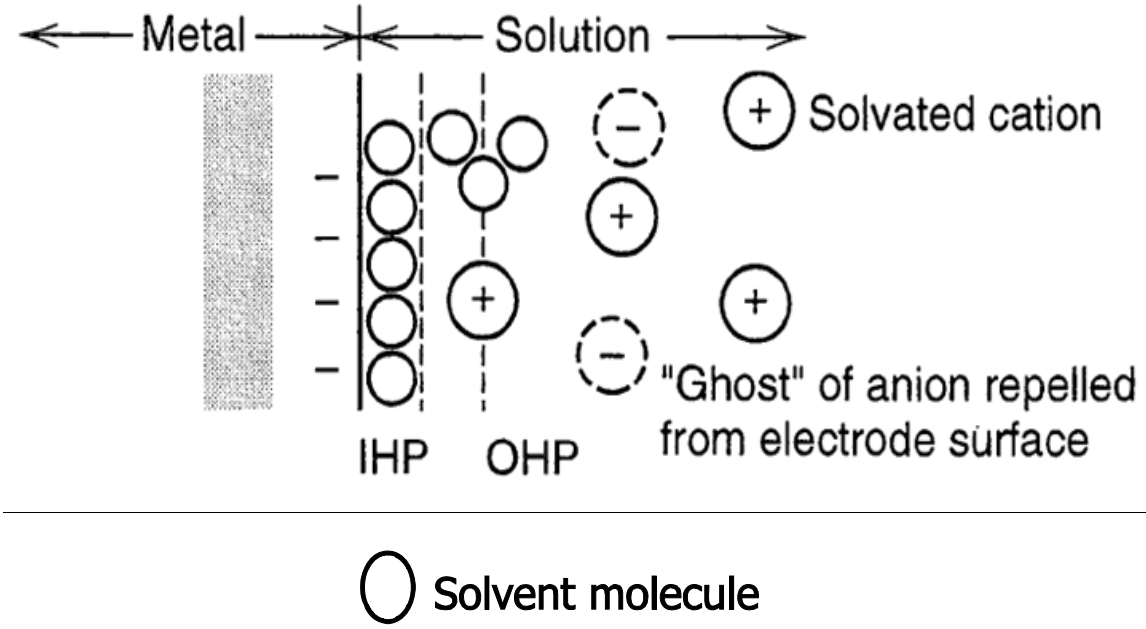


Figura 1.7: Modelo propuesto de la estructura de una región de la doble capa eléctrica que se forma en la interfaz electrodo/solución, en ausencia de adsorción iónica específica en la superficie del electrodo.

La descripción termodinámica para una reacción en un electrodo en el equilibrio se describe a través de la ecuación de Nernst (Ecuación 1.1), que permite relacionar el potencial del electrodo con las concentraciones de los compuestos que participan de la reacción en el seno de la solución. En el caso general de una reacción rédox del tipo

$$O + ne^- \longleftrightarrow R$$

siendo O la especie oxidada y R la especie reducida, la ecuación de Nernst es:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_O^*}{C_R^*} \qquad [1.1]$$

donde C_O^* y C_R^* es la concentración de la especie oxidada y de la especie reducida, respectivamente, en el seno de la solución. En el equilibrio, E^0 es el potencial de reducción de la cupla rédox medido respecto del electrodo normal de hidrógeno, NHE.

1.2.1.-Celda electroquímica

Una celda electroquímica se define generalmente como el conjunto que conforman un grupo de electrodos (típicamente dos o tres) y una solución electrolítica. Un electrodo es un conductor electrónico y la carga será transportada a través de este por el movimiento de los electrones. El material de los electrodos puede ser de metales inertes (Pt o Au generalmente), metales líquidos (Hg, amalgamas), carbono (grafito) y semiconductores.

La solución electrolítica es un conductor iónico y la carga se transporta a través de ella debido al movimiento de los iones. Las soluciones electrolíticas frecuentemente utilizadas contienen H^+, Na^+, Cl^- ya sea en agua, o menos frecuentemente, en solventes no acuosos. La solución electrolítica debe presentar muy baja resistencia (es decir, ser altamente conductora) (Skoog y Leary, 1994; Bard y Faulkner, 2001).

1.2.2.-Procesos faradaicos y no-faradaicos

Dos tipos de procesos pueden dar lugar a corrientes en un electrodo. Un proceso faradaico es aquel en el que la carga es físicamente transferida a través de una interfaz, generalmente de la forma de transferencia de electrones, desde un electrodo a un ión en una solución o viceversa y por lo tanto, está relacionado con alguna reacción de oxido-reducción. Este tipo de procesos están gobernados por la Ley de Faraday, que postula que la extensión de una reacción química en un electrodo es proporcional a la intensidad de corriente; las corrientes resultantes se denominan corrientes faradaicas.

Pero existen algunos casos en donde no se produce una transferencia de carga en la interfaz electrodo/solución debido a condiciones cinéticas o termodinámicamente desfavorables. En estos casos la estructura de la interfaz electrodo/solución puede cambiar con variaciones en el potencial o en la composición de la solución, produciéndose corrientes externas, al menos de manera transiente, cuando el potencial, el área del electrodo o la composición de la solución varían. En estos casos nos encontramos frente a procesos no-faradaicos en los cuales a pesar de no haber transferencia de carga a través de la interfaz, existen procesos de adsorción y desorción en la superficie de los electrodos que originan corrientes no-faradaicas o capacitivas.

Para comprender la diferencia básica entre una corriente faradaica y no-faradaica, se podría imaginar un electrón viajando hacia la superficie del electrodo. Cuando el electrón alcanza la interfaz de la solución, puede hacer sólo una de dos cosas. Puede permanecer en la superficie del electrodo y aumentar la carga de la interfaz electrodo/solución o doble

capa, lo que constituye una corriente no-faradaica. Alternativamente puede abandonar el electrodo y transferirse a la solución, convirtiéndose de este modo en una corriente faradaica.

En el dominio de la electricidad, un capacitor representa un interfaz perfectamente no-faradaica, y una resistencia, una perfectamente faradaica. Las interfaces electrodo/solución pueden tener ambos componentes y ambos deberían tenerse en cuenta al estudiar transferencias de carga y sus reacciones asociadas (Skoog y Leary, 1994; Bard y Faulkner, 2001).

1.2.3.-Sistema de tres electrodos

La reacción global que tiene lugar en una celda electroquímica se compone de dos semirreacciones independientes, que describen los cambios químicos que ocurren en los electrodos. Cada semirreacción (y, consecuentemente, la composición química del sistema en las cercanías de los electrodos) responde a la diferencia de potencial de la interfaz electrodo/solución correspondiente a cada electrodo. La mayoría de las veces nos interesa la semirreacción que ocurre en un sólo electrodo, al que denominamos electrodo de trabajo (WE) o indicador.

Con el objetivo de poner el foco en el estudio del WE, uno estandariza la otra mitad de la celda utilizando un electrodo al que se denomina de referencia (RE) que, básicamente, mantiene un potencial constante en el tiempo y que es independiente de la composición de la solución en donde se encuentra. Esto permite considerar que cualquier cambio que ocurre en la celda, se deba fundamentalmente a los cambios producidos en el WE. Se dice entonces que se controla el potencial del WE al utilizar un RE respecto del cual se fija su potencial, que es similar a decir que se controla que los electrones pasen a través del WE. El uso de un tercer electrodo, auxiliar o contraelectrodo (CE), cierra el circuito de corriente con el WE, evitando de esta manera la circulación de corriente a través del RE, lo que podría alterar su potencial (Figura 1.8).

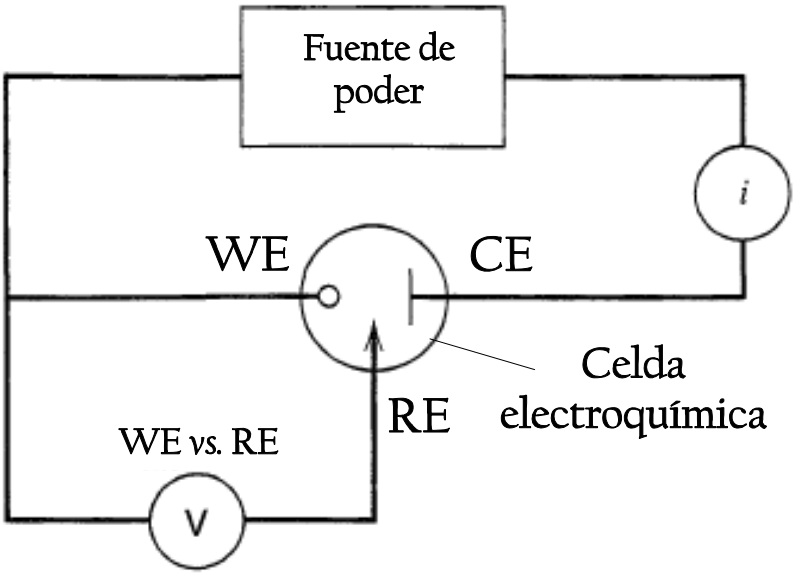


Figura 1.8: Esquema de un sistema de tres electrodos: WE, RE y CE, y el circuito eléctrico que se genera entre ellos al conectarlos a una fuente de poder de alta impedancia.

Cada uno de los electrodos del sistema requiere presentar ciertas características básicas como ser:

- ✓ Los WE para sistemas rédox suelen ser de Pt, Au, Pd, otro metal inerte, u otro material inerte (carbón vítreo, otras formas de carbón, etc.). En estas aplicaciones, el electrodo inerte actúa como fuente o sumidero de electrones transferidos desde un sistema rédox presente en una solución y su potencial responde a la ecuación de Nernst y la actividad del par rédox involucrado.
- ✓ Los RE comúnmente empleados son el RE de calomel, $Hg/Hg_2Cl_2/KCl$ (saturado, acuoso), de manera abreviada, SCE_{sat}, y el de plata/cloruro de plata, Ag/AgCl/KCl (saturado, acuoso), de manera abreviada, $Ag/AgCl_{sat}$. El potencial intrínseco de la interfaz de cada uno de estos electrodos con la solución es constante.
- ✓ El CE suele ser también de un metal inerte (típicamente de Pt, o de acero inoxidable) y su superficie debe ser mayor que la del WE, de manera de que no limite la circulación de corriente y su impedancia pueda ser despreciada frente a la del WE.

Si se conecta la celda a una batería o una fuente de poder y se le aplica un potencial negativo, esto es, se aplica un potencial negativo al WE, se fuerza a que los electrones se dirijan a lugares electrónicamente vacantes de la solución. En cambio, si se aplicara un potencial positivo, se produce una corriente que dirigirá los electrones desde la solución

hacia el electrodo. El potencial en el cual esto ocurre es específico de cada sustancia química presente en la solución del sistema (Skoog y Leary, 1994; Bard y Faulkner, 2001).

1.2.4.-Sistema de dos electrodos

En algunas ocasiones se pueden fusionar las funcionalidades del CE y del RE, si este último puede abastecer a la solución de la corriente requerida y si la disminución del potencial en la solución es pequeña y no significativa. Los llamados electrodos de pseudoreferencia pueden actuar como sustitutos de los RE en determinadas situaciones, pero de ser posible debe evitarse su uso.

Un electrodo de pseudoreferencia puede consistir en un alambre de un material que intercambie fácilmente carga con la solución, como por ejemplo el Pt (Kahlert, 2002). Además, debe ser capaz de aplicar un potencial relativamente reproducible a la solución. También debe tener la capacidad de que la corriente pase a través de él de manera similar a como funciona el CE, hacia o desde la solución. Si el CE y el RE finalmente se combinan, pasaríamos de tener un sistema de 3 electrodos a tener un sistema de 2 electrodos, como se muestra en la Figura 1.9.

Estos sistemas de dos electrodos pueden ser de gran utilidad para el diseño, fabricación industrial a gran escala y comercialización de sistemas analíticos de bajo costo y tamaño, como los sistemas de electrodos planares generados por *screen-printing* o fotolitografía.

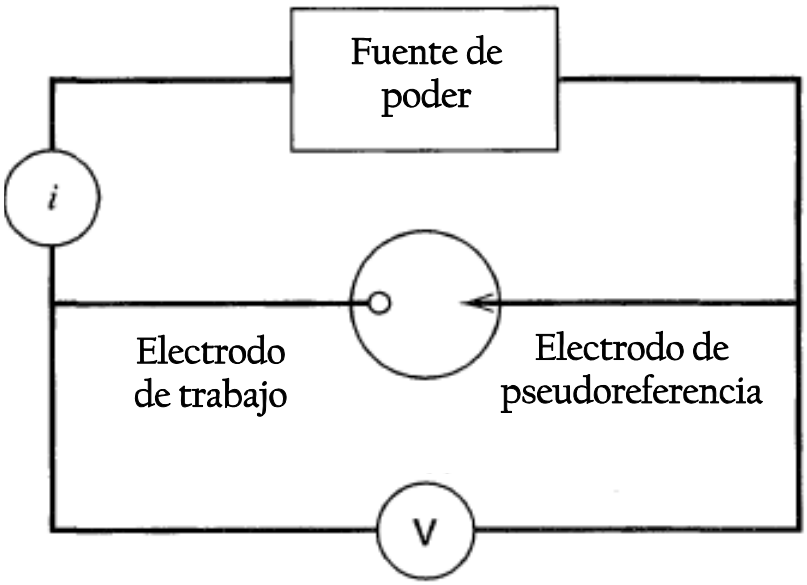


Figura 1.9: Esquema de un sistema de dos electrodos, WE y pseudoreferencia, y sus relaciones dentro del circuito eléctrico generado al conectarlos a una fuente de poder.

1.2.5.-Instrumentación empleada

Para los experimentos electroquímicos, el instrumental generalmente utilizado se denomina potenciostato-galvanostato. La función de potenciostato permite aplicar una diferencia de potencial (o "voltaje") constante entre dos electodos (un RE y un WE) sumergidos en una solución, mientras que mide simultáneamente la corriente que pasa a través del WE. Para otro tipo de experimentos se utiliza la función de galvanostato, que permite controlar la corriente que pasa a través de la celda electroquímica, mientras que mide el potencial al que se encuentra el WE. Además el potenciostato-galvanostato contiene un generador de funciones, de manera de producir la perturbación deseada, y un sistema de grabado y visualización de la señal.

Los analizadores de espectroscopía de impedancia, EIS, son potenciostatos diseñados especialmente para medir impedancia aplicando un voltaje AC, y funcionan, generalmente en un rango de frecuencias entre 10^{-2} y 10^{5} Hz

Un voltímetro de alta impedancia (comúnmente conocido como *tester*) presenta una resistencia interna grande que impide que haya un flujo de corriente apreciable durante la medición de diferencias de potencial (Bard y Faulkner, 2001).

1.3.-BIOSENSORES BASADOS EN TRANSDUCTORES ELECTROQUÍMICOS

El elemento transductor en los biosensores electroquímicos es el electrodo y la técnica electroquímica empleada (cuya elección permite muchas veces además, la amplificación de la señal). De acuerdo al principio de detección, las técnicas electroquímicas pueden clasificarse como técnicas amperométricas (técnicas a potencial controlado), potenciométricas ($i \cong 0$) y conductimétricas (Thévenot et al., 2001; Jaffrezic-Renault y Dzyadevych, 2008). De acuerdo a la técnica utilizada los biosensores pueden ser clasificados entonces como amperométricos (si se miden cambios en la corriente), potenciométricos (si se miden cambios en el potencial) o conductimétricos (si se observan cambios en la impedancia o la conductividad). En la Tabla 1.3 se presentan algunos ejemplos de distintas aplicaciones analíticas de métodos electroquímicos.

Tabla 1.3: Clasificación de transductores electroquímicos basados en la técnica de medición empleada (Thévenot et al., 2001).

Tipo de medición	Transductor	Analito
Potenciométrico	Electrodo selectivo a iones, ISE	K^+, Cl^-, Ca^{2+}, F^-
	Electrodo de vidrio	H^+, Na^+
	Electrodo de gas	CO_2, NH_3
	Electrodo de metal	Especies rédox
Amperométrico	Electrodo de metal o de carbono	O_2, azúcares, alcholes
	Electrodos químicamente modificados	Azúcares, alcoholes, fenoles, oligonucleótidos
Conductimétrico, impedimétrico	Electrodos interdigitados, electrodos de metal	Urea, especies cargadas, oligonucleótidos

El transporte de masa hacia la superficie del electrodo puede deberse a la difusión, migración o convección. La distribución de manera homogénea de las especies en el seno de la solución puede ser inducida por agitación, el uso de un electrodo rotatorio o el uso de un sistema de flujo continuo permitiendo un transporte eficiente y reproducible de masa mediante convección forzada, incrementando la sensibilidad y precisión de la técnica y es de utilidad en algunas aplicaciones de los biosensores electroquímicos (Ertl et al., 2000b; Kumar et al., 2001; Sarath Babu et al., 2004; Wang, 2006).

1.3.1.-Biosensores amperométricos

1.3.1.1.-Fundamentos teóricos

En los dispositivos amperométricos se aplica un potencial entre un RE y un WE. Dicho potencial aplicado hace que se produzca una transferencia electrónica o corriente neta, la magnitud de la misma es directamente proporcional a la concentración de la sustancia electroactiva presente en la solución (Scheller y Schubert, 1992).

El electrodo de oxígeno tipo Clark es un sensor amperométrico en el cual el oxígeno difunde a través de una membrana de teflón permeable a dicho gas y se reduce a peróxido de hidrógeno en un electrodo de Pt que se ha fijado a un potencial (-600 mV) contra un electrodo de referencia de Ag/AgCl (Clark y Lyons, 1962). La transformación de este dispositivo en un biosensor fue favorecida por la existencia de enzimas (oxidasas) que catalizan la oxidación de varios compuestos como carbohidratos, ácidos grasos, colesterol, etc., acompañado de un gran consumo de oxígeno (Gouda et al., 2002; Sarath Babu et al., 2007).

En los biosensores amperométricos suelen utilizarse electrodos que tienen enzimas inmovilizadas en su superficie de manera de oxidar o reducir el analito produciendo una corriente, proporcional a la concentración del sustrato o sustratos de la enzima (Lorenzo et al., 1998). Aunque la mayoría de los dispositivos comerciales son biosensores amperométricos basados en el uso de enzimas, no han hecho un gran impacto en ámbitos en donde se requiere monitoreo continuo (Griffiths y Hall, 1993).

Los dispositivos amperométricos suelen presentar mayores rangos lineales y menores tiempos de respuesta que los dispositivos potenciométricos. Sin embargo, problemas como interferencias con especies electroactivas a potenciales cercanos o inferiores a -600 mV, o cambios en el oxígeno disuelto de la muestra (cofactor necesario cuando una enzima oxidasa se utiliza como material biológico), se presentan en los dispositivos amperométricos. En el caso de biosensores microbianos en los que se mide el consumo de O_2 realizado por los microorganismos, una de las soluciones propuestas es el reemplazo del oxígeno por una molécula que contenga hierro, que puede actuar como un mediador de electrones artificial, haciendo de intermediario entre el componente biológico microbiano y el electrodo (Kaláb y Skládal, 1994; Pasco et al., 2000). El uso de mediadores también facilita la medición de la actividad enzimática en biosensores basados en oxidasas donde el ferroceno y otras moléculas son habitualmente utilizadas como mediadores rédox.

Idealmente un mediador debería presentar las siguientes características:

a) Participar directamente en reacciones rédox, tanto con el material biológico como con el electrodo, y que la transferencia de los electrones sea rápida,
b) Ser estable bajo las condiciones requeridas del ensayo,
c) No participar en otra reacción además de la presentada en a),
d) Presentar un potencial rédox distinguible del de otras especies electroactivas que puedan estar presentes en la muestra,
e) Ser estable a un amplio rango de pH,
f) Preferentemente no ser tóxico, especialmente si se lo quiere utilizar en aplicaciones *in-situ*,
g) Que se pueda inmovilizar o retener de manera sencilla.

Los mediadores intervienen en la transferencia de electrones desde los centros rédox de las enzimas al WE. Otra opción posible sería logar una transferencia directa de electrones entre la enzima y el electrodo, de manera de lograr la bioelectrocatálisis (Dzyadevych et al., 2008), esto simplificaría el sistema aunque experimentalmente se ha demostrado que la eficiencia de estos procesos de transferencia directa de carga suele ser muy baja e insuficiente para algunos sistemas de uso analítico, clínico u otros.

De manera de mejorar la estabilidad del biosensor, se utiliza generalmente un sistema de 3 electrodos en donde un CE cierra el circuito de la circulación de corriente con el WE, evitando que esta circule por el RE. En el sistema de 2 electrodos, el potencial aplicado varía dado que la circulación de corriente por el RE modifica el potencial de este. Por ello, el uso de un electrodo de pseudoreferencia debería restringirse a sistemas amperométricos en donde la corriente a medir sea muy baja (Thévenot et al., 2001).

1.3.1.2.-Técnicas amperométricas empleadas

1.3.1.2.i.-Cronoamperometría

El experimento de cronoamperometría (CA) se realiza aplicando un potencial constante entre un WE y un RE (o un pseudoreferencia) y se registra la corriente que circula entre los electrodos WE y CE si se emplea un sistema de detección de 3 electrodos, o la corriente que pasa entre el WE y el pseudoreferencia si se emplea un sistema de 2 electrodos. Se mide la dependencia de la corriente en el tiempo de una solución en condiciones estáticas y los datos obtenidos de esta manera se grafican como corriente *vs* tiempo. De esta manera, el transporte de masa se debe exclusivamente a la difusión y la curva de corriente *vs* tiempo refleja el cambio de la concentración de la especie

electroactiva en las cercanías del electrodo, además de la expansión gradual de la doble capa. Dado que el analito se consume en las cercanías del electrodo, en esta técnica se alcanza un estado estacionario, pero no el equilibrio.

El decaimiento de la corriente en el tiempo, en un electrodo planar y en un proceso de difusión controlada (sin que estén involucrados procesos de adsorción) está dado por la ecuación de Cottrell (Ecuación 1.2)

$$i(t) = nFAC \sqrt{\frac{D}{\pi t}} \qquad [1.2]$$

donde i es la intensidad de corriente, n el número de electrones intercambiados, A el área del electrodo, D el coeficiente de difusión de la especie electroactiva, C la concentración de la especie electroactiva y t el tiempo transcurrido desde el salto de potencial. A partir de esta ecuación también se observa que la corriente generada, i, es proporcional a la cantidad de especies electroactivas presentes en el seno de la solución, C (Zanello, 2003) y depende del área del electrodo, A.

Si se integra la corriente en función del tiempo, se logra la medición de la carga entregada o consumida por el sistema, lo que se suele denominar como un experimento de tipo cronoculombimétrico (Bard y Faulkner, 2001; Wang, 2006).

La variación de corriente en el tiempo para un electrodo en condiciones estacionarias dependerá del potencial aplicado y de la geometría del electrodo.

La difusión en electrodos planos depende de sus dimensiones, a medida que su radio aumenta, el electrodo plano puede aproximarse geométricamente a un plano infinito y la difusión de las especies en este tipo de electrodos será unidireccional y la corriente disminuirá con el tiempo de la manera descripta por Cottrell, Ecuación 1.2, (decaerá con la raíz cuadrada de t). En el caso de los microelectrodos, la difusión de las especies ya no será unidireccional y presentará un comportamiento similar al de una esfera, en donde la corriente, en lugar de decaer en el tiempo, tenderá a mantenerse alrededor de un valor constante. Esto sucede por ejemplo, en el caso de utilizar como electrodo una gota de mercurio (electrodo de gota colgante) (Skoog y Leary, 1994; Bard y Faulkner, 2001).

1.3.1.2.ii.-Voltametría cíclica (CV)

En la CV se le aplica una rampa de potencial a un WE, respecto de un RE, a una determinada velocidad y se mide la corriente producida. La rampa de potencial se aplica

desde un potencial inicial (E_i) hasta uno final (E_f) y luego la dirección del escaneo se invierte, terminando un ciclo de voltametría en el E_i. De esta manera se grafica en un voltamograma E *vs* i como se muestra en la Figura 1.10.

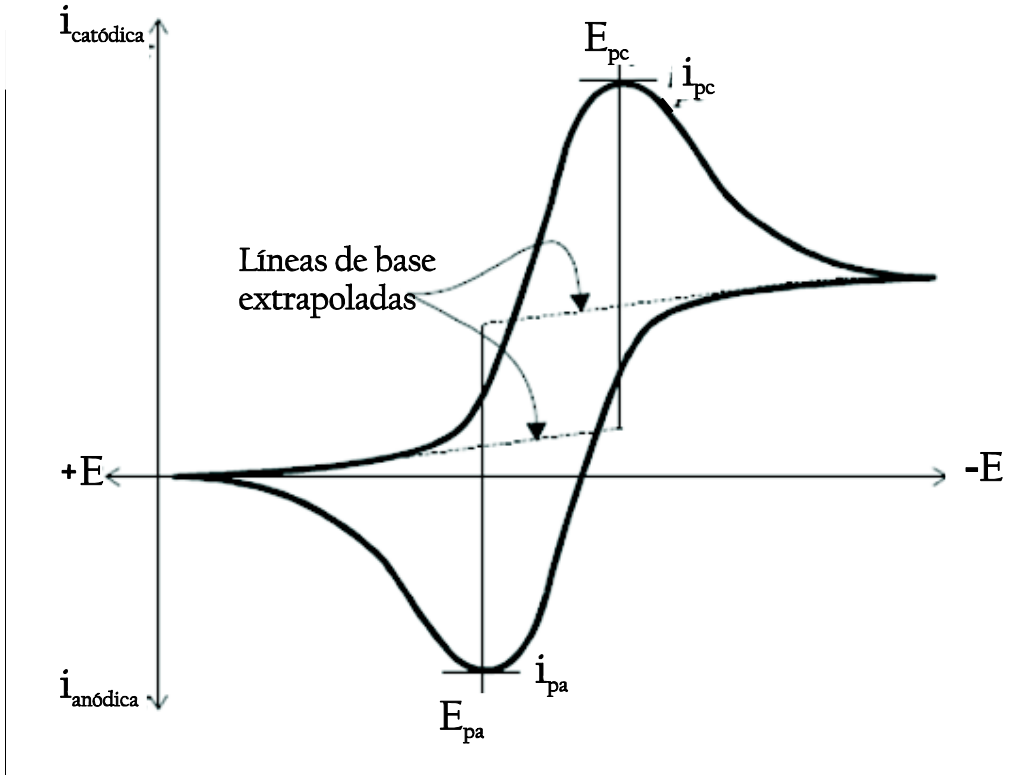


Figura 1.10: Voltamograma cíclico típico de un proceso rédox reversible, en donde se transfiere 1 electrón.

En una reacción rédox reversible, en donde se transfiere 1 electrón, la CV generalmente presenta dos picos, uno correspondiente a la oxidación del compuesto reducido (el pico anódico) y el otro a la reducción del compuesto oxidado (el pico catódico). Se puede reconocer el potencial correspondiente a cada pico (E_p) siendo el correspondiente a la oxidación el potencial del pico anódico, E_{pa}, y el correspondiente a la reducción el potencial del pico catódico o E_{pc}.

De manera similar se pueden identificar la corriente del pico anódico, i_{pa} y la corriente del pico catódico, i_{pc}. La intensidad de la corriente es proporcional a la concentración del analito que se está reduciendo u oxidando dependiendo de si se considera la intensidad del pico catódico o del anódico, respectivamente. Por lo tanto la igualdad en la magnitud del i_{pc} y del i_{pa} implica que todo lo que se oxida en el escaneo desde E_i a E_f (siendo $E_i < E_f$), o "de ida" de la CV, se reduce en el escaneo desde E_f hasta E_i, o "de vuelta" de la CV.

En la CV, la posición de los picos anódicos y catódicos permite obtener información acerca de la termodinámica de la cupla rédox utilizada. Si la reacción es completamente reversible e interviene el intercambio de 1 electrón, es decir n = 1, el ΔE entre los E_p será de $\cong$ 60 mV (Whitson et al., 1973; Bard y Faulkner, 2001; Zanello, 2003).

1.3.2.-Biosensores potenciométricos

1.3.2.1.-Fundamentos teóricos y funcionamiento

En el funcionamiento de los sensores potenciométricos se mantiene una condición de flujo de corriente muy cercana a cero (son sistemas de alta impedancia), donde la diferencia de potencial entre un WE y un RE (o entre dos RE) constituye la señal analítica. Esta señal de "voltaje" presenta una relación logarítmica con la concentración del analito correspondiente, de acuerdo a la Ecuación 1.3.

$$E_m = -\frac{RT}{z_x F} \ln \frac{a_x^{\beta}}{a_x^{\alpha}} \qquad [1.3]$$

siendo E_m el potencial de membrana, z_x carga del ión, x el analito al cual es selectiva la membrana, a su actividad, α y β las fases separadas por la membrana. Si se mantiene constante la concentración del analito de un lado de la membrana, el potencial de membrana E_m responderá a la actividad del analito del otro lado de la membrana de manera Nernstiana. A ambos lados de la membrana lo que se produce es un movimiento de cargas que genera ese potencial de membrana (Skoog y Leary, 1994; Bard y Faulkner, 2001).

Transductores comúnmente empleados en química analítica y para la construcción de biosensores son los electrodos sensibles al protón (electrodos de pH), y algunos electrodos gaseosos (por ejemplo de dióxido de carbono o de amonio), entre otros de los numerosos electrodos ión-selectivos disponibles (conocidos como ISE por sus siglas en inglés). La sensibilidad y selectividad de los sensores potenciométricos puede ser sobresaliente de acuerdo a la membrana empleada en el sistema (Griffiths y Hall, 1993; Harris, 2003).

En los ISE, el mecanismo general por el que se desarrolla un potencial de manera selectiva a ciertos iones depende de la naturaleza de la membrana, mecanismo especialmente estudiado en los electrodos de membrana de vidrio, como los de pH. En los

electrodos de membrana el potencial observado es un tipo de potencial de unión que se desarrolla en la membrana que separa la solución del analito a determinar, de la solución de referencia. El tiempo de respuesta es de segundos a minutos, el color y la turbidez no interfieren en sus determinaciones, pero puede producirse el taponamiento de la unión líquida porosa (mediante la cual se mantiene el intercambio lento de iones Cl^- entre el RE y la solución) si no se realiza una buena limpieza o se contamina con proteínas o solventes orgánicos (Figura 1.11) (Harris, 2003).

1.3.2.2.-ISE de membrana de vidrio

Un ejemplo de este tipo de dispositivos es un electrodo de pH que es un ISE de membrana de vidrio intercambiadora de cationes que permite detectar la presencia de H^+ en una muestra. La membrana de vidrio es el elemento sensible a los H^+ y separa la solución a determinar (muestra) del interior del electrodo. Un electrodo combinado de pH (Figura 1.11) está formado por dos tubos uno dentro de otro; el tubo interno contiene al denominado electrodo indicador formado por la membrana de vidrio sensible al pH y un electrodo RE (interno) que sensa el potencial que se desarrolla en esa membrana. En el tubo externo se encuentra un RE (externo) conectado eléctricamente con la solución que se está midiendo mediante la unión porosa. Se mide la diferencia de potencial entre ambos electrodos, relacionada con la concentración de H^+ en la muestra (Skoog y Leary 1994; Bard y Faulkner, 2001; Harris, 2003).

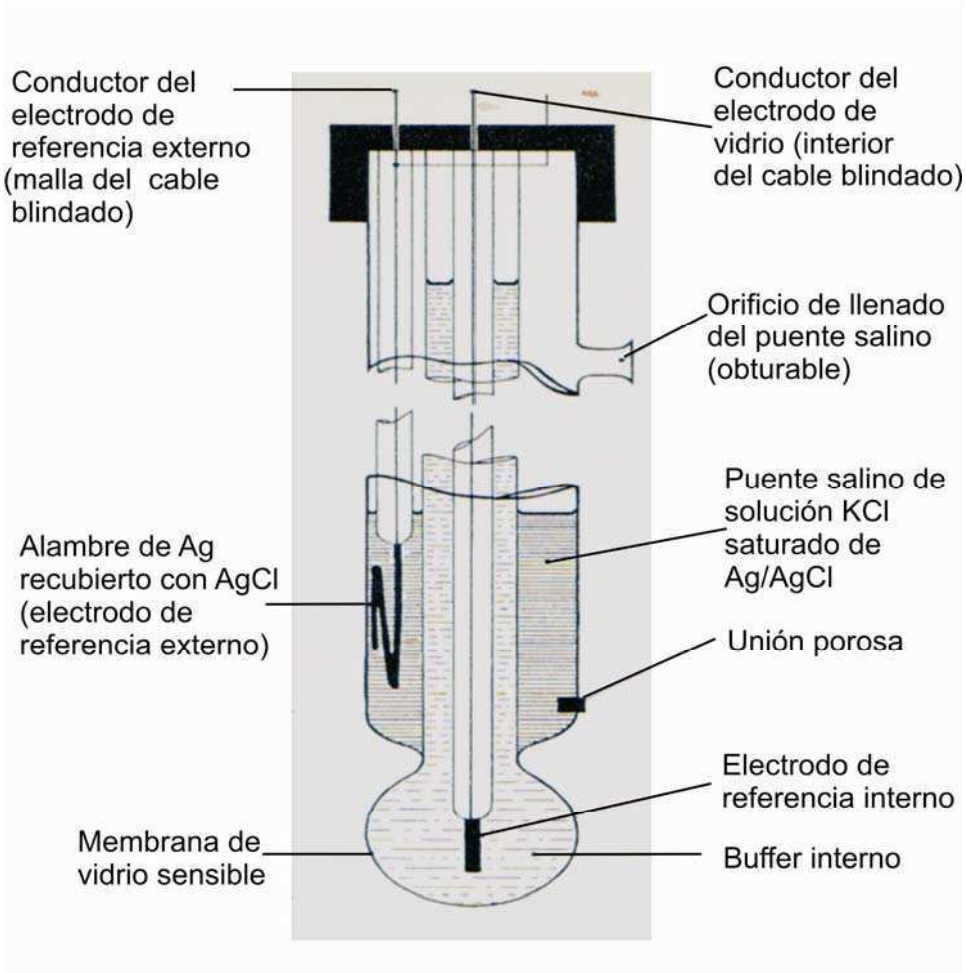


Figura 1.11: Esquema de un ISE de membrana de vidrio, electrodo de pH combinado.

Los ISE responden de forma lineal al logaritmo de la actividad del analito, dentro de un rango de actividades, según la ecuación de Nernst (Ecuación 1.3) por lo que pequeños errores en la medición del potencial llevan a grandes errores en la concentración del analito sensada. Esta es la razón por la cual este tipo de sensores requieren del uso de un electrodo de referencia estable. Al incorporar un receptor biológico a alguno de estos dispositivos, transformamos un sensor químico en un biosensor (Guilbault y Montalvo, 1970; Mifflin et al., 1984; Riechel, 1984).

1.3.3.-Biosensores impedimétricos

1.3.3.1.-Fundamentos teóricos

Otra manera de realizar estudios electroquímicos es aplicando al sistema una señal alternante de poca magnitud, y estudiar cómo evoluciona en el tiempo el sistema luego de tal perturbación. Generalmente esto se logra aplicando un voltaje sinusoidal de baja

amplitud a una frecuencia (ω) particular y midiendo la corriente resultante. Si en lugar de aplicar el voltaje a una frecuencia fija se realiza un barrido de frecuencias, la técnica se denomina espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS).

La impedancia (Z) se define como:

$$Z = \frac{V(t)}{i(t)} \qquad [1.4]$$

y

$$Z(\omega) = Z_{re} - jZ_{im} \qquad [1.5]$$

por lo tanto es función de la ω aplicada.

La parte imaginaria de la impedancia Z_{im} se define como:

$$Z_{im} = \frac{1}{\omega C_B} \qquad [1.6]$$

siendo C_B la suma de las capacitancias conectadas en serie. De la Ecuación 1.6 se deduce que si $\omega = 0$ (es decir, en condiciones de corriente continua, DC), la impedancia puede ser descripta por su parte real, la resistencia y por lo tanto el sistema puede ser estudiado de acuerdo a la Ley de Ohm (V = i x R) donde R se corresponde a Z_{re} de la Ecuación 1.5. En la Figura 1.12 se observa un diagrama de la relación entre corriente y voltaje alternantes a una frecuencia ω, siendo ϕ, la fase, en el tiempo, entre la corriente y el voltaje de acuerdo a la Ecuación 1.7.

$$i = E\omega C_B \sin(\omega t + \phi) \qquad [1.7]$$

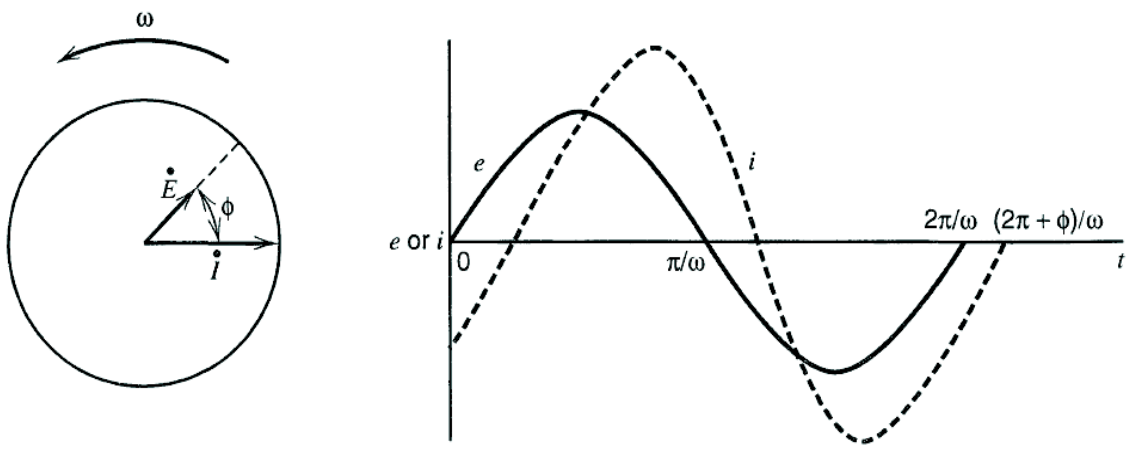


Figura 1.12: Diagrama de relaciones entre corriente y voltaje alternantes a ω y ϕ distintas de 0.

Si $\phi = \pi/2$, la corriente presente en el sistema es puramente capacitiva y $Z_{re} = 0$. La Figura 1.13 permite entender de manera gráfica las relaciones entre Z_{re}, Z_{im}, Z y ϕ (Bard y Faulkner, 2001; Orazem y Tribollet, 2008).

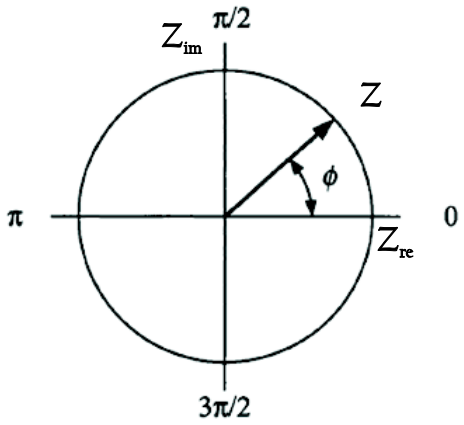


Figura 1.13: Diagrama de fasores que presenta las relaciones entre la Z_{im}, Z_{re}, Z y ϕ.

1.3.3.2.-Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)

La espectroscopía de impedancia electroquímica, EIS, permite estudiar una amplia variedad de fenómenos electroquímicos (Macdonald, 1992).

Si la impedancia de la interfaz electrodo/solución cambia cuando el receptor captura el analito, la técnica de EIS puede ser utilizada para determinar el cambio impedimétrico de dicha interfaz. El cambio de la impedancia medida en una muestra es función de la ω de la señal aplicada, las propiedades de la superficie y geometría de los

electrodos empleados, la proporción superficie/volumen, la distancia entre los electrodos, la conductividad de la solución, la temperatura y, si se emplean células como material biológico, del tipo y número de las mismas y del medio de cultivo que se utilice (Mikkelsen y Rechnitz, 1989; Shulga et al., 1994; Lei et al., 2006; Orazem y Tribollet, 2008).

1.3.3.3.-Electrodos interdigitados (IDES)

Un IDES consiste en un par de electrodos dispuestos entre sí como dos peines enfrentados, Figura 1.14.

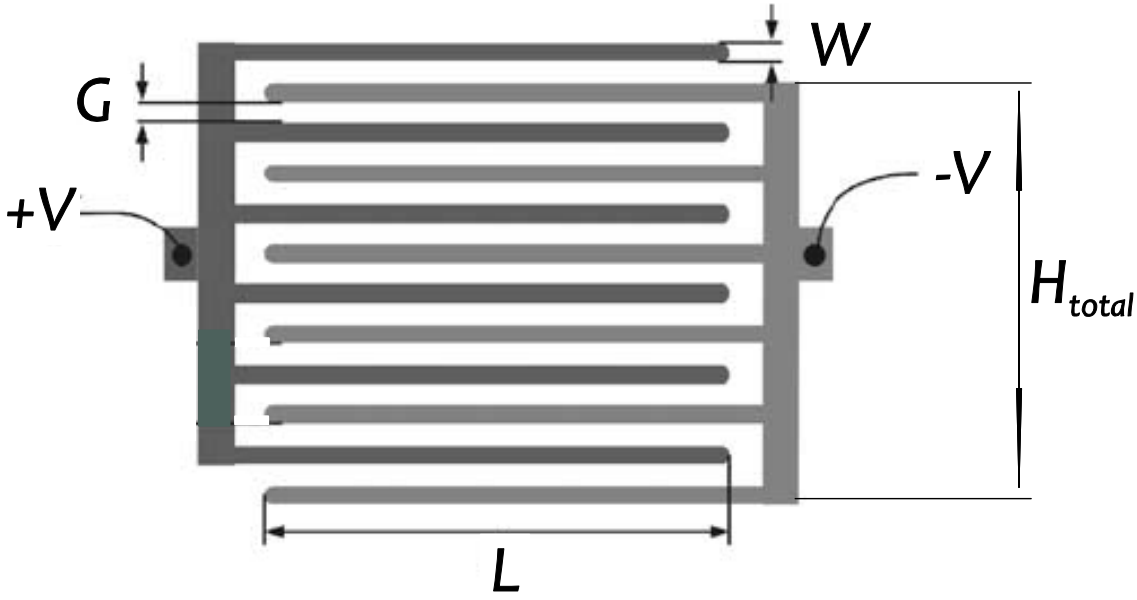


Figura 1.14: Vista planar de un IDES en donde se muestra el ancho del dedo, W, distancia entre electrodos, G, el largo de cada dedo, L y el alto total de los electrodos, H_{total}.

Los parámetros W, G, L y H_{total} (o N, el número de dedos por electrodo) permiten calcular el área de cada electrodo y sus variaciones han sido extensamente estudiadas de manera de optimizar la sensibilidad de los mismos (Wang et al., 2008). Dado que los electrodos no están conectados entre sí, cada par de dedos, de polaridad opuesta, funciona como un capacitor produciéndose un campo eléctrico entre ellos (Figura 1.15)

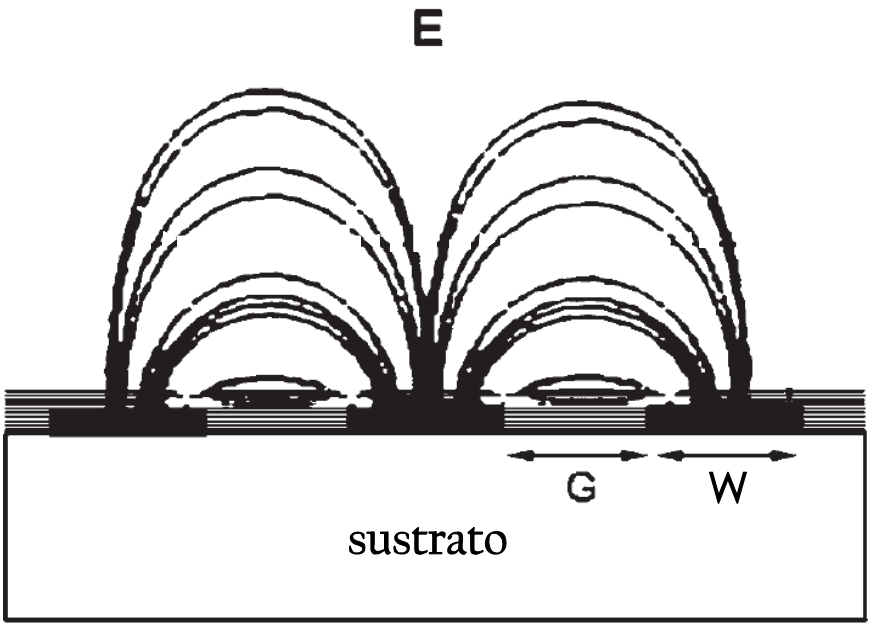


Figura 1.15: Diagrama del campo eléctrico que se produciría al utilizar IDES para la técnica de EIS (Ertl y Heer, 2009).

Los IDES son empleados para el sensado biológico debido a su bajo costo de producción, posibilidad de miniaturización y posibilidad de producción industrial en grandes cantidades. Estos electrodos pueden ser acoplados a canales microfluídicos de manera de establecer puertos de análisis en micro sistemas de análisis total (μTAS por sus siglas en inglés) (Richter et al., 2011). La mayoría de los autores coinciden en que el uso de electrodos interdigitados es la mejor opción para el desarrollo de biosensores impedimétricos (Olthuis et al., 1993; Sheppard et al., 1993; Dzyadevich et al., 1994; Olthuis et al., 1994; Weimar y Gopel, 1995; Lee et al., 2000).

1.3.3.4.-Análisis de los datos obtenidos mediante EIS

Los datos de Z pueden ser presentados como gráficos de $|Z|$ y ϕ *vs* ω (Figura 1.16), conocidos como *Bode plot*, o como gráficos en donde se muestra la Z en su modo complejo, Z_{re} *vs* Z_{im}, en donde cada punto corresponde a cada una de las ω utilizadas (Figura 1.17), conocidos como *Nyquist plot*.

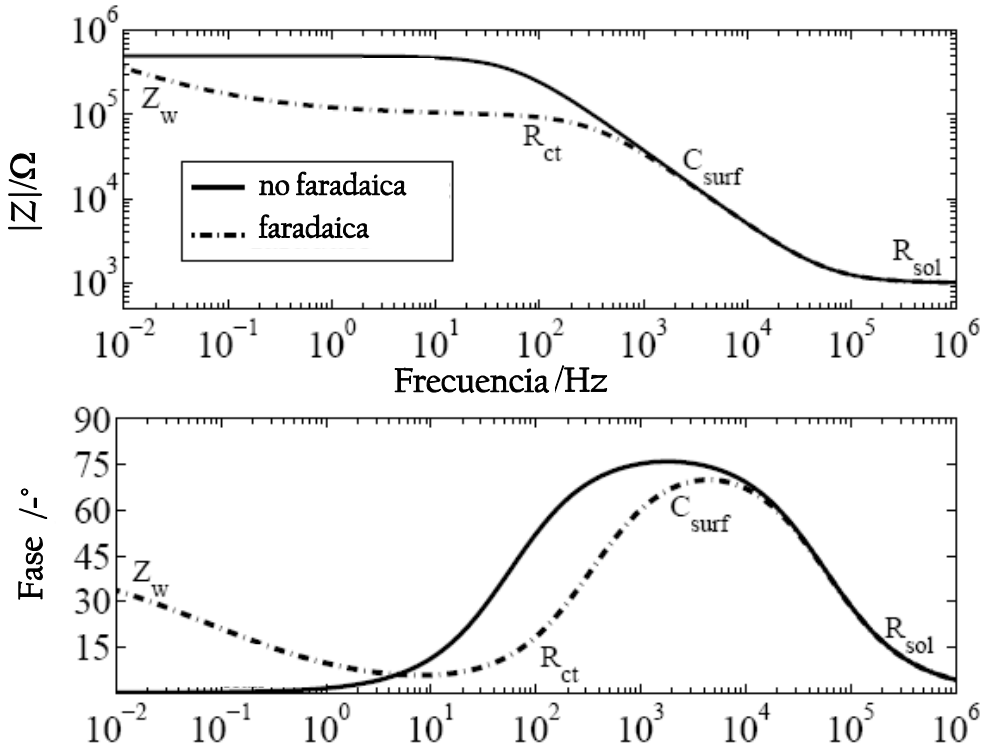


Figura 1.16: *Bode plot* de una EIS generada usando datos simulados. La línea entera representa la Z no-faradaica y la punteada, la Z faradaica (Daniels, 2010).

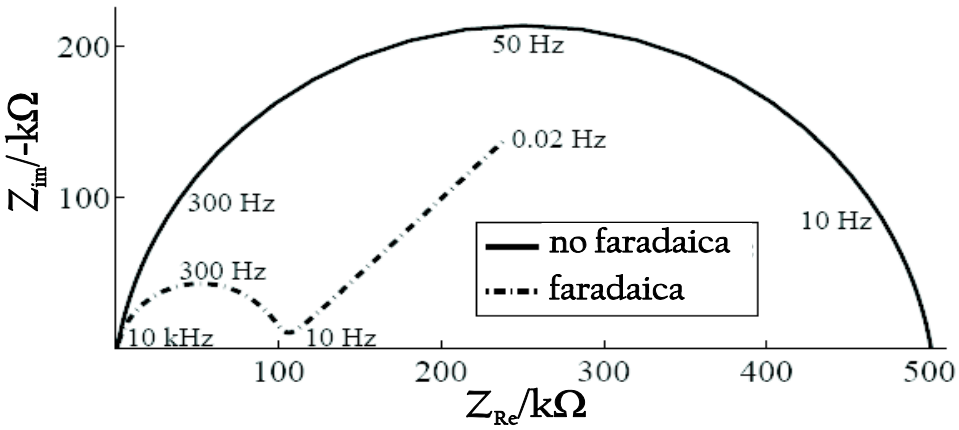


Figura 1.17: *Nyquist plot* de una EIS generada usando datos simulados. La línea entera representa la Z no-faradaica y la punteada, la Z faradaica (Daniels, 2010).

Los elementos que generalmente se distinguen en una celda electroquímica son la resistencia de una solución (R_{sol}), que surge del movimiento de los iones del seno de una solución en respuesta a un potencial aplicado, la capacitancia entre el electrodo de metal y los iones de la solución (C_{surf}), la capacitancia de la doble capa iónica (C_{dl}), la resistencia de la transferencia de carga entre la solución y el electrodo (R_{ct}) y, en los sensores faradaicos, la impedancia de Warburg (Z_w).

Si se conoce la geometría del electrodo y la conductividad de la solución (calculable a partir de los coeficientes de difusión de los iones que la componen) la R_{sol} puede ser calculada, sin embargo, suele ser tratada como un parámetro a ajustar dado que su valor exacto no suele ser significativo. La C_{surf} puede ser modelada como una combinación en serie de la capacitancia de la modificación superficial y la C_{dl}, en el caso de electrodos modificados superficialmente. Z_w presenta un significado físico sólo en la EIS faradaica y es una manifestación del retraso en la difusión de la especie electroactiva hacia el electrodo. Mientras que la C_{dl} es independiente de la frecuencia ω, Z_w es dependiente de la misma. R_{sol} presenta efectos en la Z_{re} evidenciados en desplazamientos de curvas de *Nyquist plot*, a altas frecuencias (Bard y Faulkner, 2001; Macdonald, 2006).

Si los electrodos se exponen directamente en una solución que no presenta especies que se puedan adsorber totalmente en ellos, al realizarse una EIS se obtiene una Z faradaica dado que se producen corrientes faradaicas debido a la transferencia de carga entre la solución y el electrodo. Al pasivar los electrodos se aumenta la resistencia a la transferencia de carga entre la solución y los electrodos; en los IDES esto se realiza generalmente mediante el depósito de una capa de nitruro de silicio (Si_3N_4) sobre los mismos (Bard y Faulkner, 2001; Lisdat y Schäfer, 2008).

Generalmente los datos "crudos" de impedancia se intentan ajustar a un circuito eléctrico modelo, de manera de extraer valores equivalentes de resistencias y capacitancias, y los cambios en los elementos del modelo son informados como la señal de salida del sensor. Otras veces, la impedancia a una frecuencia en particular es la empleada como señal. Dependiendo de los valores de los parámetros de cada modelo de circuito eléctrico, los datos a una dada frecuencia pueden contener información acerca de varios elementos del circuito o estar dominados por uno sólo. La elección del modelo al cual ajustar es muchas veces empírico y un sólo elemento del modelo puede estar involucrado en diferentes efectos físicos. No hay un único modelo que "pueda explicar" un espectro dado. Los mejores modelos aplicados a interfaces electrodo/solución pueden no ajustar todos los datos medidos a frecuencias extremas o requieren tantos parámetros que se vuelven poco prácticos (Macdonald, 1992).

La transformada Kramers-Kronig puede actuar como un test de validez de datos, independiente de los resultados obtenidos mediante EIS, que permite chequear la consistencia de los datos obtenidos (Macdonald, 1992; Macdonald, 2006).

1.4.-PARÁMETROS GENERALES DE CALIDAD DE AGUA

La gestión y protección de las fuentes naturales de agua dulce es fundamental para mantener su calidad, la conservación de la biodiversidad y permitir su uso ya sea como lugares de recreación o en la producción de alimentos y de agua para consumo humano, u otros usos agrícolas e industriales. El agua potable se obtiene fundamentalmente a partir de "agua cruda", proveniente de fuentes de agua dulce superficial, o aguas subterráneas, y es absolutamente esencial para la salud pública; el agua contaminada microbiológicamente, o con metales pesados u otros compuestos tóxicos atenta contra la salud humana. Las aguas procedentes del uso humano e industrial, deben ser tratadas antes de ser nuevamente vertidas a los ambientes naturales de manera de evitar problemas de salud, ecológicos y económicos. Las aguas residuales industriales comúnmente contienen sustancias orgánicas e inorgánicas (colorantes, fenoles, metales pesados, cianuro, entre otros) y patógenos microbianos.

Los métodos empleados para tratar el agua, y conseguir que sea apta para el consumo humano o para su vertido en ríos o lagos, incluyen una gran variedad de tratamientos físicos y químicos de potabilización. Dependiendo de la calidad del "agua cruda", los métodos de potabilización deberán ser más o menos complejos, y por ello, más o menos costosos, convirtiendo a la preservación de la calidad de los cuerpos de agua naturales en una motivación no sólo sanitaria y ecológica sino también, económica.

El objetivo del tratamiento de las aguas cloacales y pluviales es reducir la cantidad de factores que permiten el crecimiento microbiano (materia orgánica principalmente) así como la eliminación de productos tóxicos, en el caso de que se encuentren presentes. La eficiencia del tratamiento se expresa en términos de reducción de BOD (demanda bioquímica de oxígeno), y se refiere a la cantidad de oxígeno consumida por los microorganismos para la oxidación de la materia orgánica fácilmente degradable en una muestra de agua; en algunos casos también se considera el oxígeno necesario para la oxidación de la materia inorgánica. Un tratamiento eficaz debería reducir los niveles de BOD a un máximo de 5 mg/L (de O_2 o BOD_5) en el agua resultante (APHA, 1995; APHA "5210", 2000; Madigan et al., 2003).

No obstante, dado el incremento de la población y su impacto en el ambiente, así como la disposición no regulada de residuos industriales en el ambiente, se requiere de métodos de monitoreo que permitan obtener resultados confiables rápidamente, de manera de evitar problemas con, por ejemplo, las plantas de tratamiento de aguas, o en los ambientes naturales, problemas que suelen requerir luego, soluciones de muy alto costo y

pérdidas irreparables en la salud humana y/o la biodiversidad. Además, la toxicidad causada por materiales peligrosos debe ser monitoreada (óptimamente en forma continua) dado que una proporción significativa de la población puede encontrarse expuesta a dichos contaminantes (Farré et al., 2005).

1.4.1.-Demanda bioquímica de oxígeno (BOD) y *Test* BOD_5

La capacidad que tiene una masa de agua determinada de consumir oxígeno se denomina BOD y es uno de los índices más empleados para el monitoreo de la polución orgánica en ambientes acuáticos. La materia orgánica fácilmente biodegradable es una mezcla compleja de biomoléculas de pequeño tamaño, oligómeros y polímeros de diversa complejidad y biodegradabilidad, por lo tanto cuantificarla de manera directa es complicado. La medición del co-sustrato, el O_2 consumido, es una muy buena aproximación a dicha cuantificación (genéricamente, este tipo de métodos es denominado "respirometría").

Internacionalmente se emplea el ensayo BOD_5 como método convencional para la medición de los niveles de materia orgánica biodegradable (APHA "5210", 1995). Este *test* mide la cantidad de O_2 disuelto (OD), consumido por los microorganismos durante la oxidación biológica de materia orgánica, bajo condiciones específicas. Para ello se determina en una muestra el OD inicial y el OD al cabo de cinco días de incubación a 20 °C y en oscuridad. La diferencia entre ambos valores será la cantidad de oxígeno consumido.

Entre otras condiciones, el agua a ser analizada debe mantenerse dentro de ciertos valores físicos y químicos (conductividad y pH). El procedimiento general consiste en la preparación del agua de dilución diariamente y el control de sus cualidades. Esta deberá colocarse a una temperatura aproximada de 20 °C, saturarse con oxígeno e inocular la muestra si presenta bajo contenido de materia orgánica. Varias diluciones de la muestra son analizadas, ya que el rango lineal de este método es pequeño; muestras cuyo oxígeno disuelto se haya agotado no tienen valor analítico. Además, de ser necesario, las muestras deben neutralizarse para llevarlas a un pH de entre 6,5 y 7,5.

Se emplea habitualmente como control de la viabilidad del inóculo y del correcto desarrollo de los procedimientos, una solución de 150 mg de glucosa + 150 mg de ácido glutámico por litro de agua destilada (GGA) que presenta un valor de BOD_5 de 198 mg/L (APHA "5210", 1995). La glucosa tiene una tasa excepcionalmente alta y variable de oxidación, pero cuando se utiliza con ácido glutámico, dicha tasa se estabiliza y es similar a la obtenida en muchas aguas cloacales municipales.

Las diluciones que dan lugar a un OD residual mayor de 1 mg/L y un consumo de OD de al menos 2 mg/L después de 5 días de incubación, producen los resultados más confiables. Los resultados suelen reportarse en mg/L de BOD_5 con dos cifras significativas y la precisión correspondiente (media y desviación estándar). La determinación del OD inicial se realiza por medio del método yodométrico de azida modificado, o bien por medio del método electrométrico con electrodo de membrana (electrodo de Clark), de acuerdo a lo establecido en la norma mexicana (Norma NMX-AA-028-SCFI, 2001). En este método, valores de pH extremos, cloro residual, nitritos y sustancias inorgánicas y orgánicas reductoras producen interferencia.

El test BOD_5 presenta dificultades prácticas asociadas con la sensibilidad a la temperatura y a la concentración de O_2, falta de validación estequiométrica y necesidad de dilución de muestras y complicaciones prácticas en el proceso de medición (Pasco, 2004). El problema de que el O_2 consumido sea el parámetro determinante de la detección rápida de BOD se relaciona con que la biodegradación de la materia orgánica se produciría a elevada velocidad si la concentración microbiana fuese muy alta, pero la baja solubilidad del O_2 lo vuelve el reactivo limitante, convirtiéndose en la principal razón de los 5 días de duración del método BOD_5, y su mayor desventaja. Tal demora vuelve imposible la intervención activa y rápida en el monitoreo ambiental y/o procesos de control. Otros problemas aparecen como resultado de la cuestionable precisión del test, aceptando un RSD de 20% en los resultados, pero además presenta un rango lineal de trabajo acotado, entre 1 y 9 mg O_2/L (solubilidad del oxígeno en agua a 25 °C) requiriendo extensivas diluciones de las muestras (Yoshida et al., 2000; Morris et al., 2001).

Puede realizarse un análisis más rápido que la determinación de BOD con fines similares, denominado demanda química de oxígeno (COD). Esta determinación presenta una cierta correlación con la BOD_5 (dependiendo de la composición del agua) y sirve como una guía para seleccionar las diluciones. Sin embargo, muchas veces este parámetro es poco útil, dado que si en la muestra existen sustancias de difícil degradación microbiana (lignina, celulosa), los valores de COD serán muy altos comparados con los obtenidos por el método BOD_5.

1.4.2.-Técnicas alternativas y respirometría de ferricianuro

Para el desarrollo de técnicas alternativas de la medición rápida de BOD, los investigadores han propuesto dos mecanismos genéricos, ambos basados en el proceso de respiración: biosensores microbianos y miniplantas de tratamiento de aguas residuales. En

ambos casos, el transductor más utilizado es el electrodo de oxígeno de Clark, por lo que las limitaciones dadas por la escasa solubilidad del oxígeno no son superadas.

Por otro lado, el empleo de mediadores de mayor solubilidad que el oxígeno en solución acuosa, tales como el ferricianuro de potasio, permite utilizar mayor cantidad de microorganismos para la degradación rápida de la materia orgánica simplificando el procedimiento analítico y evitando en gran medida la necesidad de diluciones de las muestras (Pasco et al., 2004).

Los mediadores solubles tienen la capacidad de ceder electrones a un electrodo que se encuentra a un potencial anódico más bajo que el oxígeno y pueden facilitar reacciones en ausencia de oxígeno. La acumulación del mediador reducido por la acción del metabolismo microbiano es directamente proporcional a la degradación de materia orgánica (Ramsay y Turner, 1988; Rawson et al., 1989; Gaisford et al., 1991; Ertl et al., 2000a).

El mediador reducido por acción del metabolismo bacteriano (por ejemplo ferrocianuro) es re-oxidado al aplicar un potencial adecuado, como se observa en la Ecuación 1.8.

$$\underset{\text{Ferrocianuro}}{[\,Fe(CN)_6\,]^{4-}} \underset{\textit{Metabolismo microbiano}}{\overset{\textit{400-600 mV}}{\rightleftharpoons}} \underset{\text{Ferricianuro}}{[\,Fe(CN)_6\,]^{3-}} + e^- \qquad [1.8]$$

En presencia de exceso de ferrocianuro y empleando un WE relativamente pequeño, la reacción puede considerarse de pseudo primer orden debido a que la concentración de ferrocianuro permanecería casi constante luego del salto de potencial. Para reacciones rápidas la corriente es proporcional a la concentración del mediador y de ahí su potencial valor como técnica analítica.

Cuando los microorganismos oxidan los compuestos orgánicos presentes en la muestra, el ferricianuro actúa como aceptor de electrones reduciéndose a ferrocianuro que se oxida en el WE (ánodo) a un determinado potencial. Los valores culombimétricos de corriente resultante pueden calcularse estequiométricamente con valores teóricos para la solución de GGA, siendo 2,316 C/μmol para la glucosa y 2,026 C/μmol para el ácido glutámico (Pasco et al., 2000).

Dado que la velocidad de la reacción es proporcional a la cantidad de catalizador (microorganismos), el exceso de mediador permite manipular el número de bacterias para

obtener una degradación del sustrato similar a la obtenida en el test BOD_5 en menor tiempo.

La otra ventaja reside en que, a diferencia del O_2, la concentración de la forma reducida del mediador al inicio de la medición es cero, incrementando la precisión de la cuantificación de la cantidad de mediador oxidado que se reduce (Pasco et al., 2000).

A pesar de que el ferricianuro es incapaz de atravesar la membrana citoplasmática, se cree que los electrones generados en la respiración, son transferidos al mediador por deshidrogenasas (por ejemplo NADPH deshidrogenasas) que atraviesan la membrana, generando corrientes que pueden ser medidas dependiendo de la actividad metabólica del microorganismo. *E. coli*, y otros organismos Gram negativos, pueden reducir oxidantes hidrofílicos como el ferricianuro directamente (Ramsay y Turner, 1988; Gaisford et al., 1991).

Los componentes terminales de la cadena respiratoria de las bacterias Gram negativas están asociados a la membrana citoplasmática (Gennis y Stewart, 1996), pero se encuentran accesibles a oxidantes pequeños e hidrofílicos como el ferricianuro, dado que la membrana externa contiene canales proteicos (porinas) que permiten la libre difusión de especies de bajo PM ($\leq$ 1000 aprox.) hacia el espacio periplásmico (Ertl et al., 2000a).

1.4.3.-Toxicidad

Actualmente en ecotoxicología se utilizan bioensayos que proporcionan información acerca de los efectos y mecanismos de acción de sustancias químicas potencialmente tóxicas, permitiendo evaluar el riesgo a su exposición. Estos ensayos aspiran a la predicción realista del comportamiento de sustancias tóxicas en el ambiente y el uso de biosensores y bioensayos es de gran interés en el área (Farré et al., 2005).

Los tóxicos que frecuentemente se encuentran en aguas tratadas son productos de desinfección formados por reacciones entre una o dos moléculas de carbono orgánico combinadas con cloro como los trihalometanos que son cancerígenos. Otros tóxicos pueden encontrarse en las fuentes de agua bebible como el plomo, proveniente de soldaduras y cañerías (Morris et al., 1992).

Una variedad de metales como el cadmio y el mercurio, o metaloides como el arsénico, pueden también encontrarse en el agua bebible como resultado de la acumulación de estos en formaciones geológicas; estos tóxicos se encuentran asociados al cáncer de vejiga y pulmón, particularmente el arsénico.

Los nitratos son contaminantes frecuentes de aguas debido a su empleo en fertilizantes, dependiendo de la zona y la estación del año, y compuestos químicos orgánicos sintéticos como pesticidas también se han encontrado en aguas destinadas al consumo humano (APHA, 2000).

1.4.3.1.-Ensayo MICROTOX®

MICROTOX® es un bioensayo normalizado internacionalmente que emplea como organismo indicador una cepa de la bacteria marina luminiscente *Vibrio fischeri.* Mediante este ensayo se examina la toxicidad aguda de muestras ambientales y compuestos puros basándose en la reducción de la bioluminiscencia natural de la bacteria. La toxicidad se expresa como la concentración de agente que produce la reducción del 50% de la luminiscencia inicial (EC_{50}). Esta respuesta es dependiente de la densidad celular y regulada a través del mecanismo de comunicación célula-célula, comúnmente conocido como *quorum sensing* (Bulich, 1982; APHA "8050", 1995).

Las reacciones de emisión de luz en la mayoría de las bacterias involucran la oxidación de riboflavin fosfato reducido ($FMNH_2$) y de un aldehído de cadena larga (8 átomos de carbono o mayor) con la correspondiente reducción del O_2. La energía sobrante en dicha reacción es la que se emite como luz verde-azulada, $\lambda_{máx}$ = 490-505 nm. Esta reacción es catalizada por la enzima bacteriana luciferasa.

La reacción de bioluminiscencia bacteriana está ligada al sistema de transporte de electrones en la respiración celular y es indicativa del estado metabólico de la célula, de modo que una disminución de la bioluminiscencia indica la disminución de la respiración celular. Los contaminantes físicos, químicos y biológicos afectan a la respiración celular alterando el porcentaje de síntesis de proteínas y lípidos y modificando por tanto, el nivel de emisión de luminiscencia (Madigan et al., 2003).

El mayor problema que presenta este ensayo es debido a las interferencias que presenta la presencia de sólidos en suspensión en la muestra. Otras desventajas de este ensayo es el tipo de bacteria empleada, dado que al ser una bacteria marina, tiene requerimientos específicos de crecimiento como la necesidad de sales en el medio y la necesidad de bajas temperaturas (típicamente una salinidad de 35 g/L y 15 °C).

1.4.3.2.-Ensayo de citotoxicidad MTT

El ensayo tradicional de evaluación de la viabilidad o citotoxicidad celular, en condiciones *in-vitro*, es el ensayo de reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5.dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolium, ensayo de MTT, que consiste en el clivaje del anillo de tetrazolium, realizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, en un compuesto de color azul, formazán, permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Los cristales de formazán se solubilizan luego de la incubación de las células con el tetrazolium y se determina su concentración espectrofotométricamente a 570 nm, esta concentración se encuentra en relación directa con la cantidad de células vivas que hay en la muestra (Mosmann, 1983; González et al., 2008).

1.5.-USO DE BIOSENSORES EN APLICACIONES AMBIENTALES, INDUSTRIALES Y CLÍNICAS

1.5.1.-Aplicaciones de biosensores amperométricos

Los biosensores amperométricos más exitosos comercialmente, que han originado decenas de compañías como Accuchek® o Medisense® y prestado relevantes servicios en el área de la salud, son los basados en el uso de la enzima glucosa oxidasa y han dado lugar a dispositivos portátiles y de fácil operación utilizados por los pacientes diabéticos para medir los niveles de glucosa de manera autosuficiente. Utilizan en general un sistema de tres electrodos descartables, construidos mediante la técnica de *screen-printing* (en capa gruesa), y un mediador soluble como el ferroceno u otros. El ferroceno y sus derivados han sido utilizados ampliamente en biosensores para la determinación de glucosa (Cass et al., 1984), alcoholes (Skládal et al., 2002; Guzman-Vázquez de Prada et al., 2004), monóxido de carbono (Turner et al., 1984) aminoácidos, glicolato y galactosa (Dicks et al., 1986).

Trabajos pioneros pueden ser recordados, Clark y Lyons desarrollaron el primer biosensor enzimático amperométrico para la determinación de glucosa en sangre, inmovilizando la enzima glucosa oxidasa en un electrodo de O_2 (1962) o el de Updike y Hicks (1967) que desarrollaron un biosensor amperométrico de glucosa basado en la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa en un gel de poliacrilamida en la superficie de un electrodo de O_2. La presencia de glucosa en solución hace que la tasa de difusión del O_2 hacia el electrodo de Pt decrezca resultando en una disminución de la corriente. Karube et al. (1979) desarrollaron un sistema para el monitoreo de la fermentación inmovilizando *Pseudomonas fluorescens* en un electrodo de O_2. Cabe destacar que los trabajos referidos

en este párrafo, si bien precursores en su momento, no han dado lugar a equipamiento comercial de uso habitual.

Sin embargo una gran diversidad de biosensores amperométricos han sido desarrollados para aplicaciones en el monitoreo ambiental, fundamentalmente para la determinación de BOD, inmovilizando microorganismos en electrodos de O_2, siendo Karube et al. (1977) un pionero en esta área (Marty et al., 1997; Chan et al., 1999; Liu y Mattiasson, 2002; Rastogi et al., 2003), o basándose en la técnica de respirometría de ferricianuro (Pasco et al., 2000; Yoshida et al., 2000; Morris et al., 2001). Como material biológico se han utilizado consorcios microbianos inmovilizados o cepas individuales, y se han empleado una gran diversidad de microorganismos.

Los inmunoensayos pueden también ser desarrollados basándose en la técnica de amperometría. En estos biosensores, los anticuerpos secundarios son detectados utilizando como marcadores enzimas que pueden convertir un sustrato no electroactivo en uno que sí lo es, o viceversa, y posteriormente se realiza la cuantificación del sustrato o producto electroactivo en un electrodo polarizado a un potencial adecuado, para producir la oxidación o reducción del las moléculas electroactivas (Heller, 1996).

1.5.2.-Aplicaciones de biosensores potenciométrico

El desarrollo de biosensores potenciométricos ofrece la posibilidad de obtener herramientas compactas y de alta selectividad y sensibilidad si se elige adecuadamente el transductor y el material biológico a utilizar. Se han desarrollado biosensores potenciométricos para aplicaciones ambientales para la detección de agentes organofosforados inmovilizando la enzima organofósforo hidrolasa (OPH) en un electrodo de pH (Mulchandani et al., 1999), o inmovilizando *Flavobacterium* sp. o membranas citoplasmáticas de esta bacteria, asociadas a una gran concentración de OPH (Gäberlein et al., 2000). Un ISE sensible a Cl^- fue modificado inmovilizando a *Pseudomonas aeruginosa* JI104 para la determinacion de tricloroetileno, TCE, en aguas residuales (Han et al., 2001).

Entre las aplicaciones industriales se encuentra la inmovilización de *E. coli* en un electrodo potenciométrico de CO_2 para la determinación de ácido glutámico, en un FIA para aplicaciones en fermentaciones (Hikuma et al., 1980) o el desarrollo de un electrodo de pH modificado con *P. aeruginosa* permeabilizada ha sido presentado para la determinación de cefalosporinas (Kumar et al., 2008) basándose en el hecho de que la actividad enzimática de la pared microbiana produce la hidrólisis de la cefalosporina acompañado por la producción de protones cerca del electrodo de pH, lo que se detecta

como un cambio de pH local sobre la membrana de vidrio del electrodo indicador. Otro biosensor potenciométrico ha sido desarrollado para la determinación de residuos de lactamasas en leche empleando un electrodo de CO_2 y *Bacillus stearothermophilus* var. calidolactis (Ferrini et al., 2008). La presencia de lactamasas inhibe el crecimiento microbiano haciendo que disminuya la cantidad de CO_2 producida (Bakker y Qin, 2006).

1.5.3.-Aplicaciones de biosensores impedimétricos

Dado que la técnica EIS permite analizar la impedancia de un sistema y es un método sensible a los fenómenos de superficie y a los cambios de propiedades en el seno de la solución, ha sido ampliamente utilizada para determinar mecanismos de corrosión, caracterizar el transporte de carga a través de membranas y en interfaces entre membrana y solución; además de ser utilizada en aplicaciones biológicas. En esta última área, además de los procesos de reconocimiento biológico se emplea como herramienta para caracterizar modificaciones de superficie como la inmovilización de biomoléculas en los electrodos (Lisdat y Schäfer, 2008).

Se han desarrollado biosensores impedimétricos para la determinación de metales pesados y pesticidas en muestras de agua inmovilizando células en un IDES de Pt (Chouteau et al., 2004). Los biosensores impedimétricos son atractivos debido a su rapidez de respuesta y sensibilidad a los analitos. Este tipo de biosensores está basado en la medición del cambio de impedancia a lo largo del tiempo como resultado del reconocimiento del analito por parte del receptor biológico. También el cambio de impedancia de una solución se puede producir cuando una enzima produce un cambio neto en alguna especie cargada o iónica (Lawrence y Moores, 1972).

Se han reportado biosensores basados en el uso de canales iónicos y su funcionamiento sensorial como biosensores flexibles, sensibles y adecuados para un amplio rango de aplicaciones (Cornell et al., 1997). Este sensor se basa en el cambio producido por un evento de reconocimiento en una población de canales iónicos presentes en una membrana lipídica.

Los biosensores impedimétricos han sido utilizados para detección de pequeñas moléculas de interés biológico (Taylor et al., 1988; Bontidean et al., 1998; Yin, 2004; Hleli et al., 2006), monitoreo de cambios del estado celular como respuesta a cambios en las condiciones del ambiente (Pancrazio et al., 1999; Arndt et al., 2004; Asphahani y Zhang, 2007; McGuinness, 2007), detección de presencia o concentración celular (Yang et al.,

2004; Mishra et al., 2005; Radke y Alocilja, 2005; Lazcka et al., 2007), o el monitoreo de membranas lipídicas (Stelzle et al., 1993; Knoll et al., 2003)

1.6.-REFERENCIAS

Alhadeff E.M., Salgado A.M., Cós O., Pereira Jr. N., Valero F., Valdman B. (2008) Integrated biosensor systems for ethanol analysis. Appl Biochem Biotechnol 146, 129-136

Apetreia I.M., Apetre C. (2013) Amperometric biosensor based on polypyrrole and tyrosinase for the detection of tyramine in food samples. Sens Actuators B Chem 178, 40-46

APHA, American Public Health Association (1995) "5210 Biochemical oxygen demand (BOD)" in: *Standard methods for the examination of water and wastewater.* (Eaton A., Clesceri L., Greenberg A. eds.) 19st ed. APHA. Washington DC, US

APHA, American Public Health Association (1995) "8050 Bacterial luminiscence" in: *Standard methods for the examination of water and wastewater.* (Eaton A., Clesceri L., Greenberg A. eds.) 19st ed. APHA. Washington DC, US

APHA, American Public Health Association (2000) 200015: Drinking water quality and public health. Am J Public Health 91, 499-500

Arndt S., Seebach J., Psathaki K., Galla H-J., Wegener J. (2004) Bioelectrical impedance assay to monitor changes in cell shape during apoptosis. Biosens Bioelectron 19, 583-594

Asphahani F., Zhang M. (2007) Cellular impedance biosensors for drug screening and toxin detection. Analyst 132, 835-841

Baeumner A.J. (2003) Biosensors for environmental pollutants and food contaminants. Anal Bioanal Chem 377, 434-445

Bakker E., Qin Y. (2006) Electrochemical sensors. Anal Chem 78, 3965-3983

Bard A., Faulkner L. (2001) "Introduction and overview of electrode processes", "Potentials and thermodynamics of cells", "Basic potential step methods", "Potential sweep methods", "Techniques based on concepts of impedance" in: *Electrochemical methods, fundamentals and applications.* 2nd ed. Wiley New York, US. Ch. 1, 2, 5, 6, 10

Belkin S. (2003) Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants. Curr Opin Microbiol 6, 206-212

Bickerstaff Jr. G.F. (1997) "Immobilization of enzymes and cells" in: *Immobilization of enzymes and cells* (Bickerstaff G.F. ed.) Humana Press, NJ, US. Ch. 1

Bjerketorp J., Håkansson S., Belkin S., Jansson J.K. (2006) Advances in preservation methods: Keeping biosensor microorganisms alive and active. Curr Opin Biotechnol 17, 43-49

Bohrn U., Stütz E., Fuchs K., Fleischer M., Schöning M.J., Wagner P. (2012) Monitoring of irritant gas using a whole-cell-based sensor system. Sens Actuators B Chem 175, 208-217

Bonetto M.C., Sacco N.J., Hilding Ohlsson A., Cortón E. (2012) Metabolism of *Klebsiella pneumoniae* freeze-dried cultures for the design of BOD bioassays. Lett Appl Microbiol 55, 370-375

Bontidean I., Berggren C., Johansson G., Csoregi E., Mattiasson B., Lloyd J.A., Jakeman K.J., Brown N.L. (1998) Detection of heavy metal ions at femtomolar levels using protein-based biosensors. Anal Chem 70, 4162-4169

Borisov S.M., Wolfbeis O.S. (2008) Optical biosensors. Chem Rev 108, 423-461

Bousse L. (1996) Whole cell biosensors. Sens Actuators B Chem 34, 270-275

Brogan K.L., Walt D.R. (2005) Optical fiber-based sensors: application to chemical biology. Curr Opin Chem Biol 9, 494-500

Bulich A.A. (1982) A practical and reliable method for monitoring the toxicity of aquatic samples. Process Biochem 17, 45-47

Byfield M.P., Abuknesha R.A. (1994) Biochemical aspects of biosensors. Biosens Bioelectron 9, 373-400

Cammann K. (1977) Bio-sensors based on ion-selective electrodes. Fresen Z Anal Chem 287, 1-9

Cass A.E.G., Davis G., Francis G.D., Hill H.A.O. (1984) Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. Anal Chem 56, 667-671

Chan C., Lehmann M., Tag K., Lung M., Kunze G., Riedel K., Gruendig B., Renneberg R. (1999) Measurement of biodegradable substances using the salt-tolerant yeast *Arxula adeninivorans* for a microbial sensor immobilized with poly (carbamoyl) sulfonate (PCS) part I: construction and characterization of the microbial sensor. Biosens Bioelectron 14, 131-138

Chen X., Hong C-Y., Lin Y-H., Chen J-H., Chen G-N., Yang H-H. (2012) Enzyme-free and label-free ultrasensitive electrochemical detection of human immunodeficiency virus DNA in biological samples based on long-range self-assembled DNA nanostructures. Anal Chem 84, 8277-8283

Chouteau C., Dzyadevych S., Chovelon J-M., Durrieu C. (2004) Development of novel conductometric biosensors based on immobilized whole cell *Chlorella vulgaris* microalgae. Biosens Bioelectron 19, 1089-1096

Clark L.C., Lyons C. (1962) Electrode system for continuous monitoring in cardiovascular surgery. Ann NY Acad Sci 102, 29-45

Connelly J.T., Baeumner A.J. (2012) Biosensors for the detection of waterborne pathogens. Anal Bioanal Chem 402, 117-127

Cornell B.A., Braach-Maksvytis V.L., King L.G., Osman P.D., Raguse B., Wieczorek L., Pace R.J. (1997) A biosensor that uses ion-channel switches. Nature 387, 580-583

D'Souza S.F. (1999) Immobilized enzymes in bioprocess. Curr Sci 77, 69-79

D'Souza S.F. (2001) Microbial biosensors. Biosens Bioelectron 16, 337-353

Daniels J.S. (2010) An integrated impedance biosensor array. PhD Dissertation, Stanford University.

Date A., Pasini P., Daunert S. (2007) Construction of spores for portable bacterial whole-cell biosensing systems. Anal Chem 79, 9391-9397

Dicks J.M., Aston W.J., Davis G., Turner A.P.F. (1986) Mediated amperometric biosensor for D-galactose, glycolate and L-aminoacids based on a ferrocene modified carbon paste electrode. Anal Chim Acta 182, 103-112

Du L., Wu C., Liu Q., Huang L., Wang P. (2013) Recent advances in olfactory receptor-based biosensors. Biosens Bioelectron 42, 570-580

Dzyadevich S.V., Shulga A.A., Patskovsky S.V., Arkhipova V.N., Soldatkin A.P., Strikha V.I. (1994) Thin-film conductometric transducers for enzyme biosensors. Rus J Electrochem 30, 887-891

Dzyadevych S.V., Arkhypova V.N., Soldatkin A.P., El'skaya A.V., Martelet C., Jaffrezic-Renault N. (2008) Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future. ITBM-RBM 29, 171-180

Eggins B. (2002) "Introduction" in: *Chemical sensors and biosensors*. Wiley & Teubner. London, England. Ch. 1

Ertl P., Heer R. (2009) Interdigitated impedance sensors for analysis of biological cells in microfluidic biochips. Elektrotech Inf Tech 126, 47-50

Ertl P., Robello E., Battaglini F., Mikkelsen S.R. (2000b) Rapid antibiotic susceptibility testing via electrochemical measurement of ferricyanide reduction by *Escherichia coli* and *Clostridium sporogenes.* Anal Chem 72, 4957-4964

Ertl P., Unterladstaetter B., Bayer K., Mikkelsen S. (2000a) Ferricyanide reduction by *Escherichia coli*: Kinetics, mechanism and application to the optimization of recombinant fermentations. Anal Chem 72, 4949-4956

Farré M., Barceló D. (2003) Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. Trends Anal Chem 22, 299-310

Farré M., Brix R., Barceló D. (2005) Screening water for pollutants using biological techniques under European Union funding during the last 10 years. Trends Anal Chem 24, 532-545

Ferrini A.M., Mannoni V., Carpico G., Pellegrini G.E. (2008) Detection and identification of beta-lactam residues in milk using a hybrid biosensor. J Agric Food Chem 56, 784-788

Franklin F.C.H., Bagdasarian M., Bagdasarian M.M., Timmis K.N. (1981) Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway. Proc Natl Acad Sci USA 78, 7458-7462

Freeman T.M., Seitz W.R. (1978) Chemiluminescent fiber optic probe for hydrogen peroxide based on the luminol reaction. Anal Chem 50, 1242-1246

Gäberlein S., Spener F., Zaborosch C. (2000) Microbial and cytoplasmic membrane-based potentiometric biosensors for direct determination of oganophosphorus insecticides. Appl Microbiol Biotechnol 54, 652-658

Gaisford W., Richardson N., Hagget B., Rawson D. (1991) Microbial biosensors for environmental monitoring. Biochem Soc Trans 19, 15-18

Gennis R., Stewart V. (1996) "Metabolism and general physiology" in: *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology.* (Niedhardt F. ed.) 2nd ed. ASM Press. Washington DC, US. Ch. 2

Ghindilis A.L., Atanasov P., Wilkinst M., Wilkins E. (1998) Immunosensors: Electrochemical sensing and other engineering approaches. Biosens Bioelectron 13, 113-131

González L.E., Juknat A.A., Venosa A.J., Verrengia N., Kotler M.L. (2008) Manganese activates the mitochondrial apoptotic pathway in rat astrocytes by modulating the expression of proteins of the Bcl-2 family. Neurochem Int 53, 408-415

Gopalan A.I., Lee K-P., Ragupathy D. (2009) Development of a stable cholesterol biosensor based on multi-walled carbon nanotubes-gold nanoparticles composite covered with a layer of chitosan-room-temperature ionic liquid network. Biosens Bioelectron 24, 2211-2217

Gouda M.D., Kumar M.A., Thakur M.S., Karanth N.G. (2002) Enhancement of operational stability of an enzyme biosensor for glucose and sucrose using protein based stabilizing agents. Biosens Bioelectron 17, 503-507

Griffiths D., Hall G. (1993) Biosensors - what real progress is being made? Trends Biotechnol 11, 122-130

Gu M.B., Choi S.H., Kim S.W. (2001) Some observations in freeze-drying of recombinant bioluminescent *Escherichia coli* for toxicity monitoring. J Biotechnol 88, 95-105

Guilbault G.G., Montalvo J.G. (1970) An enzyme electrode for the substrate urea. J Am Chem Soc 92, 2533-2538

Guzman-Vázquez de Prada A., Peña N., Parrado C., Reviejo A.J., Pingarrón J.M. (2004) Amperometric multidetection with composite enzyme electrodes. Talanta 62, 896-903

Han T.S., Kim Y.C., Sasaki S., Yano K., Ikebukuro K., Kitayama A., Nagamune T., Karube I. (2001) Microbial sensor for trichloroethylene determination. Anal Chim Acta 431, 225-230

Harris D.C. (2003) "Fundamentos de la electroquímica", "Electrodos y potenciometría", "Técnicas electroanalíticas" en: *Análisis químico cuantitativo*. Ed. Reverté, 3er ed., SA Barcelona, España. Caps. 14, 15, 17

Heller A. (1996) Amperometric biosensors. Curr Opin Biotechnol 7, 50-54

Higgins I.J., Swain A., Turner A.P.F. (1987) Principles and application of biosensors in microbiology. J Appl Bacteriol Symp Suppl, 93S-104S

Hikuma M., Obana H., Yasuda T. (1980) A potentiometric microbial sensor based on immobilized *Escherichia coli* for glutamic acid. Anal Chim Acta 116, 61-67

Hildebrandt A., Bragós R., Lacorte S., Marty J.L. (2008) Performance of a portable biosensor for the analysis of organophosphorus and carbamate insecticides in water and food. Sens Actuators B Chem 133, 195-201

Hleli S., Martelet C., Abdelghani A., Burais N., Jaffrezic-Renault N. (2006) Atrazine analysis using an impedimetric immunosensor based on mixed biotinylated selfassembled monolayer. Sens Actuators B Chem 113, 711-717

Jaffrezic-Renault N., Dzyadevych S.V. (2008) Conductometric microbiosensors for environmental monitoring. Sensors 8, 2569-2588

Justino C.I.L., Rocha-Santos T.A., Duarte A.C. (2010) Review of analytical figures of merit of sensors and biosensors in clinical applications. Trends Anal Chem 29, 1172-1183

Kafi Md.A., Yea C-H., Kim T-H., Kumar Yagati A., Choi J-W. (2013) Electrochemical cell chip to detect environmental toxicants based on cell cycle arrest technique. Biosens Bioelectron 41, 192-198

Kahlert H. (2002) "Reference electrodes" in *Electroanalytical methods: Guide to experiments and applications.* (F. Scholz, ed.) Springer. New York, US. Part III.2

Kaláb T., Skládal P. (1994) Evaluation of mediators for development of amperometric microbial bioelectrodes. Electroanalysis 6, 1004-1008

Karube I., Matsunaga T., Mitsuda T., Suzuki S. (1977) Microbial electrode BOD sensor. Biotechnol Bioeng 19, 1535-1547

Karube I., Mitsuda S., Suzuki S. (1979) Glucose sensor using immobilized whole cells of *Pseudomonas fluorescens.* Eur J Appl Microbiol 7, 343-350

Karube I., Nomura Y. (2000) Enzyme sensors for environmental analysis. J Mol Catal B Enzym 10, 177-181

Kergaravat S.V., Gómez G.A., Fabiano S.N., Laube Chávez T.I., Pividori M.I., Hernández S.R. (2012) Biotin determination in food supplements by an electrochemical magneto biosensor. Talanta 97, 484-490

Kintzios S., Pistola E., Konstas J., Bem F., Matakiadis T., Alexandropoulos N., Biselis I., Levin R. (2001) The application of the bioelectric recognition assay for the detection of human and plant viruses: Definition of operational parameters. Biosens Bioelectron 16, 467-480

Knoll W., Yu F., Neumann T., Schiller S., Naumann R. (2003) Supramolecular functional interfacial architectures for biosensor applications. Phys Chem Chem Phys 5, 5169-5175

Koide S., Ito N., Karube I. (2007) Development of a micro-planar amperometric bile acid biosensor for urinalysis. Biosens Bioelectron 22, 2079-2085

Komori K., Nada J., Nishikawa M., Notsu H., Tatsuma T., Sakai Y. (2009) Simultaneous evaluation of toxicities using a mammalian cell array chip prepared by photocatalytic lithography. Anal Chim Acta 653, 222-227

Kotanen C.N., Moussy F.G., Carrarac S., Guiseppi-Elie A. (2012) Implantable enzyme amperometric biosensors. Biosens Bioelectron 35, 14-26

Kumar M.A., Thakur M.S., Senthuran A., Senthuran V., Karanth N.G., Hatti-Kaul R., Mattiasson B. (2001) An automated flow injection analysis system for on-line monitoring of glucose and L-lactate during lactic acid fermentation in a recycle bioreactor. World J Microbiol Biotechnol 17, 23-29

Kumar S., Kundu S., Pakshirajan K., Dasu V.V. (2008) Cephalosporins determination with a novel microbial biosensor based on permeabilized *Pseudomonas aeruginosa* whole cells. Appl Biochem Biotech 151, 653-664

Lawrence A.J., Moores G.R. (1972) Conductimetry in enzyme studies. Eur J Biochem 24, 538-546

Lazcka O., Del Campo F.J., Muñoz F.X. (2007) Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. Biosens Bioelectron 22, 1205-1217

Lee W.Y., Kim S.R., Kim T.H., Lee K.S., Shin M.C., Park J.K. (2000) Sol-gel-derived thick-film conductometric biosensor for urea determination in serum. Anal Chim Acta 404, 195-203

Lei et al., 2006; Sua L., Jia W., Houb C., Lei Y. (2011) Microbial biosensors: A review. Biosens Bioelectron 26, 1788-1799

Lei Y., Chen W., Mulchandani A. (2006) Microbial biosensors. Anal Chim Acta 568, 200-210

Lim W.A. (2010) Designing customized cell signaling circuits. Nat Rev Mol Cell Biol 11, 393-403

Lisdat F., Schäfer D. (2008) The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. Anal Bioanal Chem 391, 1555-1567

Liu J., Mattiasson B. (2002) Microbial BOD sensors for wastewater analysis. Water Res 36, 3786-3802

Lorenzo E., Pariente F., Hernandez L., Tobalina F., Darder M., Wu Q., Maskus M., Abruna H.D. (1998) Analytical strategies for amperometric biosensors based on chemically modified electrodes. Biosens Bioelectron 13, 319-332

Ludwig R., Ortiz R., Schulz C., Harreither W., Sygmund C., Gorton L. (2013) Cellobiose dehydrogenase modified electrodes: Advances by materials science and biochemical engineering. Anal Bioanal Chem 405, 3637-3658

Macdonald D.D. (2006) Reflections on the history of electrochemical impedance spectroscopy. Electrochim Acta 51, 1376-1388

Macdonald J.R. (1992) Impedance spectroscopy. Ann Biomed Eng 20, 289-305

Madigan M., Martinko J., Parker J. (2003) "Tratamiento de aguas residuales, potabilización de aguas y enfermedades microbianas transmitidas por el agua" in: *Brock. Biología de los microorganismos*. 10ma ed, Pearson Prentice Hall, España. Cap. 28

Marty J.L., Olive D., Asano Y. (1997) Measurement of BOD: Correlation between 5-day BOD and commercial BOD biosensor values. Environ Technol 3, 333-337

McGuinness R. (2007) Impedance-based cellular assay technologies: Recent advances, future promise. Curr Opin Pharmacol 7, 535-540

Mifflin T.E., Andriano K.M., Robbins W.B. (1984) Determination of penicillin using an immobilized enzyme electrode. J Chem Ed 61, 638-639

Mikkelsen S.R., Rechnitz G.A. (1989) Conductometric transducers for enzyme-based biosensors. Anal Chem 61, 1737-1742

Mishra N.N., Retterer S., Zieziulewicz T.J., Isaacson M., Szarowski D., Mousseau D.E., Lawrence D.A., Turner J.N. (2005) On-chip micro-biosensor for the detection of human CD4(+) cells based on AC impedance and optical analysis. Biosens Bioelectron 21, 696-704

Morris K., Catterall K., Zhao H., Pasco N., John R. (2001) Ferricyanide mediated biochemical oxygen demand - development of a rapid biochemical oxygen demand assay. Anal Chim Acta 442, 129-139

Morris R., Audet A., Angelillo I., Chalmers T., Mosteller F. (1992) Chlorination and chlorination by-products and cancer: A meta-analysis. Am J Public Health 82, 955-963

Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 65, 55-63

Mulchandani P., Mulchandani A., Kaneva I., Chen W. (1999) Biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents. 1. Potentiometric enzyme electrode. Biosens Bioelectron 14, 77-85

Nagel B., Dellweg H. Gierasch L.M. (1992) Glossary for chemists of terms used in biotechnology. Pure Appl Chem 64, 143-168

Nakamura H., Tohyama K., Tanaka M., Shinohara S., Tokunaga Y., Kurusu F., Koide S., Gotoh M., Karube I. (2007) Development of a package-free transparent disposable

biosensor chip for simultaneous measurements of blood constituents and investigation of its storage stability. Biosens Bioelectron 23, 621-626

Norma NMX-AA-028-SCFI (2001) Análisis de agua - Determinación de la demanda bioquímica de oxígeno en aguas naturales residuales (DBO_5) y residuales tratadas - Método de prueba

Olthuis W., Smith A., Van der Zalm R.A.J., Bergveld P. (1994) New operational modes for the Ta_2O_5 - based electrolyte conductance cell. Sens Actuators B Chem 18, 65-68

Olthuis W., Volanschi A., Bomer J.G., Bergveld P. (1993) A new probe for measuring electrolytic conductance. Sens Actuators B Chem 13, 230-233

Orazem M.E., Tribollet B. (2008) "Passive electrical circuits" in: *Electrochemical impedance spectroscopy*. Wiley. NJ, US. Cap. 4

Paitan Y., Biran D., Biran I., Shechter N., Babai R., Rishpon J., Ron E.Z. (2003) On-line and in-situ biosensors for monitoring environmental pollution. Biotechnol Adv 22, 27-33

Pancrazio J.J., Whelan J.P., Borkholder D.A., Ma W., Stenger D.A. (1999) Development and application of cell-based biosensors. Ann Biomed Eng 27, 697-711

Pasco N., Baronian K., Jeffries C., Hay J. (2000) Biochemical mediator demand-a novel rapid alternative for measuring biochemical oxygen demand. Appl Microbiol Biotechnol 53, 613-618

Pasco N., Baronian K., Jeffries C., Webber J., Hay J. (2004) MICREDOX® - development of a ferricyanide-mediated rapid biochemical oxygen demand method using an immobilized *Proteus vulgaris* biocomponent. Biosens Bioelectron 20, 524-532

Paul D., Pandey G., Pandey J., Jain R.K. (2005) Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration. Trends Biotechnol 23, 135-142

Pfleger B.F., Pitera D.J., Newman J.D., Martin V.J.J., Keasling J.D. (2007) Microbial sensors for small molecules: Development of a mevalonate biosensor. Metab Eng 9, 30-38

Premkumar J.R., Rosen R., Belkin S., Lev O. (2002) Sol-gel luminescence biosensors: Encapsulation of recombinant *E. coli* reporters in thick silicate films. Anal Chim Acta 462, 11-23

Radke S.M., Alocilja E.C. (2005) A microfabricated biosensor for detecting foodborne bioterrorism agents. IEEE Sens J 5, 744-750

Ramsay G., Turner A. (1988) Development of an electrochemical method for the rapid determination of microbial concentration and evidence for the reaction mechanism. Anal Chim Acta 215, 61-69

Rastogi S., Kumar A., Mehra N.K., Makhijani S.D., Manoharan A., Gangal V., Kumar R. (2003) Development and characterization of a novel immobilized microbial membrane for rapid determination of biochemical oxygen demand load in industrial waste waters. Biosens Bioelectron 18, 23-29

Rawson D., Willmer A., Turner A. (1989) Whole-cell biosensors for environmental monitoring. Biosensors 4, 299-311

Reshetilov A.N., Donova M.V., Dovbnya D.V., Boronin A.M., Leathers T.D., Greene R.V. (1996) FET-microbial sensor for xylose detection based on *Gluconobacter oxydans* cells. Biosens Bioelectron 11, 401-408

Richter L., Charwat V., Jungreuthmayer C., Bellutti F., Brueckl H., Ertl P. (2011) Monitoring cellular stress responses to nanoparticles using a lab-on-a-chip. Lab Chip 11, 2551-2560

Riechel T.L. (1984) A gas-sensor-based urea enzyme electrode. J Chem Ed 61, 640-642

Riedel K., Renneberg R., Wollenberg U., Kaiser G., Scheller F. (1989) Microbial sensors: Fundamentals and application for process control. J Chem Technol Biotechnol 44, 85-106

Rodríguez-Mozaz S., Lopez de Alda M.J., Marco M.P., Barceló D. (2005) Biosensors for environmental monitoring: A global perspective. Talanta 65, 291-297

Sarath Babu V.R., Kumar M.A., Karanth N.G., Thakur M.S. (2004) Stabilization of immobilized glucose oxidase against thermal inactivation by silanization for biosensor applications. Biosens Bioelectron 19, 1337-1341

Sarath Babu V.R., Patra S., Karanth N.G., Kumar M.A., Thakur M.S. (2007) Development of a biosensor for caffeine. Anal Chim Acta 582, 329-334

Scheller F., Schubert F. (1992) "Fundamentals of biosensors" in: *Techniques and instrumentation in analytical chemistry* - Volume 11 Biosensors. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, Netherlands. Ch. 2

Scheper T.H., Hilmer J.M., Lammers F., Müller C., Reinecke M.J. (1996) Biosensors in bioprocess monitoring. J Chromatogr A 725, 3-12

Schmid R.D., Künnecke W. (1990) Flow injection analysis (FIA) based on enzymes or antibodies-applications in the life sciences. J Biotechnol 14, 3-31

Sharp R.R., Bryers J.D., Jones W.G., Shields M.S. (1998) Activity and stability of a recombinant plasmid-borne TCE degradative pathway in suspended cultures. Biotechnol Bioeng 57, 287-296

Sheppard N.F., Tucker R.C., Wu C. (1993) Electrical conductivity measurements using microfabricated interdigitated electrodes. Anal Chem 65, 1199-1202

Shulga A.A., Dzyadevich S.V., Soldatkin A.P., Patskovsky S.V., Strikha V.I., El'skaya A.V. (1994) Thin film conductometric biosensor for glucose and urea determination. Biosens Bioelectron 9, 217-219

Singh B., Satyanarayana T. (2008) Phytase production by a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* in solid state fermentation and its potential applications. Bioresour Technol 99, 2824-2830

Skládal P., Morozova N.O., Reshetilov A.N. (2002) Amperometric biosensors for detection of phenol using chemically modified electrodes containing immobilized bacteria. Biosens Bioelectron 17, 867-87

Skoog D., Leary J. (1994) "Introducción a la química electroanalítica" y "Potenciometría" en: *Análisis instrumental.* 5ta ed. McGraw-Hill. NY, US. Caps. 22, 23

Stanier R.Y., Wachter D., Gasser C., Wilson A.C. (1970) Comparative immunological enzymes studies of two *Pseudomonas.* J Bacteriol 102, 351-362

Stelzle M., Weissmuller G., Sackmann E. (1993) On the application of supported bilayers as receptive layers for biosensors with electrical detection. J Phys Chem 97, 2974-2981

Taylor R.F., Marenchic I.G., Cook E.J. (1988) An acetylcholine receptor-based biosensor for the detection of cholinergic agents. Anal Chim Acta 213, 131-138

Thévenot D.R., Toth K., Durst R.A., Wilson G.S. (2001) Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. Biosens Bioelectron 16, 121-131

Thomulka K.W., McGee D.J., Lange J.H. (1993) Detection of biohazardous materials in water by measuring bioluminescence reduction with the marine organism *Vibrio harveyi.* J Environ Sci Health A 28, 2153-2166

Turner A.P.F., Aston W.J., Higgins I.J., Bell J.M., Colby J., Davis G., Hill H.A.O. (1984) Carbon monoxide: Acceptor oxidoreductase from *Pseudomonas thermocarboxydovorans* strain C2 and its use in a carbon monoxide sensor. Anal Chim Acta 163, 161-174

Turner A.P.F., Pickup J.C. (1985) Diabetes mellitus: Biosensors for research and management. Biosensors 1, 85-115

Updike J.W., Hicks J.P. (1967) The enzyme electrode. Nature 214, 986-988

Urgun-Demirtas M., Stark B., Pagilla K. (2006) Use of genetically engineered microorganisms (GEMs) for the bioremediation of contaminants. Crit Rev Biotechnol 26, 145-164

Vojinovic V., Esteves F.M.F., Cabral J.M.S., Fonseca L.P. (2006) Horseradich peroxidase combined with oxidase enzymes a valuable bioanalytical tool: Lactate oxidase - A case study. Anal Chim Acta 565, 240-249

Wang B., Barahona M., Buck M. (2013) A modular cell-based biosensor using engineered genetic logic circuits to detect and integrate multiple environmental signals. Biosens Bioelectron 40, 368-376

Wang B., Buck M. (2012) Customizing cell signaling using engineered genetic logic circuits. Trends Microbiol 20, 376-384

Wang J. (2006) "Controlled potential techniques" in: *Analytical electrochemistry*. 3rd ed. Wiley. NJ, US. Ch. 3, 4

Wang L., Wang H., Wang L., Mitchelson K., Yu Z., Cheng J. (2008) Analysis of the sensitivity and frequency characteristics of coplanar electrical cell–substrate impedance sensors. Biosens Bioelectron 24, 14-21

Wang X., Liu M., Wang X., Wu Z., Yang L., Xia S., Chen L., Zhao J. (2013) P-benzoquinone-mediated amperometric biosensor developed with *Psychrobacter* sp. for toxicity testing of heavy metals. Biosens Bioelectron 41, 557-562

Weimar U., Gopel W. (1995) A.c. measurements on tin oxide sensors to improve selectivities and sensitivities. Sens Actuators B Chem 26, 13-18

Whitson P.E., VandenBorn H.W., Evans D.H. (1973) Acquisition and analysis of cyclic voltammetric data. Anal Chem 45, 1298-1306

Wilson M.S. (2005) Electrochemical immunosensors for the simultaneous detection of two tumor markers. Anal Chem 77, 1496-1502

Yang L.J., Li Y.B., Griffis C.L., Johnson M.G. (2004) Interdigitated microelectrode (ime) impedance sensor for the detection of viable *Salmonella typhimurium*. Biosens Bioelectron 19, 1139-1147

Yin F. (2004) A novel capacitive sensor based on human serum albumin-chelant complex as heavy metal ions chelating proteins. Anal Lett 37, 1269-1284

Yoshida N., Yano K., Morita T., McNiven S.J., Nakamura H., Karube I. (2000) A mediator-type biosensor as a new approach to biochemical oxygen demand estimation. Analyst 125, 2280-2284

Zanello P. (2003) "Fundamentals of electrode reactions" in: *Inorganic electroquemistry: Theory, practice and application*. The Royal Society of Chemistry. Cornwall, UK. Ch. 1

Zhang S., Wright G., Yang Y. (2000) Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. Biosens Bioelectron 15, 273-282

CAPÍTULO 2: DESARROLLO DE UN BIOENSAYO METABÓLICO BASADO EN RESPIROMETRÍA DE FERRICIANURO PARA LA DETERMINACIÓN RÁPIDA DE BOD

2.1.-INTRODUCCIÓN

Internacionalmente el método estándar empleado para la determinación de BOD es el ensayo BOD_5. Si el inóculo es saludable y la metodología ha sido adecuadamente realizada, luego de 5 días de incubación se espera un consumo de 198 ± 30,5 mg O_2/L correspondiente a la solución estándar de GGA (APHA "5210", 1995). Otra solución estándar que suele emplearse para verificar los procedimientos es el agua sintética que se describe en la guía OECD (OECD, 1993) y que denominamos $OECD_{std}$.

Pero este ensayo presenta algunos problemas, siendo el principal de ellos el tiempo de determinación de BOD, 5 días. El empleo de biosensores microbianos podría permitir disminuir el tiempo necesario para obtener la respuesta analítica, lo que posibilitaría tomar decisiones rápidas para la gestión de los recursos hídricos y la optimización de plantas de tratamiento de aguas cloacales o industriales. Se han desarrollado diferentes tipos de biosensores basados en respirometría que pretenden determinar BOD *in-situ* y en tiempo real, poniendo énfasis en que las mediciones puedan ser realizadas de manera rápida (en el orden de minutos u horas).

Muchos de los biosensores microbianos desarrollados combinan la medición del O_2 disuelto con el empleo de bacterias inmovilizadas (Karube et al., 1977; Yang et al., 1996; Chan et al., 1999). La miniplanta de tratamiento de aguas residuales MICREDOX® simula el test BOD_5, pero reemplaza al O_2 por ferricianuro de potasio como aceptor final de electrones (Pasco et al., 2004).

Una estequiometría representativa de la oxidación aeróbica de materia orgánica se puede observar en la Ecuación 2.1.

$$CH_2O + O_2 \longrightarrow H_2O + CO_2 \qquad [2.1]$$

La degradación de compuestos orgánicos por microorganismos, empleando ferricianuro en lugar de O_2 también involucra la oxidación de materia orgánica hasta CO_2 dada la estequiometría presentada en las Ecuaciones 2.2, 2.3 y 2.4 (Pasco et al., 2004).

$$CH_2O + H_2O \longrightarrow CO_2 + 4\,H^+ + 4\,e^- \qquad [2.2]$$

$$4\,[\,Fe\,(CN_6)\,]^{3-} + 4\,e^- \longrightarrow 4\,[\,Fe\,(CN_6)\,]^{4-} \qquad [2.3]$$

$$CH_2O + H_2O + 4\,[\,Fe\,(CN_6)\,]^{3-} \longrightarrow CO_2 + 4\,H^+ + 4\,[\,Fe\,(CN_6)\,]^{4-} \qquad [2.4]$$

Distintas variedades y combinaciones de microorganismos, así como el uso de una única cepa bacteriana o de consorcios bacterianos, han sido empleados con el objetivo de desarrollar biosensores adecuados para la determinación de BOD. Estos microorganismos han sido dispuestos de manera libre en las muestras a determinar (en desarrollos de bioensayos), o inmovilizados en diversos soportes, entre ellos membranas y geles (en el desarrollo de biosensores). Pero el uso de comunidades microbianas inmovilizadas no ha sido exitoso y ha llevado a resultados no reproducibles (Liu y Mattiasson, 2002; Lei et al., 2006).

Uno de nuestros objetivos ha sido desarrollar un bioensayo, basado en la respirometría de ferricianuro, usando como componente biológico *Klebsiella pneumoniae*, cepa aislada de un producto liofilizado, BODSEED, comercializado por Bio-Systems International, declarado como producto no patogénico y utilizado de manera habitual como inóculo para la determinación de BOD_5.

Los miembros del género *Klebsiella* son bacilos Gram negativos, no móviles, fermentadores de lactosa, y generalmente encapsulados que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, ubicuos en la naturaleza. Casi todas las cepas de este género crecen en medios comunes, e incluso en medios mínimos, pudiendo utilizar el amonio o nitrato como única fuente de nitrógeno. Pueden además utilizar un amplio rango de compuestos como fuente de carbono e incluso degradan compuestos como herbicidas, pesticidas y otros compuestos tóxicos (Matsen et al., 1974; Nawaz et al., 1992; Heesche-Wagner et al., 1999; Sharma et al., 2000; Marshall y White, 2001; Essa et al., 2002; Kwon et al., 2002; Brisse et al., 2006)

Los protocolos y procedimientos publicados por otros autores incluían, al realizarse las determinaciones de BOD, mediante respirometría de ferricianuro algunos procedimientos poco adecuados para un dispositivo o equipamiento que pudiera realizar mediciones *in-situ* como el burbujeo de N_2 (dado que se asumía una competencia entre el O_2 y el ferricianuro) o un paso de centrifugación, al finalizar el tiempo de incubación de la muestra, con el objetivo de separar el material biológico (y por lo tanto interrumpir la reducción del ferricianuro) y antes de la cuantificación del ferrocianuro producido mediante técnicas amperométricas o culombimétricas (Ertl et al., 2000a; Ertl et al., 2000b;

Morris et al., 2001). La centrifugación de las muestras, luego de su incubación con el material biológico y el ferricianuro, era necesaria antes de nuestro trabajo dado que las mediciones son consecutivas y no simultáneas, en general se utiliza un único potenciostato y las mediciones no son instantáneas, necesitando tiempos del orden del minuto (amperometría) o más (culombimetría), para la medición de cada muestra.

2.2.-MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1.-Soluciones y medios de cultivo

Se empleó medio líquido Luria-Bertoni (LB) compuesto por (en g/L) bacto triptona (10); NaCl (10) y extracto de levadura (5), en agua destilada.

Los plaqueos de las cepas fueron realizados en *bacto antibiotic medium* (AM) (DIFCO) compuesto por (en g/L): extracto de carne (1,5); extracto de levadura (3); peptona (6) y agar (1,5), en agua destilada.

Se empleó medio mínimo (MM) conteniendo (en g/L): Na_2HPO_4 (6); KH_2PO_4 (3); NH_4Cl (1); NaCl (0,5); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,12) y $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,01), en agua destilada ajustado a pH 7,0.

La concentración de la solución madre de ferricianuro de potasio ($K_3[Fe(CN)_6]$) (Aldrich) utilizada fue 100 mM y se preparó en MM ajustando el pH a 7,0.

Se empleó una solución madre de ferrocianuro de potasio ($K_4[Fe(CN)_6]$) (Carlo Erba) de concentración 25 mM en MM ajustada a pH 7,0.

En todo momento, las soluciones que contienen ferricianuro o ferrocianuro, se mantuvieron a pH neutro dado que en medio ácido se produce el desprendimiento de cianhídrico (HCN). El descarte de estas soluciones se realizó mediante el servicio de Higiene y Seguridad de la FCEN.

Las soluciones madre de D-glucosa, D-fructosa, ácido L-glutámico, lactosa, ácido succínico, sacarosa, y GGA fueron preparadas en MM y esterilizadas mediante filtración, utilizando una membrana de 0,22 μm de poro.

El patrón más utilizado en las determinaciones de BOD en el ensayo BOD_5 es la solución de GGA (150 mg de glucosa/L + 150 mg de ácido glutámico/L), que presenta un valor de BOD_5 de 198 mg de BOD_5/L. Las diluciones del patrón de GGA empleadas se realizaron a partir de una solución madre de 12,5 g de glucosa/L + 12,5 g de ácido glutámico/L, en MM.

Otra solución estándar de calibración utilizada en los protocolos de medición de BOD fue también utilizada en este trabajo y ha sido denominada $OECD_{std}$ (OECD, 1993). Simula la composición de una muestra de agua residual domiciliaria dado que incorpora sustancias orgánicas de mayor complejidad y variedad que la solución de GGA. Esta solución $OECD_{std}$ contiene (en g/L): peptona (15), extracto de carne (11), urea (3), NaCl (0,7), $CaCl_2$ anhidro (0,3), $MgSO_4.7H_2O$ (0,2) y $K_2HPO_4.3H_2O$ (3,7) en agua destilada estéril. Esta solución presenta un valor de BOD_5 de 17000 mg/L. Se guardó a 4 °C en oscuridad y se utilizó hasta 7 días luego de ser preparada.

Se utilizó como muestra de agua simulada, para estudios preliminares antes de la medición de muestras de aguas cloacales reales, una solución conteniendo (en mg/L): peptona (11) y extracto de carne (150) en MM. Esta solución, denominada Sim-1, presenta dos fuentes de carbono complejas de manera de simular también la composición de un agua de desperdicio. Esta es la concentración final que se utilizó en cada *well* o pocillo en el experimento y también se utilizó una dilución al medio (1:2) de la Sim-1, denominada Sim-2. Sus valores de BOD_5 son 175 mg/L y 85 mg/L respectivamente (medición realizada por AySA).

Los compuestos inhibidores del crecimiento microbiano utilizados (y la concentración de sus respectivas soluciones madre) fueron: alcohol etílico (96% v/v), cloroxilenol (48 g/L, correspondiente a la formulación del ESPADOL®), formaldehido (40% m/v), iodo povidona (100 g/L, correspondiente a la formulación del Pervinox®), H_2O_2 (12% m/m), isopropanol absoluto, NaOH (400 g/L), azida sódica (20 g/L), hipoclorito de sodio (55 g Cl/L) y timol (500 g/L, solución realizada en etanol 96%). Las soluciones de NaOH y azida sódica fueron realizadas en agua destilada.

2.2.2.-Aislamiento de cepas e identificación de *Klebsiella pneumoniae* y *Bacillus cereus*

Se aislaron 7 cepas a partir de 2 partidas diferentes de un producto liofilizado (BOODSEED), comercializado por Bio-systems International (1238 E. Inman Parkway Beloit, WI 53511, US). Sólo 3 de ellas fueron enviadas para su identificación mediante la secuenciación del 16S rRNA.

La extracción de ácidos nucleicos, la amplificación mediante PCR y la secuenciación del 16S rRNA fue realizada por Macrogen Inc. (Seoul, South Korea). Se utilizaron los *primers* universales (518 F: 5-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3 y 800R: 5-ACCAGGGTATCTAATCC-3) para la amplificación y secuenciación, mediante PCR, del gen. La secuencia nucleotídica se obtuvo mediante secuenciación cíclica utilizando el kit Big

DyeTM (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) como terminador, y el analizador ABI 3730 XL (Applied Biosystems). La secuencia obtenida fue comparada con secuencias nucleotídicas de especies bacterianas de referencia presentes en las bases de datos genómicos GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information), EMBL (European Molecular Biology Laboratory), DDBJ (DNA Data Bank of Japan) y PDB (Protein Data Bank) utilizando la herramienta de alineamiento de secuencias BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastresulting).

Una de las cepas aisladas presentó niveles de similitud del 98% con las secuencias de *Klebsiella pneumoniae* cepas K30 y K8 (correspondiente a los números de acceso EU661377 y EU661374), ambas cepas aisladas de la rizósfera (Sachdev et al., 2009).

Otra de las cepas aisladas presentó niveles de similitud del 90% con *Bacillus cereus* cepas GXBC-3 y YC-16 (correspondientes a los números de acceso JX218990.1 y JN187086.1, respectivamente). Se utilizaron los mismos *primers* (518 F y 800R) para la amplificación y secuenciación, mediante PCR, del gen.

La última cepa enviada presentó un nivel de similitud del 89% con *Bacillus thuringiensis* cepa 1P04SC, *Bacillus mycoides* cepa 1P04SB y *Bacillus cereus* cepa YC-16 (correspondientes a los números de acceso EU977773.1, EU977772.1 y JN187086.1). En este caso la similitud se obtuvo comparando la secuencia amplificada con el *primer* 518F solamente, por esta razón decidimos llamar a esta cepa por su nombre arbitrario, cepa BO8.

2.2.3.-Condiciones de cultivo del consorcio bacteriano BODSEED

El consorcio bacteriano liofilizado BODSEED fue cultivado en caldo LB. Luego de 2 h en agitación a 29 ± 1 °C se dejó decantar el soporte sólido del liofilizado (salvado de trigo) durante 30 min, y el sobrenadante fue transferido a caldo LB fresco e incubado a 29 ± 1 °C, sin agitación, hasta que alcanzó una DO_{600} de 1 ± 0,2. El cultivo fue luego centrifugado en una microcentrífuga a 14000 *g* por 30 s, lavado 2 veces con MM y resuspendido en MM. La concentración del resuspendido bacteriano de BODSEED fue de 18 ± 1 (correspondiente a 1,1 x 10^{10} $UFC_{totales}$/mL, de acuerdo al recuento realizado en medio sólido, n = 3).

2.2.4.-Condiciones de mantenimiento y cultivo de *K. pneumoniae* y otras cepas de BODSEED

Todas las cepas aisladas de BODSEED (7) fueron mantenidas a 4 °C en cultivos sólidos (medio AM) repicadas cada 15 días y además, 6 de ellas fueron mantenidas en cultivos criopreservados con 20% de glicerol en LB, mantenidos a -75 °C (el congelamiento y descongelamiento fueron realizados de forma gradual, luego de un paso por -20 °C durante 3 días).

Los experimentos fueron realizados con suspensiones bacterianas concentradas, obtenidas de cultivos frescos líquidos, en caldo LB, a partir de criopreservados.

Cada experimento se inició inoculando un cultivo criopreservado de *K. pneumoniae* en caldo LB e incubando a 29 ± 1 °C sin agitación durante 17 h. La cepa se utilizó en todos los experimentos en fase exponencial tardía (ver Figura 2.1) cultivándose a una DO_{600} de 0,9 ± 0,1 (absorbancia correspondiente a una concentración bacteriana promedio de 2,4 x 10^8 UFC/mL). Los cultivos líquidos obtenidos fueron centrifugados a 14000 *g* por 30 s o a 900 *g* por 10 min, y resuspendidos en MM. La densidad óptica, DO, de estas suspensiones bacterianas fue ajustada a una DO_{600} de 18 ± 2 (correspondiente a 4,2 x 10^9 UFC/mL).

Los cultivos líquidos de las cepas *Bacillus cereus*, BO8, BO10, BO366, BO367, BO368 fueron inoculados con una ansada de cada placa fresca (luego de 1 día de ser repicadas) en caldo LB e incubados a 29 ± 1 °C en agitación hasta alcanzar una DO_{600} de 1 ± 0,2. Los cultivos líquidos fueron posteriormente centrifugados a 900 *g* por 10 min, lavados 2 veces en MM y resuspendidos finalmente en MM (suspensiones bacterianas con DO_{600} de 19 ± 1).

2.2.5.-Fabricación y manipulación de los electrodos

Los ensayos electroquímicos (CA y CV) fueron realizados empleando un sistema de 3 electrodos conformado por un WE de Pt (0,196 mm^2), RE de $Ag/AgCl_{sat}$ y un CE de acero inoxidable. Los RE utilizados fueron fabricados semanalmente en el laboratorio y su potencial verificado contra un RE patrón comercial de $Ag/AgCl_{sat}$ antes de su uso.

Los electrodos fueron lavados con agua destilada antes de realizar cada medición. Luego de realizar cada medición los electrodos fueron lavados con agua destilada y alcohol (50:50) y se pulió manualmente el WE durante 2 min con alúmina (1 y 0,3 μm).

2.2.6.-Ensayos de voltametría cíclica, CV

Se realizaron experimentos con muestras (n = 2) conteniendo 6,25 g/L de ferricianuro, 5 g/L de glucosa en MM y en presencia o no del biocatalizador (DO_{600} final = 1 de *K. pneumoniae*) en un volumen final de 50 mL. Ambas muestras fueron incubadas por 2 h a 37 ± 1 °C, centrifugadas a 900 *g* y posteriormente medidas electroquímicamente. Las mediciones fueron realizadas bajo condiciones estáticas registrándose las corrientes al aplicar una rampa de potencial (de -600 mV a +700 mV) a 50 mV/s.

Antes de realizar las mediciones, cada muestra se agitó de manera circular, se colocaron los electrodos, y se dejó en reposo durante 2 min (quiet time).

2.2.7.-Ensayos de cronoamperometría, CA

Las mediciones fueron realizadas bajo condiciones estáticas y se registraron las corrientes de manera continua en muestras ubicadas en placas multipozo de 12 pocillos conteniendo cada uno 2 mL de muestra. Las incubaciones fueron realizadas a 37 ± 1 °C, salvo excepciones detalladas más adelante. La cantidad de réplicas utilizadas se detalla en cada experimento.

La placa multipozo se agitó circularmente de forma manual, se colocaron los electrodos y se dejo reposar 1 min antes de realizar la medición. Luego se aplicó un potencial fijo de +500 mV, *vs* $Ag/AgCl_{sat}$, a cada muestra durante 10 s (la corriente límite instantánea fue utilizada como dato analítico, es decir, el valor de corriente correspondiente al segundo 10).

2.2.8.-Curva de calibración de ferrocianuro

2 mL de muestras conteniendo 6,25 g/L de ferricianuro en MM y distintas concentraciones de ferrocianuro fueron medidas por CA (n = 2). Se consideró que luego del tiempo de incubación (en los experimentos con bacterias), las muestras contienen un exceso de ferrocianuro.

2.2.9.-Consideraciones generales de las muestras con bacterias

Los niveles basales de reducción de ferricianuro, producidos por fenómenos no biológicos, fueron obtenidos a partir de la medición de muestras preparadas sin el material

biológico (blancos). El metabolismo microbiano endógeno, fue cuantificado a partir de muestras conteniendo bacterias sin fuente de carbono agregada. Por último, el metabolismo total fue cuantificado en muestras con alguna fuente de carbono presente en el medio. La cuantificación del metabolismo endógeno y total fue realizada para cada concentración bacteriana ensayada en esta Tesis.

Todas las muestras fueron preparadas en MM. Los datos presentados en esta Tesis corresponden al metabolismo exógeno (exógeno = total – endógeno) del material biológico, a menos que se detalle de otra manera.

2.2.10.-Preparación e incubación de muestras burbujeadas con N_2

Las muestras ensayadas bajo la condición de des-aireado (condición A) fueron burbujeadas con N_2 durante 10 min. La placa multipozo fue colocada inmediatamente después en un contenedor previamente lavado durante 10 min con N_2 y sellado, de manera de mantener una atmósfera libre de O_2. Las muestras fueron incubadas en estas condiciones durante 1,5 h, posteriormente se agregó formaldehido (2% m/v) y se realizaron las mediciones.

2.2.11.-Preparación de muestras para la selección de un inhibidor adecuado de *K. pneumoniae*

44 mL de una muestra, conteniendo ferricianuro (6,25 g/L), glucosa (5 g/L) y *K. pneumoniae* (DO_{600} final = 1) fue incubada a 37 ± 1 °C por 75 min. Posteriormente, 2 mL de este volumen fue secuencialmente agregado a diferentes pocillos (n = 4 para cada inhibidor o ninguno) conteniendo diferentes inhibidores del crecimiento bacteriano o ninguno (al cual denominamos control positivo, CP) y se registró la corriente de los pocillos que no contenían inhibidor, los CP (t = 75 min). Las placas multipozo con las muestras fueron incubadas a 37 ± 1 °C durante 45 y 105 min (t = 120 y 180 min, respectivamente) y se realizaron las correspondientes mediciones cronoamperométricas, secuencialmente, en el orden en que se agregaron los 2 mL.

La concentración final de los inhibidores en cada pocillo fue: cloroxilenol (2,4 g/L), etanol (9,6% v/v), formaldehido (2% m/v), H_2O_2 (1,2% m/m), iodo povidona (5 o 0,5 g/L), isopropanol (10% v/v), NaOH (2 g/L), azida sódica (0,02 g/L), hipoclorito de sodio (5,5 g cloro/L) o timol (5,25 g/L). Los volúmenes agregados a cada pocillo fueron menores al 10% del volumen total de cada pocillo (2 mL) de manera de no diluir significativamente el ferrocianuro producido.

Otra muestra de 24 mL, conteniendo también ferricianuro, glucosa y *K. pneumoniae* (en concentraciones 6,25 g/L, 5 g/L y DO_{600} = 1, respectivamente), fue cultivada a 37 °C durante 1 h. Posteriormente, 2 mL de este volumen fue secuencialmente agregado a diferentes pocillos (n = 4) conteniendo etanol, formaldehido, iodo povidona (0,5 g/L), isopropanol, NaOH, timol o ningún inhibidor (CP) y se registró la corriente de los pocillos conteniendo los CP (t = 1 h). Las placas multipozo con las muestras fueron incubadas a 37 ± 1 °C durante 180 min (t = 4 h) y posteriormente se realizaron las correspondientes mediciones cronoamperométricas, en el orden en que fueron agregados los 2 mL de muestra a cada pocillo, de manera de mantener el tiempo de incubación constante en cada experimento. Luego de estas mediciones se guardaron las muestras a 4 °C de manera de minimizar la evaporación. Tres mediciones más fueron realizadas luego de t = 25, 49 y 74 h.

Luego de realizar las mediciones de 25 y 74 h, 100 μL de cada muestra fue plaqueada en placas de AM e incubadas hasta 5 días a 37 ± 1 °C de manera de estudiar la supervivencia de *K. pneumoniae* a cada inhibidor (así como también la posibilidad de crecimiento de contaminación en las muestras).

2.2.12.-Efecto de diferentes fuentes de carbono en la producción de corriente

Muestras conteniendo ferricianuro (6,25 g/L), *K. pneumoniae* (DO_{600} = 1) fueron estudiadas agregando distintas concentraciones de glucosa o 2,8 mM de fructosa, lactosa, ácido succínico, ácido glutámico o sacarosa (n = 3, para cada fuente de carbono). En estos experimentos, la suspensión bacteriana fue obtenida luego de lavar 2 veces con MM los pellets provenientes del cultivo líquido. Luego de incubar durante 2 h a 37 ± 1 °C, se agregaron 0,5 g/L de iodo povidona, para detener la actividad microbiana, y se realizaron las correspondientes mediciones.

2.2.13.-Construcción de curvas de calibración con soluciones estándar, GGA y $OECD_{std}$

Muestras conteniendo ferricianuro (6,25 g/L) y *K. pneumoniae* (DO_{600} de 1) fueron estudiadas agregando distintas concentraciones de las soluciones estándar GGA u $OECD_{std}$ (n = 4, para cada punto de calibración) de manera de realizar las curvas de calibración del bioensayo ($BOD_{K.\ pneumoniae}$). Los pellets bacterianos fueron lavados 2 veces con MM antes de su uso como material biológico de las curvas de calibración.

Se ensayaron concentraciones de GGA entre 5 y 1500 mg BOD_5/L. Luego de incubar las muestras durante 2 h a 37 ± 1 °C, se agregaron 0,5 g/L de iodo povidona de manera de detener la reducción microbiana de ferricianuro.

Se ensayaron concentraciones de $OECD_{std}$ entre 30 y 800 mg BOD_5/L. Luego de incubar las muestras durante 2 h a 37 ± 1 °C, la reducción de ferricianuro fue finalizada por centrifugación a 14000 *g* por 30 s (y los pellets fueron mantenidos a -20 °C por 10 min, y luego a 4 °C, de manera de frenar rápidamente el metabolismo bacteriano y tratando de evitar que las células se congelaran). Luego de realizar las mediciones de los sobrenadantes, se reconstituyeron las muestras con sus respectivos pellets, se agregó formaldehido (2% m/v) y se volvieron a realizar las mediciones de CA.

2.2.14.-Determinación de BOD_5

4 muestras de aguas cloacales reales, tomadas de distintas partes del sistema de alcantarillado de Buenos Aires y 2 muestras simuladas (Sim-1 y Sim-2) fueron analizadas mediante el ensayo tradicional de determinación de BOD, el *test* BOD_5. El análisis fue realizado de acuerdo a la Norma 5210 B *Standard determination* (APHA "5210", 1995) por AySA, Aguas y Saneamientos Argentinos.

2.2.15.-Medición de BOD de muestras de agua, simuladas o reales, empleando el bioensayo desarrollado en este trabajo, $BOD_{K.\ pneumoniae}$

Las muestras de aguas cloacales reales y muestras de agua simuladas, Sim-1 y Sim-2, fueron filtradas a través de una membrana de 0,22 μm antes de ser incubadas en presencia de ferricianuro (6,25 g/L) y *K. pneumoniae* (DO_{600} de 1) durante 2 h a 37 ± 1 °C, posteriormente se agregó formaldehido (2%) (n = 4). Los niveles basales de reducción de ferricianuro en las muestras reales de agua (por razones independientes de la acción microbiana) fueron determinados en pocillos incubando cada una de estas muestras sólo con ferricianuro (6,25 g/L).

Los valores de $BOD_{K.\ pneumoniae}$ de cada muestra se calcularon a partir de una curva de calibración de $OECD_{std}$ realizada el mismo día en que se hizo cada experimento.

Las muestras de agua de desperdicio fueron mantenidas a -20 °C y utilizadas hasta una semana después de haber sido recolectadas.

2.2.16.-Equipamiento utilizado

Las mediciones de DO fueron realizadas con un espectrofotómetro Kontron Uvikon 710 (Zurich, Suiza). Los pellets bacterianos fueron obtenidos con una microcentrífuga Cavour VT 1216 (Buenos Aires, Argentina) a 14000 *g* o una centrifuga Sorvall RC-5B, GMI Inc (Minesota, US) a 900 *g*.

Las mediciones cronoamperométricas fueron realizadas utilizando un potenciostato ISKRA MA 5440 (Kranj, Yugoslavia). La adquisición continua de datos fue realizada utilizando un voltímetro Fluke-289 (Fluke corporation, WA, US) conectado al output analógico del ISKRA y a una PC a través de un puerto USB.

Las mediciones de voltametría cíclica fueron realizadas utilizando un potenciostato Potentiostat/Galvanostat/ZRA (Series G 300™ from Gamry Instruments Inc. Warminster, USA)

2.2.17.-Análisis estadístico

Los desvíos estándar informados fueron calculados de acuerdo a la Ecuación 2.5:

$$DS = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{(n - 1)}} \qquad [2.5]$$

siendo $\bar{x}$ la media y x el valor de cada medición.
Los valores informados o graficados responden a la forma $\bar{x} \pm DS_{(n-1)}$.

Las diferencias entre valores fueron consideradas significativas de acuerdo a la prueba *t* de Student, Ecuación 2.6

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S_{12} \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}} \qquad [2.6]$$

habiendo determinado previamente, mediante Fischer, Ecuación 2.7

$$F = \frac{S_1^{\,2}}{S_2^{\,2}} \qquad [2.7]$$

que $S_1 = S_2$, y por lo tanto se utilizó la Ecuación 2.8 para el cálculo de S_{12}

$$S_{12} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)\ S_1{}^2 + (n_2 - 1)\ S_2{}^2}{n_1 + n_2 - 2}} \qquad [2.8]$$

y se consideró que habían diferencias significativas entre las medias si $p < 0{,}05$.

2.3.-RESULTADOS

2.3.1.-Capacidad de reducción de ferricianuro de las cepas aisladas empleándolas individualmente y del consorcio BODSEED

El liofilizado BODSEED se comercializa como inóculo para el ensayo BOD_5 de aguas tratadas o con baja carga microbiana. El producto no informa las cepas que contiene, pero es un producto declarado como libre de patógenos (www.bodseed.com) y por lo tanto se utilizó como material biológico de partida para elegir el material biológico de nuestro bioensayo

Se aislaron cepas de dos partidas distintas del producto, con diferentes fechas de vencimiento. Un total de 7 cepas fueron aisladas, se las denominó arbitrariamente, y se las caracterizó de manera sencilla (tinción de Gram, catalasa, oxidasa, tipo de morfología micro y macroscópica y algunas, las Gram y oxidasa negativas, fueron testeadas con el API 20E). Posteriormente, 2 cepas fueron secuenciadas satisfactoriamente. Este trabajo de aislamiento fue realizado en parte durante mi tesis de licenciatura (Estudio del metabolismo microbiano mediante técnicas electroquímicas y sus posibles aplicaciones para el diseño de biosensores, Junio 2008).

Klebsiella pneumoniae fue la cepa elegida para el desarrollo de nuestro ensayo, su curva de crecimiento, a 29 ± 1 °C sin agitación, se presenta en la Fig. 2.1.

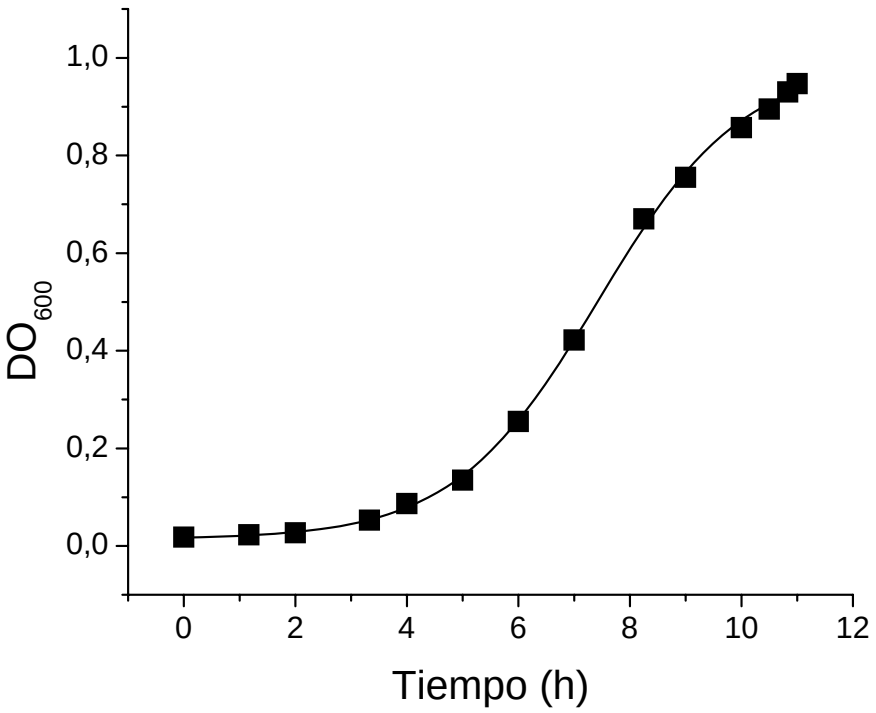


Figura 2.1: Curva de crecimiento de *Klebsiella pneumoniae*, cultivo realizado sin agitación (n = 2).

Las cepas *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, BO8, BO10, BO366, BO367 y BO368 fueron incubadas durante 2 h en presencia de 6,25 g/L de ferricianuro y en presencia o no de 0,5 g/L de glucosa (Figura 2.2). Dado que no todas las bacterias podrían utilizar el ferricianuro como aceptor de electrones, o lo utilizarían con diferentes cinéticas, este ensayo fue utilizado en conjunto con algunas características de interés que observamos durante el aislamiento de las cepas, lo que nos permitió elegir la cepa a utilizar en los trabajos subsiguientes.

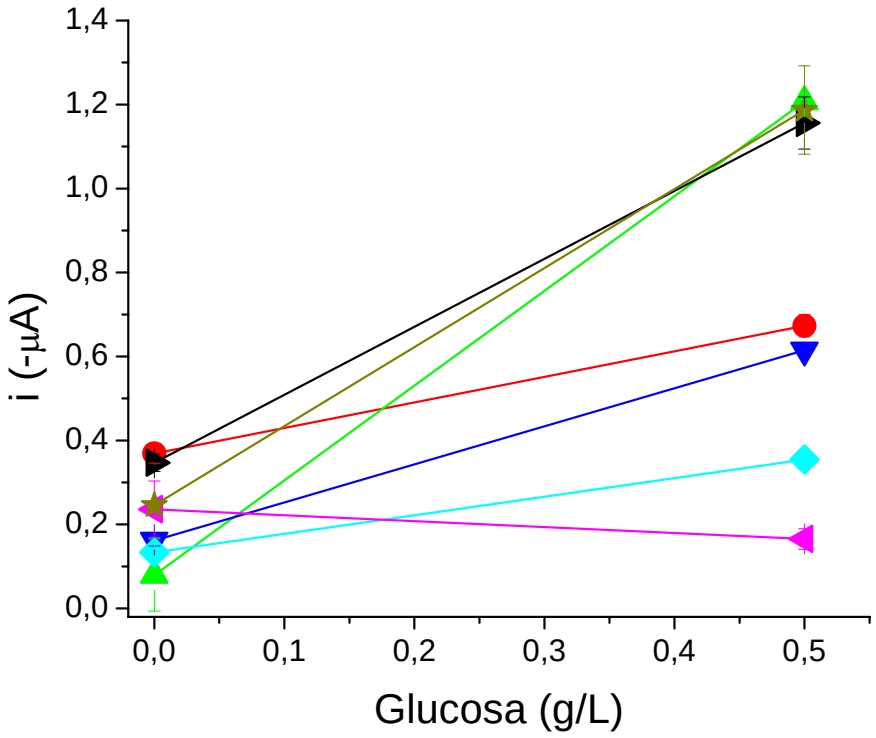


Figura 2.2: Valores de corriente, proporcionales a la actividad microbiana de reducción de ferricianuro, obtenidos por cronoamperometría (CA), incubando durante 2 h las cepas *Klebsiella pneumoniae* (★), *Bacillus cereus* (▲), BO8 (▶), BO10 (◀), BO366 (▼), BO367 (◆) y BO368 (●), al terminar la incubación se agregó formol. Los valores representan $\bar{x} \pm DS_{(n-1)}$ del metabolismo total (n = 2).

Las cepas *K. pneumoniae*, *B. cereus* y la cepa BO8 produjeron luego de la incubación, las corrientes más elevadas, correspondiente a una elevada velocidad de reducción del ferricianuro. La sensibilidad en este ensayo puede definirse como el cambio de señal entre los valores de corriente obtenidos para las dos situaciones ensayadas (sin agregado y con agregado de glucosa). Se observó una mayor pendiente al utilizar las cepas *B. cereus* y *K. pneumoniae*, por lo que estas dos cepas fueron preseleccionadas como candidatas para ser utilizadas en nuestro bioensayo de determinación rápida de BOD.

Por último, se observó que los valores de reducción endógena de *B. cereus* (al ser incubado en ausencia de una fuente de carbono en un medio mínimo) fueron muy bajos y consistentes con las observaciones vistas al realizar los aislamientos a partir de la pastilla de BODSEED (pobre o nulo crecimiento en ausencia de oxígeno o en condiciones de medio mínimo), por lo tanto decidimos que no era una buena opción para nuestro bioensayo. En

cambio algunas especies de *Klebsiella* (*K. oxytoca*) ya habían sido utilizadas previamente para el diseño de biosensores para la determinación de BOD (Yoshida et al., 2001) y por lo tanto esta cepa fue elegida como nuestro material biológico.

2.3.2.-Voltametrías cíclicas de muestras con ferricianuro incubado en presencia o ausencia de *K. pneumoniae*

La utilización de ferricianuro como mediador es interesante en el diseño de biosensores/bioensayos electroquímicos dada su capacidad de ser utilizado como aceptor de electrones por los microorganismos y sus propiedades electroactivas.

Se evaluó mediante la técnica de CV el sistema a utilizar en nuestro bioensayo, la cupla ferri/ferrocianuro en medio MM utilizando un WE de Pt (Figura 2.3).

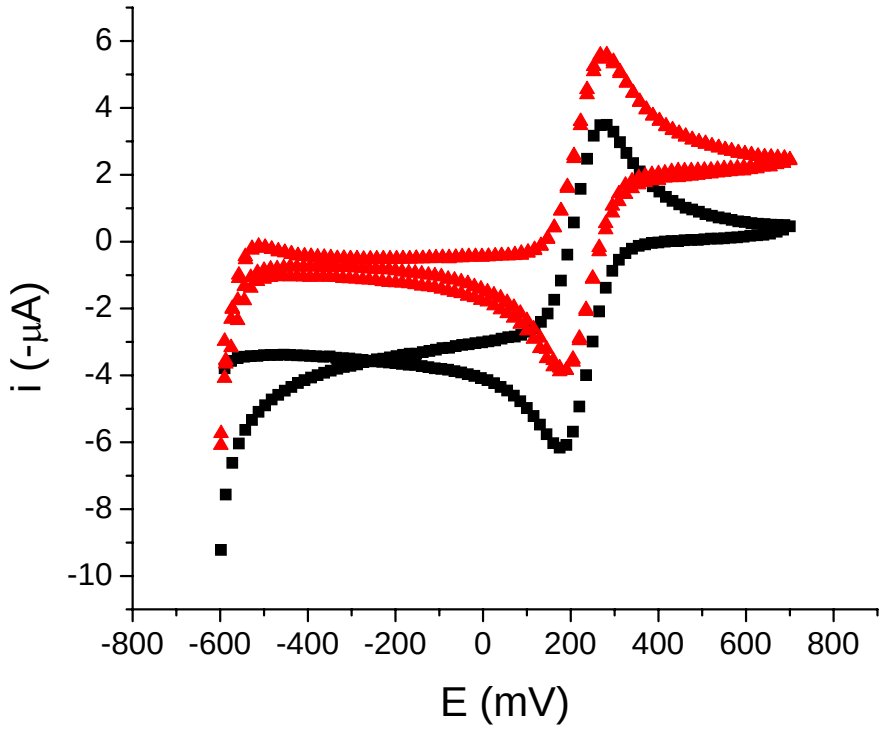


Figura 2.3: CV de muestras conteniendo ferricianuro (6,25 g/L) y glucosa (5 g/L) en MM y en ausencia (negro) o presencia (rojo) de *K. pneumoniae* (n = 2). Una rampa de potencial entre -600 y +700 mV a 50 mV/s fue aplicada a un WE de Pt.

Sólo se observan los picos correspondientes a la reducción del ferricianuro, pico catódico, (a 185 mV) y a la oxidación del ferrocianuro, pico anódico, (a 275 mV), con un ΔE de 90 mV, por lo tanto, ninguno de los componentes del MM es electroactivo en la

ventana de potencial utilizada, como se esperaba. La curva de las muestras con bacterias está desplazada hacia arriba, presentando corrientes más negativas, de acuerdo con la convención utilizada (ver Sección 1.3.1.2.ii).

2.3.3.-Curva de calibración de ferrocianuro

Con el objetivo de cuantificar la cantidad de ferrocianuro producido por las bacterias conociendo las corrientes producidas y así poder comparar nuestros resultados con los de bibliografía, se realizó una curva de calibración de ferrocianuro (Figura 2.4).

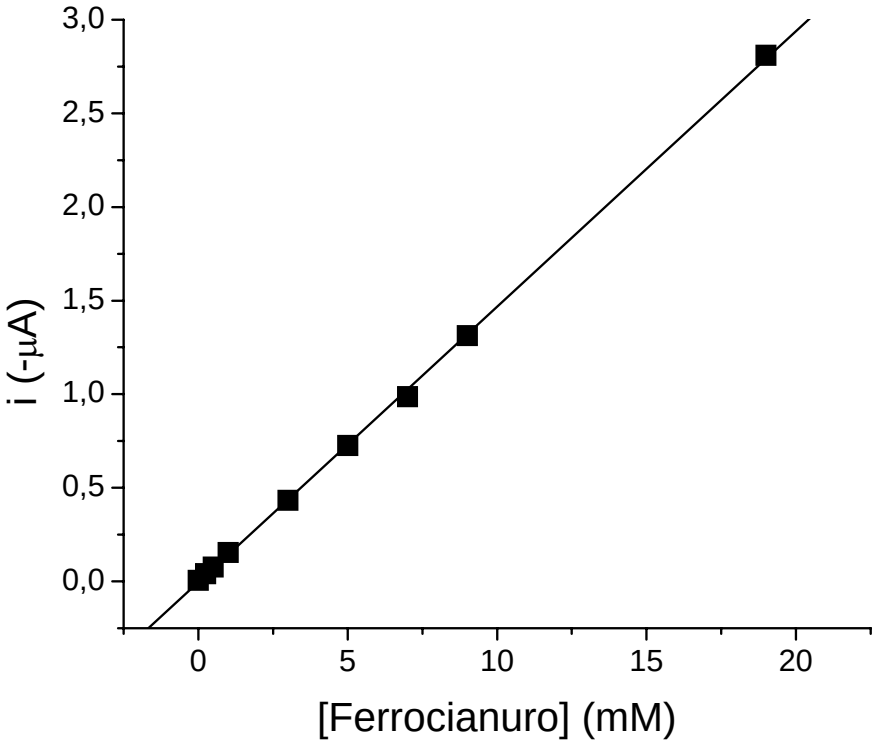


Figura 2.4: Curva de calibración de ferrocianuro (n = 2) realizada por cronoamperometría, (+500 mV *vs* $Ag/AgCl_{sat}$). y = -0,00417 + 0,14715 x, r^2: 0,99964.

Se comprueba que la concentración y la corriente presentan una relación lineal al menos hasta 19 mM de ferrocianuro.

2.3.4.-Búsqueda de un inhibidor del metabolismo de *K. pneumoniae*

De manera de estandarizar los tiempos de incubación de las muestras medidas de manera secuencial (al menos que se disponga de un equipamiento no habitual y costoso,

como un multi-potensiostato de 16 canales), buscamos algún compuesto químico que finalice la reducción bacteriana de ferricianuro sin generar interferencias en la determinación electroquímica (ya sea por ser electroactivos a los potenciales utilizados, que reaccionen sobre el electrodo, que eviten o enmascaren la re-oxidación del ferrocianuro o que reduzcan al ferricianuro, entre otras posibilidades).

Para esto buscamos entre los compuestos que típicamente se utilizan para evitar o inhibir el crecimiento microbiano o biológico en general (timol, NaOH, isopropanol), para evitar contaminaciones microbianas de células eucariotas (azida sódica), compuestos que se utilizan como desinfectantes de heridas (iodo povidona, cloroxilenol, etanol, H_2O_2) y compuestos conocidos que presentan efectos biocidas (formol, hipoclorito de sodio), de manera de encontrar el adecuado para el bioensayo presentado aquí.

La concentración empleada de cada compuesto dependió de la concentración efectiva de cada compuesto y de que su agregado no diluyera la muestra, por ello se prepararon soluciones madre concentradas en algunos de los casos (azida sódica o NaOH).

Si bien el mecanismo de acción del compuesto no era de nuestro interés (razón por la cual los llamamos "inhibidor"), sí nos interesaba que su efecto se prolongara en el tiempo. Primero se estudió la diferencia de corriente obtenida entre un control positivo, CP (muestra sin agregado de un inhibidor) y las muestras con el agregado de cada inhibidor por separado, luego de t = 120 y 180 min de incubación (45 y 105 min luego de agregar los inhibidores) (Figura 2.5).

La azida sódica, utilizada como un inhibidor de las bacterias Gram negativas, y el cloroxilenol fueron estudiadas también, pero ninguno de los dos compuestos sirvió a nuestros propósitos, la azida sódica (2 g/L, concentración final en el pocillo) no inhibió el crecimiento de *K. pneumoniae* y el cloroxilenol no permitió obtener resultados reproducibles en las condiciones de nuestro bioensayo. Utilizando un electrodo de área 100 veces mayor, se observó que el cloroxilenol frenaba la reducción bacteriana de ferricianuro. Pero cuando cambiamos el WE por el de Pt de 0,196 mm^2 obtuvimos mediciones no reproducibles. Dado que el Espadol® presenta en su composición aceite de pino, y luego de su agregado se observaron gotitas de aceite en la muestra, creemos que estas intervenían desfavorablemente en las mediciones amperométricas. Por lo tanto estos dos compuestos se descartaron rápidamente y no fueron incluidos en la Figura 2.5.

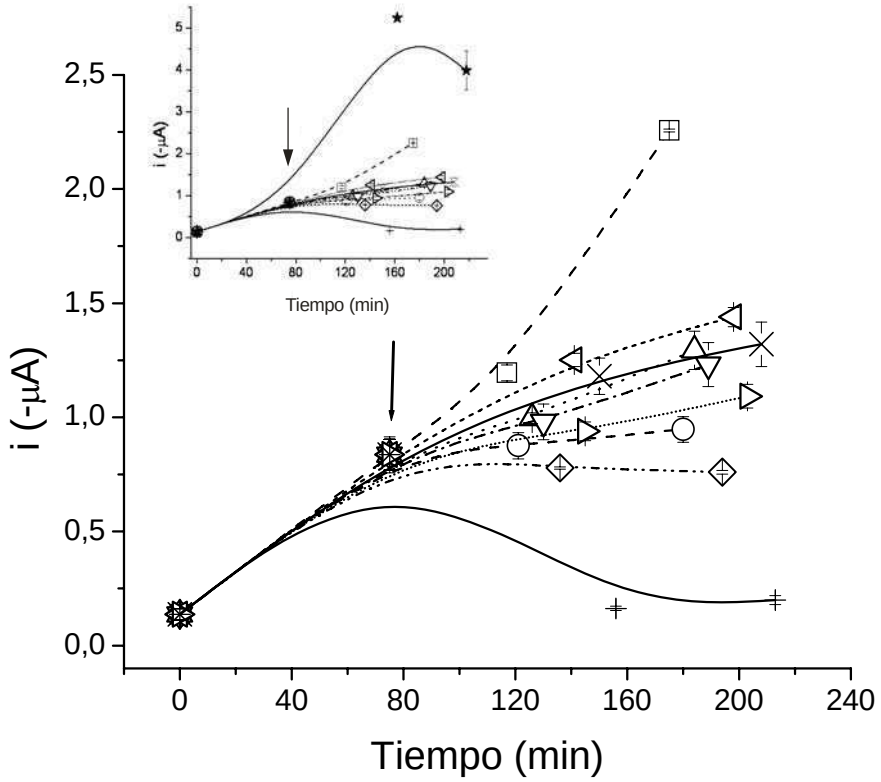


Figura 2.5: Efecto de los inhibidores en la reducción bacteriana del ferricianuro. Las mediciones de CA (+500 mV *vs* $Ag/AgCl_{sat}$) fueron realizadas en controles CP (□), etanol (△), formaldehido (◊), iodo povidona 5 g/L (◁), iodo povidona 0,5 g/L (▷), isopropanol (▽), NaOH (x), hipoclorito de sodio (+), o timol (○) luego de t = 75, 120 y 180 min (en la figura insertada se incluye el H_2O_2 (⋆)). La flecha indica el tiempo de agregado de los inhibidores. Los valores representan $\bar{x} \pm DS_{(n-1)}$ del metabolismo total (n = 4).

El uso de H_2O_2 generó una señal significativamente mayor a la de los CP a t = 160 y 220 min (prueba *t* de Student, poblaciones independientes $p < 0,05$ y n = 4). Cuando el hipoclorito de sodio fue utilizado como inhibidor, las corrientes disminuyeron significativamente (prueba *t* de Student, poblaciones independientes $p < 0,05$ y n = 4). Por lo tanto, ni el H_2O_2 ni el hipoclorito cumplieron con nuestra necesidad de detener la reducción bacteriana del ferricianuro sin afectar la determinación amperométrica (Figura 2.5).

Por lo tanto, las mejores opciones para detener la reducción bacteriana de ferricianuro, al menos hasta luego de 105 min de ser agregados, fueron el formol, el timol, el NaOH, la iodo povidona 0,5 g/L y el isopropanol.

El agregado de estos inhibidores fue estudiado nuevamente, esta vez las mediciones se realizaron hasta luego de 3 días de ser agregados de manera de elegir el más adecuado a nuestros propósitos.

Luego de 73 h del agregado (t = 74 h), sólo las muestras que contienen timol o formaldehido mantienen la señal analítica inalterable (Figura 2.6). No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los valores registrados en los CP a t = 1 h y los valores de las muestras con formol o con timol.

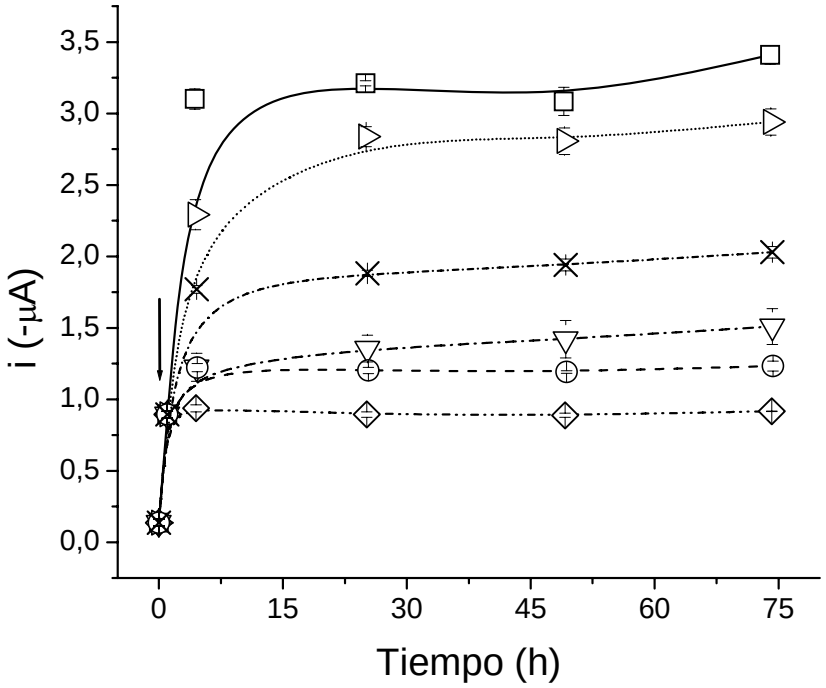


Figura 2.6: Diferencia del efecto de los inhibidores en la reducción bacteriana del ferricianuro. Las mediciones de CA fueron realizadas en muestras controles CP (□), con formaldehido (◊), con iodo povidona 0,5 g/L (▷), con isopropanol (▽), con NaOH (x) o con timol (○) a t = 4, 25, 49, y 74 h (o 3, 24, 48 y 73 h luego de agregar cada inhibidor). La flecha indica el tiempo de agregado de los inhibidores. Los valores representan $\bar{x} \pm DS_{(n-1)}$ del metabolismo total (n = 4).

Las muestras con el agregado de isopropanol no presentaron diferencias significativas respecto del CP a t = 1 h ($p > 0,05$), pero los datos presentan mayor dispersión que los obtenidos con el agregado de timol o formol (RSD ≅ 10% con el isopropanol, RSD ≅ 2% con el agregado de formol o timol) (Fig. 2.6).

Si comparamos las Figuras 2.5 y 2.6 podemos ver que el uso de iodo povidona 0,5 g/L puede ser de utilidad pocas horas después de su agregado; por lo tanto fue utilizado en aquellos experimentos medidos inmediatamente después de su agregado.

El propósito principal de este experimento era detener la reducción bacteriana de ferricianuro. De manera de evaluar el efecto sobre la viabilidad microbiana de cada compuesto utilizado en los ensayos de la Figura 2.6, se realizaron plaqueos en medio AM de cada muestra luego de realizar las mediciones correspondientes a t = 25 h y no se observó crecimiento bacteriano en las muestras con formol, con timol y con NaOH hasta luego de 5 días después de incubar las placas.

Después de las mediciones a t = 74 h se realizó nuevamente un plaqueo de todas las muestras y sólo las que tenían agregado formol no presentaron crecimiento bacteriano. Este resultado también es el observado luego de 5 días después de incubar las placas.

2.3.5.-Efecto de distintas concentraciones de ferricianuro en la producción de corriente y la DO de *K. pneumoniae*

Las concentraciones de ferricianuro utilizadas en las determinaciones de BOD mediadas por este compuesto (BOD_{FM}) se encuentran entre 40 y 60 mM dado que dentro de estas concentraciones las corrientes obtenidas serían independientes de la concentración del mediador, según ha sido detallado previamente (Ertl et al., 2000a; Morris et al., 2001; Catterall et al., 2003; Pasco et al., 2004; Nakamura et al., 2007).

Pero dado que altas concentraciones de este mediador podrían tener efectos tóxicos sobre las bacterias utilizadas, o bien disminuir la solubilidad de otros compuestos en la muestra, y con el sentido de racionalizar el uso de reactivos potencialmente peligrosos, además de costosos, se decidió estudiar en nuestro sistema el efecto de las concentraciones del mediador (3,3; 6,25; 9,9; 14,8 y 19,8 g/L) en las corrientes producidas incubando a *K. pneumoniae* (DO_{600} de 1) en presencia de glucosa durante 2 h. La actividad microbiana fue detenida por el agregado de 0,5 g/L de iodo povidona (Figura 2.7)

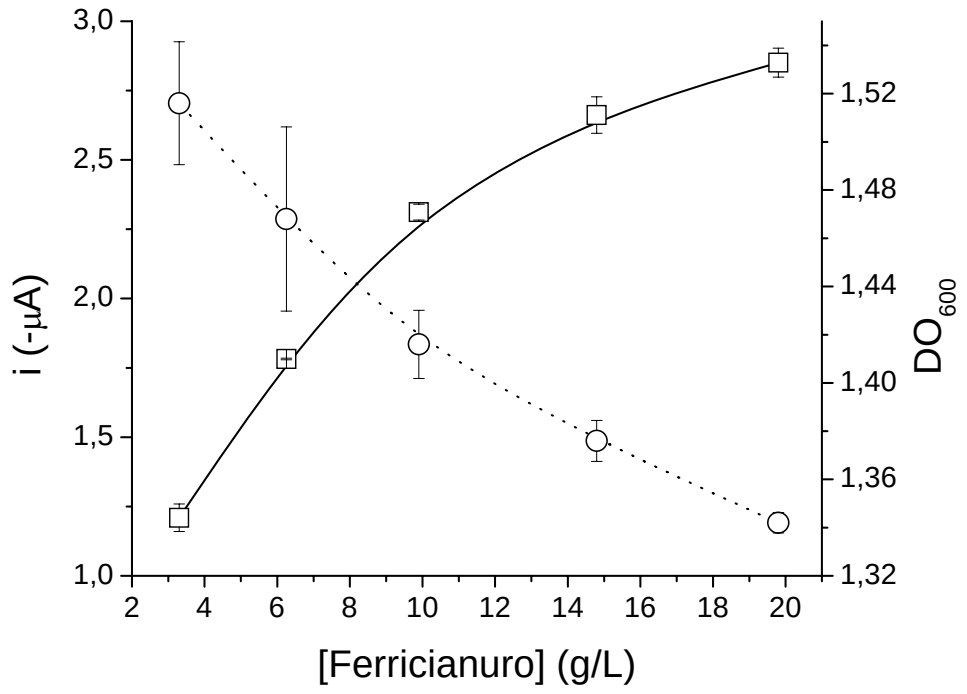


Figura 2.7: Efecto de la concentración de ferricianuro en la producción de corriente (□ y línea entera) y en el crecimiento microbiano, medido de acuerdo a la DO de las muestras (○ y línea punteada) luego de incubar a *K. pneumoniae* durante 2 h en presencia de 5 g/L de glucosa. Los valores representan $\bar{x} \pm DS_{(n-1)}$ (n = 2) de ensayos de CA.

Puede observarse que a bajas concentraciones de ferricianuro (hasta 10 g/L), la corriente aumenta con el aumento de la concentración del mediador, pero a mayores concentraciones (a partir de 19,8 g/L, correspondiente a 60 mM), la corriente alcanzaría un *plateau.* No se encontraron diferencias significativas de corriente al usar 14,8 o 19,8 g/L de ferricianuro ($p > 0,05$) y esto es acorde a lo encontrado por otros autores (Ohki et al., 1994; Marty et al., 1997; Liu y Mattiasson, 2002).

Liu ha observado efectos nocivos (cambios en la morfología, disminución del metabolismo y muerte celular) en el crecimiento de *E. coli* al incubarla con diferentes concentraciones de ferricianuro durante distintos tiempos (Liu et al., 2009). Por lo tanto, decidimos evaluar de manera sencilla si *K. pneumoniae* estaba siendo afectada por el mediador, midiendo la DO_{600} de cada muestra, incluidas dos muestras endógenas, una conteniendo 6,25 y otra 19,8 g/L (Figura 2.7) luego de la incubación de 2 h. Dado que en las muestras endógenas se incuba a *K. pneumoniae* sin fuente de carbono, sometiéndola a una situación de estrés que podría hacerla aún más susceptible al ferricianuro, y que no

sabíamos si ese efecto tóxico podía ser permanente, decidimos realizar dos muestras endógenas y estudiarlas en conjunto con las demás muestras. Los datos obtenidos demuestran un efecto negativo, menor crecimiento microbiano, al aumentar la concentración de ferricianuro. Se observó una disminución significativa de DO cuando se incubó *K. pneumoniae* a altas concentraciones de ferricianuro, a partir de 14,8 g/L (*Test t* de Student, n = 2) (Figura 2.7), dado que la DO_{600} inicial fue de 0,9 ± 0,1.

2.3.6.-Efecto de la concentración de *K. pneumoniae* y la des-aireación de las muestras en la producción de corriente

El procedimiento general de las determinaciones de BOD_{FM} incluye un paso de des-aireado de la muestra, burbujeándolas con N_2 antes de incubarlas (Ertl et al., 2000a; Pasco et al., 2000; Catterall et al., 2001; Baronian et al., 2002; Catterall et al., 2003; Pasco et al., 2004; Chen et al., 2008; Jordan et al., 2010). En ninguno de estos trabajos se explican las razones del uso de este paso. Creemos que podría ser un paso estándar a partir que Kaláb y Skládal (1994) encontraron que, si a *Paracoccus denitrificans* se le bloqueaba el flujo de electrones hacia el O_2 utilizando cianuro, se producía un aumento de la señal (aumentaba la corriente) al incubarlo en presencia de ferroceno, otro mediador empleado en el diseño de biosensores.

De manera de simplificar los procedimientos de la determinación de BOD_{FM}, estudiamos las corrientes producidas en muestras donde distintas concentraciones de *K. pneumoniae* fueron incubadas en presencia de 6,25 g/L de ferricianuro y 5 g/L de glucosa bajo dos condiciones diferentes de incubación: muestras burbujeadas con N_2 e incubadas en una atmósfera de N_2 (condición A) y muestras no burbujeadas con N_2 e incubadas en una atmósfera en presencia de O_2 (condición B) (n = 4) (Figura 2.8). Se planteó la hipótesis de que era posible que, si la concentración bacteriana fuera lo suficientemente alta, la actividad metabólica aeróbica podría consumir rápidamente el O_2 (en pocos minutos), y no sería necesario des-airear las muestras, lo que sería una gran ventaja desde el punto de vista del diseño de equipamiento analítico sencillo, portátil y económico.

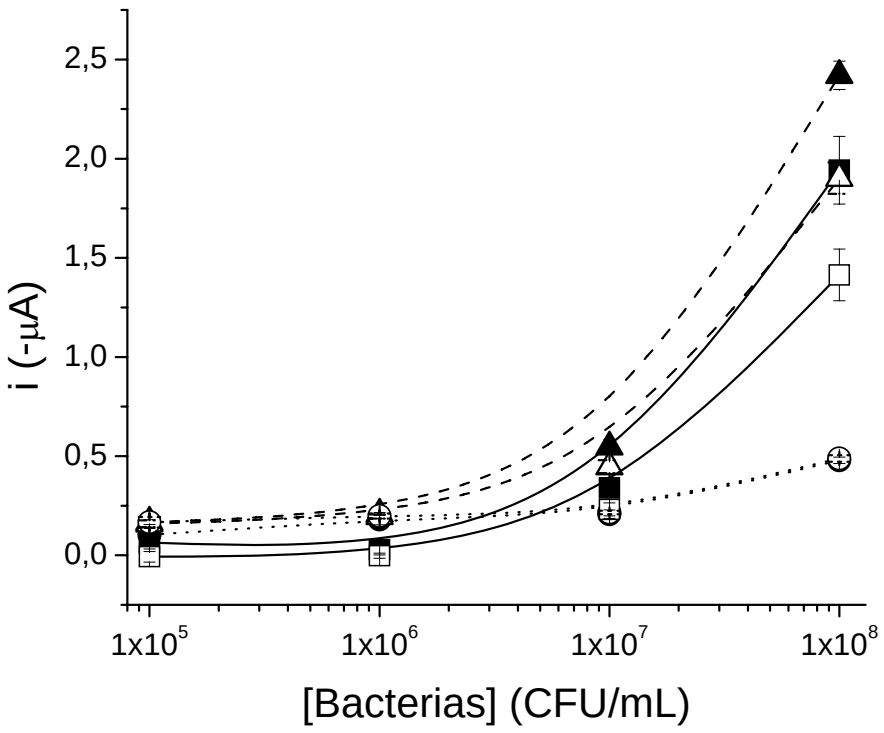


Figura 2.8: Efectos de la concentración bacteriana y la des-aireación de las muestras en la producción de corrientes. Ensayos de CA en los que distintas concentraciones de *K. pneumoniae* fueron incubadas en presencia de 6,25 g/L de ferricianuro y 5 g/L de glucosa en la condición A, des-aireadas, (△, □, ○) o B, no des-aireadas, (▲, ■, ●) durante 1,5 h. Los metabolismos totales (△, ▲ y línea de guiones), exógenos (□, ■ y línea entera) y endógenos (○, ● y línea de puntos) han sido incluidos y los valores representan $\bar{x} \pm DS_{(n-1)}$ (n = 4).

Diferencias significativas se encontraron entre las condiciones A y B cuando la concentración bacteriana fue alta (2,5 x 10^8 UFC/mL), observándose mayores corrientes en la condición B, es decir, en las muestras no des-aireadas. Estas diferencias se encontraron en los metabolismos exógenos, pero no en los endógenos (Figura 2.8). Estos resultados son diferentes a los encontrados por Liu al utilizar *E. coli* (Liu et al., 2009).

Por lo tanto, no es necesario des-airear las muestras antes de realizar la determinación cronoamperométrica para obtener mayores corrientes. Otra posible explicación a los datos obtenidos es que, dado que la proporción de [ferricianuro]/[O_2 disuelto] en el medio es de 80/1 (considerando que la solubilidad del O_2, a 37 °C, es de 6,9 mg/L), el equilibrio podría estar desplazado, cinética o difusionalmente, hacia el uso de

ferricianuro como aceptor de electrones. Por otro lado, creemos que la obtención de corrientes significativamente más altas en la condición B (en presencia de oxígeno) podría deberse a la fisiología de las bacterias luego del proceso de des-aireado, más que a un efecto de la presencia o no de O_2.

2.3.7.-Comparación entre el uso de *K. pneumoniae* o de un consorcio bacteriano, BODSEED, para la cuantificación de BOD

La determinación de BOD es utilizada para estimar la cantidad de oxígeno que será utilizada por los microorganismos al oxidar compuestos orgánicos biodegradables en muestras de agua. Por lo tanto, en los ensayos de determinación de BOD deberían utilizarse microorganismos capaces de degradar una amplia variedad de compuestos, seguida de la cuantificación de un producto o subproducto de esa degradación (O_2, CO_2 o, en nuestro caso, ferrocianuro).

En las determinaciones rápidas de BOD, dependiendo de la biodegradabilidad de los compuestos de la muestra (dependiendo de la/s cepa/s utilizada/s) así como de su concentración, la señal obtenida puede ser muy baja. En los métodos de determinación rápida de BOD, los valores que se obtienen suelen ser menores que aquellos obtenidos en el ensayo BOD_5, en términos de cantidad de materia orgánica biodegradable, debido al tiempo disponible para degradarla.

Por lo tanto, dado que la cepa *K. pneumoniae* ha sido elegida como cepa individual para su posible uso en el bioensayo desarrollado aquí, dada su alta resistencia a condiciones adversas (como ser crecimiento con baja concentración de fuente de carbono, en condiciones de cultivo con baja aireación y capaz de degradar varios compuestos orgánicos complejos, además de fuentes de carbono simples como ser glucosa, fructosa, lactosa, ácido succínico, entre otros) se comparó la producción de corriente en experimentos donde el material biológico fue un cultivo puro (*K. pneumoniae*) o un consorcio bacteriano (utilizando el liofilizado BODSEED). La muestra de BODSEED utilizada para este experimento es la que contenía las cepas *K. pneumoniae*, BO366, BO367 y BO368.

Realizamos una curva de calibración de GGA utilizando una DO_{600} de 1 de *K. pneumoniae* o de BODSEED y 6,25 g/L de ferricianuro, incubamos por 2 hs y la incubación fue detenida por el agregado de 0,5 g/L de iodo povidona antes de medir (Figura 2.9).

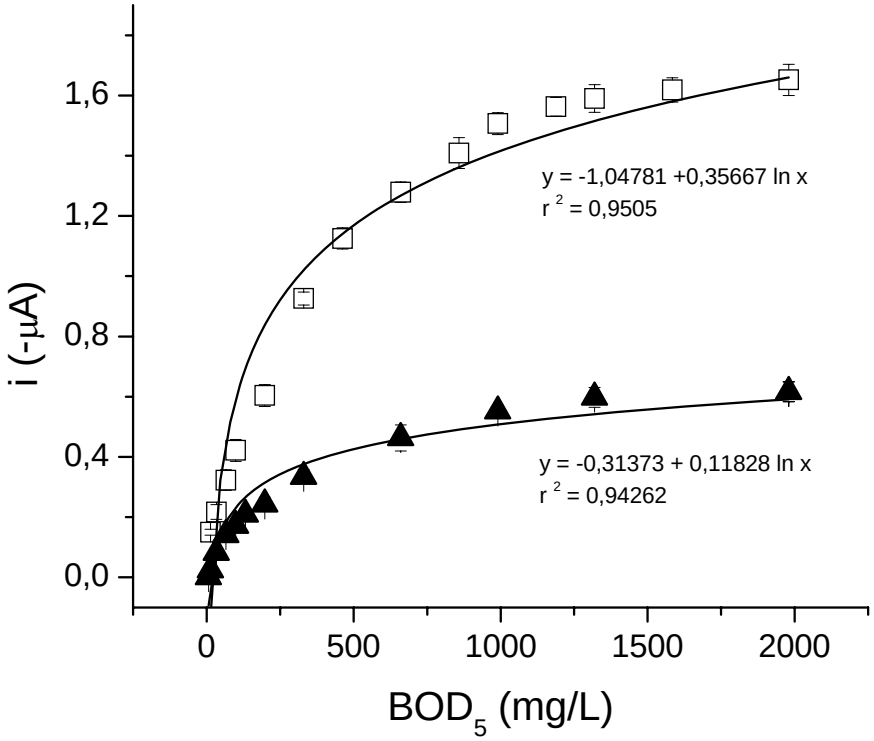


Figura 2.9: Curvas de calibración de GGA, realizadas mediante CA, utilizando *K. pneumoniae* (□) o BODSEED (▲) como material biológico. Los valores representan $\bar{x} \pm DS_{(n-1)}$ (n = 4).

No sólo se observa mayor producción de corriente utilizando a *K. pneumoniae* como única cepa (Figura 2.9) sino que también parecería observarse un mayor rango lineal (Figura 2.10) al utilizarla como única cepa, lo que permitiría resolver el análisis de la señal y la calibración utilizando un equipo sencillo que no pudiera realizar calibraciones no-lineales; además, un mayor rango lineal implica que las muestras incógnitas de relativo alto contenido de BOD requerirían menor cantidad de diluciones (Chan et al., 1999; Rastogi et al., 2003).

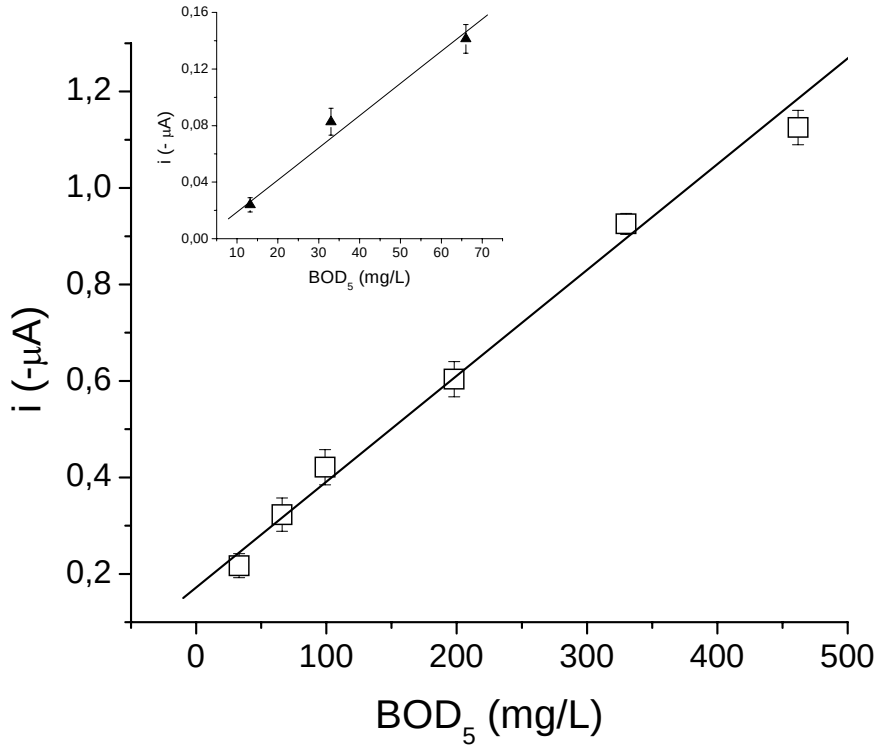


Figura 2.10: Regresión lineal obtenida al realizar la curva de calibración de GGA utilizando *K. pneumoniae* como biocatalizador. En la figura insertada se observa el rango lineal obtenido con BODSEED y la pendiente, muy similar a la obtenida con *K. pneumoniae*.

Siendo el rango lineal obtenido por *K. pneumoniae* entre 30 y 500 mg BOD_5/L (r^2 = 0,9926) y al rango lineal de BODSEED entre 10 y 70 mg BOD_5/L (r^2 = 0,9841). Sin embargo la sensibilidad del bioensayo (dada por la pendiente de la recta en el rango lineal) utilizando cualquiera de los dos material biológicos fue similar (2,32 o 2,28 nA x L/mg BOD_5 obtenidos con *K. pneumoniae* o con BODSEED respectivamente).

2.3.8.-Calibración del bioensayo empleando *K. pneumoniae* y patrones de $OECD_{std}$

La solución de GGA, comúnmente empleada como estándar de calibración del ensayo BOD_5, suele no ser la más adecuada para la calibración de BOD en aguas residuales municipales e industriales, dado que estas muestras presentan una composición más compleja con sustancias de difícil degradación, si lo comparamos con la biodegradabilidad de la glucosa o el ácido glutámico. Por lo tanto suele utilizarse otro estándar de calibración, el $OECD_{std}$, de composición más compleja.

Por lo tanto realizamos una curva de calibración utilizando como fuente de carbono el $OECD_{std}$, y las mediciones se realizaron luego de dos condiciones diferentes de finalizar la reducción microbiológica de ferricianuro (centrifugando o agregando formol). Luego de 2 h de incubar *K. pneumoniae* con 6,25 g/L de ferricianuro y distintas concentraciones de $OECD_{std}$, centrifugamos cada muestra, y se registraron las corrientes (mediante CA) en los sobrenadantes. Luego se recompusieron las muestras (juntándose nuevamente cada pellet con su respectivo sobrenadante), se homogenizó cada muestra (utilizando un vórtex), se agregó formol y se volvió a medir (ver Sección 2.2.13 para mayor detalle) (Figura 2.11). Esto se realizó de esta manera para descartar la posibilidad de que algún componente de la solución de $OECD_{std}$ reaccionara con el formol, actuando como interferencia en el método.

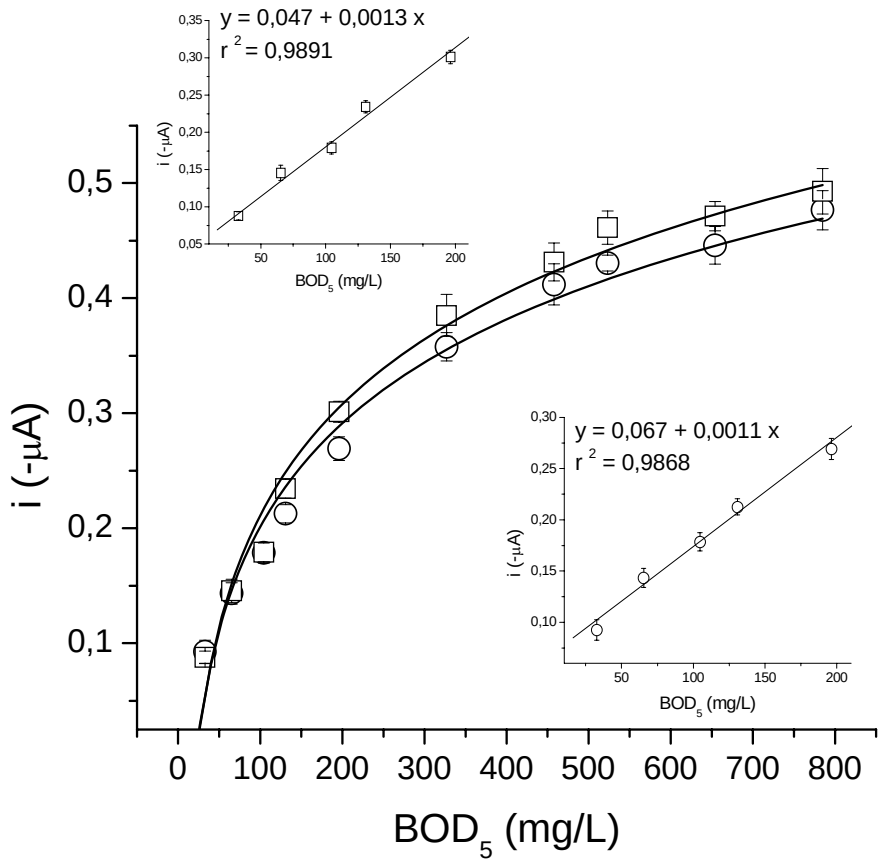


Figura 2.11: Curva de calibración utilizando $OECD_{std}$ luego de centrifugar (□) y luego de agregar formol (○) a las muestras, después de incubar a *K. pneumoniae* durante 2 h en presencia de ferricianuro. Los valores representan $\bar{x} \pm DS_{(n-1)}$ (n = 4). En las figuras insertadas, superior e inferior, se observan las regresiones lineales de la curva de calibración luego de centrifugar o agregar formol, respectivamente.

No se observaron diferencias significativas entre las corrientes obtenidas luego de centrifugar y las obtenidas luego de recomponer la muestra y agregar formol, y tampoco se vieron efectos ni en el rango lineal ni en la sensibilidad del bioensayo (la pendiente obtenida luego de centrifugar y luego de agregar formol fue similar, 1,1 y 1,3 nA x L/mg BOD_5, presentando un r^2 = 0,9891 y r^2 = 0,9868, respectivamente) por lo tanto no se observa, en las determinaciones cronoamperométricas, que la solución de $OECD_{std}$ presente compuestos que interfieran con el formol. Puede observarse también que el rango lineal, entre 30 y 200 mg BOD_5/L, es comparable a los presentados por otros autores al utilizar este estándar (Liu y Mattiasson, 2002). El rango lineal obtenido al graficar i *vs* Ln (BOD_5) fue entre 30 y 450 mg BOD_5/L (rango lineal aparente, con un r^2 = 0,991).

Por lo tanto el uso de formol, como mecanismo para detener el proceso de reducción del ferricianuro luego del tiempo de incubación probó ser una elección acertada para reemplazar el paso de centrifugación, al menos en las condiciones de uso de las dos soluciones utilizadas como estándares de calibración y verificación de funcionamiento del inóculo, GGA y la $OECD_{std}$.

2.3.9.-Aplicación del bioensayo para la determinación de BOD en muestras reales de agua ($BOD_{K.\ pneumoniae}$) y comparación con los valores de BOD_5

La determinación de BOD de 4 muestras de aguas cloacales municipales y 2 muestras simuladas (Sim-1 y Sim-2) se realizó mediante el ensayo tradicional de BOD_5 y el uso de nuestro bioensayo ($BOD_{K.\ pneumoniae}$) luego de los pasos de desarrollo previamente detallados (Tabla 2.1).

Tabla 2.1: Comparación entre los valores de BOD obtenidos en el ensayo de BOD_5 y por el bioensayo $BOD_{K.\ pneumoniae}$ de 4 muestras de agua reales y 2 muestras simuladas. La calibración del $BOD_{K.\ pneumoniae}$ fue realizada utilizando $OECD_{std}$ y los valores informados representan $\bar{x} \pm DS_{(n-1)}$ (n = 4) y el %RSD fue calculado como 100 x $DS/\bar{x}$.

Muestra	BOD_5 (mg/L)	$BOD_{K.\ pneumoniae}$ (mg/L)	%RSD (100 x $DS/\bar{x}$)	$BOD_{K.\ pneumoniae}/BOD_5$
Agua cloacal 1	145	167 ± 13	7,78	1,15
Agua cloacal 2	120	151 ± 14	9,27	1,26
Agua cloacal 3	130	119 ± 12	10,08	0,92
Agua cloacal 4	120	116 ± 12	10,34	0,97
Sim-1	175	43 ± 8	18,6	0,25
Sim-2	85	24 ± 6	25	0,28

De manera de evaluar la presencia de compuestos potencialmente tóxicos, se realizó la determinación de BOD de diluciones 1:4 y 1:8 de cada muestra de agua clocal. Los valores de BOD obtenidos luego de la corrección por dilución, de las muestras cloacales 1 y 2 fueron similares en ambas diluciones. Pero, luego de realizar la corrección por dilución, los valores de BOD obtenidos en las muestras 3 y 4, fueron más altos los obtenidos con la muestra más diluida (una diferencia de aproximadamente el 25% de los valores de BOD entre ambas diluciones en cada muestra), por lo tanto, creemos que estas muestras presentaban algún componente que era tóxico para el metabolismo de *K. pneumoniae* o interfería con el método de determinación. Los valores de BOD obtenidos por la determinación mediante $BOD_{K.\ pneumoniae}$ se ajustaron de manera adecuada a los valores de BOD_5 y la relación entre ambos valores se informa en la Tabla 2.1 como $BOD_{K.\ pneumoniae}/BOD_5$. El %RSD de cada muestra se mantuvo alrededor del 10%.

Dado que el *Standard Methods* sugiere que las muestras se determinen el día del muestreo (APHA "5210", 1995), se determinó nuevamente la BOD de cada muestra cloacal mediante el $BOD_{K.\ pneumoniae}$, antes de ser descartadas (7 días luego del día de muestreo). En esta segunda medición, los valores de las muestras 1 y 3 disminuyeron alrededor de un 15% y el de la muestra 2 disminuyó un 35%. El valor de la muestra 4 se mantuvo alrededor del valor inicialmente medido (117 ± 13 mg/L). Estos resultados muestran que la composición de algunas muestras varía en el tiempo aún manteniéndolas a -20 °C.

2.4.-DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

K. pneumoniae ha demostrado ser un candidato nutricionalmente versátil para nuestro bioensayo mediado por ferricianuro sin requerir des-airear las muestras permitiendo simplificar la metodología generalmente utilizada en este tipo de determinaciones, BOD_{FM}.

El rango lineal obtenido al utilizar esta cepa bacteriana se encuentra entre 30 y 500 mg BOD_5/L (r^2 = 0,9926) cuando se utiliza GGA como estándar de calibración y entre 30 y 200 mg BOD_5/L (r^2 = 0,9868) cuando se utiliza el $OECD_{std}$ como estándar de calibración. Este rango lineal representa una gran mejora frente al rango lineal del ensayo BOD_5 (que se encuentra entre 1 y 9 mg BOD_5/L).

El rango lineal obtenido al utilizar el $OECD_{std}$ es comparable con el informado en bibliografía independientemente de utilizar una cepa individual (Kaláb y Skládal, 1994; Marty et al., 1997; Sakaguchi et al., 2007; Zhang et al., 2008) o un consorcio bacteriano (Catterall et al., 2003; Oota et al., 2010) Sin embargo el rango lineal aparente es similar al encontrado por Chiappini et al. (2010).

El uso del formaldehido para finalizar el proceso catalizado por los microorganismos de la reducción de ferricianuro, permitió obtener determinaciones reproducibles, sin interferencias electroquímicas y demostró detener el proceso hasta 74 h luego de su agregado. Esto fue ensayado con los patrones utilizados habitualmente para la determinación de BOD, GGA y $OECD_{std}$, y con las muestras de aguas cloacales y simuladas. Además se demostró que impide el crecimiento microbiano en las muestras.

Por lo tanto los objetivos de esta primera etapa se cumplieron, encontramos un compuesto que permite evitar la centrifugación sin presentar interferencias electroquímicas ni afectar la reproducibilidad de las determinaciones de BOD. Obtuvimos un RSD ≤ 10,4% al determinar la BOD de muestras de agua reales con nuestro bioensayo ($BOD_{K.\ pneumoniae}$) (Tabla 2.1) y esto también representa una mejora a las determinaciones frente al RSD del 20% que se acepta en el ensayo BOD_5. No fue posible comparar estos RSDs con los obtenidos mediante la medición por AySA de las muestras, dado que en el informe recibido no se presentaron los DS ni ningún otro tipo de análisis estadístico.

Muestras de aguas cloacales municipales (4) y muestras simuladas (2) fueron determinadas con nuestro bioensayo y las determinaciones de las primeras presentaron buena correlación con los valores obtenidos mediante el ensayo BOD_5, calculado como $BOD_{K.\ pneumoniae}/BOD_5$ (Tabla 2.1).

2.5.-REFERENCIAS

APHA, American Public Health Association (1995) "5210 Biochemical oxygen demand (BOD)" in: *Standard methods for the examination of water and wastewater* (Eaton A., Clesceri L., Greenberg A. eds.) 19st ed. APHA. Washington DC, US

Baronian K.H.R., Downard A.J., Lowen R.K., Pasco N. (2002) Detection of two distinct substrate-dependent catabolic responses in yeast cells using a mediated electrochemical method. Appl Microbiol Biotechnol 60, 108-113

Brisse S., Grimont F., Grimont P.A.D. (2006) "The Genus *Klebsiella*" in: *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria* (Dworkin M. ed.) 3rd ed. Springer. NY, US. Ch. 3

Catterall K., Morris K., Gladman C., Zhao H., Pasco N., John R. (2001) The use of microorganisms with broad range substrate utilization for the ferricyanide-mediated rapid determination of biochemical oxygen demand. Talanta 55, 1187-1194

Catterall K., Zhao H., Pasco N., John R. (2003) Development of a rapid ferricyanide-mediated assay for biochemical oxygen demand using a mixed microbial consortium. Anal Chem 75, 2584-2590

Chan C., Lehmann M., Tag K., Lung M., Kunze G., Riedel K., Gruendig B., Renneberg R. (1999) Measurement of biodegradable substances using the salt-tolerant yeast *Arxula adeninivorans* for a microbial sensor immobilized with poly (carbamoyl) sulfonate (PCS) part I: construction and characterization of the microbial sensor. Biosens Bioelectron 14, 131-138

Chen H., Ye T., Qiu B., Chen G., Chen X. (2008) A novel approach based on ferricyanide-mediator immobilized in an ion-exchangeable biosensing film for the determination of biochemical oxygen demand. Anal Chim Acta 612, 75-82

Chiappini S.A., Kormes D.J., Bonetto M.C., Sacco N., Cortón E. (2010) A new microbial biosensor for organic water pollution based on measurement of carbon dioxide production. Sens Actuators B Chem 148, 103-109

Ertl P., Unterladstaetter B., Bayer K., Mikkelsen S. (2000a) Ferricyanide reduction by *Escherichia coli*: Kinetics, mechanism and application to the optimization of recombinant fermentations. Anal Chem 72, 4949-4956

Ertl P., Robello E., Battaglini F., Mikkelsen S.R. (2000b) Rapid antibiotic susceptibility testing via electrochemical measurement of ferricyanide reduction by *Escherichia coli* and *Clostridium sporogenes.* Anal Chem 72, 4957-4964

Essa A.M., Macaskie L.E., Brown N.L. (2002) Mechanisms of mercury bioremediation. Biochem Soc Trans 30, 672-674

Heesche-Wagner K., Schwarz T., Kaufmann M. (1999) Phenol degradation by an enterobacterium: a *Klebsiella* strain carries a TOL-like plasmid and a gene encoding a novel phenol hydroxylase. Can J Microbiol 45, 162-171

Jordan M.A., Welsh D.T., Teasdale P.R., Catterall K., John R. (2010) A ferricyanide-mediated activated sludge bioassay for fast determination of the biochemical oxygen demand of wastewaters. Water Res 44, 5981-5988

Kaláb T., Skládal P. (1994) Evaluation of mediators for development of amperometric microbial bioelectrodes. Electroanalysis 6, 1004-1008

Karube I., Matsunaga T., Mitsuda T., Suzuki S. (1977) Microbial electrode BOD sensor. Biotechnol Bioeng 19, 1535-1547

Kwon G.S., Kim J.E., Kim T.K., Sohn H.Y., Koh S.C., Shin K.S., Kim D.G. (2002) *Klebsiella pneumoniae* KE-1 degrades endosulfan without formation of the toxic metabolite, endosulfan sulfate. FEMS Microbiol Lett 215, 255-259

Lei Y., Chen W., Mulchandani A. (2006) Microbial biosensors. Anal Chim Acta 568, 200-210

Liu C., Sun T., Zhai Y., Dong S. (2009) Evaluation of ferricyanide effects on microorganisms with multi-methods. Talanta 78, 613-617

Liu J., Mattiasson B. (2002) Microbial BOD sensors for wastewater analysis. Water Res 36, 3786-3802

Marshall S.J., White G.F. (2001) Complete denitration of nitroglycerin by bacteria isolated from a washwater soakaway. Appl Environ Microbiol 67, 2622-2626

Marty J.L., Olive D., Asano Y. (1997) Measurement of BOD: Correlation between 5-day BOD and commercial BOD biosensor values. Environ Technol 3, 333-337

Matsen J.M, Spindler J.A, Blosser R.O. (1974) Characterization of *Klebsiella* isolates from natural receiving waters and comparison with human isolates. Appl Microbiol 28, 672-678

Morris K., Catterall K., Zhao H., Pasco N., John R. (2001) Ferricyanide mediated biochemical oxygen demand-development of a rapid biochemical oxygen demand assay. Anal Chim Acta 442, 129-139

Nakamura H., Suzuki K., Ishikuro H., Kinoshita S., Koizumi R., Okuma S., Gotoh M., Karube I. (2007) A new BOD estimation method employing a double-mediator system by ferricyanide and menadione using the eukaryote *Saccharomyces cerevisiae.* Talanta 72, 210-216

Nawaz M.S., Heinze T.M., Cerniglia C.E. (1992) Metabolism of benzonitrile and butyronitrile by *Klebsiella pneumoniae.* Appl Environ Microbiol 58, 27-31

Ohki A., Shinohara K., Ito O., Naka K., Maeda S., Sato T., Akano H., Kato N., Kawamura Y. (1994) A BOD sensor using *Klebsiella oxytoca* AS1. Int J Environ Anal Chem 4, 261-269

Oota S., Hatae Y., Amada K., Koya H., Kawakami M. (2010) Development of mediated BOD biosensor system of flow injection mode for *shochu* distillery wastewater. Biosens Bioelectron 26, 262-266

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development (1993) Guidelines for testing chemicals. Guideline 302A & 303. Paris, France

Pasco N., Baronian K., Jeffries C., Hay J. (2000) Biochemical mediator demand - a novel rapid alternative for measuring biochemical oxygen demand. Appl Microbiol Biotechnol 53, 613-618

Pasco N., Baronian K., Jeffries C., Webber J., Hay J. (2004) MICREDOX® - development of a ferricyanide-mediated rapid biochemical oxygen demand method using an immobilized *Proteus vulgaris* biocomponent. Biosens Bioelectron 20, 524-532

Rastogi S., Kumar A., Mehra N.K., Makhijani S.D., Manoharan A., Gangal V., Kumar R. (2003) Development and characterization of a novel immobilized microbial membrane for rapid determination of biochemical oxygen demand load in industrial waste waters. Biosens Bioelectron 18, 23-29

Sachdev D.P., Chaudhari H.G., Kasture V.M., Chopade B.A. (2009) Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing *Klebsiella pneumoniae* strains from rizosphere of wheat (*Triticum aestivum*) and their effect on plant growth. Indian J Exp Biol 47, 993-1000

Sakaguchi T., Morioka Y., Yamasaki M., Iwanaga J., Beppu K., Maeda H., Morita Y., Tamiy E. (2007) Rapid and onsite BOD sensing system using luminous bacterial cells-immobilized chip. Biosens Bioelectron 22, 1345-1350

Sharma P.K., Balkwill D.L., Frenkel A., Vairavamurthy M.A. (2000) A new *Klebsiella planticola* strain (Cd-1) grows anaerobically at high cadmium concentrations and precipitates cadmium sulfide. Appl Environ Microbiol 66, 3083-3087

Yang Z., Suzuki H., Sasaki S., Karube I. (1996) Disposable sensor for biochemical oxygen demand. Appl Microbiol Biotechnol 46, 10-14

Yoshida N., Hoashi J., Morita T., McNiven S.J., Nakamura H., Karube I. (2001) Improvement of a mediator-type biochemical oxygen demand sensor for on-site measurement. J Biotechnol 88, 269-275

Zhang L., Zhou S., Zhuang L., Li W., Zhang J., Lub N., Deng L. (2008) Microbial fuel cell based on *Klebsiella pneumoniae* biofilm. Electrochem Commun 10, 1641-1643

CAPÍTULO 3: AVANCES PARA EL DESARROLLO DE EQUIPAMIENTO. USO DE LIOFILIZADOS Y CONVECCIÓN FORZADA

3.1.-INTRODUCCIÓN

Klebsiella pneumoniae fue utilizada en el Capítulo 2 como bacteria modelo para la determinación de BOD mediante respirometría de ferricianuro, pero su uso en condiciones de cultivo líquido no es adecuada para el diseño de un bioensayo que pueda ser utilizado *in-situ.* Generalmente, en el diseño y desarrollo de biosensores/bioensayos a ser utilizados *in-situ* se emplean microorganismos inmovilizados (Chee et al., 2001; Liu y Mattiasson, 2002; Pasco et al., 2004; Sakaguchi et al., 2007; Kara et al., 2009). Pero las condiciones de almacenamiento y conservación de los mismos aún no permiten la obtención de resultados analíticos de alta reproducibilidad (Bjerketorp et al., 2006).

Los microorganismos a menudo requieren de métodos de preservación especiales para asegurar su óptima viabilidad, almacenamiento, pureza y estabilidad dado que tienen una tendencia inherente a mutar en cultivos de laboratorio, por lo que es muy importante el uso de procedimientos para mantenerlos viables y genéticamente estables (Sly, 1992).

La liofilización es uno de los métodos de preservación más utilizados para la conservación de microorganismos y consiste en la eliminación del agua de una sustancia congelada por sublimación del hielo bajo vacío. El éxito de este método de conservación depende de los pasos de congelación y deshidratación, de las características físicoquímicas del medio de suspensión, el tipo de microorganismo, el estado fisiológico del cultivo, las condiciones del cultivo, la concentración de los microorganismos, entre otros (Sly, 1992).

Aunque la liofilización es un proceso común de conservación de microorganismos, la supervivencia luego del proceso y la vida útil del liofilizado dependen del microorganismo y de las condiciones del proceso tanto como del almacenamiento del producto. Para reducir los efectos no deseados de este proceso -principalmente cambios físicos en los lípidos de membrana y cambios en la estructura de proteínas sensibles- suelen utilizarse sustancias crioprotectoras como la leche descremada, sacarosa, glicerol, trehalosa o glutamato de sodio (Leslie et al., 1995; Martos et al., 2007).

Las ventajas que ofrece la liofilización se observan en la facilidad de empleo del producto, mantenimiento y almacenamiento del material biológico y su uso en investigación e industria (Perry, 1995). Sin embargo este proceso puede ser letal para gran parte de la población sometida al mismo. Tal pérdida de viabilidad puede ser evitada si se

emplean crioprotectores adecuados, dependiendo de la concentración bacteriana sometida a la liofilización y su estado metabólico (Leslie et al., 1995; Morgan et al., 2006).

Pero no todos los aditivos son efectivos durante el proceso de liofilización y el almacenamiento del producto, y el éxito de su uso dependerá de la cepa que se quiera preservar y el proceso en el cual el producto será utilizado. Combinar algunos compuestos comúnmente utilizados como crioprotectores, por ejemplo suplementar leche descremada con glutamato de sodio, puede incrementar el efecto crioprotector durante el almacenamiento del liofilizado (Leslie et al., 1995; Martos et al., 2007). La eficiencia de algunos de los crioprotectores puede estar relacionada con la producción de metabolitos naturales involucrados como crioprotectores del estrés ambiental. Un mecanismo celular común en la adaptación al estrés osmótico es la acumulación intracelular de solutos orgánicos (como glicerol, trehalosa, prolina, glicina betaina, glutamato de sodio, etc.) o inorgánicos (como iones K^+) en el citoplasma de manera de restaurar el turgor y evitar la plasmólisis producida por el shock hiperosmótico (Csonka, 1989; Madkour et al., 1990).

Sin embargo la viabilidad no es un criterio totalmente confiable para evaluar el éxito de la liofilización dado que los sobrevivientes pueden estar metabólica o estructuralmente dañados. La preservación del material biológico y sus condiciones fisiológicas es esencial en el desarrollo de bioensayos y biosensores, que dependen de su desempeño como reporteros (o biorreceptores) de las condiciones ambientales particulares a las que se los somete (Bjerketorp et al., 2006).

Numerosos sistemas de sensado basados en el uso de células han sido desarrollados con propósitos ambientales y su *perfomance* puede ser mejorada si se logra adecuadamente que el material biológico esté en condiciones luego de almacenarse y que su utilización sea apropiada para el monitoreo *in-situ*. La portabilidad, preservación y almacenamiento por tiempos prolongados (lo que se denomina tiempo de estantería o *shelf life*) de biosensores o bioensayos basados en bacterias, son cruciales para producir métodos y equipamiento que puedan ser utilizados fuera del laboratorio, sin necesidad de personal altamente calificado, como lo exige el monitoreo *in-situ* (Farré et al., 2005; Bjerketorp et al., 2006).

Esto podría ser de particular interés en países en desarrollo, donde las condiciones de trabajo suelen ser difíciles para el monitoreo *in-situ*, en términos de almacenamiento y transporte, debido a la existencia de localidades en regiones remotas, lo que implica, por ejemplo, dificultades en la conservación de la cadena de frío. Asimismo, estas condiciones de almacenamiento y transporte también se verían afectadas en el caso de producirse algún evento catastrófico (sea este un desastre natural o un accidente), ya que frecuentemente causan fallas parciales o totales en los servicios eléctricos y otras infraestructuras.

Date desarrolló un bioensayo interesante basado en el uso de esporas que mejora notablemente los problemas de almacenamiento, preservación y transporte del material biológico. A pesar de las ventajas, la lentitud del proceso de germinación y el requerimiento de esterilidad, idealmente, para la germinación de las esporas, son inconvenientes difíciles de superar para su uso en el monitoreo *in-situ* (Date et al., 2007).

Con el objetivo de diseñar un sistema portátil susceptible de ser utilizado por un operador sin experiencia en microbiología, que pueda ser despachado por correo, y que presente un "tiempo de estante" relativamente prolongado (fecha de vencimiento de al menos dos meses), se optimizaron distintas técnicas de liofilización obteniéndose cultivos liofilizados de *Klebsiella pneumoniae* metabólicamente activos luego de 20 minutos de ser rehidratados. El agregado de leche descremada más glutamato de sodio o de trehalosa ha dado buenos resultados.

En nuestra búsqueda de desarrollar un bioensayo portátil y de bajo costo, se intentó también reemplazar el WE de Pt utilizado en el Capítulo 2, por un electrodo de oro realizado por *screen-printing* (fabricados en el INTI) o por un electrodo de carbón realizado bajo la misma técnica en el laboratorio. La técnica de *screen-printing* permite producir gran cantidad de electrodos a bajo costo, de calidad industrial (características y funcionalidad prácticamente idénticas) dado que se utiliza una misma máscara para fabricar todos los electrodos, de manera de obtener un comportamiento similar de todos ellos. Esto permitiría reducir el costo de los bioensayos propuestos aquí y minimizar los pasos o etapas necesarias para cada análisis, dado que cada electrodo se utilizaría en un único análisis y se descartaría (Domínguez Renedo et al., 2007). Para la fabricación de estos electrodos se utilizan tintas que contienen el material conductor (Au o carbón en este caso) y un material polimerizable que permite el fraguado de la tinta sobre el sustrato utilizado (acetato, plásticos, sílica, alúmina, vidrio, etc.)

Electroquímicamente, si se realiza la amperometría en condiciones de agitación de la muestra, se mantiene constante la concentración del analito cerca del electrodo y esto permite aumentar la precisión de la técnica, su reproducibilidad, y la intensidad de la señal de corriente medida (y por lo tanto su sensibilidad). Se intentó entonces reemplazar la condición estática de las mediciones realizadas en el Capítulo 2, por una condición hidrodinámica, mediante convección forzada por agitación magnética o utilizando un electrodo vibratorio, de manera de mejorar nuestro bioensayo para la determinación rápida de BOD (y como último paso del desarrollo elaborado en esta Tesis). El empleo de electrodos rotatorios (de uso habitual en los laboratorios electroquímicos) permite obtener ensayos con buena reproducibilidad, pero son instrumentos de costo y consumo eléctrico

relativamente alto, siendo poco apropiados para ser integrados en un equipo portátil (Bard y Faulkner, 2001).

3.2.-MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1.-Soluciones y medios de cultivo

Los cultivos líquidos fueron realizados en caldo LB; los plaqueos fueron realizados en placas con *bacto antibiotic medium* (AM) (ver detalle de todas las soluciones nombradas aquí en el Capítulo 2, Sección 2.2.1); se utilizó medio mínimo, MM, en la preparación de las muestras, los lavados de los pellets, la preparación de algunas soluciones (detallado en cada caso) y la rehidratación de los cultivos liofilizados. Se utilizó una solución madre de ferricianuro de potasio, de concentración 200 mM en MM, y una de ferrocianuro de potasio 100 mM en MM; como soluciones estándar de calibración para BOD fueron empleadas las usadas habitualmente, GGA y $OECD_{std}$. Una solución de 40% m/v de formol fue utilizada como solución madre para inhibir la reducción microbiana de ferricianuro.

Se utilizó una solución madre de una mezcla de leche descremada y glutamato de sodio que contenía 50% m/v de leche y 25% m/v de glutamato de sodio (MSG), en agua destilada. Se utilizó una solución madre de trehalosa 1 M, realizada en agua destilada. Las soluciones de leche-MSG y de trehalosa fueron esterilizadas con membrana de filtración de 0,22 μm de poro.

3.2.2.-Proceso de liofilización de *Klebsiella pneumoniae*

La cepa aislada de *K. pneumoniae* (ver Capítulo 2, Sección 2.2.2) fue crecida en caldo LB a 29 °C en agitación hasta alcanzar una DO_{600} de 1,7 ± 0,2 (ver Figura 3.1) correspondiente a una fase exponencial tardía (2,9 x 10^8 UFC/mL) (cultivo A), o en caldo LB suplementado con 20% de glicerol por 6 días, también a 29 °C en agitación, hasta alcanzar una DO_{600} de 0,6 ± 0,1 y una concentración bacteriana de 2,3 x 10^8 UFC/mL (cultivo B). Luego de centrifugar a 900 *g* durante 6 min, los pellets obtenidos fueron lavados 2 veces con MM o no. Se agregó un crioprotector o ninguno a los pellets, lavados o sin lavar, obtenidos a partir del cultivo A, se los homogeneizó y se los dejó en reposo a temperatura ambiente durante 20 min, luego se los colocó a -20 °C por 4 h antes de ser liofilizados. Estas condiciones se encuentran resumidas en la Tabla 3.1.

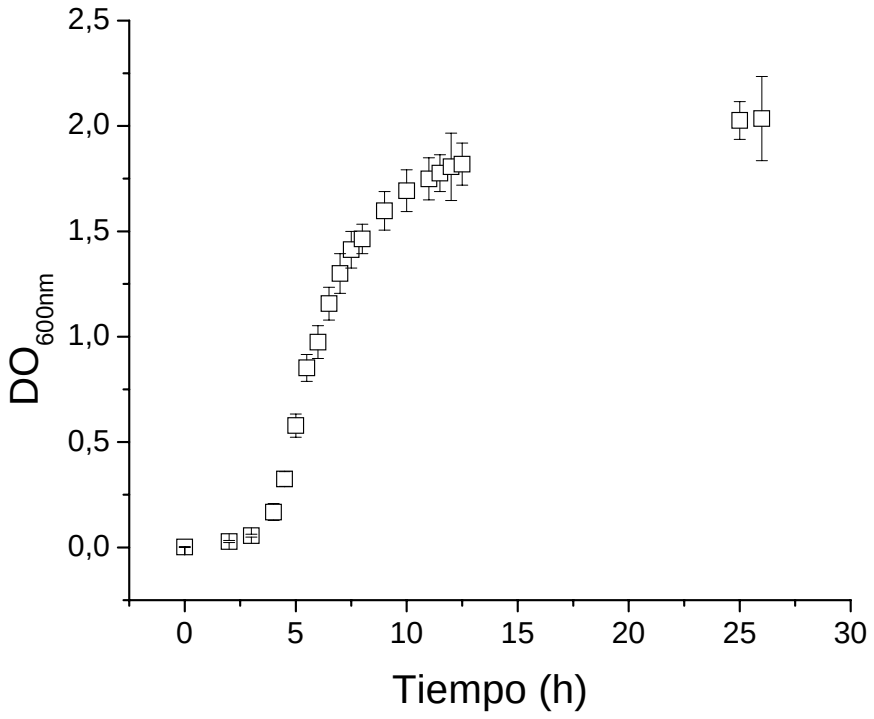


Figura 3.1: Curva de crecimiento de *K. pneumoniae* cultivada en medio LB en agitación a 29 °C (cultivo A).

El cultivo B fue centrifugado. La mitad del pellet obtenido se lavó dos veces con MM y se colocó a -20 °C por 4 h antes de su liofilización y la otra mitad directamente se colocó a -20 °C por 4 h antes de su liofilización, sin lavar. A estos pellets no se les agregó crioprotector.

Las soluciones crioprotectoras empleadas (en concentración final) fueron leche descremada adicionada con glutamato de sodio (10% m/v y 5% m/v, respectivamente), denominada leche-MSG y trehalosa (100 mM). Los cultivos liofilizados que tenían leche-MSG fueron denominados A_3 y A_4, y aquellos adicionados con trehalosa, A_5 y A_6. Las diferentes condiciones ensayadas se resumen en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1: Diferentes condiciones de cultivo estudiadas para obtener cultivos liofilizados de *K. pneumoniae* metabólicamente activos.

Cultivo líquido	Solución crioprotectora	Pellets (liofilizados)
A	Ninguna	Sin lavar (A_1)
		Lavados (A_2)
	Leche-MSG	Sin lavar (A_3)
		Lavados (A_4)
	Trehalosa	Sin lavar (A_5)
		Lavados (A_6)
B	Ninguna	Sin lavar (B_1)
		Lavados (B_2)

Durante el proceso de liofilización, la muestra fue retirada del freezer a -20 °C y colocada a -40 °C en la cámara de liofilización. El vacío se aplicó desde 10 mbar hasta 0,1 mbar, y la temperatura final, luego de 12 h de liofilización, fue de 25 °C.

3.2.3.-Tasas de supervivencia luego de la liofilización

La recuperación de cada cultivo liofilizado se realizó mediante la rehidratación durante 20 min en MM, estas suspensiones fueron utilizadas tanto para el estudio de las tasas de supervivencia como para el estudio de la actividad metabólica de cada cultivo liofilizado. Diluciones apropiadas fueron realizadas y se cultivaron en medio sólido AM a 37 ± 1 °C por 24 h, de manera de calcular la tasa de supervivencia de cada uno de los liofilizados. Se realizaron 3 plaqueos por dilución (n = 3).

La tasa aritmética de supervivencia (ASR) se expresó de acuerdo a como se muestra en la Ecuación 3.1.

$$\mathrm{ASR} = \frac{(\mathrm{UFC/mL})_{\mathrm{lf}}}{(\mathrm{UFC/mL})_{\mathrm{cl}}} \quad \mathrm{x} \quad 100 \qquad [3.1]$$

donde lf corresponde al cultivo liofilizado y cl corresponde al cultivo líquido, previo a la liofilización.

La tasa logarítmica de supervivencia (LSR) fue también determinada de acuerdo a la Ecuación 3.2

$$LRS = \frac{[\log_{10}(UFC/mL)]_{lf}}{[\log_{10}(UFC/mL)]_{cl}} \quad x \quad 100 \qquad [3.2]$$

3.2.4.-Fabricación y manipulación de los electrodos

Los ensayos electroquímicos (CA y CV) fueron realizados empleando un sistema de 3 electrodos. En este Capítulo se utilizaron electrodos de diferentes materiales y se combinaron en diferentes configuraciones (Tabla 3.2). Los RE de $Ag/AgCl_{sat}$ fueron fabricados semanalmente y su potencial verificado contra un RE patrón comercial de $Ag/AgCl_{sat}$ antes de su uso.

Tabla 3.2: Electrodos (WE, RE y CE) de diferentes materiales empleados en este Capítulo. La combinación de los distintos electrodos más la condición de medición, estática o hidrodinámica, dió lugar a distintos sistemas electroquímicos.

Condición (Sistema electroquímico)	WE (área)	RE	CE
Estática (Es_1)	Pt (0,196 mm^2)	$Ag/AgCl_{sat}$	Acero inoxidable
Estática (Es_2)	Tinta de carbón (4 mm^2)	$Ag/AgCl_{sat}$	Acero inoxidable
Estática (Es_4)	Tinta de Au (0,785 mm^2)	$Ag/AgCl_{sat}$	Tinta de Au
Hidrodinámica (Di_1) (agitador magnético, 750 rpm)	Pt (0,196 mm^2)	$Ag/AgCl_{sat}$	Acero inoxidable
Hidrodinámica (Di_2) (micromotor, 10000 rpm)	Tinta de Au (0,785 mm^2)	Tinta de Au	Tinta de Au
Hidrodinámica (Di_3) (micromotor, 10000 rpm)	Tinta de Au (0,785 mm^2)	$Ag/AgCl_{sat}$	Tinta de Au
Hidrodinámica (Di_4) (minitorno, 6500 rpm)	Tinta de Au (0,785 mm^2)	$Ag/AgCl_{sat}$	Tinta de Au

El sistema Es_1 (WE de Pt, RE de $Ag/AgCl_{sat}$ y CE de acero inoxidable, en condiciones estacionarias) fue utilizado como referencia para estudiar el metabolismo de los cultivos liofilizados así como para estudiar la reproducibilidad de la implementación de la

convección forzada, dado que había sido empleado en el Capítulo 2 con buenos resultados.

Los electrodos de tinta de Au y de tinta de carbón fueron realizados por la técnica de *screen-printing* en capa gruesa (Figura 3.2). La tinta de oro (pasta comercial organo-metálica de Au, ESL D8083) fue impresa en un sustrato de α-Al_2O_3 (alúmina 96%), utilizando una impresora EKRA Microtonic-II y secada a 125 °C durante 15 min.

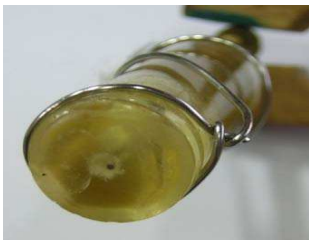
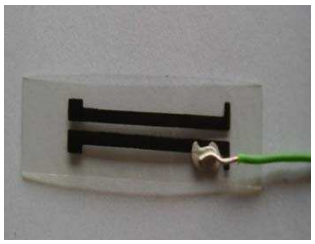
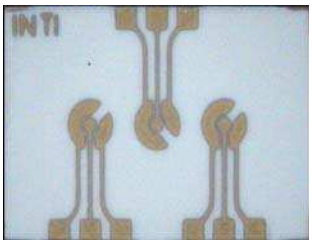
A  B  C 

Figura 3.2: Diferentes WE utilizados en este trabajo. A) Pt de 0,196 mm^2; B) Tinta de carbón, por *screen-printing*, de 4 mm^2; C) Tinta de Au, por *screen-printing*, de 0,785 mm^2.

Los electrodos fueron lavados con agua destilada antes de realizar cada medición. Luego de realizar cada medición los electrodos de trabajo fueron lavados con agua destilada y etanol (50:50) y se pulieron manualmente (pulido húmedo) durante 2 min con alúmina (1 y 0,3 μm). En el caso de los electrodos de tinta de Au, los tres electrodos fueron pulidos suavemente de forma manual, dado que los tres son de Au y están en el mismo plano.

La condición hidrodinámica del sistema electroquímico Di_1 consistió en la convección forzada mediante agitación magnética de la muestra (a 750 rpm), agitación constante sin generación de vórtice. En los sistemas Di_2 y Di_3, la convección forzada fue realizada a través del uso de un electrodo vibratorio. En las condiciones Di_2 y Di_3 el electrodo de tinta de Au se colocó en contacto con un micromotor (como los utilizados en los teléfonos celulares) que gira a 8500 ± 2000 rpm, conectado a 1,5 V. En la condición Di_4 el electrodo de tinta de oro se hizo vibrar mediante un minitorno Dremel a 6500 ± 2100 rpm, conectado a 220 V.

3.2.5.-Ensayos de cronoamperometría, CA

Las mediciones fueron realizadas bajo condiciones estáticas o hidrodinámicas y se registraron las corrientes de manera continua en muestras ubicadas en placas multipozo de 12 pocillos conteniendo cada uno 2 mL de muestra. Las incubaciones fueron realizadas a 37 °C.

En las condiciones estáticas (sistemas Es_1 y Es_2) la placa multipozo se agitó circularmente de forma manual, se colocaron los electrodos y se dejó reposar 1 min antes de realizar la medición. Luego se aplicó un potencial de +500 mV (WEs de Pt y de Au) o +600 mV (WE de tinta de carbón) a cada muestra durante 10 s, contra el respectivo RE (en todos los casos, la corriente límite instantánea fue utilizada como dato analítico, es decir, el valor de corriente correspondiente al segundo 10).

En las condiciones de convección forzada (hidrodinámicas) se aplicó un potencial de +500 mV durante 45 s contra los respectivos RE. Se realizó un promedio de las corrientes obtenidas en los últimos 20 s de aplicación del potencial, dado que en condiciones de convección forzada la corriente alcanza un *plateau* porque la concentración de ferrocianuro se mantiene constante en las cercanías del electrodo, siempre y cuando el ferrocianuro consumido durante la aplicación del potencial sea despreciable frente a la concentración de ferrocianuro en el seno de la muestra (como sucede en nuestro caso). La media de los valores obtenidos fue utilizada como dato analítico.

3.2.6.-Consideraciones generales de las muestras con *K. pneumoniae*

Los niveles basales de reducción de ferricianuro, que pueden ocurrir por fenómenos no biológicos durante la incubación o durante el tiempo de almacenamiento de la solución madre de ferricianuro, fueron obtenidos a partir de la medición de muestras preparadas en ausencia de material biológico (blancos). El metabolismo microbiano endógeno, fue cuantificado a partir de muestras conteniendo bacterias, pero sin fuente de carbono agregada. Por último, el metabolismo total fue cuantificado en muestras con alguna fuente de carbono agregada al medio. La cuantificación del metabolismo endógeno y total fue realizada para cada cultivo liofilizado ensayado en este Capítulo.

Todas las muestras fueron preparadas en MM. Los datos presentados en este Capítulo corresponden al metabolismo exógeno del material biológico (exógeno = total – endógeno), con algunas excepciones detalladas en cada caso particular.

3.2.7.-Actividad metabólica de *K. pneumoniae* luego de la liofilización. Curvas de calibración de patrones de GGA y $OECD_{std}$

Los ensayos cronoamperométricos fueron realizados con 2 mL de muestra, luego de incubar las bacterias en presencia de ferricianuro durante 2 h a 37 ± 1 °C, en presencia de distintas concentraciones de GGA u $OECD_{std}$. Las muestras contenían ferricianuro (6,25 g/L)

y diferentes cultivos liofilizados de *K. pneumoniae* (0,71 ± 0,05 mg/mL, peso equivalente al peso seco que se corresponde con una DO_{600} = 1 en un cultivo líquido). La reducción microbiana de ferricianuro fue finalizada con el agregado de formol, en una concentración final de 2% m/v.

3.2.8.-Ensayos de voltametría cíclica, CV

Los experimentos se realizaron en muestras de 5 mL (n = 2) conteniendo ferricianuro, en presencia o no de *K. pneumoniae* liofilizada y alguna fuente de carbono o ninguna (se detalla en cada caso la composición de las muestras). Las muestras conteniendo *K. pneumoniae* fueron incubadas por 2 h a 37 °C, centrifugadas posteriormente a 900 *g* y medidas electroqu-imicamente.

Las mediciones fueron realizadas en condiciones estáticas e hidrodinámicas registrándose la variación de corriente al aplicar una rampa de potencial, (de -500 mV a +600 mV) a 50 mV/s, salvo excepciones detalladas en cada caso en particular.

En las condiciones estáticas, cada muestra se agitó de manera circular, se colocaron los electrodos y se dejó en reposo durante 2 min ("*quiet time*") antes de realizar cada medición.

En las condiciones hidrodinámicas, se encendió el sistema de convección forzada, utilizado en cada caso, 1 min antes de aplicar el potencial a cada muestra y se mantuvo encendido durante la medición.

3.2.9.-Curva de calibración de ferrocianuro

2 mL de muestras conteniendo 6,25 g/L de ferricianuro en MM fueron medidas por CA luego de agregar distintas concentraciones de ferrocianuro (n = 2). Estas curvas fueron realizadas en condiciones estáticas e hidrodinámicas.

3.2.10.-Equipamiento utilizado

Las mediciones de DO fueron realizadas con un espectrofotómetro Kontron Uvikon 710 (Zurich, Suiza). Los pellets bacterianos fueron obtenidos con una microcentrífuga Cavour VT 1216 (Buenos Aires, Argentina) a 14000 *g* o una centrifuga Sorvall RC-5B, GMI Inc (Minesota, US) a 900 *g*.

Los liofilizados fueron realizados en un liofilizador Rificor L-05 (Buenos Aires, Argentina), por cortesía de la Dra. Sandra Ruzal y su equipo, del laboratorio de Estudios de Estrés Osmótico en Bacterias Gram Positivas.

Las mediciones cronoamperométricas fueron realizadas utilizando un potenciostato ISKRA Polarograh modelo MA 5450 (Kranj, Yugoslavia). La adquisición continua de datos fue realizada utilizando un voltímetro Fluke-289 (Fluke corporation, WA, US) conectado a un output analógico del ISKRA y a una PC a través de un conector USB.

Las mediciones de voltametría cíclica fueron realizadas utilizando un potenciostato Potentiostat/Galvanostat/ZRA (Series G 300™ from Gamry Instruments Inc. Warminster, USA)

3.2.11.-Análisis estadístico

Los desvíos estándar informados fueron calculados de acuerdo a la Ecuación 2.5 (ver Sección 2.2.17). Los valores informados o graficados responden a la forma $\bar{x} \pm DS_{(n-1)}$.

3.3.-RESULTADOS

3.3.1.-Supervivencia de *K. pneumoniae* luego de la liofilización

La tasa de supervivencia de cada cultivo liofilizado de *K. pneumoniae* fue determinada luego de 1 día de realizado el proceso y luego de 20 y 35 días de almacenamiento a -20 °C (Tabla 3.3). El porcentaje de supervivencia de un tratamiento determinado es habitualmente calculado de dos maneras, como el número de células viables (UFC/mL) antes y después del liofilizado, en un cálculo aritmético (ASR) o bien, la tasa de supervivencia se puede calcular considerando la proporción del logaritmo de la cantidad de células viables (LSR) antes y después del proceso (Morgan et al., 2006), en la Tabla 3.3 presentamos el ASR y el LSR calculado para cada cultivo liofilizado, de manera de poder realizar comparaciones adecuadas con otros autores, y relacionarlas con el estudio electroquímico del metabolismo remanente en esos liofilizados (capacidad de reducir ferricianuro en relación con la concentración de fuente de carbono), de manera de poder usar alguno de ellos en el bioensayo propuesto para la determinación rápida de BOD.

Dado que algunos autores han probado que las condiciones de estrés durante el cultivo, promueven la síntesis natural de productos osmolitos (Csonka, 1989; Madkour et

al., 1990) y que el glicerol puede difundir libremente a través de la membrana (Csonka, 1989), probamos cultivar *K. pneumoniae* en presencia de una alta concentración de glicerol (20% v/v en LB, cultivo B) para observar si esta condición permitía obtener un liofilizado de alta supervivencia y/o buena actividad metabólica, sea porque promoviera la síntesis natural de osmolitos o porque el glicerol, al difundir en su interior, funcionara como crioprotector. Sin embargo, sólo obtuvimos un producto liofilizado adecuado luego de liofilizar el pellet lavado proveniente del cultivo B; el liofilizado B_1, proveniente del pellet no lavado del cultivo B presentó una consistencia pastosa, que impidió su correcta manipulación, por lo que fue descartado.

Tabla 3.3: Tasas de supervivencia aritmética y logarítmica (como se encuentran definidas en la Sección 3.2.3) de diferentes cultivos liofilizados de *K. pneumoniae* (n = 3). Los valores de ASR se han informado como $\overline{x} \pm DS_{(n-1)}$. Sólo se informa la media de los LSR. Los valores informados fueron calculados luego de [a]1, [b]20 o [c]35 días de liofilizar (ver también Tabla 3.1). ND: no determinado. NC: no concluyente.

Cultivos liofilizados	[a]ASR %	[a]LSR %	[b]ASR %	[c]ASR %
A_1	0,17 ± 0,01	73,8	ND	ND
A_2	6,2 ± 0,1	86,7	3,3 ± 0,1	ND
A_3	9,8 ± 0,2	89,0	3,3 ± 0,2	ND
A_4	35,1 ± 4,1	95,5	27,5 ± 2,3	21,2 ± 0,6
A_5	31,0 ± 1,8	92,0	NC	28,0 ± 1,8
A_6	35 ± 1	95,0	NC	31 ± 1
B_1		No se obtuvo producto liofilizado		
B_2	4,9 ± 0,5	86	ND	ND

En la Tabla 3.3 se observa que en general la supervivencia luego de la liofilización fue mayor si los pellets eran lavados antes del agregado de los crioprotectores. También puede observarse que se obtuvo una mejor ASR si *K. pneumoniae* era cultivada en agitación en LB (cultivo A). Los crioprotectores que permiten obtener una tasa de supervivencia mayor de *K. pneumoniae* luego de liofilizar son las soluciones de leche-MSG (liofilizado A_4) y trehalosa (liofilizados A_5 y A_6, en este caso no hay diferencia si el LB del cultivo líquido se elimina o no antes de agregar la trehalosa y liofilizar). Dado que el DS del recuento de algunos liofilizados fue superior al 20%, preferimos informar los ASR como no concluyentes.

El ensayo para estudiar la condición metabólica de los distintos liofilizados consistió en realizar determinaciones cronoamperométricas de muestras conteniendo los distintos liofilizados e incubarlas en presencia de distintas concentraciones de GGA u $OECD_{std}$ (curvas de calibración de GGA y $OECD_{std}$) y comparar los resultados con los obtenidos en determinaciones amperométricas, también utilizando GGA u $OECD_{std}$, de cultivos líquidos de *K. pneumoniae* (presentado en el Capítulo 2). El medio de rehidratación utilizado para recuperar los cultivos liofilizados (MM) no tenía ninguna fuente de carbono.

3.3.2.-Actividad metabólica de *K. pneumoniae* luego de la liofilización

Los estudios con los cultivos liofilizados se realizaron con la finalidad de emplear el más adecuado como material biológico de un bioensayo metabólico para la determinación rápida de BOD, y por lo tanto era imprescindible que el estado metabólico celular se mantuviera luego de la liofilización y la conservación del cultivo, para esto se consideró la capacidad de reducción de ferricianuro de un cultivo líquido de *K. pneumoniae* incubado en presencia de alguna fuente de carbono, como estado metabólico óptimo. Dado que los sobrevivientes podrían estar metabólicamente dañados, luego de la liofilización se realizaron los ensayos de actividad metabólica el día de finalización de la liofilización (Figura 3.3).

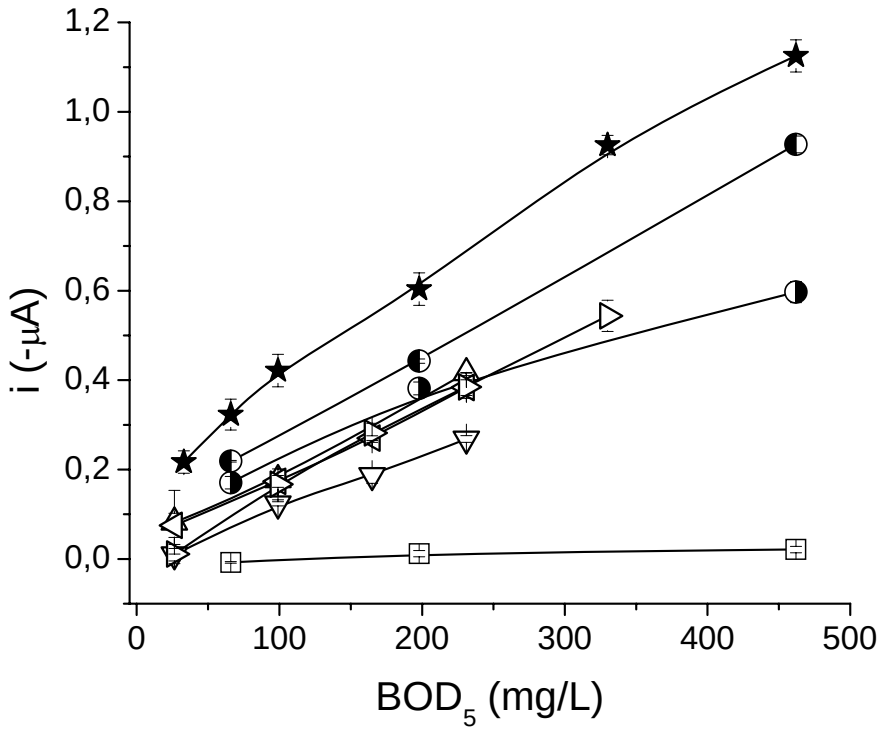


Figura 3.3: Curvas de calibración utilizando GGA como única fuente de carbono. Los ensayos de CA fueron realizados utilizando un WE de Pt (sistema Es_1) y distintos cultivos liofilizados de *K. pneumoniae*, A_1 (△), A_2 (▽), A_3 (◁), A_4 (▷), A_5 (◐), A_6 (◑), B_2 (□), o un cultivo líquido (★). Los valores representan $\bar{x} \pm DS_{(n-1)}$ del metabolismo exógeno (n = 3).

La sensibilidad del ensayo de calibración de BOD puede ser definida como la pendiente de la recta de calibración, en el rango lineal de la misma. Para los liofilizados A_1, A_4 y A_5 la sensibilidad fue de 1,66; 1,88 y 1,80 nA L/mg BOD_5, respectivamente, y fue comparable a la obtenida con el cultivo líquido de *K. pneumoniae* (2,11 nA L/mg BOD_5).

Pero la utilización de GGA como fuente de carbono puede no ser una buena opción para determinar una adecuada actividad metabólica de cada liofilizado para su uso como material biológico del bioensayo rápido para BOD propuesto, debido a la complejidad de composición que suelen presentar las muestras de aguas reales.

Por lo tanto se seleccionaron algunos de los cultivos liofilizados, estudiados en presencia de GGA, y se estudió su actividad en presencia de $OECD_{std}$ al finalizar la liofilización (Figura 3.4).

Se observó en la Figura 3.3 que, si bien el liofilizado A_6 presentó una pendiente similar a la del liofilizado A_5, parece perder la linealidad luego de los 200 mg BOD_5/L.

Obtener el liofilizado A_5 requirió de menor cantidad de pasos que obtener el liofilizado A_6 y el liofilizado A_5 presentó una actividad metabólica muy similar a la del cultivo líquido de *K. pneumoniae*, por lo tanto sólo se utilizó este liofilizado, de los que tenían trehalosa, en presencia de $OECD_{std}$ como fuente de carbono, para estudiar su capacidad metabólica. No se evaluó el metabolismo en presencia de $OECD_{std}$ de los liofilizados A_1 ni B_2. Distintos cultivos liofilizados A_1 presentaron comportamientos irreproducibles al metabolizar GGA (así como presentó una sensibilidad de 1,66 nA L/mg BOD_5 en una ocasión, en otra, su sensibilidad fue de 0,55 nA L/mg BOD_5). El cultivo liofilizado B_2 no fue capaz de metabolizar GGA por lo tanto, consideramos que estaba metabólicamente dañado.

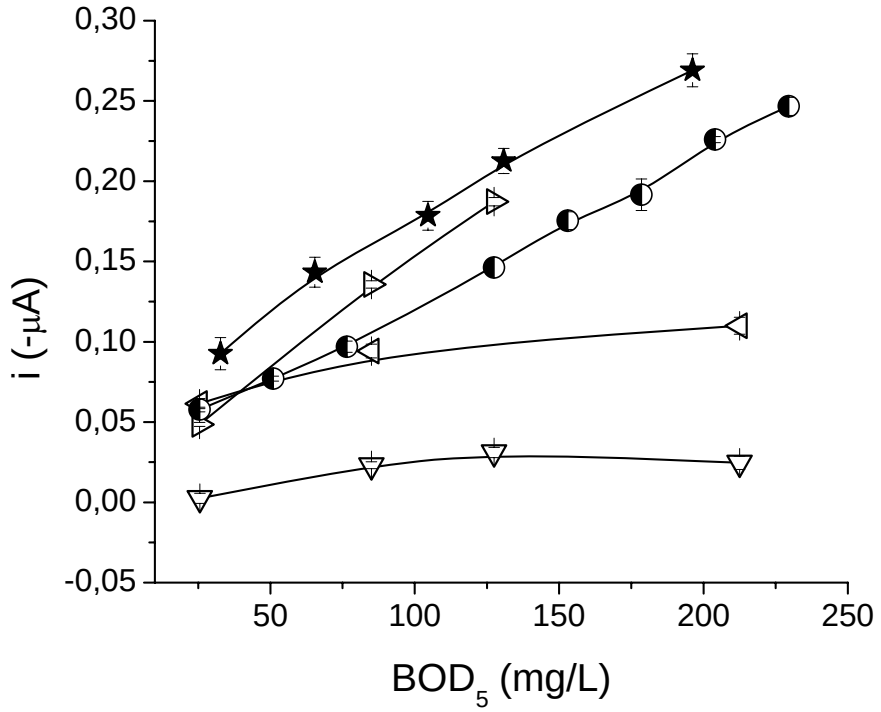


Figura 3.4: Curvas de calibración utilizando $OECD_{std}$ como fuente de carbono. Ensayos cronoamperométricos medidos con un WE de Pt, sistema Es_1, utilizando distintos cultivos liofilizados de *K. pneumoniae*, A_2 (▽), A_3 (◁), A_4 (▷), A_5 (◐), o un cultivo freso (⋆). Los valores representan $\overline{x} \pm DS_{(n-1)}$ del metabolismo exógeno (n = 3).

Los liofilizados A_4 y A_5 fueron capaces de utilizar $OECD_{std}$ como fuente de carbono y ferricianuro como aceptor de electrones. La sensibilidad del bioensayo fue comparable al utilizar los liofilizados A_4 y A_5 (1,37 y 0,94 nA L/mg BOD_5) y el cultivo líquido (1,06 nA L/mg BOD_5). El liofilizado A_5 también presentó un rango lineal similar al que presentó el cultivo líquido de *K. pneumoniae* (de 25 a 200 mg/L de BOD_5). Los liofilizados A_2 y A_3 no

fueron adecuados para el diseño del bioensayo propuesto aquí, ya que presentaron menor sensibilidad respecto del cultivo líquido (30 y 50%, respectivamente), al incubarlos con $OECD_{std}$.

De manera de estandarizar los ensayos, se utilizó la misma cantidad de liofilizado en los ensayos metabólicos de cada liofilizado, pero dependiendo del crioprotector utilizado, los distintos liofilizados presentaron distinta tasa de supervivencia y por lo tanto la cantidad de UFC presente en cada experimento metabólico fue distinta. Por lo tanto planteamos un índice metabólico (M/C), calculado mediante la Ecuación 3.3, que permitiera considerar realmente la actividad metabólica de los liofilizados en cada bioensayo y poder compararlo con el cultivo líquido

$$\mathrm{M/C} = \frac{[\mu\mathrm{g\ ferrocianuro} \quad / \quad (\mathrm{UFC} \quad * \quad \mathrm{mgBOD_5})]_{\mathrm{lf}}}{[\mu\mathrm{g\ ferrocianuro} \quad / \quad (\mathrm{UFC} \quad * \quad \mathrm{mgBOD_5})]_{\mathrm{cl}}} \qquad [3.3]$$

siendo lf el cultivo liofilizado y cl el cultivo líquido.

Para realizar el cálculo de este índice se utilizó el valor de la pendiente de una curva de μg ferrocianuro *vs* UFC x mg BOD_5 de cada cultivo liofilizado y de la curva correspondiente al cultivo líquido. A partir de los ensayos de CA mostrados en las Figuras 3.3 y 3.4, y la curva de calibración de ferrocianuro realizada en el Capítulo 2, Sección 2.3.3, se calcularon los μg de ferrocianuro producidos por cada cultivo liofilizado en presencia de distintas concentraciones de fuentes de carbono luego de 1 día después de liofilizar (considerando las UFC correspondientes). En la Tabla 3.4 se comparan los índices M/C obtenidos, de los cultivos liofilizados.

Tabla 3.4: Índice M/C utilizando GGA u $OECD_{std}$ como fuentes de carbono. Entre paréntesis se presenta el rango lineal obtenido al realizar las curvas de calibración para cada liofilizado, en mg BOD_5/L. ND: no determinado.

Cultivo liofilizado	Indice M/C (GGA)	Indice M/C ($OECD_{std}$)
A_1	6,4 (25-250)	ND
A_2	2,4 (25-250)	1,1 (25-125)
A_3	1,5 (25-250)	1,1 (25-85)
A_4	0,9 (25-330)	1,3 (25-220)
A_5	4,6 (60-450)	0,38 (25-220)
A_6	2,2 (60-200)	ND

Se observa en la Tabla 3.4 que los índices obtenidos con el cultivo A_4, sea utilizando GGA u $OECD_{std}$, se encuentran cercanos a 1, indicando que la actividad metabólica presente en los ensayos se corresponde con el n° de UFC o, dicho de otro modo, la mayoría de las UFC presentes en el liofilizado se encuentran metabólicamente activas (y, al menos en teoría, esto sería exactamente lo que pasa al utilizar un cultivo líquido en fase exponencial, todas las UFC estarían metabólicamente activas siendo su índice M/C = 1). Por lo tanto, la utilización de leche-MSG (leche suplementada con glutamato de sodio) permite obtener un cultivo liofilizado de *K. pneumoniae* con el metabolismo casi intacto.

Los índices M/C calculados para el liofilizado A_5 con GGA y con $OECD_{std}$ son bastante distintos de 1, pero este liofilizado fue el único que presentó, con ambas fuentes de carbono, un rango lineal similar al que se obtiene con el cultivo líquido de *K. pneumoniae*.

Los rangos lineales obtenidos con los liofilizados A_2 o A_3 fueron menores al obtenido con el cultivo líquido. El índice M/C (GGA) correspondiente al liofilizado A_1 no fue tenido en cuenta dado que las condiciones de liofilización de este cultivo dieron resultados no reproducibles.

De acuerdo a los resultados obtenidos, realizamos entonces estudios de la actividad metabólica de los liofilizados A_4 y A_5 luego de 35 días de almacenamiento a -20 °C. En la Tabla 3.5 se presentan las sensibilidades normalizadas [$(sensibilidad_{lf}/sensibilidad_{cl}) \times 100$] de cada ensayo de CA utilizando los liofiliados A_4 y A_5 y GGA u $OECD_{std}$ como fuente de carbono, luego de 1 o 35 días de liofilizar.

Tabla 3.5: Sensibilidades normalizadas de los cultivos liofilizados A_4 y A_5 utilizando GGA u $OECD_{std}$ como fuente de carbono (n = 3).

Cultivos liofilizados	Sensibilidades normalizadas, GGA		Sensibilidades normalizadas, $OECD_{std}$	
	Luego de 1 día	Luego de 35 días	Luego de 1 día	Luego de 35 días
A_4	86,3	79,6	115	79,2
A_5	85,3	66,8	44,5	33,7

En la Tabla 3.5 puede observarse que el uso de leche-MSG (cultivo liofilizado A_4) permitió obtener un liofilizado con mejores condiciones metabólicas que el uso de trehalosa (A_5), luego de 35 días de almacenamiento del producto.

El uso de cualquiera de los dos crioprotectores permite obtener un rango lineal similar al obtenido utilizando un cultivo líquido de *K. pneumoniae* (de 30 a 500 mg

BOD_5/L utilizando GGA y de 25 a 200 mg BOD_5/L utilizando OECD), aún cuando la utilización de ambos liofilizados hace que el bioensayo pierda algo de sensibilidad luego de 35 días de almacenamiento.

3.3.3.-Ensayos con convección forzada

Dado que los liofilizados A_4 y A_5 fueron capaces de reducir ferricianuro al metabolizar GGA y $OECD_{std}$ permitiendo obtener un bioensayo de rango lineal y sensibilidad similares a los obtenidos con un cultivo líquido de *K. pneumoniae*, el paso siguiente en la mejora del diseño de este bioensayo rápido para BOD fue estudiar el comportamiento de electrodos realizados por *screen-printing*. Esta es una técnica industrial de producción que permite obtener electrodos de bajo costo, lo que permitiría implementar en el bioensayo $BOD_{K.\ pneumoniae}$, el uso de electrodos descartables. Sin embargo, en los siguientes experimentos, algunos de los electrodos fueron reutilizados dado que fueron poducidos en poca cantidad.

El INTI (Dra. Liliana Fraigi y su equipo de trabajo, del Centro de Electrónica e Informática) diseñó y construyó un sistema vibratorio acoplado a un sistema de 3 electrodos de tinta de Au realizados por *screen-printing* (Figura 3.2 C y Figura 3.5). Con este sistema se realizó una caracterización electroquímica de su comportamiento en una solución conteniendo ferrocianuro/ferricianuro 19 mM (de cada uno) en MM (Figura 3.6). A fines comparativos, esta muestra se midió también con el sistema Di_1, aplicando convección forzada a la muestra mediante agitación magnética (ver Sección 3.2.4 y Tabla 3.2 de este Capítulo para más detalles).

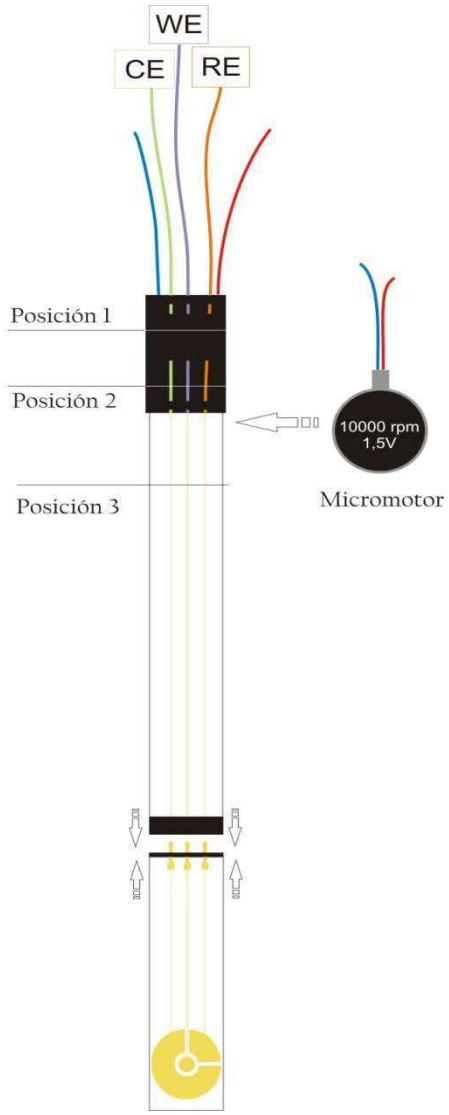


Figura 3.5: Esquema del electrodo vibratorio realizado por el INTI (y descripto en la Sección 3.2.4). Se indican las posiciones de fijación que se estudiaron (la distancia de las posiciones 1, 2 y 3, calculadas hasta el centro del WE, fueron de 10, 9 y 8 cm, respectivamente).

Dado que la convección forzada debe ser aplicada de manera adecuada para que permita obtener buenos resultados en los ensayos, en términos de flujo de la muestra hacia el electrodo, aparición de vórtices, generación de burbujas, etc (Bard y Faulkner, 2001), se estudió además, la distancia de fijación del electrodo vibratorio de Au (Sistema Di_2) (Figura 3.6).

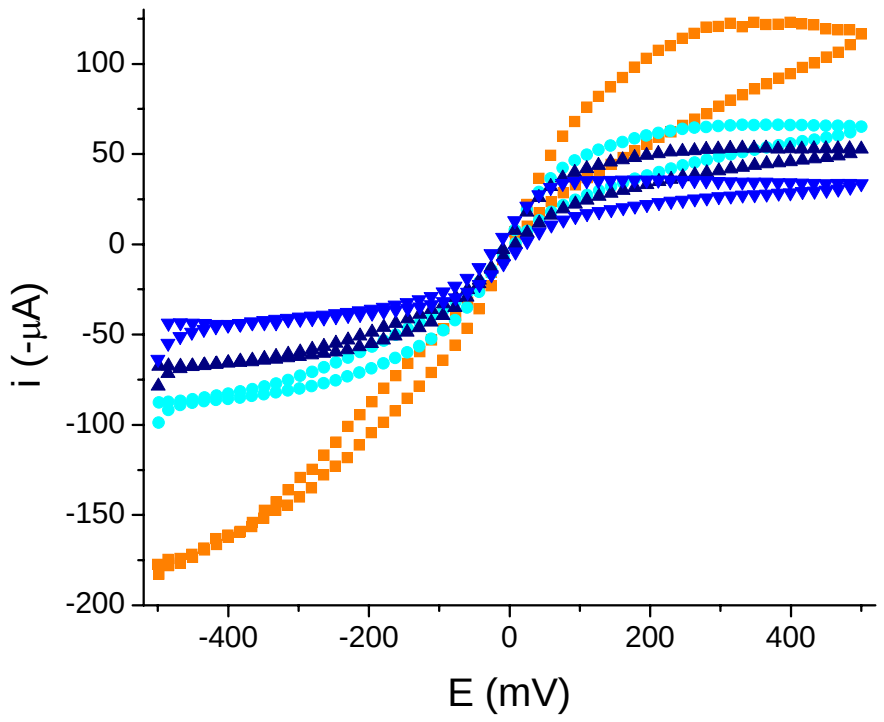


Figura 3.6: Voltametrías cíclicas de una solución conteniendo 6,25 g/L de ferricianuro y 8 g/L de ferrocianuro (ferricianuro/ferrocianuro 19/19 mM). Medición en condiciones hidrodinámicas empleando el sistema Di_1 (■), o Di_2 fijando el electrodo en distintas posiciones: posición 1 (●), posición 2 (▲), posición 3 (▼) según se detalla en la Figura 3.5 (rampa de potencial entre -500 y +500 mV, aplicada a una velocidad de barrido de 25 mV/s).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se consideró que el sistema Di_2 daba mejores resultados que el sistema Di_1 (ver en detalle cada sistema en la Tabla 3.2), y además, el mejor punto de fijación que se encontró para el electrodo vibratorio fue la posición 3 (ver Figura 3.5).

Posteriormente se realizó entonces una curva de calibración de GGA mediante cronoamperometría utilizando el cultivo liofilizado A_5 (ver detalles en Sección 3.2.5, 3.2.6 y 3.2.7 de este Capítulo) en condiciones hidrodinámicas utilizando el sistema Di_2 fijo en posición 3 (Figura 3.7).

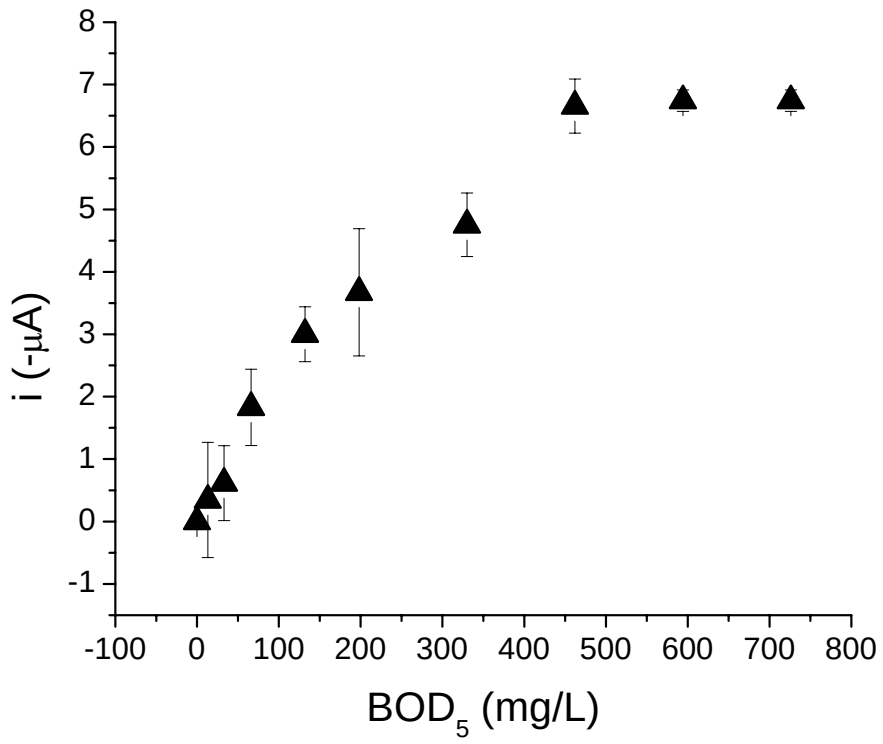


Figura 3.7: Curva de calibración utilizando GGA como fuente de carbono, el sistema electroquímico Di_2 fijo en posición 3 y el cultivo liofilizado de *K. pneumoniae* A_5.

Se observó un rango lineal entre 30 y 450 mg/L BOD_5, similar al obtenido con el sistema Es_1 y este mismo liofilizado (luego de estar almacenado a -20 °C por 20 días) (Sección 3.3.2) y una sensibilidad de 13,4 nA L/mg BOD_5 (r^2 = 0,986), aún cuando los DS fueron mayores a los obtenidos con el WE de Pt.

Estos resultados eran alentadores, por lo tanto se realizó una curva de calibración cronoamperométrica utilizando $OECD_{std}$ como fuente de carbono del liofilizado A_5 (este cultivo podía degradar tanto GGA como $OECD_{std}$ en 2 horas, reduciendo ferricianuro y era más fácil de realizar que el liofilizado A_4, con leche-MSG, por lo tanto teníamos mucha cantidad para realizar todos estos experimentos). Pero los resultados no fueron buenos. Los desvíos obtenidos fueron enormes (RSD entre 30 y 50%).

Este resultado nos hizo sospechar del desempeño del sistema Di_2, dado que sabíamos que el material biológico utilizado sí degradaba OECD. Sospechábamos que el uso de un RE (pseudoreferencia) de Au podía no ser una buena elección, de acuerdo con lo expuesto en el Capítulo 1, Sección 1.2.3, el RE debe mantener su potencial fijo independientemente de la solución medida. El potencial medido contra un electrodo de

pseudoreferencia depende de las concentraciones relativas de ferri y ferrocianuro, y en este caso la baja concentración de ferrocianuro puede hacer este sistema inviable.

Decidimos por lo tanto estudiar el sistema Es_4 (Tabla 3.2), reemplazando el RE (pseudoreferencia) de tinta de Au que tiene el sistema Es_3, por uno de $Ag/AgCl_{sat}$, que utiliza el sistema Es_4, y estudiamos el comportamiento de 3 sistemas de electrodos distintos, Es_1, Es_3 y Es_4 mediante voltametría cíclica (CV) de muestras conteniendo 6,25 g/L de ferricianuro, el liofilizado A_5 y la presencia o no de $OECD_{std}$ (Figura 3.8).

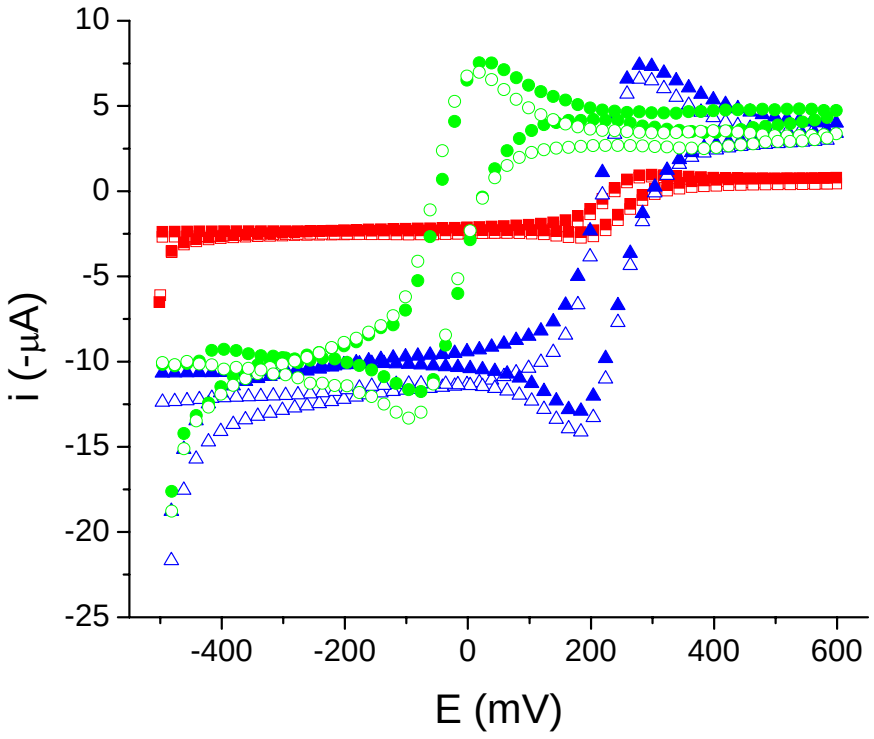


Figura 3.8: CV realizadas con los sistemas de medición estática, Es_1 (□ y ■), Es_3 (○ y ●), o Es_4 (△ y ▲), de muestras conteniendo ferricianuro, *K. pneumoniae* liofilizada, A_5, en ausencia (□, ○ y △) o presencia (■, ● y ▲) de $OECD_{std}$.

Se pudo observar que los picos correspondientes a la reducción del ferricianuro (pico catódico) y a la oxidación del ferrocianuro (pico anódico) obtenidos con el sistema Es_3 (RE de tinta de Au) se han desplazado a potenciales más negativos (los picos catódicos aparecen entre 14,7 y 29, 5 mV y los picos anódicos entre -100,8 y -80,3 mV) respecto de los obtenidos con los sistemas Es_1, que es nuestro sistema de electrodos de referencia (WE de Pt, RE de Ag/AgCl y CE de acero inoxidable), y Es_4 (también con RE de Ag/AgCl). El pico catódico se encuentra a 289 mV o a 281,6 mV utilizando el RE de Ag/AgCl y un WE

de Pt o de tinta de Au, respectivamente; el pico anódico se encuentra a 182 mV o a 183,6 mV.

De acuerdo a estos resultados, se continuó la búsqueda por mejorar la tecnología de nuestro bioensayo utilizando el sistema Di_3 (ver detalles en Tabla 3.2) fijado en la posición 3 y se estudió el desempeño del sistema mediante cronoamperometría hidrodinámica (Figura 3.9).

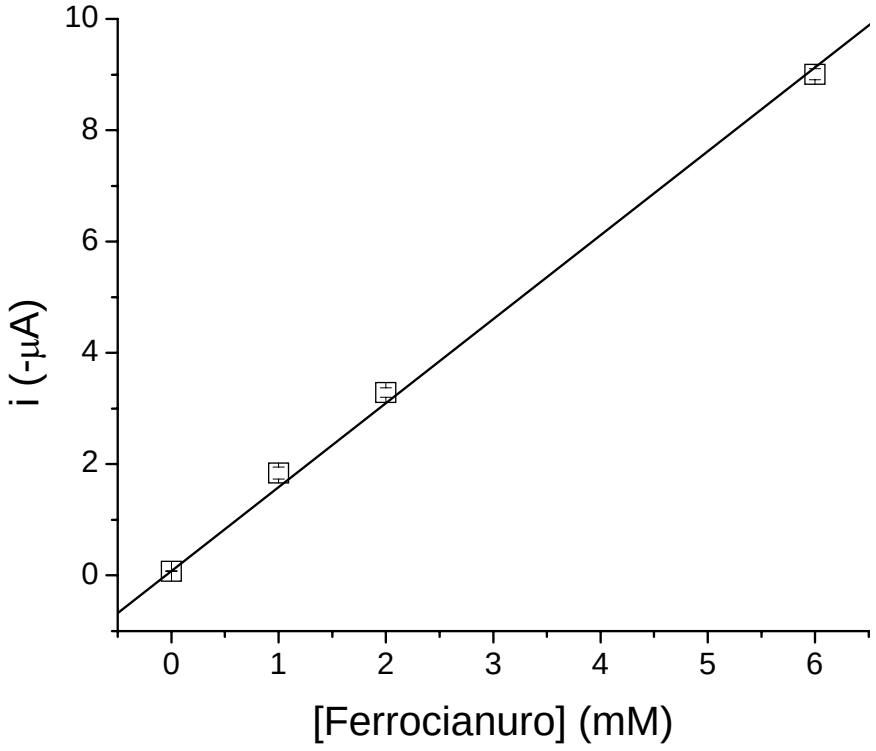


Figura 3.9: Curva de calibración de ferrocianuro realizada mediante CA hidrodinámica con el sistema Di_3 (r^2 = 0,999).

Dado que la linealidad obtenida fue buena en la calibración de ferrocianuro, se utilizó el sistema Di_3 para realizar una curva de calibración con $OECD_{std}$ y el liofilizado A_5 de *Klebsiella pneumoniae* (Figura 3.10).

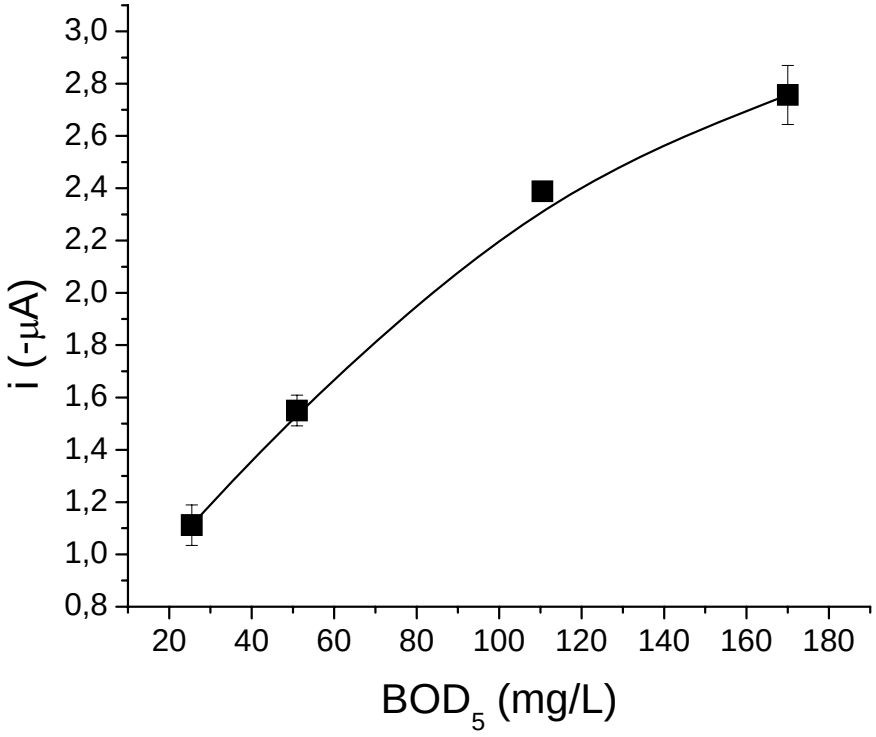


Figura 3.10: Curva de calibración realizada mediante CA, utilizando $OECD_{std}$ como fuente de carbono del liofilizado A_5, empleando el sistema electroquímico Di_3.

Se observa en la Figura 3.10 que el rango lineal obtenido al utilizar el sistema Di_3 (25 a 110 mg BOD_5/L) fue menor que el obtenido con el sistema Es_1 (20 a 200 mg BOD_5/L) aunque la sensibilidad fue buena, 15,2 nA L/mg BOD_5. Dado que con el liofilizado A_5 se logró detectar hasta 200 mg BOD_5/L con el WE de Pt, el problema de la disminución del rango lineal al utilizar el sistema Di_3 no estaba relacionado al metabolismo del liofilizado, por lo tanto sospechamos que el problema podía ser ocasionado por el sistema vibratorio del sistema Di_3.

Como último intento de mejorar el desarrollo de nuestro bioensayo, realizamos algunas pruebas para ver si el sistema vibratorio que presentaba el sistema Di_3 podía mejorarse implementando un nuevo modo de vibración, el sistema Di_4 (Figura 3.11).

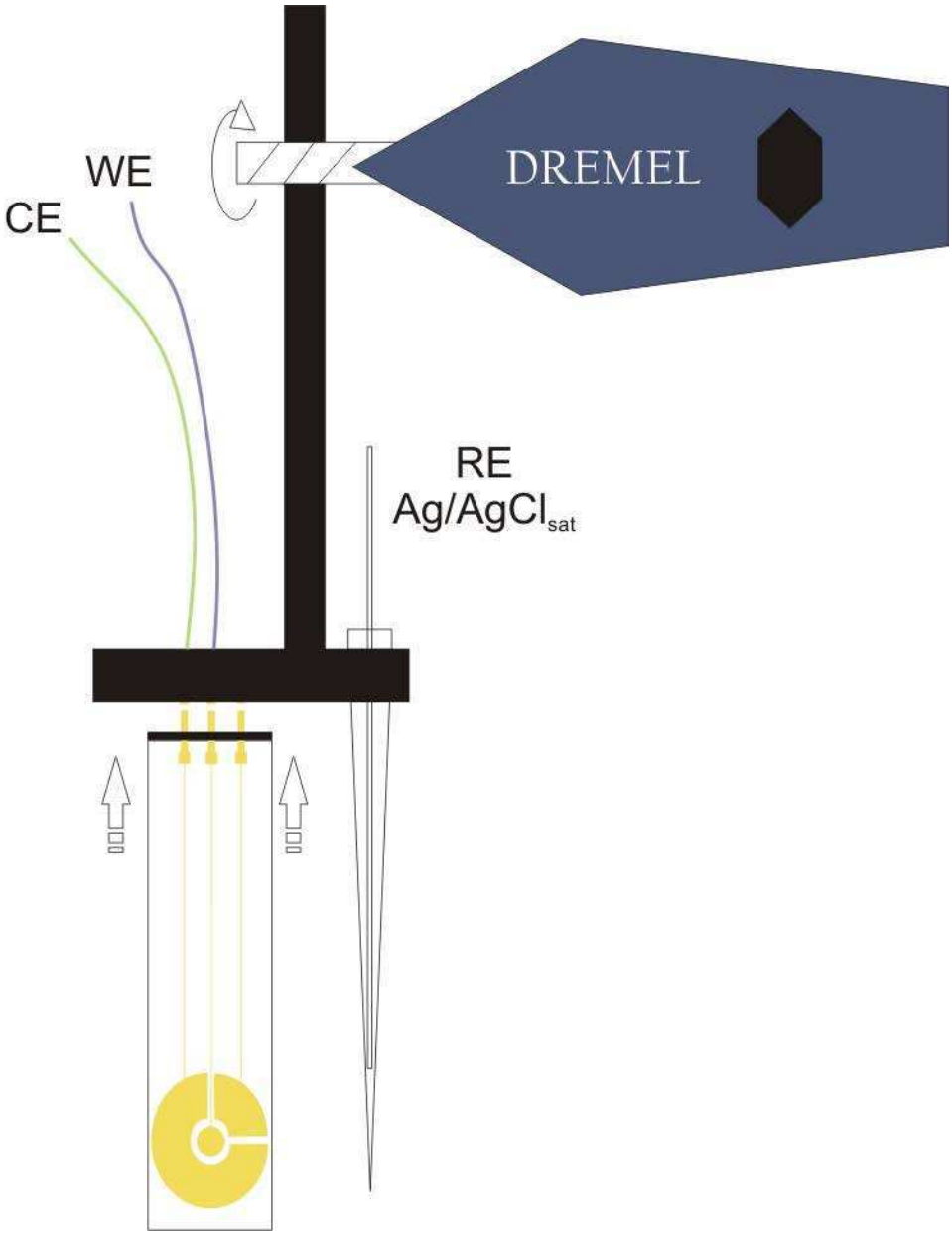


Figura 3.11: Esquema del sistema electroquímico Di_4.

Se realizaron voltametrías cíclicas de una solución conteniendo 6,25 g/L de ferricianuro en MM aplicando distintas velocidades angulares del torno (0, 4750; 6500; o 10000 rpm) (Figura 3.12)

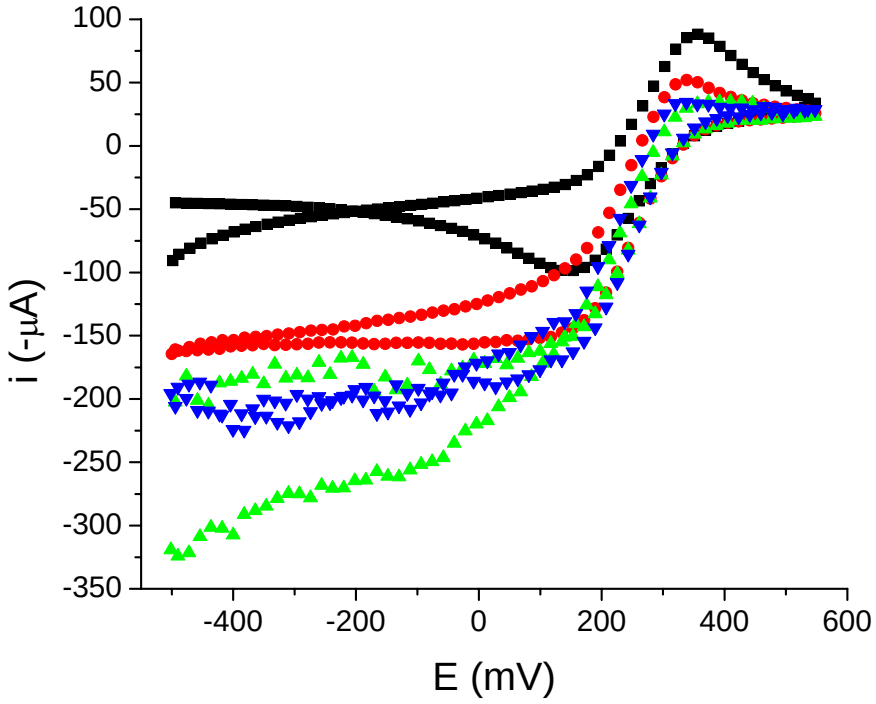


Figura 3.12: CV realizada con el sistema Di_4 de una muestra conteniendo 2,5 g/L de ferrocianuro y 13,2 g/L de ferricianuro en MM a distintas velocidades, 0 (■), 4750 rpm (●), 6500 rpm (▲), o 10000 rpm (▼).

De acuerdo a lo observado en la Figura 3.12, se eligió la velocidad de 6500 rpm (con la que se obtuvieron condiciones de menor ruido y relativamente buenas condiciones de mezclado) y se realizaron voltametrías cíclicas de muestras conteniendo 13,2 g/L de ferricianuro y distintas concentraciones de ferrocianuro (Figura 3.13) y una curva de calibración de ferrocianuro mediante cronoamperometría hidrodinámica (Figura 3.14).

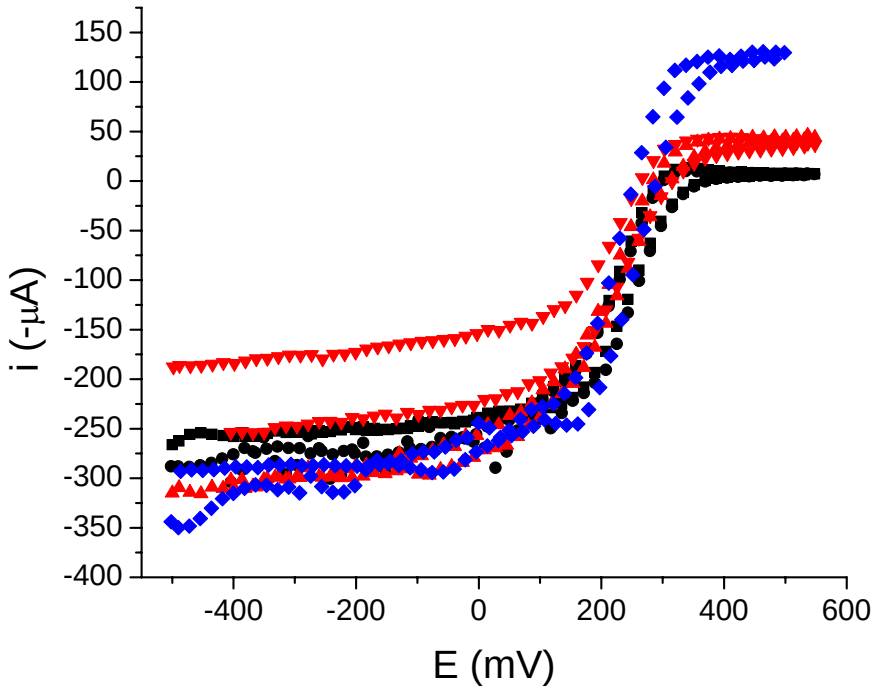


Figura 3.13: CV hidrodinámicas utilizando el sistema Di_4 (6500 rpm) de muestras conteniendo 13,2 g/L de ferricianuro y distintas concentraciones ferrocianuro 0 (■ y ●), 2,5 (▲ y ▼), o 8,5 (◆) g/L.

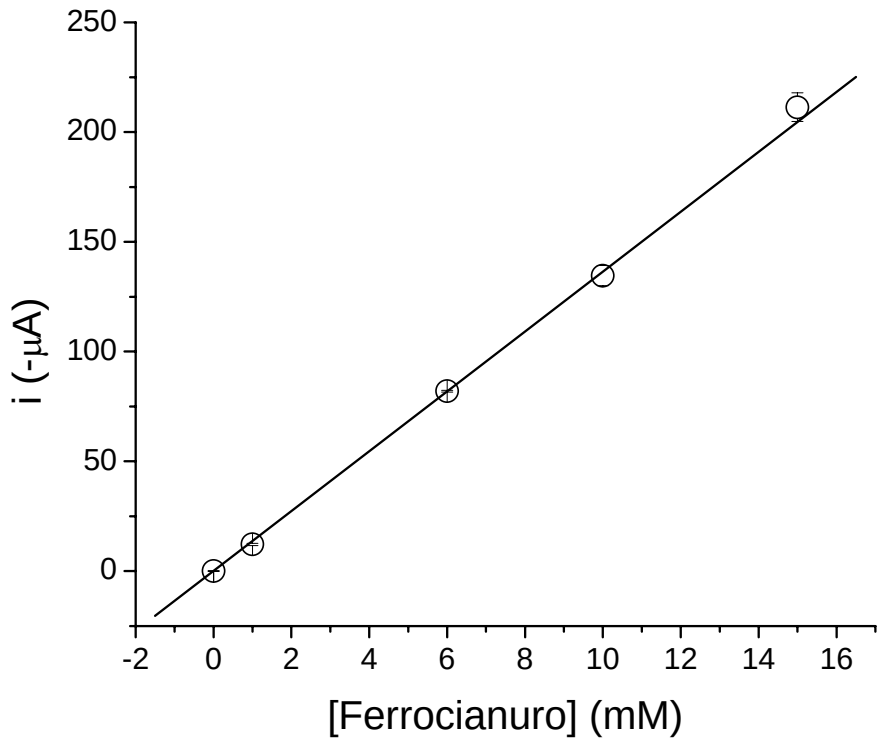


Figura 3.14: Curva de calibración de ferrocianuro realizada mediante CA hidrodinámica (aplicando +500 mV) con el sistema Di_4 (6500 rpm). y = 0,09054 + 13,6343 x. r^2 = 0,9999.

En las Figuras 3.13 y 3.14 puede observarse que el método de vibración que se utilizaba en el sistema Di_4, parece ser más adecuado para la convección forzada del analito, y por lo tanto para mantener constante la concentración de ferrocianuro cerca del electrodo, que el sistema Di_3 (Figura 3.9).

Cabe destacar que también se empleó un WE de tinta polimérica de carbono (sistema Es_2, ver Sección 3.2.4 de este capítulo) realizado por *screen-printing*. El uso del sistema Es_2 presentó grandes DS (RSD del 25-35%) al realizar curvas cronoamperométricas de calibración de $OECD_{std}$ con el cultivo liofilizado de *K. pneumoniae*, A_5 (ver detalles en la Sección 3.2.5) el rango lineal fue poco amplio, entre 100 y 130 mg BOD_5/L (no se muestran los datos) y por lo tanto no se siguió utilizando.

3.4.-DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las diferencias en la tasa de supervivencia de *K. pneumoniae* y la actividad metabólica obtenidas en este estudio indicaron que no todos los crioprotectores empleados fueron efectivos para la liofilización y el almacenamiento de esta cepa bacteriana.

El lavado de los pellets mejoró la tasa de supervivencia de todos los cultivos liofilizados (Tabla 3.3). No realizamos un estudio acerca de este fenómeno, pero creemos que el lavado puede favorecer la eliminación de metabolitos tóxicos acumulados durante el cultivo líquido de *K. pneumoniae*, dado que esto ha sido demostrado, con otras bacterias, en Landwall y Holme (1977).

Pero el procedimiento de lavado podría también, ocasionar daños estructurales y/o estrés celular, produciendo disminución de la actividad metabólica de los liofilizados obtenidos (Tabla 3.4 y Figuras 3.3 y 3.4). El mejor ejemplo de que un liofilizado puede presentar sobrevivientes con daño metabólico es el liofilizado B_2 que, a pesar de presentar un ASR del 5% (Figura 3.3), mostró una capacidad casi nula de metabolizar la glucosa presente en el estándar GGA, al menos durante las 2 h de incubación del bioensayo (y 20 min de rehidratación en MM) (Figura 3.3).

En cambio, el liofilizado A_2 presentó una ASR similar, y mejor capacidad metabólica. Por lo tanto hemos probado que luego de la rehidratación, los sobrevivientes pueden presentar daños serios en su metabolismo dependiendo del proceso de liofilización al cual se los someta, y esto podría ocasionar la obtención de valores erróneos, o la extensión en el tiempo del proceso de determinación de un bioensayo o biosensor metabólico, comprometiendo su desempeño.

Basándonos en la suposición presentada por Tan y Wu (1999) que plantea que los liofilizados podrían presentar una actividad enzimática remanente de los no-sobrevivientes (utilizando como criterio de sobreviviente la capacidad de crecimiento en medio sólido) a un determinado proceso, utilizamos una proporción de 1 (peso de liofilizado/peso seco de cultivo líquido) como concentración microbiana de los ensayos metabólicos realizados con cultivos liofilizados, y el índice M/C para analizar la eficacia de los liofilizados en dichos ensayos y poder compararlos con los ensayos metabólicos de un cultivo líquido de *K. pneumoniae*.

El índice M/C obtenido con el liofilizado A_5 fue de 4 cuando se utilizó GGA como fuente de carbono; esto podría estar asociado a una actividad enzimática remanente en este liofilizado capaz de utilizar GGA y reducir ferricianuro, además de la capacidad de las UFC de metabolizar GGA. Pero esto también podría estar indicando que luego de la

liofilización *K. pneumoniae* perdió la capacidad de crecer en placa de la misma manera que lo hacía antes de la liofilización, lo que haría que la ASR disminuya, pero aún mantiene la capacidad de metabolizar glucosa y utilizar ferricianuro como aceptor de electrones.

La solución $OECD_{std}$ parece requerir una maquinaria enzimática más compleja. El liofilizado A_5 presentó un índice M/C menor a 1; dado que el índice obtenido por este liofilizado al utilizar GGA fue de 4, no solo la maquinaria enzimática capaz de emplear GGA no puede degradar el $OECD_{std}$ sino que además muchas de las UFC no fueron capaces de metabolizar este estándar de calibración que contiene proteínas y sustancias orgánicas complejas (Tabla 3.4).

La pérdida de viabilidad luego de liofilizar una cepa puede no ser de mayor importancia si se quiere preservar una cepa microbiana, pero resulta crucial en el diseño de bioensayos/biosensores metabólicos de determinación rápida. El desarrollo de bioensayos para determinaciones *in-situ* requiere de la adecuada disposición del material biológico. Generalmente los bioensayos de toxicidad, utilizando bacterias luminosas, ya sean *wild-type* o bacterias genéticamente modificadas, utilizan material biológico liofilizado luego de un tiempo de rehidratación que va desde los 15 min y hasta no más de 2 h (Gu et al., 2001; ISO 11348-3 (E), 2007), pero no hemos encontrado resultados publicados acerca del uso de cultivos liofilizados para la determinación rápida de BOD. En este Capítulo demostramos que cultivos liofilizados de *K. pneumoniae* utilizando como sustancias crioprotectoras leche-MSG (adicionada con glutamato de sodio), cultivo A_4, o trehalosa, cultivo A_6, permiten obtener resultados reproducibles de curvas de calibración, realizadas mediante ensayos amperométricos, hasta 35 días después de liofilizarlas, manteniéndolas almacenadas a -20 °C.

Por otro lado, el uso de un electrodo de referencia de tinta de Au no parece ser adecuado en las condiciones estudiadas, pero el uso de electrodos WE y CE de tinta de Au realizados por screen-printing permitió obtener curvas de calibración con un rango lineal mayor al del ensayo BOD_5 (Figuras 3.7 y 3.10). Debería mejorarse el sistema de vibración e implementarse el uso de nuevos electrodos en cada ensayo, de manera de lograr mejorar la reproducibilidad de los experimentos.

3.5.-REFERENCIAS

Bard A., Faulkner L. (2001) "Methods involving forced convection-hydrodynamic methods" in: *Electrochemical methods, fundamentals and applications.* 2nd ed. Wiley. NY, US. Ch. 9

Bjerketorp J., Håkansson S., Belkin S., Jansson J.K. (2006) Advances in preservation methods: Keeping biosensor microorganisms alive and active. Curr Opin Biotechnol 17, 43-49

Chee G-J., Nomura Y., Ikebukuro K., Karube I. (2001) Biosensor for the evaluation of biochemical oxygen demand using photocatalytic pretreatment. Sens Actuators B Chem 80, 15-20

Csonka L.N. (1989) Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. Microbiol Rev 53, 121-147

Date A., Pasini P., Daunert S. (2007) Construction of spores for portable bacterial whole-cell biosensing systems. Anal Chem 79, 9391-9397

Domínguez Renedo O., Alonso-Lomillo M.A., Arcos Martínez M.J. (2007) Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. Talanta 73, 202-219

Farré M., Brix R., Barceló D. (2005) Screening water for pollutants using biological techniques under European Union funding during the last 10 years. Trends Anal Chem 24, 532-545

Gu M.B., Choi S.H., Kim S.W. (2001) Some observations in freeze-drying of recombinant bioluminescent *Escherichia coli* for toxicity monitoring. J Biotechnol 88, 95-105

ISO 11348-3 (E) (2007) Water quality-determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminiscent Bacteria Test)-Part 3: Method using freeze-dried bacteria. Geneva: International Organization for Standardization (ISO)

Kara S., Keskinler B., Erhan E. (2009) A novel microbial BOD biosensor developed by the immobilization of *P. syringae* in micro-cellular polymers. J Chem Technol Biotechnol 84, 511-518

Landwall P., Holme T. (1977) Removal of inhibitors of bacterial growth by dialysis culture. J Gen Microbiol 103, 345-352

Leslie S.B., Israeli E., Lighthart B., Crowe J.H., Crowe L.M. (1995) Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. Appl Environ Microbiol 61, 3592-3597

Liu J., Mattiasson B. (2002) Microbial BOD sensors for wastewater analysis. Water Res 36, 3786-3802

Madkour M.A., Tombras-Smith T.L., Smith G.M. (1990) Preferential osmolyte accumulation: a mechanism of osmotic stress adaptation in diazotrophic bacteria. Appl Environ Microbiol 56, 2876-2881

Martos G.I., Minahk C.J., Font de Valdez G., Morero R. (2007) Effects of protective agents on membrane fluidity of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. bulgaricus. Lett Appl Microbiol 45, 282-288

Morgan C.A., Herman N., White P.A., Vesey G. (2006) Preservation of micro-organisms by drying: a review. J Microbiol Methods 66, 183-193

Pasco N., Baronian K., Jeffries C., Webber J., Hay J. (2004) MICREDOX-development of a ferricyanide-mediated rapid biochemical oxygen demand method using an immobilized *Proteus vulgaris* biocomponent. Biosens Bioelectron 20, 524-532

Perry S.F. (1995) Freeze-drying and cryopreservation of bacteria. Methods Mol Biol 38, 21-30

Sakaguchi T., Morioka Y., Yamasaki M., Iwanaga J., Beppu K., Maeda H., Morita Y., Tamiy E. (2007) Rapid and onsite BOD sensing system using luminous bacterial cells immobilized chip. Biosens Bioelectron 22, 1345-1350

Sly L. (1992) Maintenance and preservation of microbial cultures in a laboratory culture collection. NATA Technical Note 14, 1-16

Tan T.C., Wu C. (1999) BOD sensors using multi-species living or thermally killed cells of a BODSEED microbial culture. Sens Actuators B Chem 54, 252-260

CAPÍTULO 4: DESARROLLO DE UN BIOSENSOR POTENCIOMÉTRICO SENSIBLE AL CO_2 BASADO EN LA INMOVILIZACIÓN DE MICROORGANISMOS PARA LA DETERMINACIÓN RÁPIDA DE BOD

4.1.-INTRODUCCIÓN

Dentro de las alternativas para la determinación rápida de BOD reportadas en la literatura, Vaiopoulou desarrolló un sistema para la determinación de BOD y COD basado en un biosensor microbiano respirométrico en el que el CO_2, producido por la degradación microbiana de los compuestos orgánicos, es medido utilizando un sensor infrarrojo de CO_2 (Vaiopoulou et al., 2005; Melidis et al., 2008), pero el sistema implementado es complejo, requiere el mantenimiento constante del pH y la saturación de O_2 y, por lo tanto, varios puntos de control; además este sistema no es fácilmente trasportable, si bien es propuesto para su utilización en el monitoreo *in-situ*.

Se han utilizado electrodos sensibles al CO_2 como transductores en sistemas biosensores basados en la inmovilización de enzimas o bacterias (Pellegrini et al., 2005; Cammaroto et al., 1998), para los analitos glucosa, piruvato, lisina, ácido glutámico y ácido úrico de manera exitosa. Ha sido también informada la construcción de biosensores microbianos conteniendo *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizados sobre electrodos sensibles a CO_2, como un método rápido y útil para cuantificar el agregado de azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa) a leche y otros productos lácteos (Cortón y Locascio, 1998).

Por lo tanto, se propuso como parte de este trabajo de Tesis la modificación de un electrodo de pH potenciométrico (ISE de membrana de vidrio) mediante una membrana permeable al CO_2 como un electrodo sensible al CO_2, Figura 4.1 (Kocmur et al., 1999) para la construcción de un biosensor microbiano. Para ello, se realizó la inmovilización de un consorcio bacteriano en una membrana de acetato de celulosa; este sistema fue ensayado con patrones de BOD y muestras de aguas cloacales. El principio de operación de este biosensor se basa en que cuando el CO_2, producido por las bacterias al degradar la materia orgánica, difunde a través de la membrana permeable al CO_2, produce una disminución del pH de la solución electrolito, y dicho cambio es sensado por el electrodo de pH.

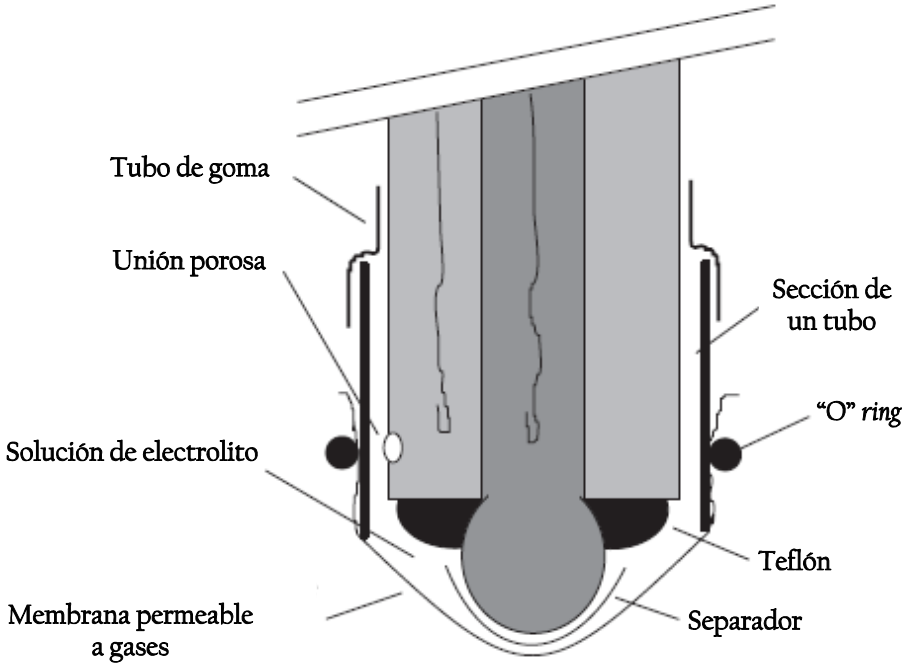


Figura 4.1: Detalle de un electrodo de CO_2 basado en la modificación de un electrodo combinado de pH con una membrana permeable a gases y una solución de electrolito, cuyo pH depende de la [CO_2].

El método amperométrico presentado en los Capítulos 2 y 3 presenta una serie de ventajas como la posibilidad de utilizar electrodos de bajo costo y producción industrial, como los realizados por *screen-printing* permitiendo la miniaturización del dispositivo, además el sistema fue reproducible y presentó %RSD bajos (alrededor del 10%) y buena correlación con los valores del ensayo BOD_5 de aguas cloacales reales, además, se observó un rendimiento metabólico similar al usar algunos de los cultivos liofilizados de *K. pneumoniae*, posibilitando un tiempo de uso luego de la preparación del liofilizado (*shelf time*) de al menos 35 días, al hacer curvas de calibración con GGA u $OECD_{std}$; sin embargo el uso de ferricianuro implica contar con la posibilidad de descartar como residuos peligrosos las muestras luego de su medición (dado que a valores ácidos de pH, el ferricianuro se disocia liberando cianhídrico). Por otro lado, el ferricianuro puede presentar interferencias con compuestos oxidantes, esto se observó con el uso de H_2O_2 o lavandina y el incremento o la disminución de las corrientes cuando se agregaban dichos compuestos a las muestras (Sección 2.3.4); algunos de estos agentes son utilizados domiciliaria e industrialmente de manera habitual, por lo que sería posible encontrarlos en aguas cloacales y residuales industriales.

El ensayo BOD_5 también presenta interferencias con valores de pH extremos, cloro residual, nitritos y sustancias inorgánicas y orgánicas reductoras (Norma NMX-AA-028-SCFI,

2001). Por lo tanto se estudió la posibilidad de utilizar otro tipo de transductor para la determinación rápida de BOD, utilizando un electrodo potenciométrico sensible a CO_2.

Mi participación en este proyecto estuvo relacionada con la inmovilización de un consorcio bacteriano entre una membrana de acetato de celulosa y la membrana permeable al CO_2 con la que se modificó el electrodo de pH (Figura 4.1), para utilizarlo en la determinación rápida de BOD (BOD_{CO2}) de muestras de aguas cloacales. Para los ensayos se utilizaron 4 muestras de aguas cloacales reales y 2 muestras simuladas. El *setup* utilizado se muestra en la Figura 4.2.

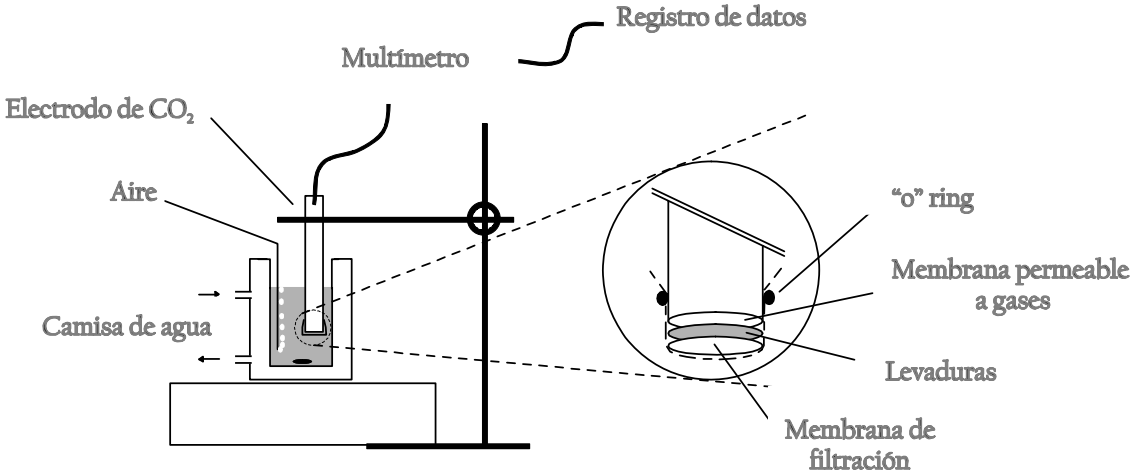


Figura 4.2: *Setup* utilizado para la determinación de BOD de muestras cloacales y simuladas, utilizando un biosensor microbiano basado en el uso de un electrodo potenciométrico de pH modificado, sensible a CO_2.

También se estudió el desempeño o performance del biosensor a distintos valores de pH y distintas concentraciones de NaCl, utilizando a *Saccharomyces cerevisiae* como material biológico. En este sistema biosensor se realiza de manera directa la medición del metabolismo microbiano a través del producto de su respiración, el CO_2, que presenta como ventaja analítica una solubilidad en agua 100 veces mayor que el O_2 (1,525 g CO_2/L o 0,0087 g O_2/L, ambos a 25 °C en agua) y por lo tanto, al igual que la respirometría de ferricianuro, permitiría aumentar la carga microbiana para que la determinación se realice de manera rápida y aumentar el rango lineal del método. Esto reduciría los tiempos de la determinación de BOD de 5 días a tiempos menores de 1 hora, permitiendo desarrollar un método rápido de cuantificación y susceptible de ser utilizado por personal sin entrenamiento y en mediciones de campo, *in-situ*.

4.2.-MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1.-Soluciones y medios de cultivo

Se utilizó buffer fosfato 100 mM conteniendo (g/L): KH_2PO_4 (9,4) y $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (14) en H_2O destilada, ajustando el pH a 7 (en caso contrario, se detalla en la respectiva sección el ajuste del pH del buffer).

La solución de electrolito que rellena la cámara del electrodo potenciométrico sensible al CO_2 contiene (g/L): NaCl (1,17) y $NaHCO_3$ (0,42) en H_2O destilada.

Solución de GGA conteniendo 10 g/L de glucosa y 10 g/L de ácido glutámico en buffer fosfato 100 mM. Esta solución fue esterilizada por filtración a través de membrana de 0,22 μm de poro.

Se utilizó una solución madre de NaCl concentrada, realizada en H_2O destilada, para el armado de muestras de concentraciones finales de de 0 a 700 mM de NaCl, en las cuales se estudió el efecto de la hipertónicidad en el desempeño del biosensor.

Las soluciones utilizadas fueron autoclavadas, con excepción de la solución de GGA.

4.2.2.-Ensamblado del electrodo potenciométrico de CO_2

El electrodo potenciométrico de CO_2 fue construido en el laboratorio y es un electrodo de Severinghaus modificado (Severinghaus y Bradley, 1958) basado en un electrodo combinado de pH, una membrana de silicona permeable a gases y una cámara rellena con una solución de electrolito (ver Figura 4.1 y Sección 4.2.1) (Kocmur et al., 1999; Cortón et al., 2000).

4.2.3.-Inmovilización de BODSEED o *Saccharomyces cerevisiae* en membrana de filtración y ensamblado del biosensor

Las cápsulas de BODSEED utilizadas (ver detalles en el Capítulo 2, Sección 2.2.2) contenían 0,5 g de un consorcio bacteriano y salvado de trigo (peso seco). El consorcio bacteriano liofilizado BODSEED fue rehidratado en 30 mL de buffer fosfato durante 30 min en agitación a 100 rpm y 29 °C. Se separó el salvado de trigo utilizando un filtro de fibra de vidrio y se centrifugó el sobrenadante a 10000 rpm (900 *g*) en una centrifuga refrigerada (10 °C) durante 15 min. Las cepas presentes en las cápsulas de BODSEED

utilizadas fueron *Klebsiella pneumoniae* y las cepas BO366, BO367 y BO368 (ver detalles del aislamiento e identificación en el Capítulo 2, Secciones 2.2.2 y 2.3.1).

En otros experimentos se utilizó como material biológico un liofilizado de *S. cerevisiae* de origen industrial (levadura de panadería) obtenida de un proveedor local (Calsa S.A.).

Se rehidrataron 5 mg de *S. cerevisiae* (peso seco) durante 5 minutos o se resuspendieron 10 mg del pellet obtenido a partir de BODSEED (peso seco) en 5 mL de buffer fosfato y se realizó una filtración al vacío, utilizando una membrana de acetato de celulosa 0,22 μm de poro, para la inmovilización (atrapamiento en membrana) del material biológico a utilizar en el biosensor.

La membrana de filtración fue inmovilizada sobre la membrana de silicona permeable a CO_2 del electrodo potenciométrico, mediante una red elástica de nylon y un *"O" ring*. Por lo que el material biológico queda atrapado entre la membrana de siliconas del electrodo de CO_2 y la membrana de filtración (0,22 μm) externamente; esta última permite la libre difusión de materiales macromoleculares y material particulado de relativamente gran tamaño, además de impedir el lavado o la pérdida del material biológico, Figura 4.3.

Figura 4.3: Esquema del armado del biosensor de BOD basado en un transductor potenciométrico sensible al CO_2.

4.2.4.-Procedimiento experimental, estabilización de la señal

El biosensor fue sumergido en 50 mL de muestra y se registró el potencial, E (mV), de manera continua hasta que la señal se estabilizara. Este procedimiento se realizó en muestras con aireación y agitación magnética continua a 25 ± 1 °C, en buffer fosfato 100 mM, sin adición de fuente de carbono.

4.2.5.-Calibración del biosensor usando *S. cerevisiae* y soluciones estándar de GGA. Efectos del pH o NaCl en el funcionamiento del biosensor

Se realizaron curvas de calibración para BOD utilizando solución GGA como patrón para evaluar el efecto del pH o la hipertonicidad del medio. Estos estudios se realizaron utilizando a *S. cerevisiae* como material biológico.

Para cada valor de pH estudiado se realizó la medición de muestras conteniendo entre 0 y 132 mg BOD_5/L, agregando sucesivamente 3 alícuotas de una solución concentrada de GGA a un volumen de 50 mL de buffer fosfato 100 mM ajustado a distintos valores de pH (entre 4 y 10) utilizando soluciones concentradas de HCl o de NaOH. Luego de cada agregado, se esperó la estabilización del biosensor (aproximadamente 20 min)

La secuencia de medición de pH fue 7, 6, 7, 5, 7, 4, 7, 8, 7, 9, 7, 10 y los valores medidos se normalizaron respecto del valor a pH 7 inmediatamente anterior. Si bien a ciertos pH la capacidad buffer de las soluciones estudiadas es mínimo, esto también es cierto para muestras reales, por lo que se evitó utilizar otros sistemas buffer.

Mediante el agregado de NaCl, se estudió el efecto de distintas concentraciones salinas en el desempeño analítico del biosensor sensible a CO_2. Para cada concentración de NaCl estudiada (entre 0 y 700 mM de NaCl) se realizó la medición de muestras conteniendo entre 0 y 132 mg BOD_5/L, agregando sucesivamente 3 alícuotas de una solución concentrada de GGA a un volumen de 50 mL de buffer fosfato 100 mM ajustado a pH 7.

4.2.6.-Calibración del biosensor usando BODSEED y soluciones estándar de GGA

Se realizaron curvas de calibración para BOD utilizando la solución GGA como patrón y el consorcio bacteriano BODSEED como material biológico. La calibración se efectuó en un volumen de 50 mL de buffer fosfato 100 mM, pH 7.

Dicha calibración fue realizada mediante la adición sucesiva de 3 alícuotas de GGA en 50 mL de buffer fosfato 100 mM. Posteriormente se lavó el biosensor con buffer fosfato y se lo sumergió en buffer fosfato 100 mM hasta que se estabilizara la señal (aproximadamente 20 min).

4.2.7.-Determinación de BOD_{CO2} en muestras de agua, reales o simuladas, utilizando como material biológico un consorcio microbiano, BODSEED

Se determinó el valor de BOD rápida (BOD_{CO2}), de 2 muestras de agua simulada (Sim-1 y Sim-2) y 4 muestras de aguas cloacales municipales reales (ver Sección 2.2.14 para más detalles).

La medición de cada muestra simulada, o real, en dilución 1:2 en buffer fosfato, se realizó luego de la estabilización del biosensor en buffer fosfato sin agregado de GGA (baja

concentración de CO_2 disuelto). Por lo tanto antes de la determinación de cada muestra se realizó una curva de calibración con GGA y la estabilización del biosensor en buffer fosfato sin agregado de GGA.

4.2.8.-Determinación de BOD_5 de muestras de aguas cloacales reales o muestras simuladas

Se determinó la BOD de 4 muestras de aguas cloacales reales y 2 muestras de agua simulada (Sim-1 y Sim-2) de acuerdo a la Norma 5210 B *Standard determination* (APHA "5210", 1995) por AySA, Aguas y Saneamientos Argentinos (ver Sección 2.2.14 para más detalles)

4.2.9.-Equipamiento utilizado

Se utilizó un electrodo combinado de pH Orion (de impedancia en el orden de 10^8 Ω), con RE de $Ag/AgCl_{sat}$ como transductor potenciométrico del electrodo sensible a CO_2. El electrodo se conectó a un circuito adaptador de impedancia construido en el laboratorio, compuesto por un amplificador operacional JFET TL082 (de impedancia de entrada de 10^{12} Ω) configurado en modo de entrada diferencial con un rechazo de modo común, CMRR, de 100 dB. El amplificador fue conectado a un conversor analógico/digital (ADC) de 12 bit, incluido en un microcontrolador (dsPIC30F4013 de Microchip Technology Inc, USA).

4.3.-RESULTADOS

4.3.1.-Calibración del biosensor

El biosensor ensamblado se sumergió en buffer fosfato hasta que se observó estabilidad en la señal registrada (un cambio de señal < 0,5 mV/h). Dicha estabilidad, que depende de la carga microbiana utilizada, se logró luego de 20-30 min. Se procedió al agregado de los patrones de GGA una vez que la señal del biosensor se mantuvo estable (ver Sección 4.2.4).

En la Figura 4.4 se observa el aumento de la respuesta del biosensor a lo largo del tiempo mientras se adicionaban alícuotas de GGA (hasta alcanzar una concentración de 47 mg BOD_5/L) a 50 mL de buffer fosfato 100 mM.

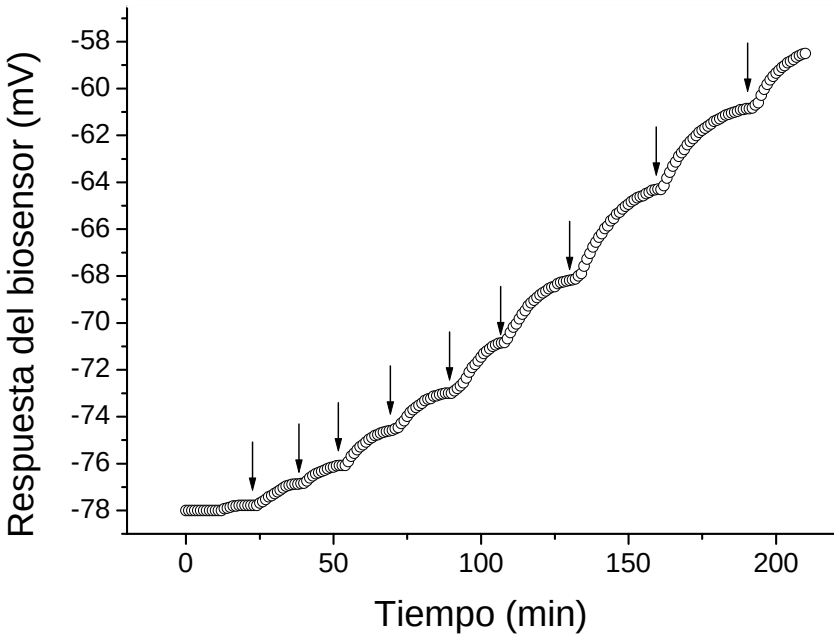


Figura 4.4: Respuesta del biosensor potenciométrico basado en el uso de *S. cerevisiae* inmovilizada (5 mg de peso seco por cm^2) luego de sucesivas adiciones de GGA. Las flechas indican el momento del agregado de cada alícuota de GGA.

El aumento de los valores de potencial es proporcional al aumento en la concentración de dióxido en la superficie del transductor sensible al CO_2, y es originado por un aumento del metabolismo y actividad respiratoria de *S. cerevisiae*.

Luego de ensamblar nuevamente el biosensor, también con 5 mg de *S. cerevisiae* inmovilizada en membrana, se realizó una curva de calibración utilizando GGA como patrón, expresando las concentraciones finales de GGA en la muestra como mg BOD_5/L, Figura 4.5.

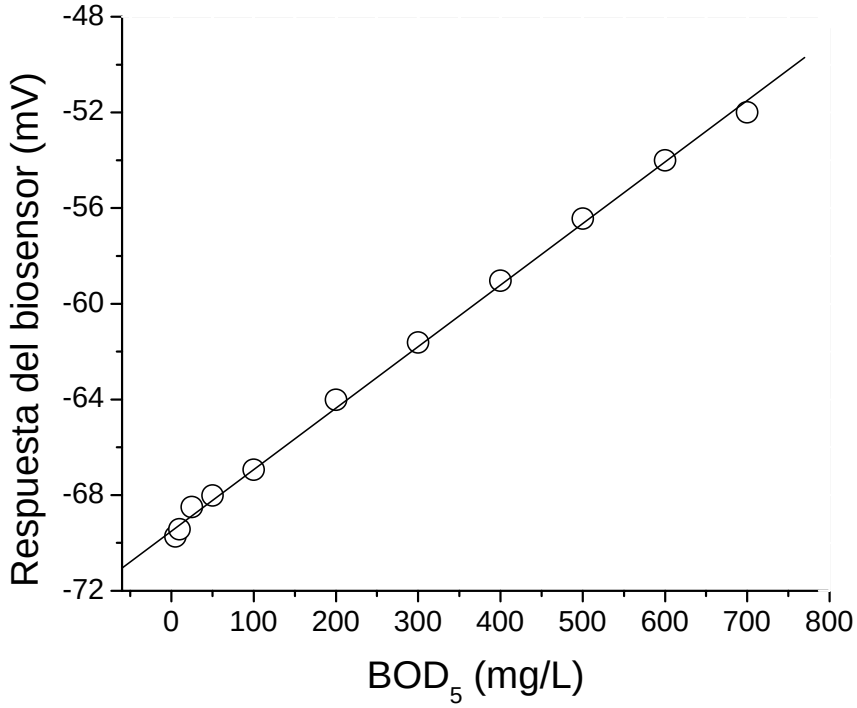


Figura 4.5: Curva de calibración obtenida con el biosensor potenciométrico basado en *S. cerevisiae* inmovilizada en membrana. y = -69,5 + 0,0257 x; r^2 = 0,996.

El tiempo que tardó el biosensor en alcanzar el nuevo equilibrio luego de cada agregado fue de 20 min aproximadamente. La sensibilidad obtenida a partir de este experimento fue de 0,0257 mV x L/mg BOD_5 en un rango lineal entre 5 y 700 mg BOD_5/L (Chiappini et al., 2010).

4.3.2.-Efectos del pH y el NaCl en el funcionamiento del biosensor

Para el estudio del efecto del pH, se realizaron curvas de calibración consistentes en 3 agregados de GGA cada una (ver condiciones en Sección 4.2.5). Las pendientes obtenidas a partir de cada curva de calibración a los distintos pH, se normalizó con la pendiente de la curva de calibración a pH 7 realizada inmediatamente antes de cada pH estudiado, los resultados obtenidos se pueden observar en la Figura 4.6.

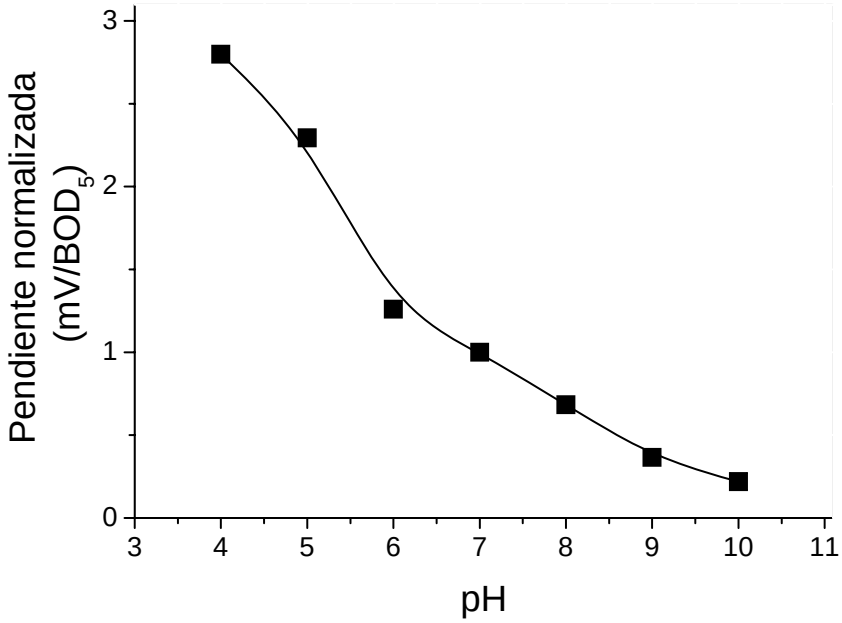


Figura 4.6: Efectos del pH en la respuesta del biosensor potenciométrico basado en *S. cerevisiae* inmovilizada sobre membrana. Pendientes obtenidas de curvas de calibración con 3 puntos de GGA a cada pH, normalizadas con las pendientes de curvas a pH 7.

Se espera que el cambio de pH afecte el funcionamiento del biosensor de CO_2 en 2 aspectos. En primer lugar, el metabolismo microbiano se verá afectado por los cambios de pH dependiendo el valor óptimo que presente la actividad metabólica del microorganismo utilizado; *S. cerevisiae* presenta una actividad metabólica óptima a pHs ácidos (alrededor de 5), esto se ve reflejado en el comportamiento del biosensor que puede observarse en la Figura 4.6 a bajos pHs y la disminución de la respuesta del biosensor en muestras a pH 6 o más alcalinas.

En segundo lugar, el equilibrio del CO_2 disuelto también se ve afectado por los valores de pH de la muestra. En soluciones ácidas el equilibrio se encuentra desplazado hacia la disolución del ácido carbónico y CO_2, encontrándose, a pH 5, casi el 90 % de las especies disueltas (Kocmur et al., 1999). La mayor concentración de CO_2 disuelto a pHs ácidos, produce el incremento de la respuesta del biosensor dado la permeabilidad de la membrana de silicona al CO_2. En condiciones alcalinas, parte del CO_2 producido por *S. cerevisiae* puede convertirse en bicarbonato, y no ser detectado por el transductor utilizado.

Probablemente la disminución de la respuesta del biosensor y la pendiente pronunciada observada a pHs ácidos, entre 4 y 6, se deba a una combinación de los dos fenómenos, la mayor actividad metabólica de *S. cerevisiae* y el desplazamiento del equilibrio hacia el aumento de CO_2 disuelto. También se observaron curvas de calibración con RSD del orden del 5% en las pendientes correspondientes a muestras con pHs ácidos, mientras que a pHs básicos (9-10) los RSD fueron más altos, del orden de los 18%.

Experimentos similares se realizaron para estudiar el efecto del agregado de NaCl (curvas de calibración de GGA), en muestras conteniendo buffer fosfato 100 mM ajustado a pH 7 y distintas concentraciones de NaCl (ver Sección 4.2.5).

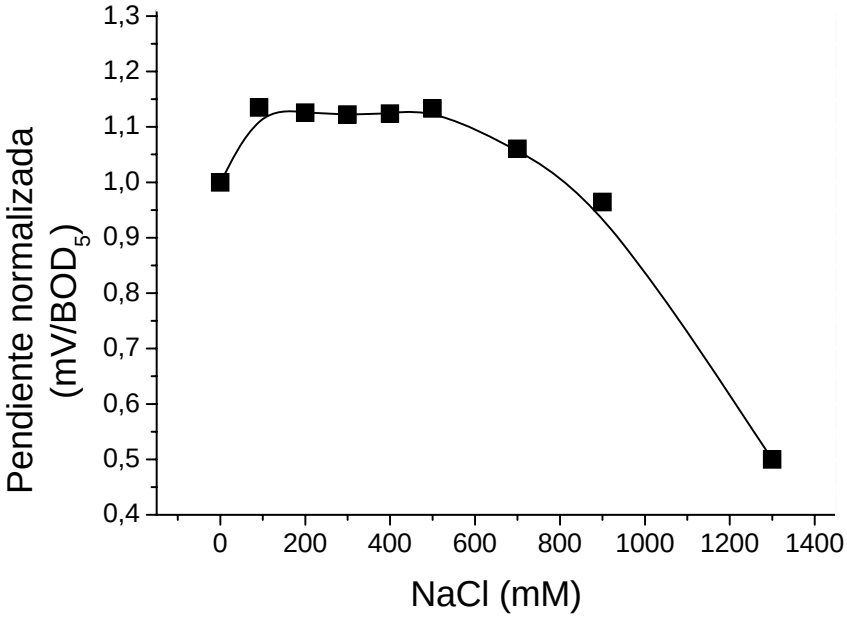


Figura 4.7: Efectos de muestras con concentraciones crecientes de NaCl en la sensibilidad del biosensor basado en *S. cerevisiae*. Se realizaron curvas de calibración utilizando GGA a distintas concentraciones de NaCl y las pendientes obtenidas en cada curva se normalizaron respecto a la pendiente de una curva sin agregado de NaCl.

En la Figura 4.7 se observa un cambio moderado en la respuesta del biosensor luego de agregar NaCl hasta una concentración de 500 mM. Las mayores pendientes se observan entre 100 y 500 mM, en este rango de concentraciones los desvíos relativos son del 7%. Esta zona de estabilidad respecto a la concentración de sal, relativamente amplia, sería la zona en la que este biosensor no se vería afectado por la concentración de NaCl. A mayores concentraciones de NaCl se observa una pendiente pronunciada, correspondiente a menores pendientes en las curvas de calibración obtenidas a cada concentración, y un

RSD del 15%. Los efectos adversos en el metabolismo de *S. cerevisiae* en un medio hipertónico (altas concentraciones de NaCl) eran esperados dado que este microorganismo no es halotolerante.

4.3.3.-Medición de muestras de aguas cloacales (BOD_{CO2}) y comparación con los valores de BOD_5

La actividad metabólica (producción de CO_2) de los microorganismos presentes en el liofilizado BODSEED, en comparación con la de *S. cerevisiae*, fue significativamente menor. Por lo tanto, como material biológico se utilizaron 10 mg/cm^2 del liofilizado para la determinación de BOD en muestras de aguas clocales reales y muestras simuladas.

Luego de ensamblar el biosensor utilizando BODSEED inmovilizado en el electrodo de CO_2 se lo dejó estabilizando en buffer fosfato (durante 4 h) y posteriormente se realizaron las mediciones potenciométricas.

Se realizó una curva de calibración con GGA (de 3 puntos) por sucesivos agregados de patrón, previo a medir cada muestra de agua (2 muestras simuladas, Sim-1 y Sim-2, y 4 muestras reales, cloacales municipales). Las mediciones se realizaron por duplicado (n = 2) y se midieron diluciones al medio de cada muestra, real, en buffer fosfato (Tabla 4.1).

Tabla 4.1: Comparación de las determinaciones de BOD de 6 muestras de agua mediante el ensayo tradicional BOD_5 y el biosensor diseñado aquí, BOD_{CO2}. La calibración del biosensor fue realizada por adición sucesiva de patrón, utilizando una solución madre concentrada de GGA.

Muestra	BOD_5 (mg/L)	BOD_{CO2}	BOD_{CO2}/BOD_5
Agua cloacal 1	145	258 ± 32	1,78
Agua cloacal 2	120	188 ± 26	1,56
Agua cloacal 3	130	210 ± 29	1,61
Agua cloacal 4	120	83 ± 12	0,69
Sim-1	175	220 ± 30	1,26
Sim-2	85	102 ± 14	1,20

Los RSD calculados en la medición de los duplicados fueron menores al 15%. Puede observarse en la Tabla 4.1 que si bien los valores de BOD_{CO2} son mayores que los de BOD_5, existe una correlación bastante buena entre los valores determinados por ambos métodos.

4.4.-DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los %RSD obtenidos mediante el biosensor potenciométrico (alrededor del 15%) fueron algo mayores que los obtenidos mediante la determinación amperométrica (alrededor del 10%) en el Capítulo 2. Con el agua cloacal 4 se obtuvo una baja correlación entre los valores de BOD_5 y los de BOD_{CO2}, esto no se observó al medir esta muestra con el método amperométrico (ver Sección 2.3.10). Debería estudiarse mejor la posibilidad de mejorar la reproducibilidad del método potenciométrico, ya sea eligiendo un material biológico más adecuado o utilizando $OECD_{std}$ como patrón de calibración antes de las determinaciones.

Si bien el biosensor potenciométrico basado en el uso de un electrodo sensible a CO_2 es compacto y fácilmente transportable, sería de gran ayuda en las determinaciones *in-situ*, disponer de varios biosensores que funcionen de manera reproducible entre sí, de manera de poder realizar las determinaciones en paralelo (curvas de calibración y distintas diluciones de una muestra y/o de varias muestras). Esto permitiría realizar cada determinación de BOD de una muestra en aproximadamente 1 hora. Pero esto incrementaría los costos para su aplicación *in-situ* y es una desventaja frente a la determinación amperométrica presentada en el Capítulo 3, que permite la utilización de electrodos realizados por *screen-printing*, realizados en forma industrial y por lo tanto de bajo costo, alta reproducibilidad entre sí y descartables.

Otra desventaja del biosensor potenciométrico de BOD, utilizando *S. cerevisiae*, es el almacenamiento del mismo luego de ser ensamblado, dado que se observa un decaimiento de su respuesta relativamente grande luego de 7 días de almacenamiento a 4 °C (Chiappini et al., 2010). Los liofilizados utilizados en el Capítulo 3 presentaron buena estabilidad metabólica durante al menos 35 días.

Sin embargo, con el biosensor potenciométrico utilizando a *S. cerevisiae* inmovilizada en membrana se observó una relación lineal de su respuesta a bajas concentraciones de BOD_5 (entre 1 y 47 $mgBOD_5/L$) al realizar curvas de calibración con patrones de GGA (Chiappini et al., 2010). El bioensayo amperométrico presentado en el Capítulo 2 en cambio, presentó un rango lineal a partir de 30 mg BOD_5/L utilizando GGA como patrón y *K. pneumoniae* como material biológico. Por ello este sistema potenciométrico sería adecuado para aguas con bajas concentraciones de BOD, como aguas naturales o efluentes tratados.

4.5.-REFERENCIAS

APHA, American Public Health Association (1995) "5210 Biochemical oxygen demand (BOD)" in: *Standard methods for the examination of water and wastewater.* (Eaton A., Clesceri L., Greenberg A. eds.) 19st ed. APHA. Washington DC, US

Cammaroto C., Diliberto L., Ferralis M., Manca R., Sanna A., Giordano M. (1998) Use of carbonic anhydrase in electrochemical biosensors for dissolved CO_2. Sens Actuators B Chem 48, 439-447

Chiappini S.A., Kormes D.J., Bonetto M.C., Sacco N., Cortón E. (2010) A new microbial biosensor for organic water pollution based on measurement of carbon dioxide production. Sens Actuators B Chem 148, 103-109

Cortón E., Kocmur S., Haim L., Galagovsky L.A. (2000) Potentiometric determination of CO_2 concentration in the gaseous phase: applications in different laboratories activities. J Chem Educ 77, 1188-1191

Cortón E., Locascio G.A. (1998) Simple flow injection analysis system for determination of added sugars in dairy products. J Dairy Res 65, 675-680

Kocmur S., Cortón E., Haim L., Locascio G., Galagovsky L. (1999) CO_2-Potentiometric determination and electrode construction, a hands-on approach. J Chem Educ 99, 1253-1255

Melidis P., Vaiopoulou E., Aivasidis A. (2008) Development and implementation of microbial sensors for efficient process control in wastewater treatment plants. Bioprocess Biosyst Eng 31, 277-282

Norma NMX-AA-028-SCFI (2001) Análisis de agua - Determinación de la demanda bioquímica de oxígeno en aguas naturales residuales (DBO_5) y residuales tratadas - Método de prueba

Pellegrini G.E., Carpico G., De Sanctis P., Coni E. (2005) Advantages and limitations of a novel hybrid biosensor for detecting toxic compounds in food. Int J Environ Anal Chem 85, 927-936

Riedel K., Renneberg R., Wollenberg U., Kaiser G., Scheller F. (1989) Microbial sensors: Fundamentals and application for process control. J Chem Technol Biotechnol 44, 85-106

Severinghaus J.W., Bradley A.F. (1958) Electrodes for blood pO_2 and pCO_2 determination. J Appl Physiol 13, 515-520

Vaiopoulou E., Melidis P., Kampragou E., Aivasidis A. (2005) On-line load monitoring of wastewaters with a respirographic microbial sensor. Biosens Bioelectron 21, 365-371

CAPÍTULO 5: CARACTERIZACIÓN DE IDES Y ESTUDIOS DE TOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN CÉLULAS NHDF

5.1.-INTRODUCCIÓN

La miniaturización de técnicas analíticas se ha vuelto una tendencia dominante en investigación y desarrollo a partir de la década pasada. El área de los μTAS (*micro total analysis system*), también llamados *lab-on-chip*, se está desarrollando rápidamente sobre todo en áreas de monitoreo ambiental (Yoo et al., 2007; Elman et al., 2008; Ben-Yoav et al., 2009; Gottschamel et al., 2009; Komori et al., 2009) y aplicaciones biomédicas (Ionescu-Zanetti et al., 2005; Whitesides, 2006). Estos sistemas miniaturizados acoplados a técnicas electroquímicas se caracterizan por ser altamente sensitivos y permiten obtener datos en tiempo real de la dinámica de un sistema biológico sometido a diversos estímulos ambientales; esto los hace ideales para el análisis celular y sus cambios fisiológicos en ambientes controlados (Gottschamel et al., 2009).

Últimamente las nanopartículas (NPs) han pasado a ser objeto de interés en varias áreas de investigación debido a sus posibles usos como *carriers* de fármacos, mejoras en la sensibilidad de detección del diagnóstico por imágenes, la disminución de los efectos colaterales en muchas drogas, así como sus múltiples aplicaciones industriales. Algunas NPs metálicas son empleadas comúnmente en la industria cosmética y otras provienen de residuos de industrias relacionadas con la informática. Pero también han pasado a ser de interés debido a sus posibles efectos tóxicos y la posibilidad de considerarlas como contaminantes atmosféricos (Schrand et al., 2010).

Las NPs pueden potencialmente causar efectos adversos a nivel de órganos, tejidos, celular, sub-celular y proteico llevando a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), inicios de una respuesta inflamatoria y perturbación y destrucción de la mitocondria, causando la apoptosis o necrosis celular (Figura 5.1).

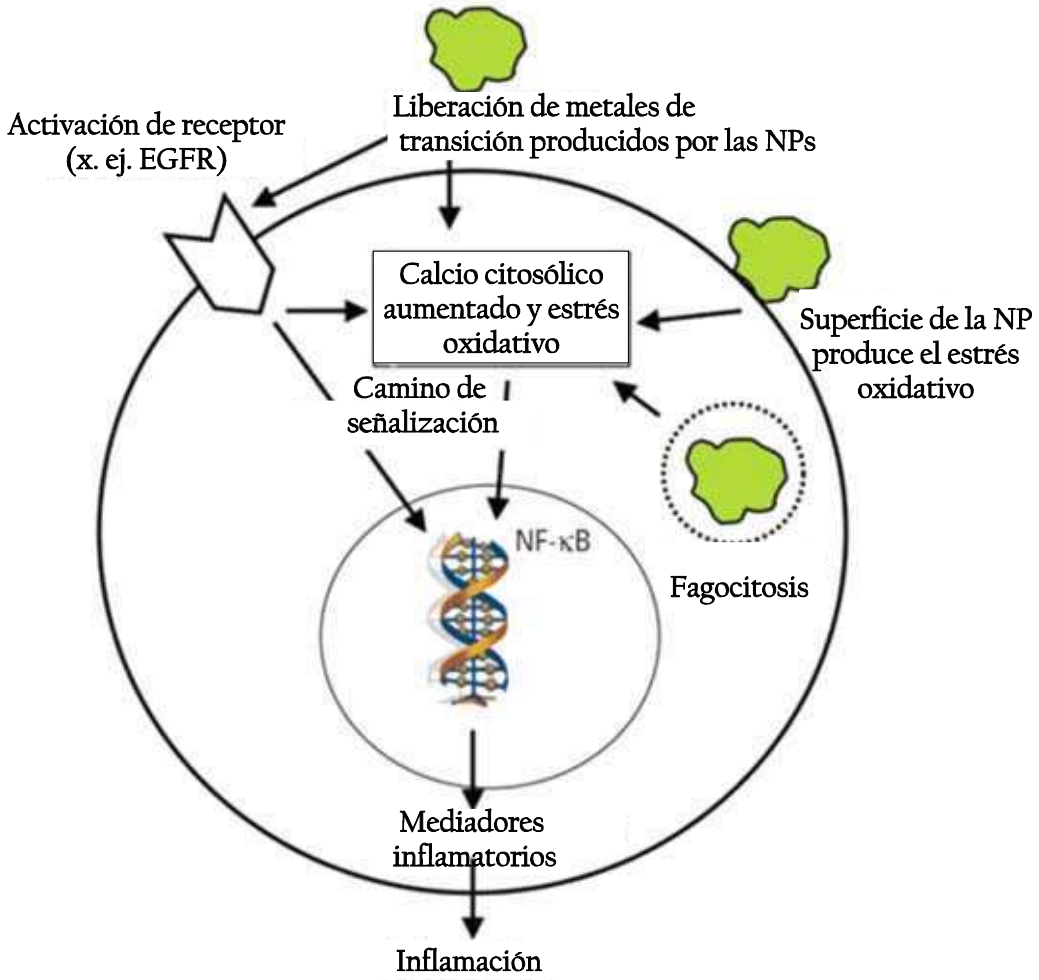


Figura 5.1: Interacción hipotética entre las NPs y una célula (Donaldson y Tran, 2002; Oberdörster et al., 2005). La inflamación y el estrés oxidativo pueden estar mediados por distintas vías: a) que la superficie de la NP produzca el estrés oxidativo celular, produciendo un aumento del calcio intracelular y la activación de genes; b) que los metales de transición liberados por las NPs produzcan el estrés oxidativo celular; c) que los metales de transición producidos por las NPs activen los receptores de la superficie celular y se produzca una activación de genes; o d) que las NPs se distribuyan intracelularmente y alcancen la mitocondria produciendo estrés oxidativo.

En el marco de una cooperación bilateral con el Austrian Institute of Technology, AIT, se ha dado comienzo al estudio y caracterización de dispositivos microfluídicos o μTAS (micro-sistemas de análisis total). Hasta el momento se ha realizado un estudio de toxicidad de NPs de Ag basado en la técnica de EIS (espectroscopía de impedancia electroquímica) como técnica electroquímica no destructiva, empleando IDES de Au de distintas áreas y

parámetros geométricos, y empleando como material biológico células NHDF (*normal human dermal fibroblasts*).

Varios biosensores y bioensayos microbianos han sido desarrollados para la determinación de toxicidad en aguas, siendo uno de los más conocidos el denominado MICROTOX®, que emplea la bacteria marina *Vibrio fischeri* como material biológico (ver Sección 1.4.3.1) (Bulich, 1982; APHA "8050", 1995) y Pasco adaptó el sistema MICREDOX® para la determinación rápida de toxicidad basada en la respirometría de ferricianuro (Tizzard et al., 2004). Pero las bacterias son resistentes a bajas concentraciones de muchos de los tóxicos y el desarrollo de μTAS podría permitir desarrollar bioensayos de determinación rápida de toxicidad utilizando células de mamífero.

Los estudios *in-vitro* para determinar la toxicidad en cultivos de células de mamífero presentan varias ventajas incluyendo resultados rápidos con bajo costo y disminuyendo la necesidad de realizar estudios *in-vivo*. Sin embargo, ha sido demostrado que las NPs pueden producir toxicidad en algunos estudios basados en cultivos celulares, pero no en otros.

Las propiedades dieléctricas de las células permiten el desarrollo de una gran variedad de ensayos basados en mediciones electroquímicas de cultivos celulares para aplicaciones en medicina y biología. Por ejemplo, si se cultivan células, que crecen adheridas a un sustrato, sobre electrodos interdigitados, realizados mediante fotolitografía, sus membranas producirán una alteración de la distribución del campo eléctrico producido entre los IDES causando un cambio en la impedancia eléctrica que puede ser detectado utilizando un potenciostato o analizador de impedancia.

Las mediciones de impedancia utilizando electrodos interdigitados, IDES, han sido aplicadas el estudio de toxicidad de NPs, pero las mediciones siempre han sido realizadas luego de incubar las células por 22-24 horas con o sin NPs (Richter et al., 2011).

Nuestro objetivo como primera aproximación al tema, fue realizar un estudio de determinación de toxicidad de NPs de Ag en células NHDF estudiando la adhesión celular en IDES mediante la técnica de EIS, luego de incubar células NHDF durante 1 h con NPs de Ag.

Los IDES están siendo ampliamente utilizados como electrodos en ensayos de EIS, pero la caracterización de los mismos ha sido estudiada para la optimización de sus parámetros y la interpretación de los datos obtenidos con soluciones salinas o con muestras conteniendo diferentes tipos celulares (Wang et al., 2008; Rana et al., 2011), pero hasta el momento no hemos encontrado estudios de reproducibilidad del método de producción de los electrodos, de las mediciones, ni estudios biológicos utilizando réplicas de manera de

obtener resultados significativamente relevantes y comparables entre sí. Los IDES son realizados mediante técnicas de micro-fotolitografía y si bien esto permite su producción a gran escala, los electrodos son delicados y cualquier evento anómalo durante su fabricación puede producir electrodos de distinta calidad y comportamiento.

5.2.-MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1.-Soluciones empleadas y medios de cultivo

Se utilizó medio DMEM alta glucosa con glutamina y agregado de 10% v/v de suero fetal bovino, FCS, para el cultivo de las células NHDF. A este medio se le adicionó 2% v/v de Hepes y 1% v/v de gentamicina y se lo llamó $DMEM_{hg}$ cuando se utilizó en los experimentos de EIS, ya sea como control o en el cultivo de células en los IDES, realizados en condiciones de no esterilidad.

Se utilizó 0,25% v/v tripsina-EDTA para despegar o "levantar" las células adheridas al sustrato.

El buffer fosfato utilizado contenía (g/L): KH_2PO_4 (9,4) y $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (14).

El número de células viables se determinó microscópicamente luego de la adición de 10 μL de una solución de Trypan Blue 0,4% m/v en 100 μL de una suspensión celular.

Se utilizó una solución coloidal de NPs de Ag de 0,1 mg/mL de concentración, y tamaño nominal de 10 nm de diámetro promedio de partícula (PL-Ag-S10-10 mg, PlasmaChem, Germany).

5.2.2.-Electrodos interdigitados (IDES) utilizados

Se utilizaron 2 chips conteniendo cada uno 4 estructuras o IDES de distintas dimensiones, pasivados con Si_3N_4, que denominamos $IDES_p$ (Tabla 5.1 y Figura 5.2), y 4 chips conteniendo 4 IDES iguales entre sí, no pasivados, denominados $IDES_m$ (Tabla 5.1 y Figura 5.3)

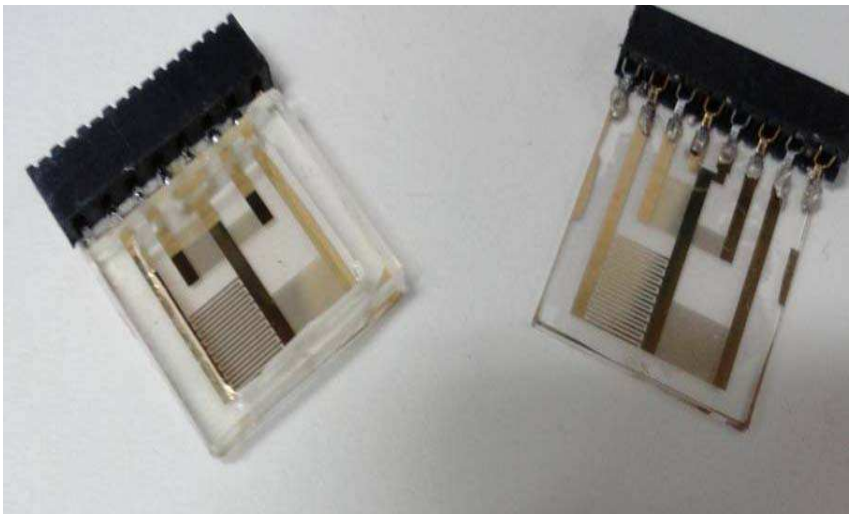


Figura 5.2: Chips conteniendo cada uno 4 estructuras de $IDES_p$ de distintas dimensiones. En el chip de la izquierda se puede observar la celda de PDMS (polímero translúcido), a la derecha se observa la conexión eléctrica realizada mediante soldadura (Sn/Pb).

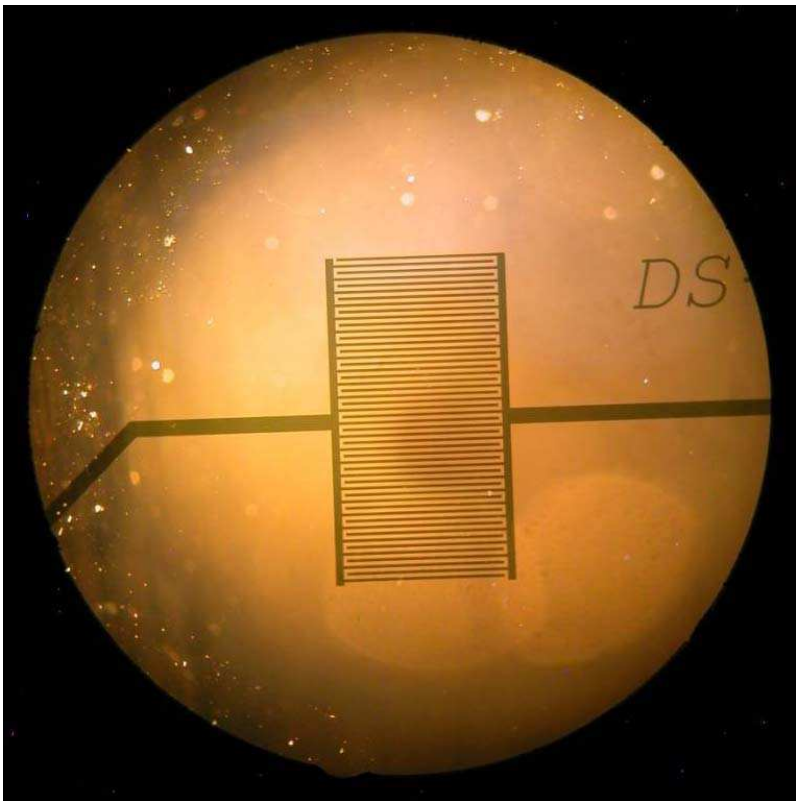


Figura 5.3: Microfotografía de una estructura de $IDES_m$ utilizada en la caracterización de estos IDES de Au (aumento 40X).

Los IDES fueron realizados en el AIT (y traídos a la Argentina por cortesía del Dr. Peter Ertl) por fotolitografía mediante la deposición de vapor, sobre un sustrato de vidrio. Primero se depositó una capa de Cr (3 nm) y luego una de Au (50 nm). Posteriormente se

pasivaron todas las estructuras de los $IDES_p$ con una capa de 300 nm de Si_3N_4 (nitruro de silicio) (deposición química de vapor mejorada por plasma a baja temperatura) (PECVD, Oxford Plasmalab 80), enmascarando los contactos para evitar la deposición de Si_3N_4 en ellos. Los $IDES_m$ no se pasivaron, el Au está expuesto a las muestras.

Tabla 5.1: Dimensiones y parámetros geométricos de las distintas estructuras de IDES utilizadas. A: área; G: distancia entre electrodos W: ancho de dedo; N: cantidad de dedos/electrodo; H_{total}: alto total de los electrodos (calculado como: [2x(W+G)xN]-W); L: largo de cada dedo (ver también Figura 1.14).

IDES	Estructura	A, mm^2	G=W, μm	N	H_{total}, μm	L, μm
$IDES_p$	S1	12,15	150	10	5850	4050
	S2	7,29	30	30	3570	4050
	S3	3,69	15	60	3585	2050
	S4	1,47	3	120	1437	2044
$IDES_m$	-----	0,96	20	25	1980	960

Sobre cada chip se adhirió una celda polimérica de polidimetilsiloxano, PDMS, curada a 70 °C durante 4 hs. Por lo tanto una misma muestra fue medida por los 4 IDES o estructuras de cada chip (sean pasivados, $IDES_p$, o no, $IDES_m$). La celda de PDMS se unió al vidrio, o a la superficie de Si_3N_4, luego de un tratamiento con plasma de O_2 (Diener Electronics) (30 s a 40 W) y se dejó durante 24 h a 50 °C (tiempo de curado).

Los $IDES_p$ se soldaron a conectores y estos se conectaron al analizador de EIS (Figuras 5.2 y 5.4).

5.2.3.-Protocolo de medición utilizado en los ensayos con $IDES_p$

Previo a su utilización, los chips con $IDES_p$ se colocaron en un horno a 37 °C por 20 min y se expusieron a plasma de O_2, 30 s a 40 W. Luego de utilizarlos con muestras conteniendo células, a estos chips se les agregó tripsina, se colocaron en la incubadora durante 30 min a 37 °C, se lavaron con abundante cantidad de buffer fosfato y finalmente con agua bidestilada.

5.2.4.-Cultivo de células NHDF

Se utilizaron células NHDF PromoCell (C-12300) como material biológico de los ensayos de EIS.

Las células NHDF se cultivaron en una incubadora con 5% de CO_2 humidificada, en placas de 6 pocillos en paralelo con cultivos en 2 frascos T25 (25 cm^2 con 5 mL de medio).

Se eliminó el medio de las placas, se lavó con PBS, se agregó 0,25% de tripsina EDTA (durante 3 min a 37 °C) de manera de "levantar" las células (despegar las células de la superficie sobre la cual crecen adheridas), se resuspendieron en 10 mL de medio DMEM nuevo y se alicuotaron correspondientemente.

Las células se pasaron cada dos días a medio de cultivo fresco (en dilución 1:2), luego de alcanzar una confluencia del 80-90%. A partir de uno de los frascos, el total de las células resuspendidas en 10 mL de medio nuevo se alicuotaron de a 2 mL en cada uno de los 5 pocillos de una placa de 6 pocillos. A partir de los 10 mL de medio nuevo con células del otro frasco T25, se alicuotaron de a 5 mL, en frascos T25 nuevos.

5.2.5.-Preparación de células NHDF para su uso en los experimentos de EIS

Luego de llegar a una confluencia del 80-90%, se despegaron las células de un pocillo (de la placa multipozo de 6 pocillos) para la preparación de las muestras; para ello se centrifugaron (220 *g* por 5 min), se contaron y resuspendieron en $DMEM_{hg}$ a la concentración deseada ((2,3 ± 0,2) x 10^5 células/mL). En los experimentos se utilizaron células entre los pasajes 15 y 17 (P15 y P17), con algunas excepciones detalladas en la correspondiente Sección.

El número de células se determinó antes de realizar cada experimento microscópicamente en cámaras de Neubauer.

5.2.6.-Incubación de células NHDF en agitación

Las células NHDF fueron incubadas en medio $DMEM_{hg}$ en agitación (en *shaker* de mesada) o no (en incubadora con 5% de CO_2) a 37 °C en tubos de 1 mL antiadherentes (Eppendorf Protein LoBind) durante 60 min.

También se incubaron células NHDF en medio $DMEM_{hg}$ en agitación (en *shaker* de mesada) a 37 °C en tubos de 1 mL antiadherentes en presencia o no de la fase acuosa de la solución coloidal de NPs de Ag (correspondiente a una concentración de 25 μg/L de NPs de

Ag) durante 60 min. En este caso también se incubó, en agitación, medio $DMEM_{hg}$ con la fase acuosa, pero sin células como un segundo control. La fase acuosa se obtuvo luego de centrifugar la solución coloidal de NPs de Ag.

Por último, las células NHDF se incubaron en medio $DMEM_{hg}$ en agitación (en *shaker* de mesada) a 37 °C en tubos de 1 mL antiadherentes en presencia o no de una solución coloidal de 10 μg/L de NPs de Ag durante 20 o 60 min.

5.2.7.-Ensayos de EIS con $IDES_p$

Se midieron dos chips en paralelo (en caso contrario, se detalló en la respectiva Sección), aunque las mediciones realizadas con cada $IDES_p$ son consecutivas, los chips estuvieron bajo las mismas condiciones durante cada medición. El tiempo entre la medición de espectros de impedancia, entre 10 y 100 kHz (10 frecuencias individuales), de cada $IDES_p$ fue de 5 min.

A ambos chips se les agregó primero medio $DMEM_{hg}$ (estabilizado en incubadora de CO_2 al 5%) y se midió aproximadamente durante 60 min. Luego se eliminó el medio de ambos chips y se colocaron las muestras correspondientes. En cada Sección se especifica qué solución se utilizó como control y cuál como muestra.

Las 4 estructuras de $IDES_p$ fueron medidas de manera continua escaneando 10 frecuencias entre 10 y 100 kHz aplicando un potencial alternante de ±75mV entre los dedos de los electrodos (salvo excepciones que se detallarán en la Sección correspondiente). Se monitoreó de manera continua la impedancia total Z, la fase ϕ, la parte real de la impedancia Z_{re} y la parte imaginaria de la impedancia Z_{im}.

5.2.8.-*Setup* experimental utilizado en los ensayos con células NHDF

Las mediciones utilizando los $IDES_p$ fueron realizadas con un analizador de espectroscopía de impedancia fabricado en el AIT (Austrian Institute of Technology) (Figura 5.4) ubicado dentro de una incubadora con CO_2 al 5% en atmósfera humidificada a 37 °C, conectado a un multiplexor y a una placa adquisidora de datos National Instruments, controlado desde la PC a través de un programa diseñado en Lab View.

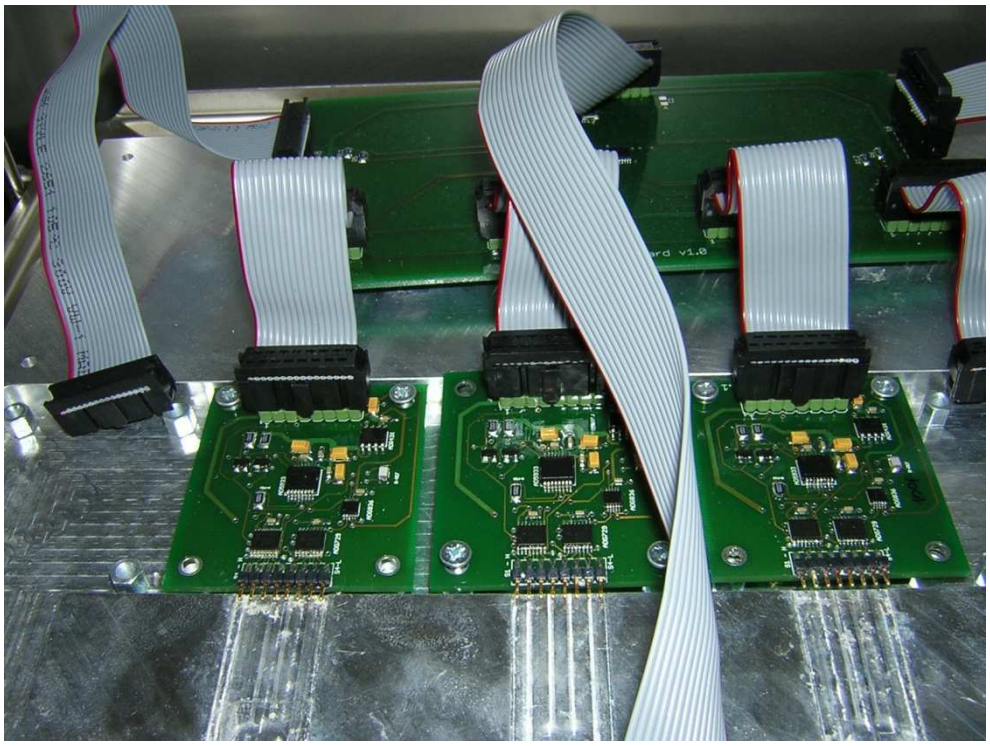


Figura 5.4: Analizador de espectroscopía de impedancia, EIS, fabricado en el AIT. En cada plaqueta se conectó un chip de los presentados en la Figura 5.2.

5.2.9.-Ensayos de EIS con $IDES_m$ y soluciones de KCl

Soluciones de KCl de distinta conductividad fueron utilizadas para realizar la caracterización de los IDES. Las conductividades utilizadas fueron entre 0,01 y 10 mS, medidas con un conductímetro digital (Curtin Matheson Scientific Inc., Houston, TX, USA). Se realizaron triplicados de las concentraciones (n = 3) y las mediciones se realizaron a 25 °C.

5.2.10.-*Setup* experimental utilizado en la caracterización de $IDES_m$

Los $IDES_m$ de Au se conectaron a un potenciostato/galvanostato/ZRA (Series G 300™, Gamry Instruments Inc. Warminster, USA) mediante conectores de Ag (en los que se conectaron los terminales del potenciostato, tipo "cocodrilo") soldados a conectores *spring-loaded* de Au (Figura 5.5).

Figura 5.5: *Setup* experimental utilizado para las mediciones de EIS (izquierda) y detalle de la conexión eléctrica de los $IDES_m$ (derecha).

Se realizaron escaneos de frecuencias entre 0,1 y 300 kHz aplicando una señal alterna de amplitud de 50 mV, el voltaje DC aplicado fue 0.

5.2.11.-Equipamiento empleado

Los ensayos con agitación fueron realizados en un shaker de mesada (Eppendorf AG Thermomixer compact, Hamburg, Germany) a 900 rpm a 37 °C.

Se utilizó una centrífuga Eppendorf Centrifuge 5702R (Hamburg, Germany).

5.3.-RESULTADOS

5.3.1.-Resultados preliminares: Frecuencias (ω) y dimensiones de $IDES_p$ óptimas para el monitoreo electroquímico del cultivo de NHDF

De manera de determinar el tiempo en que se alcanza una línea de base estable, a que frecuencia, ω, o rango pequeño de ω, el sistema presenta una mejor relación señal/ruido, y en cuanto tiempo se obtiene la señal que puede ser utilizada como la respuesta analítica del sistema. Se realizaron mediciones de impedancia mediante EIS de $IDES_p$ de 2 chips conteniendo cada uno medio $DMEM_{hg}$, estabilizado previamente en la

incubadora con CO_2, escaneando frecuencias de 10 a 100 kHz. Luego de 102 min se eliminó de ambos el medio y se agregó en un chip medio de cultivo $DMEM_{hg}$, estabilizado, como blanco y en el otro chip células NHDF (P47) en $DMEM_{hg}$ como muestra y se continuó la medición. En la Figura 5.6 se muestra el espectro obtenido con la estructura S2 de $IDES_p$ (ver detalles de las estructuras en la Tabla 5.1).

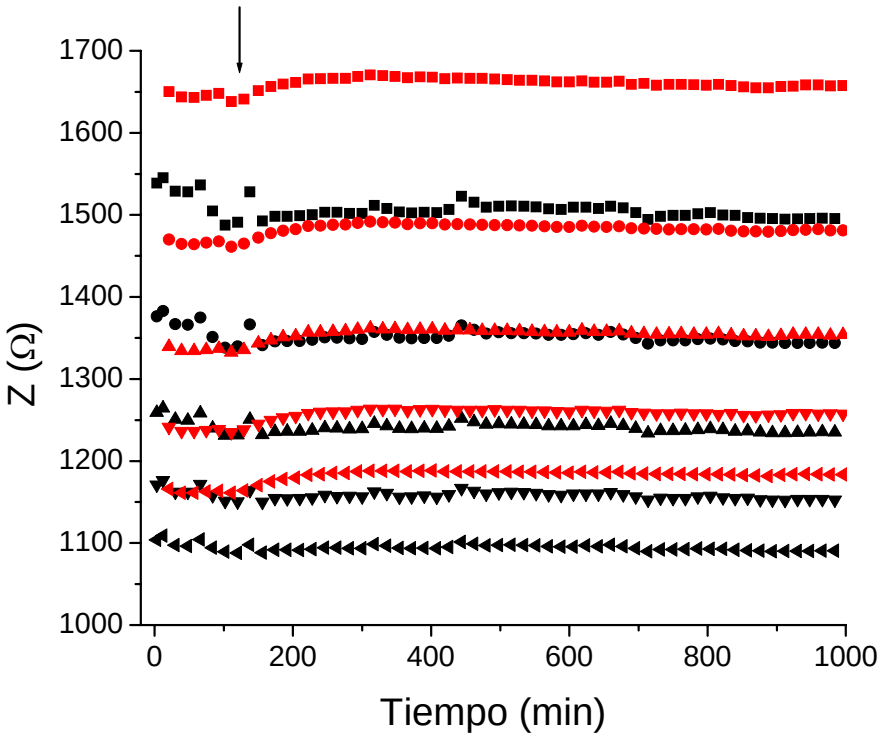


Figura 5.6: Espectro de impedancia obtenido al realizar EIS con la estructura S2 de chips con $IDES_p$ al realizar un escaneo de frecuencias entre 10 y 100 kHz. La flecha indica el cambio del medio $DMEM_{hg}$ de ambos chips, reemplazándolo por medio $DMEM_{hg}$ fresco, utilizado como blanco, (negro) o células NHDF en medio $DMEM_{hg}$ (rojo). Se muestran las ω de 60 (■, ■), 70 (●, ●), 80 (▲, ▲), 90 (▼, ▼) o 100 (◄, ◄) kHz.

Se puede observar que las estructuras S2 de ambos chips presentan diferencias entre sí en los primeros 100 minutos, en los que ambos chips tienen únicamente medio $DMEM_{hg}$, presentan distinta pendiente en la curva así como una diferencia de impedancia que va desde alrededor de 50 Ω hasta alrededor de 100 Ω. Esta diferencia en la señal, al medir el blanco en ambos chips, así como los saltos que se observan en la señal en estos primeros minutos de las mediciones, son menores a altas frecuencias (80, 90 y 100 kHz).

Además, se observa que la impedancia aumenta luego del agregado de medio con células NHDF, indicativo de que las células se están adhiriendo al sustrato, dado que este

tipo celular no crece en suspensión, y que la renovación del medio en el otro chip (símbolos negros en la Figura 5.6, medio sin células) no cambió la tendencia de la señal. Luego de las mediciones electroquímicas, se observó la morfología ahusada o elongada, típica de los fibroblastos al crecer adheridos a un sustrato. En la Figura 5.7 se muestra la estructura S1 de un chip con células NHDF adheridas a su superficie.

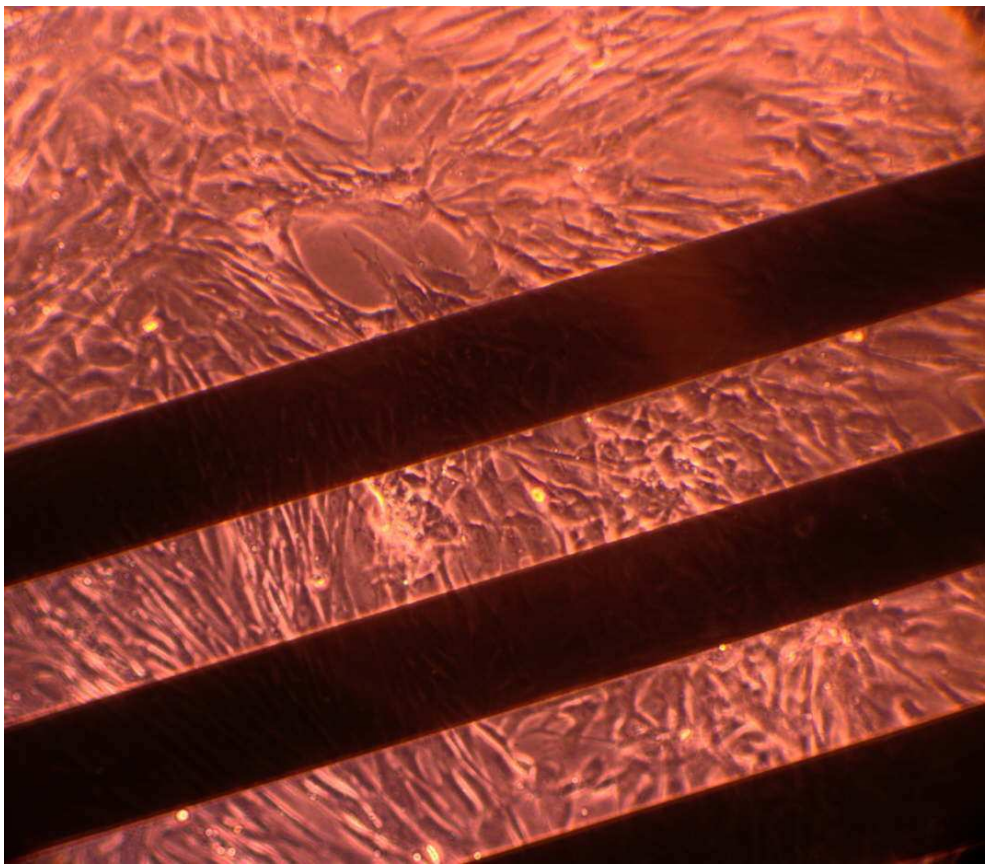


Figura 5.7: Microfotografía de la estructura S1 de un chip con $IDES_p$ luego de incubar durante 1000 min con células NHDF. La foto se realizó con microscopio invertido y contraste de fase (G = W de 150 μm).

Se observó también que la curva de impedancia aumenta al utilizar $IDES_p$ de menores dimensiones. En la Figura 5.8 se puede observar que las curvas de impedancia alcanzadas con la estructura S3 (estructura S3 de G = W de 15 μm, ver también Tabla 5.1) del chip al que se adicionaron células, se encuentran desplazadas a mayores valores de impedancia que las curvas obtenidas con la estructura S2 (estructura S2, G = W de 30 μm, ver también Tabla 5.1) de este mismo chip (frecuencias entre 70 y 100 kHz). Asimismo las curvas obtenidas con la estructur S2 se encuentran algo desplazadas hacia valores mayores de impedancia que las curvas obtenidas con la estructura S1.

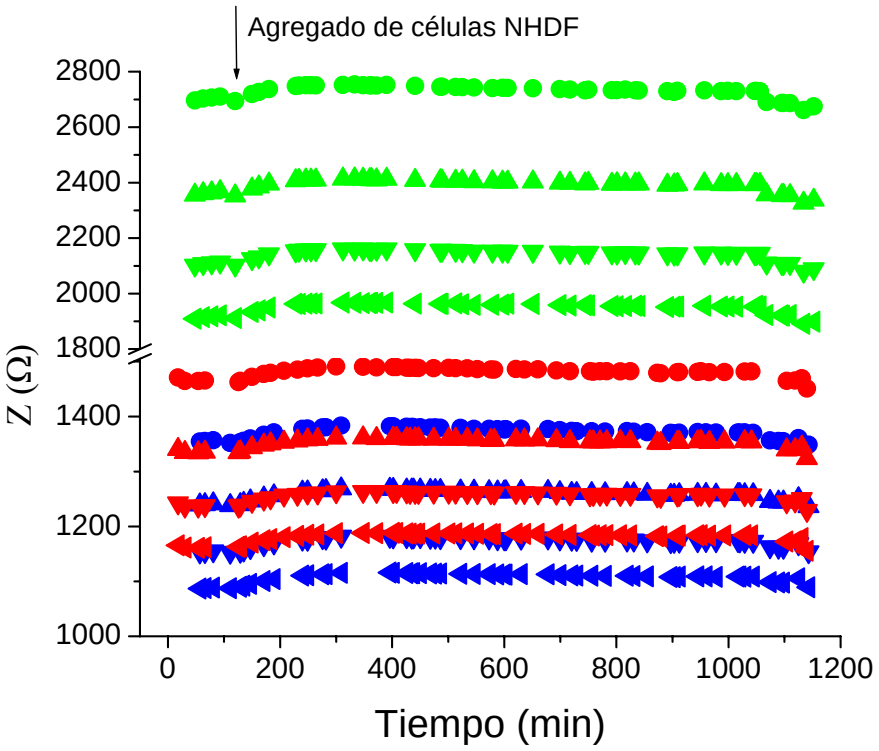


Figura 5.8: Espectros de impedancia realizados con las estructuras S1 (azul), S2 (rojo), y S3 (verde) a frecuencias de 70 (●, ●, ●), 80 (▲, ▲, ▲), 90(▼, ▼, ▼) y 100 (◄, ◄, ◄) kHz. La flecha indica el tiempo de reemplazo del medio $DMEM_{hg}$ por la muestra conteniendo células NHDF en medio $DMEM_{hg}$.

Por último, estos resultados son comparables con lo observado por Wang et al. (2008) al realizar un estudio del efecto de los distintos parámetros geométricos de IDES sobre los espectros de impedancia obtenidos, donde observó que la pendiente de las curvas de impedancia aumenta a medida que aumenta la frecuencia utilizada y disminuye el área del electrodo.

5.3.2.-Efectos en la adhesión celular de NHDF luego de incubarlas con NPs de Ag

En relación con el objetivo principal de este proyecto (estudiar la toxicidad de NPs de Ag al incubarlas con células NHDF), se decidió que el ensayo de exposición a las NPs deberían ser realizado bajo agitación, para asegurar que todas las células fueran expuestas a la totalidad de las NPs. Dado que este factor (la agitación) podría ser importante tanto desde el punto de vista del cultivo celular como desde las señales electroquímicas a ser obtenidas, se estudió en primer lugar el efecto de la agitación en la viabilidad e impedancia

de células NHDF (P15) incubadas a 37 °C en agitación o no en tubos no adherentes (ver Sección 5.2.6).

De acuerdo al recuento de células en condiciones de agitación y no-agitación, utilizando Trypan Blue, se pudo concluir que la muerte celular en las células agitadas durante 60 min, fue del 4%. En la Figura 5.9 se observa un cuadrante (de 4x4 cuadrados) con 2 células muertas. Para la cuantificación de las células se utiliza un colorante que permita distinguir células viables de las que no lo son, el más utilizado es el Trypan Blue (colorante vital). Las células no viables han perdido la permeabilidad selectiva de su membrana citoplasmática y por lo tanto se tiñen de azul, mientras que las células viables permanecen incoloras.

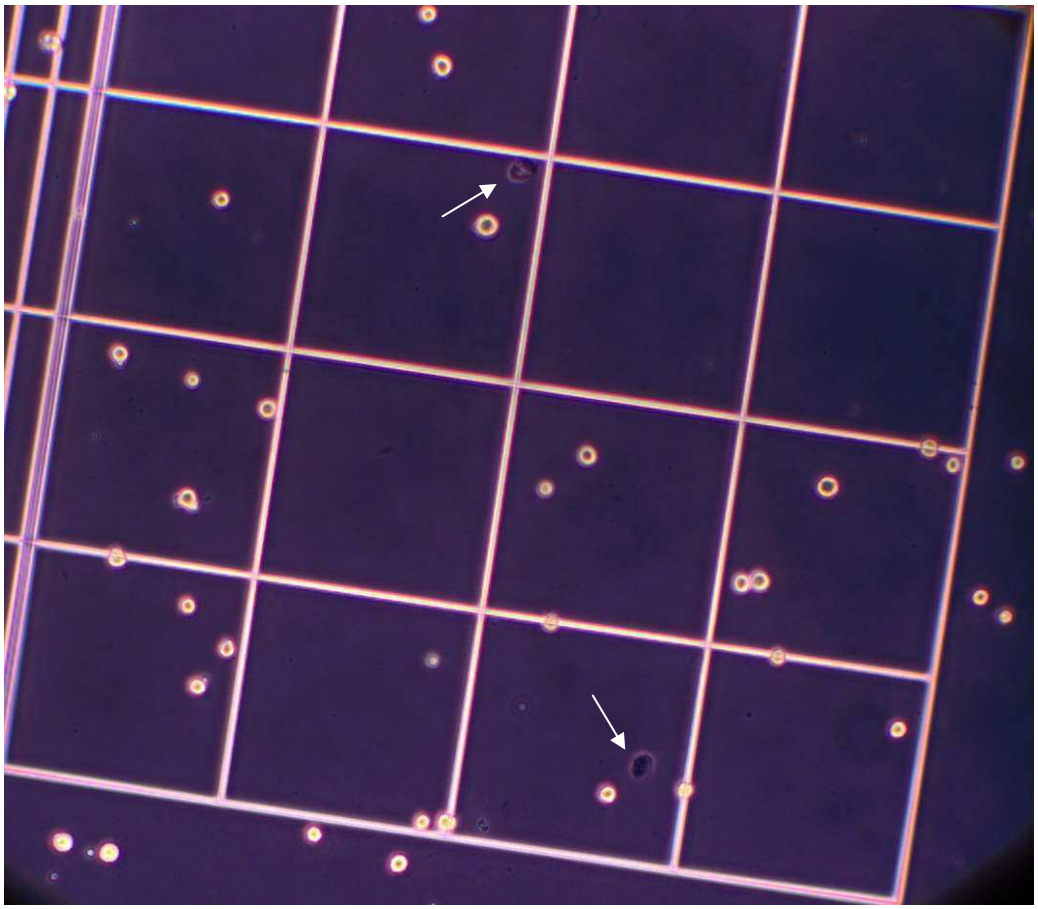


Figura 5.9: Microfotografía de un cuadrante de una cámara de Neubauer (compuesta por 4 cuadrantes y 16 cuadrados/cuadrante) sembrada con células NHDF luego de ser incubadas en agitación por 60 min y el agregado de Trypan Blue. Las flechas blancas indican las células muertas encontradas.

Se cultivaron células NHDF (P15) en agitación o no en tubos anti-adherentes durante 60 min. Luego se las colocó en dos chips y se realizó el estudio de impedancia a ω 70 kHz para estudiar el efecto de la agitación en la adhesión celular (Figura 5.10). Previo al

agregado de células, se midió durante 55 min medio $DMEM_{hg}$. Dado que no se utilizaron réplicas en estos experimentos, realizados en el AIT, y debido a la escasez de chips que funcionaran adecuadamente, los resultados sólo pueden ser analizados cualitativamente. La impedancia obtenida durante la incubación del medio $DMEM_{hg}$ en ambos chips es distinta (esto se había observado en la Sección 5.3.1, al medir en los mismos chips, medio $DMEM_{hg}$ únicamente), pero presentan una pendiente comparable (a diferencia de lo observado en la Sección 5.3.1) -13 mΩ/min en el chip A y -25 mΩ/min en el chip B.

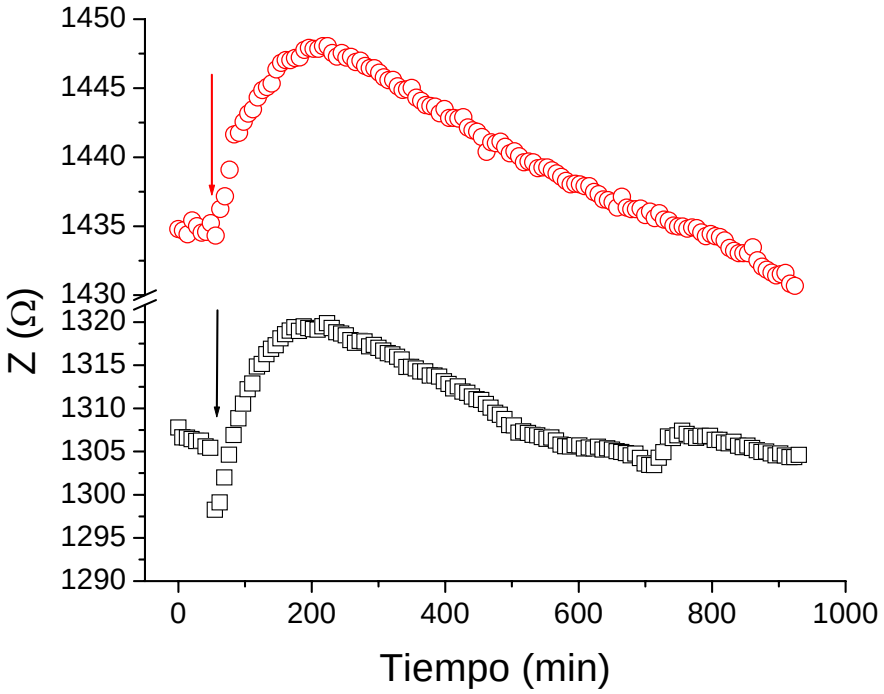


Figura 5.10: Impedancia obtenida al aplicar 70 kHz a la estructura S2 de chips conteniendo células NHDF en medio $DMEM_{hg}$ previamente incubadas en tubos anti-adherentes durante 60 min en agitación (○, denominado chip A) o sin agitar (□, denominado chip B). Las flechas muestran el tiempo en el que se agregaron las células.

Cuando estudiamos las curvas de adhesión celular (esto es luego de agregar las células NHDF en cada chip, indicado por la flecha en la Figura 5.10) observamos que el aumento de la pendiente es de 93 mΩ/min en las células agitadas y 107,6 mΩ/min en las células no agitadas, aún cuando la pendiente de ambas curvas de adhesión fue similar en los primeros 50 min (en la Figura 5.10 sería entre t = 55 min y t = 105 min), 255 *vs* 239 mΩ/min. Pero luego, la pendiente de la curva obtenida con células agitadas disminuye, lo cual podría estar indicando que la agitación modificaría de alguna manera la capacidad de

adhesión de las células. Este cambio en la pendiente no se había observado al cultivar células NHDF sin tratamiento en este chip (Figura 5.6). Pero, como ya se mencionó, estos chips contienen $IDES_p$ y están siendo reutilizados, por lo tanto los cambios que se van observando pueden deberse a modificaciones en la capa de nitruro de silicio o diferencias en la cinética de adhesión de las células debido a diferencias en la superficie de los chips.

La pasivación de la superficie de los IDES permite disminuir al mínimo corrientes faradaicas que pudieran generarse como resultado de la presencia de especies electroactivas en las muestras. La fase (ϕ) de un IDES permite saber que tipos de corrientes están circulando en los IDES (ver Sección 1.3.3). Una fase de 90° indica que las corrientes que están ocurriendo son únicamente no-faradaicas, o dicho de otro modo, la única corriente que está "circulando" es la capacitiva (Rana et al., 2011; Lisdat y Schäfer, 2008).

Al observar la fase de los chips utilizados hasta este momento, encontramos que ha disminuido respecto a lo que debería ser la fase de un IDES pasivado, la estructura S2 de ambos chips presenta una fase alrededor de los 71 y 75° durante el experimento mostrado en la Figura 5.10 (la fase medida al realizar el experimento de la Figura 5.6 fue de 78°). Dado que la fase inicialmente no fue de 90°, la pasivación realizada fue defectuosa y por lo tanto los tratamientos para eliminar restos proteicos y celulares (sucesivos pipeteos de tripsina, buffer fosfato, agua, quizá también eventuales roces con la punta de los tips) así como quizá la misma adhesión celular, podrían estar incrementando los defectos de la capa de pasivación, llevando a un comportamiento distinto de los $IDES_p$, o a un comportamiento celular distinto durante el proceso de adhesión celular, evidenciándose en diferencias en las pendientes de las curvas de adhesión.

Se estudió a continuación la toxicidad de la fase acuosa de la suspensión de las NPs dado que estas pueden formar agregados fácilmente dependiendo de las condiciones y composición del medio, y no se poseía información acerca de esta fase acuosa. Se incubaron células NHDF (P16) en presencia o ausencia de dicha fase acuosa, sin NPs, durante 60 min en agitación a 37 °C. Se utilizó como segundo control, la incubación de esta fase acuosa sin NPs y medio $DMEM_{hg}$ en ausencia de células (ver detalles en la Sección 5.2.6). Luego de esta incubación, se colocaron las distintas muestras en distintos chips.

2 de los 3 chips utilizados no funcionaron, el tipo de soldadura utilizado no estaba siendo el apropiado. La pendiente obtenida, en el chip que funcionaba, al medir medio $DMEM_{hg}$ fue negativa y se observó el cambio a una pendiente positiva al agregar la muestra con células NHDF, medio $DMEM_{hg}$ y la fase acuosa, sin NPs, de la suspensión coloidal. Estos datos fueron únicamente informativos dado que el comportamiento de este chip no fue el que se esperaba de acuerdo a los experimentos realizados anteriormente.

Se estudió por último la toxicidad de las NPs de Ag incubando células NHDF P17 con o sin NPs (10 μg/mL) en agitación durante 20 min o 60 min. Inicialmente se midió la impedancia de medio $DMEM_{hg}$ como línea de base, posteriormente el medio se reemplazó por las células que habían sido tratadas con o sin NPs solo durante 20 min en agitación.

La pendiente de la curva de adhesión de las células NHDF previamente incubadas en agitación durante 20 min con NPs (65 mΩ/min) fue menor que la del control, células previamente incubadas sin NPs durante 20 min (273 mΩ/min). Se observó una disminución (8 veces menor) de la impedancia máxima alcanzada en la curva de adhesión de las células que habían sido incubadas en presencia de NPs durante 20 min (durante la curva de adhesión la impedancia aumentó 4 Ω) frente a la impedancia máxima alcanzada por las células previamente incubadas en ausencia de NPs, durante 20 min (durante la curva de adhesión, la impedancia aumentó 32 Ω).

También pudimos observar diferencias cualitativas (mediante microscopía óptica) entre ambos chips luego de incubar 20 min (Figura 5.11) y 60 min (Figura 5.12) las células con o sin NPs.

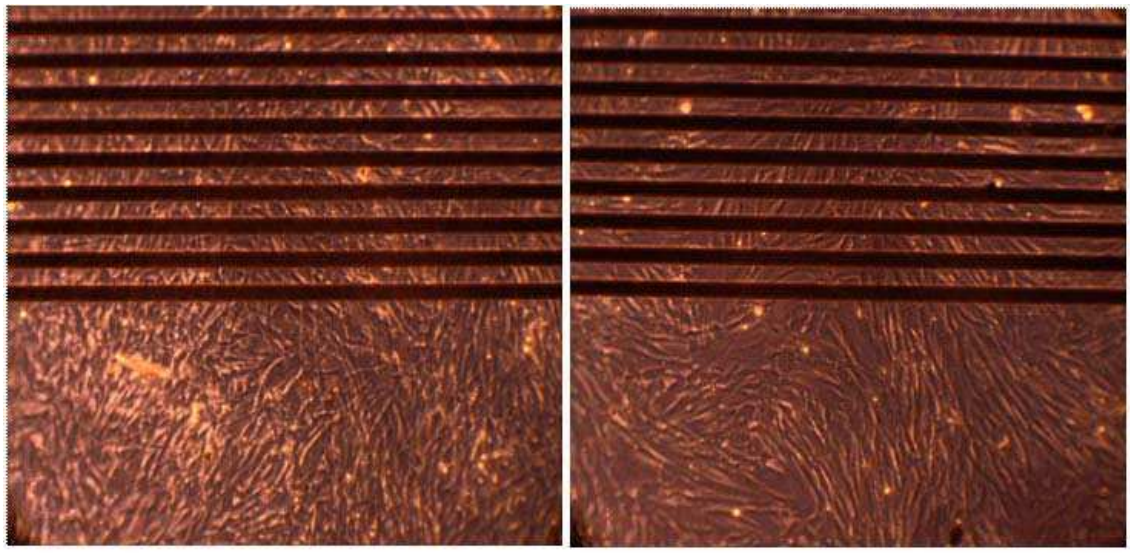


Figura 5.11: Microfotografías (microscopio invertido, 100x) tomadas luego de incubar los chips durante 12 h (como referencia se muestra la estructura S2 de $IDES_p$, el ancho de los dedos de Au se observa como líneas negras, de 30 μm). A la derecha se muestra un sector del chip conteniendo células NHDF incubadas en agitación durante 20 min en presencia de NPs de Ag; a la izquierda un sector del chip conteniendo células NHDF incubadas durante 20 min en agitación en ausencia de NPs.

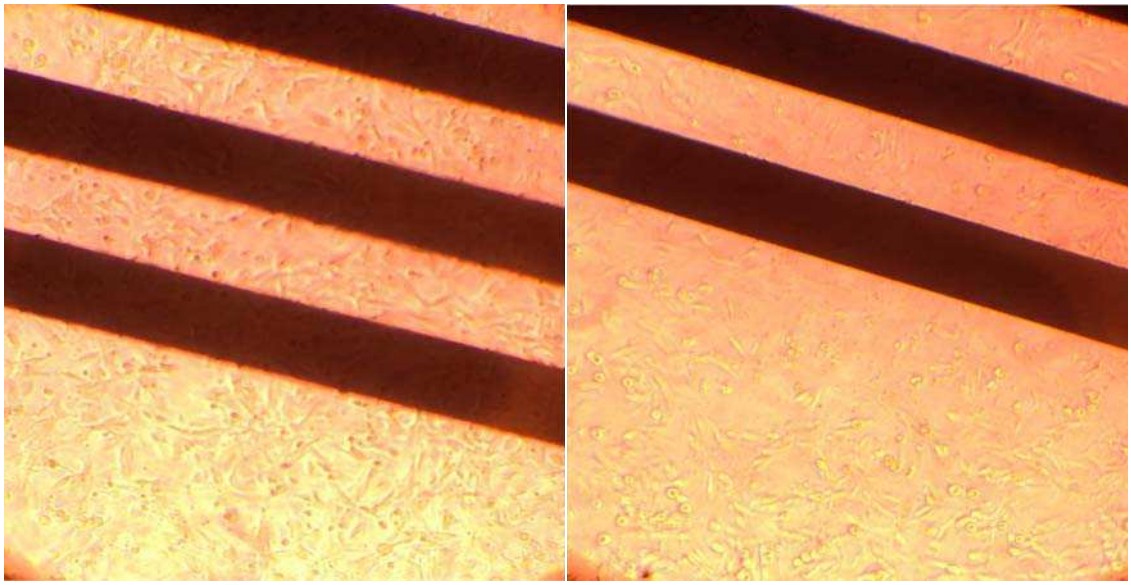


Figura 5.12: Microfotografías (microscopio invertido, 100x) tomadas luego de incubar los chips durante 2 h (como referencia se muestra la estructura S1 de $IDES_p$, el ancho de los dedos de Au se observa como líneas negras, de 150 μm). A la derecha se muestra un sector del chip conteniendo células NHDF incubadas en agitación durante 60 min en presencia de NPs de Ag; a la izquierda un sector del chip conteniendo células NHDF incubadas durante 60 min en agitación en ausencia de NPs.

Puede observarse una diferencia en la densidad celular adherida en el chip con células NHDF incubadas con NPs y el chip con células incubadas sin NPs, independientemente del tiempo de incubación, siendo menor la adhesión de las células incubadas en presencia de NPs de Ag.

Por lo tanto por el momento puede decirse que la solución conteniendo NPs de Ag (10 μg/L), en las condiciones ensayadas, sería tóxica para las células NHDF luego de incubar en agitación durante tan sólo 20 min.

De acuerdo con los resultados de los experimentos presentados hasta el momento en este Capítulo, decidimos realizar cambios en el enfoque de este nuevo tema. La conexión de los IDES al potenciostato (mediante soldadura a las pistas de oro generadas por microlitografia), la reutilización de los electrodos $IDES_p$ y la realización de mediciones individuales (simplificados) no nos permitían alcanzar nuestros objetivos adecuadamente; todos estos factores atentan contra la obtención de mediciones reproducibles, con bajos DS y por lo tanto que generen información relevante y confiable.

5.3.3.-Caracterización de $IDES_m$ mediante ensayos de EIS, utilizando soluciones de distinta conductividad

Debido a la poca reproducibilidad observada al reutilizar los $IDES_p$, a la necesidad de contar con réplicas en las mediciones, de manera de poder interpretarlas estadísticamente y a la necesidad de entender mejor el sistema con el que estábamos trabajando, realizamos una caracterización de electrodos $IDES_m$ nuevos, presentes en 4 chips, enviados por el Dr. Ertl desde Viena.

Se realizó la caracterización de los $IDES_m$ mediante la técnica de EIS y un barrido de frecuencias entre 0,1 y 300 kHz en presencia de soluciones de distinta conductividad de KCl (entre 0,01 y 10 mS), ver detalles en las Secciones 5.2.9 y 5.2.10.

Al utilizar los $IDES_m$ se pudo observar una relación lineal entre la impedancia y la conductividad de la solución en un rango entre 0,25 y 1,2 mS, en el rango de frecuencias entre 60 y 100 kHz (Figura 5.13).

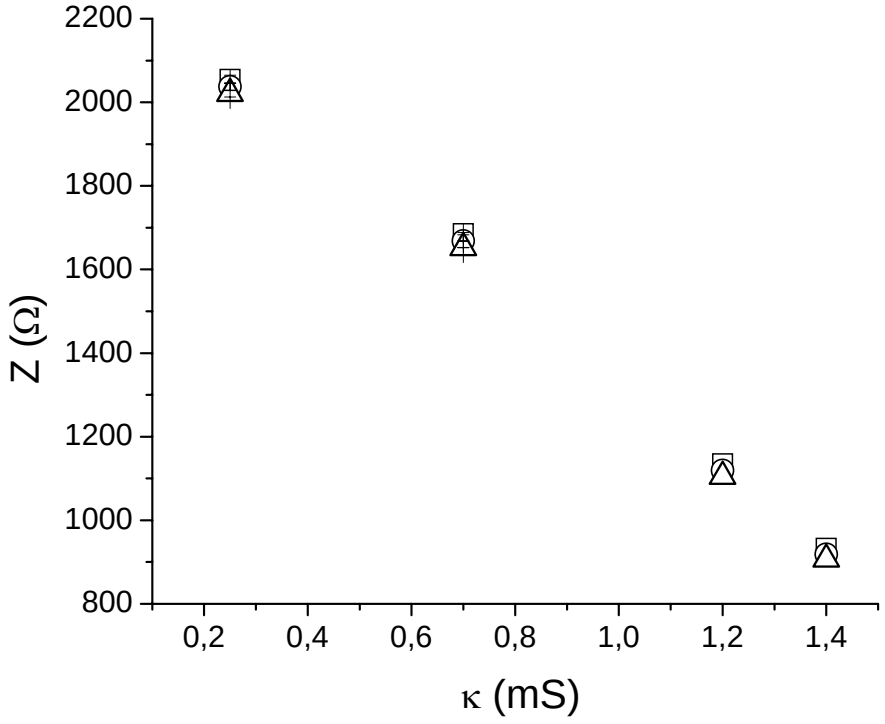


Figura 5.13: Ejemplo de rango de linealidad obtenido con los $IDES_m$ a 60 (□), 80 (○), y 100 (△) kHz.

También se observan pocas diferencias de los valores de impedancia que se registran entre estas frecuencias con todos los $IDES_m$ analizados. Los gráficos tipo *Bode* (Figura 1.16) y tipo *Nyquist* (Figura 1.17), así como los gráficos de fase, ϕ, obtenidos con todos los $IDES_m$ estudiados se ajustaron al tipo de gráficos esperado al medirse impedancia faradaica (ver Sección 1.3.3) dado que los IDES utilizados no estaban pasivados (Rana et al., 2011).

Ahora bien, se observó que los $IDES_m$ utilizados presentan un comportamiento distinto dependiendo de la ω analizada y la conductividad de la solución. En un *Bode plot* (Z *vs* ω) utilizando $IDES_m$ (Figura 5.14), una recta de pendiente nula se corresponde con una impedancia puramente resistiva mientras que una impedancia puramente capacitiva se observa como una recta de pendiente de -45°. El espectro de impedancia de una muestra utilizando IDES evidencia que a distintas frecuencias, la impedancia está gobernada por distintos elementos de un circuito eléctrico a distintas frecuencias (Rana et al., 2011).

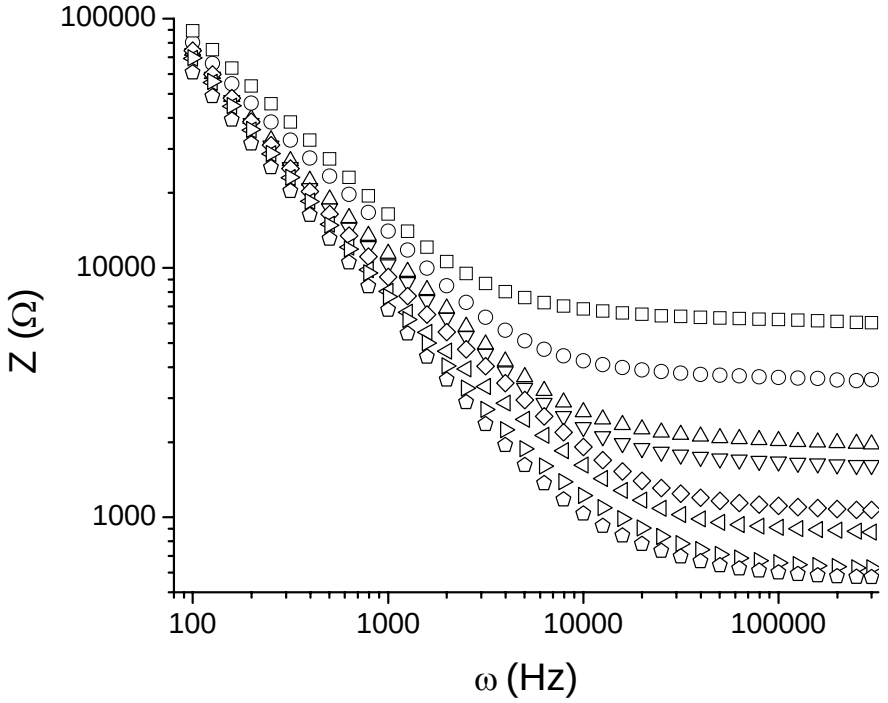


Figura 5.14: *Bode plot* de un espectro de impedancia obtenido con un $IDES_m$ al realizar un barrido de frecuencias, ω, a muestras conteniendo concentraciones de KCl de conductividad 0,010 (□); 0,070 (○); 0,250 (△); 0,7 (▽); 1,2 (◇); 1,4 (◁); 5,5 (▷) y 10 (⌂) mS.

Como se puede ver en la Figura 5.14, a bajas frecuencias se observa un comportamiento puramente capacitivo y a altas frecuencias un comportamiento puramente resistivo, dependiendo de la conductividad de la solución.

No hemos encontrado estudios de caracterización de IDES (ya sean pasivados o no) que nos permitan relacionar el comportamiento teórico de estos electrodos con el comportamiento de los mismos utilizando soluciones salinas y muestras con células. Hasta el momento, en la bibliografía hemos encontrado mediciones realizadas con $IDES_p$ (Richter et al., 2011) realizando estudios de adhesión celular de escasa relevancia biológica al no estudiarse réplicas debido a la baja reproducibilidad de los experimentos, o el uso de $IDES_m$ para estudiar la optimización de los parámetros geométricos de los IDES (Wang et al., 2008) y el comportamiento de los mismos en soluciones salinas (Rana et al., 2011) que no permiten correlacionar la teoría con las mediciones de muestras químicas y biológicas.

5.4.-DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La técnica de impedancia ha mostrado ser no destructiva y no invasiva, por lo tanto es ideal para el monitoreo continuo de cultivos celulares y su comportamiento ante diversos estímulos, pero sus aplicaciones aún presentan serios problemas para que esta técnica pueda utilizarse como transductor de biosensores para monitoreo ambiental, o aplicaciones clínicas y de diagnóstico.

El uso de $IDES_p$ permitiría realizar estudios de cultivos celulares a través de la técnica EIS de relativamente fácil interpretación, dado que, si los electrodos se encuentran adecuadamente pasivados, sólo se realizan mediciones de corrientes capacitivas y el aumento o disminución de la impedancia se debería exclusivamente a cambios ocurridos en la superficie de los electrodos, como la adhesión celular, secreción de proteínas o polímeros u otras sustancias en la superficie de los electrodos.

Se observó un aumento de la impedancia luego de agregar medio con células NHDF comparado con la impedancia registrada en el chip que solo contenía medio. De acuerdo a los registros bibliográficos (Lisdat y Schäfer, 2008; Richter et al., 2011) y las microfotografías tomadas, este aumento de impedancia es indicativo de que las células se están adhiriendo al sustrato durante el tiempo de incubación.

Los resultados de los espectros de impedancia obtenidos con $IDES_p$ de distintas dimensiones fueron comparables con los resultados presentados en la bibliografía consultada, la pendiente de las curvas de impedancia aumentó al aumentar la frecuencia

utilizada y, a una determinada frecuencia, al disminuir el área del electrodo (Wang et al., 2008).

Se observó un efecto en la impedancia con las células NHDF previamente incubadas en agitación y en tubos anti-adherentes durante 60 min (Figura 5.8 y 5.9). Las células NHDF crecen adheridas a un sustrato, si bien la muestra utilizada como control también fue incubada en tubos anti-adherentes, la suma de condiciones de stress en las células agitadas puede haber influido en su posterior capacidad para adherirse a los electrodos evidenciándose esto en un menor aumento de la impedancia.

Sí se observó un claro efecto en la impedancia (datos no presentados gráficamente) y la densidad celular (Figuras 5.11 y 5.12), aunque no lo suficientemente cuantitativo, luego de incubar las células en presencia o no de NPs de Ag, durante 20 y 60 min. La pendiente de la curva de adhesión, medida mediante la técnica de impedancia, de las células NHDF previamente incubadas en agitación durante 20 min con NPs (65 mΩ/min) fue menor que la del control, células previamente incubadas sin NPs (273 mΩ/min). Además la impedancia máxima alcanzada en la curva de adhesión de las células que habían sido incubadas en presencia de NPs durante 20 min disminuyó 8 veces frente a la impedancia máxima alcanzada por las células utilizadas como control. Bajo las condiciones estudiadas, la solución coloidal de NPs de Ag sería tóxica para las células NHDF.

Durante la caracterización de los $IDES_m$ se observó una relación lineal entre la impedancia y la conductividad de la solución en muestras de conductividad entre 0,25 y 1,2 mS, y frecuencias entre 60 y 100 kHz (Figura 5.12).

En estudios futuros nos proponemos estudiar la relación entre la teoría, el uso de $IDES_m$ en mediciones de muestras con soluciones salinas y sus posibles correlaciones con las mediciones de muestras conteniendo células, utilizando $IDES_m$ que presenten comportamientos similares para la medición de réplicas de muestras biológicas.

5.5.-REFERENCIAS

APHA, American Public Health Association (1995) "8050 Bacterial luminiscence" in: *Standard methods for the examination of water and wastewater.* (Eaton A., Clesceri L., Greenberg A. eds.) 19st ed. APHA. Washington DC, US

Ben-Yoav H., Biran A., Pedahzur R., Belkin S., Buchinger S., Reifferscheid G., Shacham-Diamand Y. (2009) A whole cell electrochemical biosensor for water genotoxicity bio-detection. Electrochim Acta 54, 6113-6118

Bulich A.A. (1982) A practical and reliable method for monitoring the toxicity of aquatic samples. Process Biochem 17, 45-47

Donaldson K., Tran C.L. (2002) Inflammation caused by particles and fibers. Inhal Toxicol 14, 5-27

Elman N.M., Ben-Yoav H., Sternheim M., Rosen R., Krylov S., Shacham-Diaman Y. (2008) Towards toxicity detection using a lab-on-chip based on the integration of MOEMS and whole-cell sensors. Biosens Bioelectron 23, 1631-1636

Gottschamel J., Richter L., Mak A., Jungreuthmayer C., Birnbaumer G., Milnera M., Brückl H., Ertl P. (2009) Development of a disposable microfluidic biochip for multiparameter cell population measurements. Anal Chem 81, 8503-8512

Ionescu-Zanetti C., Shaw R.M., Seo J., Jan Y., Jan L.Y., Lee L.P. (2005) Mammalian electrophysiology on a microfluidic platform. Proc Natl Acad Sci U.S.A 102, 9112-9117

Komori K., Nada J., Nishikawa M., Notsu H., Tatsuma T., Sakai Y. (2009) Simultaneous evaluation of toxicities using a mammalian cell array chip prepared by photocatalytic lithography. Anal Chim Acta 653, 222-227

Lisdat F., Schäfer D. (2008) The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. Anal Bioanal Chem 391, 1555-1567

Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J. (2005) Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. Environ Health Persp 113, 823-839

Rana S., Page R.H., McNeil C.J. (2011) Impedance spectra analysis to characterize interdigitated electrodes as electrochemical sensors. Electrochim Acta 56, 8559-8563

Richter L., Charwat V., Jungreuthmayer C., Bellutti F., Brueckl H., Ertl P. (2011) Monitoring cellular stress responses to nanoparticles using a lab-on-a-chip. Lab Chip 11, 2551-2560

Schrand A.M., Rahman M.F., Hussain S.M., Schlager J.J., Smith D.A., Syed A.F. (2010) Metal based nanoparticles and their toxicity assessment. Wiley Interdiscip Rev: Nanomed Nanobiotechnol 2, 544-568

Tizzard A., Webber J., Gooneratne R., John R., Hay J., Pasco N. (2004) MICREDOX: application for rapid biotoxicity assessment. Anal Chim Acta 522, 197-205

Wang L., Wang H., Wang L., Mitchelson K., Yu Z., Cheng J. (2008) Analysis of the sensitivity and frequency characteristics of coplanar electrical cell–substrate impedance sensors. Biosens Bioelectron 24, 14-21

Whitesides G.M. (2006) The origins and the future of microfluidics. Nature 442, 368-373

Yoo S.K., Lee J.H., Yun S-S., Gu M.B., Lee J.H. (2007) Fabrication of a bio-MEMS based cell-chip for toxicity monitoring. Biosens Bioelectron 22, 1586-1592

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES GENERALES

6.1.-CONCLUSIONES GENERALES

En esta Tesis se desarrollaron biosensores y bioensayos basados en distintas técnicas electroquímicas, utilizando principalmente células microbianas, pero también células de mamífero. Los trabajos realizados permitieron la publicación de 3 trabajos en revistas de alto índice de impacto, una patente y otros 2 trabajos se encuentran en preparación.

Se logró desarrollar satisfactoriamente un bioensayo amperométrico basado en la respirometría de ferricianuro, utilizando a la cepa bacteriana *K. pneumoniae* como material biológico, lo que permitió determinar muestras reales de aguas cloacales y muestras simuladas, con una buena correlación con los valores obtenidos mediante el ensayo BOD_5, calculado como $BOD_{K.\ pneumoniae}/BOD_5$ y con un RSD del orden del 10%.

Cuando la cepa fue utilizada a partir de un cultivo líquido, el rango lineal del bioensayo fue entre 30 y 500 mg BOD_5/L (r^2 = 0,9926) al utilizar GGA como estándar de calibración y entre 30 y 200 mg BOD_5/L (r^2 = 0,9868) al utilizar $OECD_{std}$ como estándar de calibración. Este rango lineal representa una gran mejora frente al rango lineal del ensayo BOD_5 (que se encuentra entre 1 y 9 mg BOD_5/L) así como respecto de otros trabajos basados en el uso de biosensores o bioensayos para la determinación rápida de BOD.

Los cultivos liofilizados de esta cepa, utilizando como sustancias crioprotectoras leche-MSG (leche adicionada con glutamato de sodio), cultivo A_4, o trehalosa, cultivo A_6, permitieron obtener resultados reproducibles de curvas de calibración de patrones de GGA y OECD, con rangos lineales similares a los obtenidos con el cultivo líquido. Las capacidades metabólicas de los cultivos liofilizados se mantuvieron hasta 35 días después de la liofilización, con almacenamiento a -20 °C.

El uso del formaldehido para finalizar la reducción de ferricianuro permitió obtener determinaciones reproducibles, sin presentar interferencias electroquímicas y demostró detener este proceso, catalizado por los microorganismos, hasta 74 h luego de su agregado. Además se demostró que impide el crecimiento microbiano en las muestras.

El uso de electrodos WE y CE de tinta de Au realizados por *screen-printing*, en un sistema de convección forzada (sistemas Di_2 y Di_3), permitió obtener curvas de calibración, con los cultivos liofilizados A_4 y A_5 de *K. pneumoniae*, con un rango lineal mayor al del ensayo BOD_5 (entre 30 y 500 mg BOD_5/L utilizando GGA y entre 25 y 110 mg BOD_5/L utilizando $OECD_{std}$), aunque no tan buenos como los obtenidos utilizando el electrodo de

Pt y estos cultivos liofilizados. Este sistema de vibración podría mejorarse, así como también implementarse el uso de electrodos nuevos en cada ensayo, de manera de lograr mejorar la reproducibilidad de los experimentos.

El biosensor desarrollado, basado en el uso de un electrodo potenciométrico sensible a CO_2, presentó algunas desventajas respecto del bioensayo amperométrico recién mencionado. Los RSD obtenidos con el biosensor potenciométrico al realizar las determinaciones de BOD de las muestras reales de aguas cloacales y 2 muestras de agua simuladas, fueron alrededor del 15%. Debería estudiarse la posibilidad de mejorar la reproducibilidad de este método, ya sea eligiendo un material biológico más adecuado o utilizando $OECD_{std}$ como patrón de calibración antes de las determinaciones.

Otra desventaja de este biosensor para la determinación rápida de BOD es el decaimiento de su respuesta luego de 7 días de almacenamiento a 4 °C al utilizar a *S. cerevisiae* como material biológico. Los cultivos liofilizados de *K. pneumoniae* presentaron buena estabilidad metabólica durante al menos de 35 días, almacenados a -20 °C.

La mayor ventaja del uso del biosensor potenciométrico fue que al utilizar a *S. cerevisiae* inmovilizada en membrana, se observó una relación lineal de su respuesta a bajas concentraciones de BOD_5 (entre 1 y 47 mg BOD_5/L) realizando curvas de calibración con patrones de GGA.

Por último, la determinación rápida de toxicidad de NPs de Ag en células NHDF, basada en el uso de IDES pasivados con nitruro de silicio ($IDES_p$) y la técnica de EIS, produjo resultados interesantes acerca de las condiciones en las que se realizan las determinaciones. Normalmente en este tipo de estudios no se utilizan réplicas, la producción en escala de los electrodos no es aún adecuada (los electrodos no presentan entre sí un comportamiento similar), las conexiones eléctricas son inadecuadas y las mediciones están poco estandarizadas, probablemente por ser un área de reciente desarrollo.

El uso de $IDES_p$ permitiría realizar estudios de cultivos celulares a través de la técnica EIS de relativamente fácil interpretación, dado que, si los electrodos se encuentran adecuadamente pasivados, sólo se realizan mediciones de corrientes capacitivas y el aumento o disminución de la impedancia se debería exclusivamente a los cambios producidos en la superficie de los electrodos. Pero la técnica de pasivación de los electrodos parece no cumplir con los requisitos necesarios (los IDES no suelen estar adecuadamente pasivados o esto no es tan fácil de lograr).

Aún así pudimos obtener algunos resultados interesantes como un claro efecto en la impedancia y la densidad celular, luego de incubar las células NHDF en agitación y en

presencia o no de NPs de Ag, durante 20 y 60 min, que nos permiten indicar que, bajo las condiciones estudiadas, la solución coloidal de NPs de Ag es tóxica para las células NHDF. La pendiente de la curva de adhesión, medida mediante la técnica de impedancia, de las células NHDF previamente incubadas en agitación durante 20 min con NPs (65 mΩ/min) fue menor que la del control, células previamente incubadas sin NPs (273 mΩ/min). La densidad celular que se observó en los chips también fue menor en las células incubadas previamente en presencia de NPs, para ambos tiempos de incubación, 20 o 60 min.

El desarrollo de biosensores y bioensayos es un área de gran interés científico dado que permiten realizar determinaciones analíticas de manera rápida y precisa, a un bajo costo y presentan diversas aplicaciones (medioambientales, industriales y clínicas). Sin embargo son varios los factores a tener en cuenta para el diseño adecuado de cada biosensor o bioensayo.

La tendencia actual en el área es la miniaturización de los dispositivos, la implementación de diversos tipos de transductores en un mismo dispositivo y la incorporación de diversas tecnologías (producción de micro y nano electrodos, implementación de materiales novedosos y de microfluídica, el uso de programas informáticos virtuales y microelectrónica, entre otros) de manera de lograr desarrollar dispositivos para el monitoreo *in-situ*, con electrodos descartables y operados de manera remota o sistemas implantables de uso clínico y/o farmacológico.