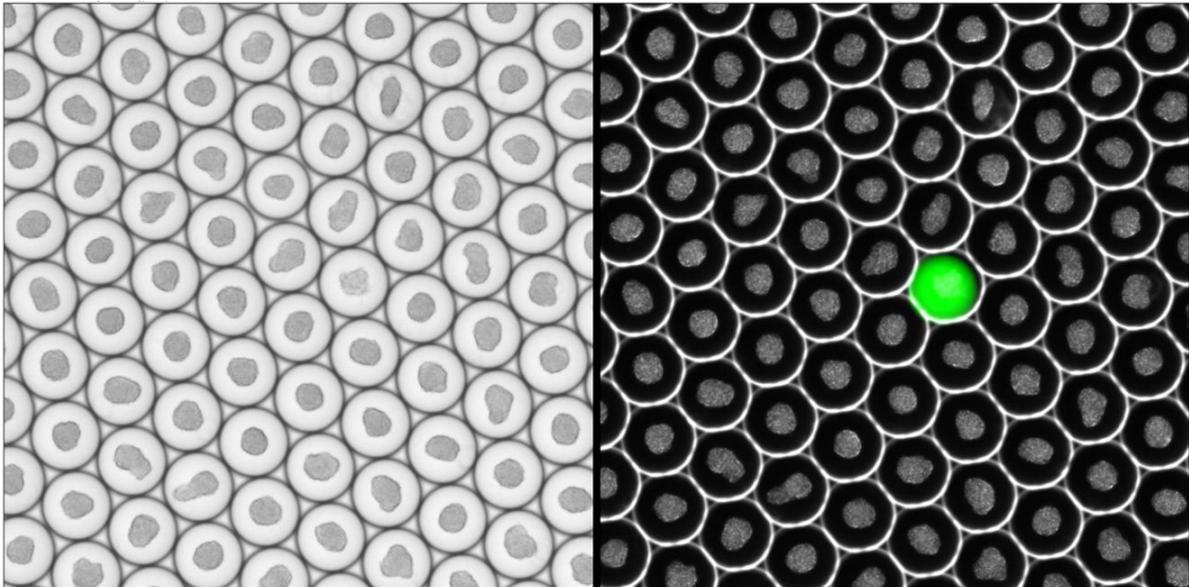


Microfluídica: llevando la experimentación a la escala y diversidad de microorganismos

No podemos ver los microbios. ¿Cómo podemos encontrarlos? ¿Que son especiales entre millones de otros?



© Sundar Hengoju (Leibniz-HKI)

Encontrar la aguja en el pajar: se separaron millones de variantes genéticas de una cepa microbiana en pequeñas gotas y se dejó que crecieran individualmente. Luego se utilizó una señal luminosa para identificar las pocas células raras que tienen una actividad particular.

Miriam A. Rosenbaum^{1,2,3} y Martina Graf^{1,2}

¹Instituto Leibniz de Investigación de Productos Naturales y Biología de las Infecciones - Instituto Hans-Knöll - Jena, Alemania

²Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Friedrich Schiller de Jena, Alemania

³. Grupo de Excelencia Balance of the Microverse, Universidad Friedrich Schiller de Jena, Alemania

Microfluídica

Sinopsis

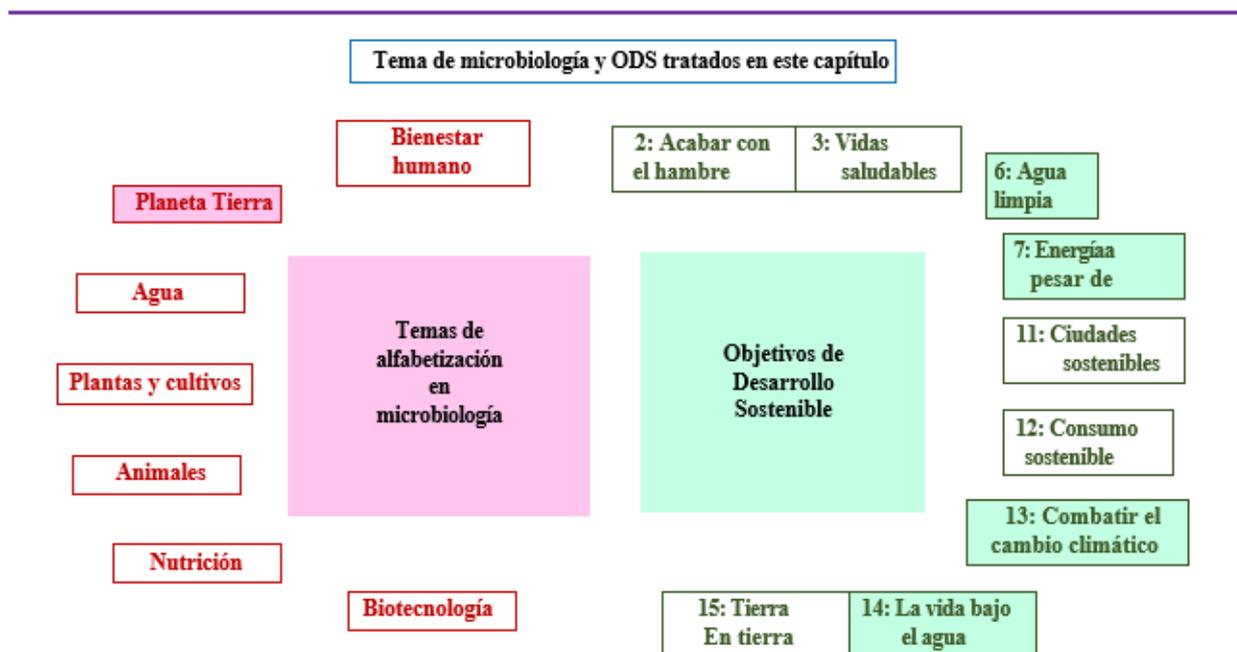
La microfluídica es el estudio y la manipulación de fluidos a escala submilimétrica. Esta tecnología permite el análisis y el control de células microbianas individuales, lo cual es esencial dada la gran diversidad e importancia de los microorganismos. Los métodos tradicionales de cultivo en masa son inadecuados para estudiar el comportamiento microbiano individual y descubrir nuevos productos naturales.

La microfluídica ofrece numerosas ventajas, entre ellas, volúmenes de muestra reducidos, tiempos experimentales más rápidos y la capacidad de realizar experimentos complejos en un solo chip. Técnicas como la microfluídica de flujo continuo y la microfluídica de gotas permiten un control preciso y una alta paralelización de los cultivos microbianos.

Las aplicaciones de la microfluídica en microbiología incluyen el estudio del crecimiento, el comportamiento y las interacciones microbianas a nivel de células individuales, la detección de nuevos productos naturales y la optimización de procesos biotecnológicos. La tecnología también es prometedora para la medicina personalizada, el diagnóstico en el punto de atención y la detección rápida de la resistencia a los antibióticos. Los futuros avances en microfluídica tienen potencial para realizar contribuciones significativas a la atención sanitaria, el control medioambiental y las prácticas industriales sostenibles.

La microbiología y el contexto social

La microbiología: Comprensión de los microorganismos, descubrimiento de nuevos productos naturales, análisis de células individuales, soluciones a problemas de salud, diagnóstico en el punto de atención. Cuestiones de sostenibilidad: tecnología de ahorro de recursos, bioeconomía.



Microfluídica: la microbiología

1. *¿Por qué necesitamos nuevos métodos para estudiar los microbios?* Los microorganismos son los organismos más comunes en la biosfera. Incluyen principalmente organismos unicelulares de los tres dominios de la vida (Archaea, Bacteria y Eukarya) y son extremadamente diversos. Genéticamente hablando, los humanos están más estrechamente relacionados con otras especies animales, como las vacas, que incluso dos cepas de la misma especie bacteriana. Hoy sabemos que estos microorganismos son extremadamente importantes para nosotros los humanos. Llevamos en nuestro cuerpo al menos tantas células de microorganismos como células humanas reales. Nos ayudan a mantenernos sanos y a digerir nuestros alimentos.

Los microorganismos también pueden producir productos naturales que son vitales para el desarrollo de fármacos, como antibióticos, agentes anticancerígenos, vitaminas y vacunas. Los productos naturales como polímeros, surfactantes y bioherbicidas también son relevantes para los procesos industriales. Para entender cómo los microbios también pueden enfermarnos y para encontrar nuevos productos naturales, necesitamos estudiar los microbios.

La gran mayoría de los microorganismos son aún desconocidos. Se calcula que hay alrededor de un billón de especies de microbios en la Tierra y el 99,999 por ciento aún no se ha descubierto ni estudiado en el laboratorio. Incluso las propiedades fisiológicas y ecológicas de los pocos microbios conocidos son en su mayoría poco conocidas. La razón principal de esto es que los microbios son en su mayoría unicelulares, por lo que un organismo no proporciona mucho material para el estudio. Debido a esto, los microbiólogos tienden a estudiar no un organismo, sino millones o miles de millones que producen mediante cultivo: permitiendo que un solo microbio se reproduzca muchas, muchas veces. Este es el procedimiento estándar para amplificar el material microbiano para su estudio. El problema, entonces, es que los microbiólogos tienden a estudiar las propiedades no de un organismo, sino de muchos, suponiendo que todos son iguales y tienen propiedades y comportamiento idénticos, por ejemplo, si crecen bien o qué moléculas se están produciendo en qué condiciones de nutrientes y oxígeno.

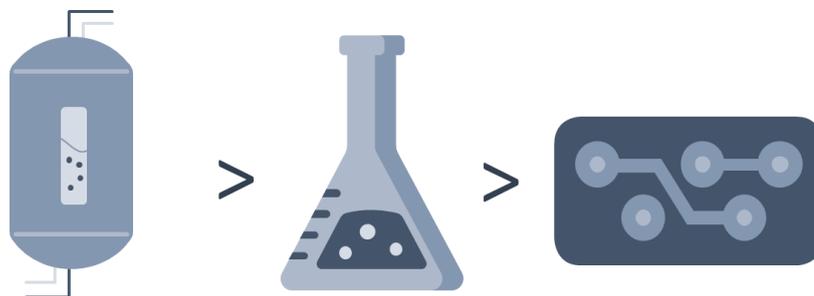
También lo vemos en la historia: hemos utilizado los procesos masivos de los microbios durante millones de años para fermentar cerveza o queso sin siquiera saber que se trata de reacciones microbianas. Solo descubrimos que los microbios están detrás de estas reacciones cuando los científicos pudieron usar un microscopio para observar directamente estas diminutas células.

Sin embargo, estudios recientes han demostrado que las diferentes células de un cultivo microbiano se comportan de manera diferente y que es incorrecto suponer que todas las células microbianas descendientes de una célula parental tendrán el mismo comportamiento o uno similar al mismo tiempo. Por lo tanto, a pesar de que las técnicas de cultivo en masa (por ejemplo, en un matraz o botella) siguen utilizándose ampliamente, no son adecuadas para buscar de manera eficiente nuevos productos naturales, cultivar organismos desconocidos con necesidades muy específicas o estudiar propiedades específicas de los microbios. Para ello, necesitamos analizar los organismos a nivel individual, unicelular, y la microfluídica es una gran herramienta para hacerlo.

2. *¿Qué es la microfluídica?* La microfluídica describe el comportamiento, el control y la manipulación de líquidos y gases en el rango submilimétrico. Por lo general, los líquidos se bombean a través de pequeñas estructuras de canales que se crean en un chip microfluídico. Este chip microfluídico generalmente se conecta a bombas para hacer pasar los fluidos a través de los canales y se coloca bajo un microscopio o sensor para observar el contenido y realizar análisis. La mayor ventaja de la microfluídica para la microbiología sobre los métodos de

Un marco educativo en microbiología centrado en la niñez

cultivo estándar, como un biorreactor, es que podemos estudiar una sola célula microbiana y su descendencia a la vez. Otra ventaja obvia es la reducción de tamaño, lo que minimiza la muestra, los reactivos y los volúmenes químicos necesarios. Pero también, se pueden realizar muchas operaciones simultáneamente debido al tamaño compacto, lo que reduce el tiempo necesario para los experimentos.



	Biorreactor	Agitación en matraz	Chip microfluídico
Volumen	1 - 1000 L	0.01 - 1 L	Más pequeños que 0.000001 L ($10^{-15} - 10^{-6}$ L)
Costo	alto	medio	bajo
Experimentos en paralelo	pocos	pocas docenas	millones
Método analítico	análisis masivo	análisis masivo	estudios de única célula

Los chips microfluídicos pueden tener más que canales o estructuras de captura. La combinación de diferentes elementos funcionales como válvulas diminutas, electrodos o lentes permite diseñar experimentos e investigaciones complejos en un solo chip, como en un laboratorio completamente equipado. Por lo tanto, los chips microfluídicos en los que se pueden realizar uno o varios procesos de análisis suelen denominarse dispositivos de laboratorio en un chip. El nombre se origina a partir de uno de los objetivos de la microfluídica: miniaturizar un proceso de laboratorio completo al tamaño de un chip para, por ejemplo, analizar rápidamente muestras ambientales en el campo o muestras humanas en un entorno clínico.

En el caso más simple, los chips microfluídicos no necesitan ningún equipo externo, salvo una pipeta para introducir la muestra en el chip. Sin embargo, este nivel de simplificación de la operación es todavía bastante raro. Los dispositivos microfluídicos actuales suelen ser más bien un chip en un laboratorio que un laboratorio en un chip, ya que la mayoría de las veces se necesitan muchos equipos externos como bombas, conectores, microscopios voluminosos y sensores.

3. Cientos de millones de pequeños biorreactores. Las células individuales pueden quedar atrapadas en estructuras microfluídicas como cámaras o gotitas, incubarse y visualizarse mediante, por ejemplo, métodos microscópicos. Por lo tanto, se pueden estudiar células individuales y colonias isoclonales derivadas de una sola célula. Esto es una enorme ventaja, ya que diferentes células de una cepa pueden mostrar un comportamiento molecular y fisiológico diferente, al igual que varían los hermanos humanos. Para poder estudiar tales diferencias de comportamiento de las células, es necesario separarlas físicamente y esto solo es posible en tales estructuras microfluídicas.

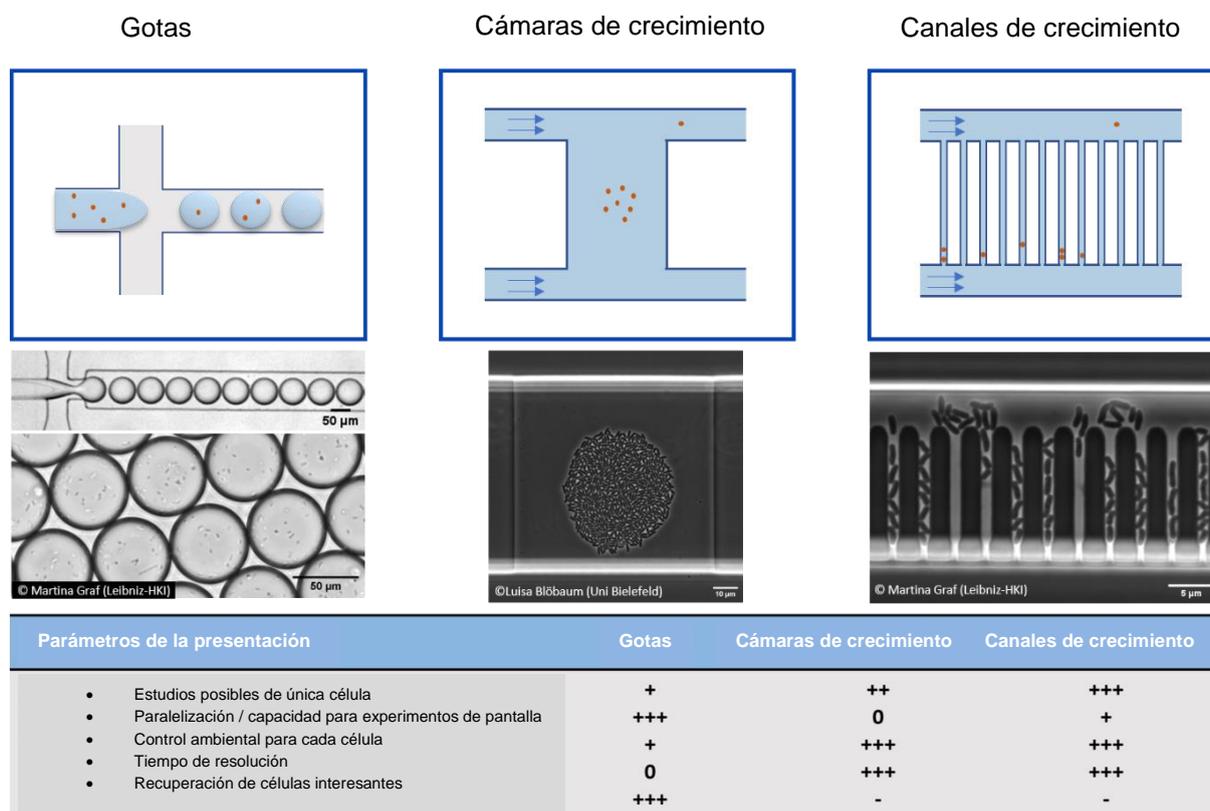
Además, se puede lograr un control preciso del entorno inmediato cuando las células se encuentran atrapadas en pequeñas cámaras y el medio pasa continuamente a través del chip (microfluídica de flujo continuo). De este modo, se puede observar directamente el crecimiento, la división y el destino de una sola célula. En este caso, incluso se puede controlar el tiempo de exposición de las células a diferentes sustancias químicas que se bombean a través de ellas y se puede estudiar la respuesta directa de los microorganismos a las sustancias químicas, ya sean

Un marco educativo en microbiología centrado en la niñez

estimulantes o toxinas. Un ejemplo de aplicación es encontrar la mejor composición del medio para una respuesta celular específica (por ejemplo, crecimiento o producción de sustancias). Cientos de estas pequeñas estructuras de captura se pueden operar en paralelo en un chip microfluídico.

En un modo de operación diferente, las células pueden quedar atrapadas dentro de pequeñas gotas de femto a microlitros (10^{-15} – 10^{-6} litros) que fluyen con la corriente fluídica (microfluídica de gotas). Las gotas se crean cuando dos fluidos inmiscibles (fluidos que no se mezclan) entran en contacto, generalmente agua y aceite. Esto permite una paralelización mucho mayor de las condiciones experimentales, porque cada gota acuosa puede ser un biorreactor miniaturizado con su propia condición ambiental o un diferente contenido microbiano: en otras palabras, cada microbio tiene su propia casa para crecer no tienen que compartir recursos con otros, sólo con sus propios descendientes.

Para la mayoría de los microorganismos, se desconocen las condiciones ideales en las que crecerán mejor. Gracias a la alta paralelización de las gotitas, se pueden analizar miles de condiciones y distintas cepas en un solo experimento. Si bien las gotitas imitan las condiciones de un biorreactor, el entorno dentro de cada gotita no se puede controlar con tanta precisión como con la microfluídica de flujo continuo.



Esquema de gradiente: - imposible, 0- nivel básico, comparado al cultivo masivo, +/++/+++ grado de característica mejorada en comparación con el cultivo a granel

4. Aplicaciones de la microfluídica en microbiología. Los chips microfluídicos se utilizan para abordar muchos tipos diferentes de cuestiones de investigación microbiológica. Podemos elegir entre operaciones que atrapan una sola célula y permiten su observación continua y directa, u operaciones de millones de cultivos paralelos en gotas que nos permiten examinar una gran cantidad de células para una determinada función.

En la microfluídica basada en células individuales, el comportamiento de crecimiento de una célula, cuándo y cómo se divide una célula, los procesos de envejecimiento y las interacciones entre células se pueden estudiar directamente observando la célula a través de un

Un marco educativo en microbiología centrado en la niñez

microscopio. De este modo, podemos aprender muchos detalles sobre la vida y las interacciones de un determinado microorganismo. Dado que muchos microorganismos pueden vivir en condiciones muy extremas, como un alto nivel de sal, un pH bajo o con compuestos tóxicos, nos interesa comprender sus estilos de vida con más detalle. E incluso si parecen muy diferentes de nosotros, los humanos, podemos aprender sobre los procesos fisiológicos y bioquímicos básicos de estas diminutas células que también son importantes para comprender las funciones biológicas en general (como dijo una vez Jacques Monod: "Lo que es cierto para *E. coli* es cierto para el elefante"). Por lo tanto, estas células microbianas representan excelentes modelos para estudios biológicos en fisiología o genética.

Por otro lado, tenemos esta gigantesca diversidad de propiedades y metabolitos potenciales en el mundo microbiano y existe un gran interés en los procesos de cribado, donde se buscan células con un comportamiento específico entre millones de otras células. Este cribado se puede realizar de manera efectiva en sistemas microfluídicos como las gotas debido a la alta paralelización y alto rendimiento: en pocas horas se pueden cultivar y analizar millones de microbios individuales. Un comportamiento específico puede ser la formación de un producto natural hasta ahora desconocido.

Tenemos una necesidad urgente de encontrar nuevos productos naturales, especialmente antibióticos, ya que los antibióticos existentes están perdiendo su eficacia. La mayoría de los antibióticos comunes tienen su origen en microorganismos. Los microorganismos patógenos son muy activos en el desarrollo de resistencias contra estos antibióticos comunes, lo que nos deja cada vez con menos estrategias de defensa contra enfermedades microbianas como la neumonía o la tuberculosis. Con la microfluídica, podemos ser más eficaces en la detección de la gran mayoría del mundo microbiano desconocido para posibles nuevos fármacos candidatos.

Además, podríamos querer seleccionar un cultivo microbiano para los mejores productores de una enzima altamente activa, lo cual es de interés para la biotecnología, por ejemplo, en detergentes para ropa, o en la fabricación de productos químicos para reemplazar reacciones no sostenibles. O podemos extraer toda la comunidad de microorganismos de ciertos entornos como el suelo, el agua o el intestino de un animal y utilizar la microfluídica de gotas para separarlos y cultivarlos en el laboratorio para estudios futuros. Las técnicas de cultivo tradicionales no son muy exitosas en esta tarea y solo cultivan entre el 3 y el 5 % de los diferentes miembros de la comunidad. Con la microfluídica de gotas, cada célula tiene su propio entorno y tiene una mejor oportunidad de crecer porque no tiene competidores.

También se pueden realizar estudios evolutivos. Las cámaras microfluídicas con diferentes condiciones de crecimiento se conectan a través de corredores que imitan diferentes paisajes ambientales. Las poblaciones bacterianas en estos hábitats interactúan entre sí a través de procesos de extinción y colonización. Por lo tanto, se puede estudiar la adaptación bacteriana a nuevos nichos ecológicos.

5. *Perspectivas (Aplicaciones futuras)*. El campo de la microfluídica se ha convertido en un campo de rápido crecimiento. campo desde sus inicios a principios de la década de 1980. Los sistemas sin células vivas ya son una parte central de muchos procesos analíticos, por ejemplo, los dispositivos de medición de azúcar en sangre o cuando se analiza sangre y orina en un laboratorio.

Debido a su manejo sencillo, rentabilidad y rápida ejecución, los sistemas microfluídicos tienen. El desarrollo de métodos para capturar células individuales, combinados con la manipulación precisa de fluidos, ha traído consigo un enorme potencial para el diagnóstico en el punto de atención. Las aplicaciones potenciales de los diagnósticos en el punto de atención basados en células se encontrarían en el campo de la medicina personalizada. Las células tumorales podrían tratarse con diferentes fármacos y combinaciones de ellos en dispositivos

Un marco educativo en microbiología centrado en la niñez

microfluídicos, para analizar qué fármaco tiene el mayor potencial de tratamiento antes de administrarlo al paciente. De manera similar, la microfluídica también podría utilizarse para la detección rápida de sepsis y resistencia a los antibióticos. Se podrían analizar muestras de pacientes para detectar resistencias bacterianas a todos los antibióticos disponibles en un solo experimento. Se podría elegir un tratamiento rápido y eficaz, lo que reduciría la mortalidad de los pacientes y la propagación de resistencias a los antibióticos.

Otra forma de combatir la amenaza de la resistencia a los antibióticos es encontrar nuevos antibióticos mediante el análisis de organismos conocidos y desconocidos. Con la posibilidad de una paralelización extremadamente alta, la microfluídica tiene el potencial de desempeñar un papel importante en el descubrimiento de nuevos productos naturales.

Hay grandes esperanzas de que las aplicaciones mencionadas anteriormente y muchas más hagan avanzar la ciencia, revolucionen el diagnóstico y lleguen al mercado en la próxima década.

Relevancia para los Objetivos de Desarrollo Sostenible y los Grandes Desafíos

La necesidad de nuevos métodos para estudiar los microbios y los avances en la tecnología de microfluidos tienen una relevancia significativa para varios Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS):

- **Objetivo 2: Poner fin al hambre, lograr la seguridad alimentaria y la mejora de la nutrición y promover la agricultura sostenible** La microfluídica puede mejorar nuestra comprensión del suelo. Microbiomas, mejorando la productividad agrícola al optimizar la salud de los cultivos y la fertilidad del suelo. Además, la identificación de microbios que producen bioherbicidas o biofertilizantes naturales puede reducir la dependencia de insumos químicos, promoviendo la agricultura sostenible.
- **Objetivo 3: Garantizar una vida sana y promover el bienestar de todos en todas las edades** La microfluídica es la tecnología es fundamental para descubrir nuevos antibióticos y otros medicamentos. También ayuda a la medicina personalizada al permitir la realización de pruebas precisas de medicamentos en células individuales, lo que conduce a tratamientos más eficaces para enfermedades como el cáncer y la sepsis.
- **Objetivo 6: Garantizar la disponibilidad de agua y su gestión sostenible y el saneamiento para todos.** Comprender las comunidades microbianas en el agua a través de técnicas de microfluidos puede mejorar los procesos de purificación de agua y el tratamiento de aguas residuales, garantizando una mejor calidad del agua y reduciendo la contaminación.
- **Objetivo 9: Construir infraestructura resiliente, promover la industrialización inclusiva y sostenible y fomentar la innovación** La microfluídica representa una innovación tecnológica importante que ofrece herramientas de análisis rápidas y rentables para diversas industrias. Esto fomenta prácticas industriales sostenibles al permitir procesos de producción más eficientes y reducir el consumo de recursos.
- **Objetivo 12: Garantizar modalidades de consumo y producción sostenibles** Al permitir la detección eficiente de microorganismos para aplicaciones industriales, la microfluídica puede identificar procesos microbianos que reemplazan los procesos químicos, lo que conduce a métodos de producción más sostenibles y reduce los contaminantes ambientales.
- **Objetivo 13: Adoptar medidas urgentes para combatir el cambio climático y sus efectos** La microfluídica puede permitir el descubrimiento de microorganismos productores de biocatalizadores. Estos biocatalizadores pueden utilizarse en

Un marco educativo en microbiología centrado en la niñez

aplicaciones de bioeconomía, reduciendo la dependencia de productos derivados del petróleo y mitigando así las emisiones de gases de efecto invernadero.

Posibles implicaciones para las decisiones

1. *Institutos de Investigación e Industria*

- a. Costo de inversión inicial para equipo microfluídico necesario
- b. Los experimentos de microfluidos son muy baratos en comparación con los experimentos en masa.
- c. Se necesitan conocimientos técnicos especiales: invertir en programas de educación y capacitación para equipar científicos/personal de laboratorio con habilidades en tecnología microfluídica
- d. La microfluídica es una tecnología de vanguardia que podría ayudar a asignar fondos.
- e. La microfluídica podría acelerar la producción del descubrimiento de medicamentos

2. *Trascendencia global*

- a. La microfluídica permite una medicina personalizada y un diagnóstico en el punto de atención rentables que pueden reducir el uso excesivo y el uso indebido de medicamentos como los antibióticos. Esto podría ayudar, por ejemplo, a desactivar la crisis mundial de resistencia a los antibióticos.
- b. El cribado de alto rendimiento de cepas microbianas podría dar lugar a nuevos productos naturales respetuosos con el medio ambiente, como bioherbicidas o polímeros biodegradables. También podrían descubrirse nuevos antibióticos y otros productos terapéuticos.
- c. Una mayor capacidad para estudiar las comunidades microbianas en diversos entornos conduce a una mejor comprensión y posiblemente a una mejor gestión de los ecosistemas.

Participación de los alumnos

- ¿Qué desafío ve usted al estudiar un microorganismo específico?
- ¿Por qué es tan difícil cultivar la mayoría de los microorganismos en el laboratorio?
- ¿Qué te gustaría saber sobre un microorganismo?
- ¿Cómo intentarías estudiar este microorganismo?
- ¿Por qué necesitamos buscar urgentemente nuevos productos naturales, como los antibióticos?
- ¿Conoces otros productos de microorganismos que podamos buscar mediante microfluídica?
- ¿Qué otras aplicaciones de la microfluídica imaginas?

La base de evidencia, lecturas complementarias y materiales didácticos

Un marco educativo en microbiología centrado en la niñez

Gotitamicro fluídica:

Shang, Luoran, Yao Cheng y Yuanjin Zhao. 2017. "Microfluidos de gotas emergentes".

Reseñas de productos químicos 117 (12): 7964–8040.

<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00848>. Joensson, Haakan N. y Helene Andersson

Svahn. 2012. "Microfluídica de gotas: una herramienta para la Análisis." *Encantado*

Química - Internacional

Edición 51 (49): 12176–92.

<https://doi.org/10.1002/anie.201200460>.

Célula única:

Rosenthal, Katrin, Verena Oehling, Christian Dusny y Andreas Schmid. 2017. "Más allá de la masa: revelando la vida de células microbianas individuales". *FEMS Microbiology Reviews* 41 (6): 751–80. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux044>.

Laboratorio de chip en dispositivos:

Roszek, SAB Hermsen B. y AW van Drongelen RE Geertsma. 2013. "Dispositivos de laboratorio en un chip para diagnósticos clínicos". Informe del Instituto Nacional de Salud Pública y Medio Ambiente (RIVM).

YouTube:

- Copa Europea de Microfluidos del Mundo: Microfluídica y Microbiorreactor: <https://www.youtube.com/watch?v=zI0ZjKdZle4>
- El Lutecio Proyecto: Microfluídica Aventuras: <https://www.youtube.com/watch?v=EYuyRUjnTgc>
- Gotitas programables: <https://www.youtube.com/watch?v=z0NBsyhApvU>

Glosario

Organismo unicelular:	También conocido como organismo unicelular. Organismo que consta únicamente de una sola célula. Lo opuesto de organismo multicelular.
Arqueas:	Dominio procariota de vida, sin membrana nuclear. La bioquímica y los marcadores de ARN difieren de las bacterias
Bacterias:	Dominio procariota de la vida, sin membrana nuclear, células con bacterias ARNr
Eucariota:	Núcleo rodeado de membrana. Animales, hongos, plantas pero también unicelulares. Los organismos pertenecen a este dominio

Un marco educativo en microbiología centrado en la niñez

Productos naturales: Compuesto químico o sustancia producida por un organismo vivo. En química médica, se hace referencia únicamente a los metabolitos secundarios (metabolitos que no son esenciales para la supervivencia pero que producen alguna ventaja evolutiva).

Laboratorio en un chip: Una combinación de múltiples funciones para el tratamiento y análisis de una muestra en un chip microfluídico para realizar un experimento completo

Isoclonal: Relativo al mismo clon, es decir, una célula con la misma identidad genética.

Interacción célula-célula: Se refiere a la interacción directa entre células. Permiten que las células se comuniquen entre sí cuando se producen cambios en el microambiente.

Nicho ecológico: describe cómo interactúa una especie dentro de un ecosistema. El nicho de una especie depende de la disponibilidad de recursos y condiciones que le permitan sobrevivir.

Punto de atención diagnóstico: Cualquier tipo de prueba diagnóstica que no necesite realizarse en el laboratorio. Ejemplos: control de glucosa en sangre y pruebas de embarazo.

Bioeconomía Transformación de una economía basada en el petróleo a una economía basada en combustibles fósiles. Los recursos se sustituyen por diversas materias primas renovables.