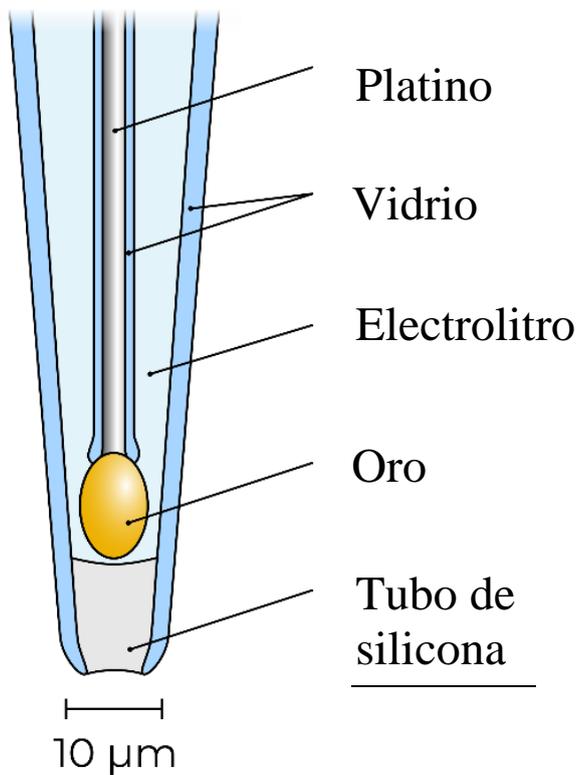


## Microsensores: una mirada al entorno microbiano

*Señorita: podemos ver microbios con un microscopio. ¿Pero cómo podemos ver lo que están haciendo?*



Izquierda: Punta del microsensor de oxígeno. Se pueden fabricar puntas con diámetros inferiores a 2 µm. Derecha: Oxígeno y microsensores de sulfuro de hidrógeno insertados en una biopelícula fotosintética. Los microsensores se insertan mediante el uso de un micromanipulador. Gráficos de Fabian Steininger, foto de Niels Peter Revsbech.

**Niels Peter Revsbech**

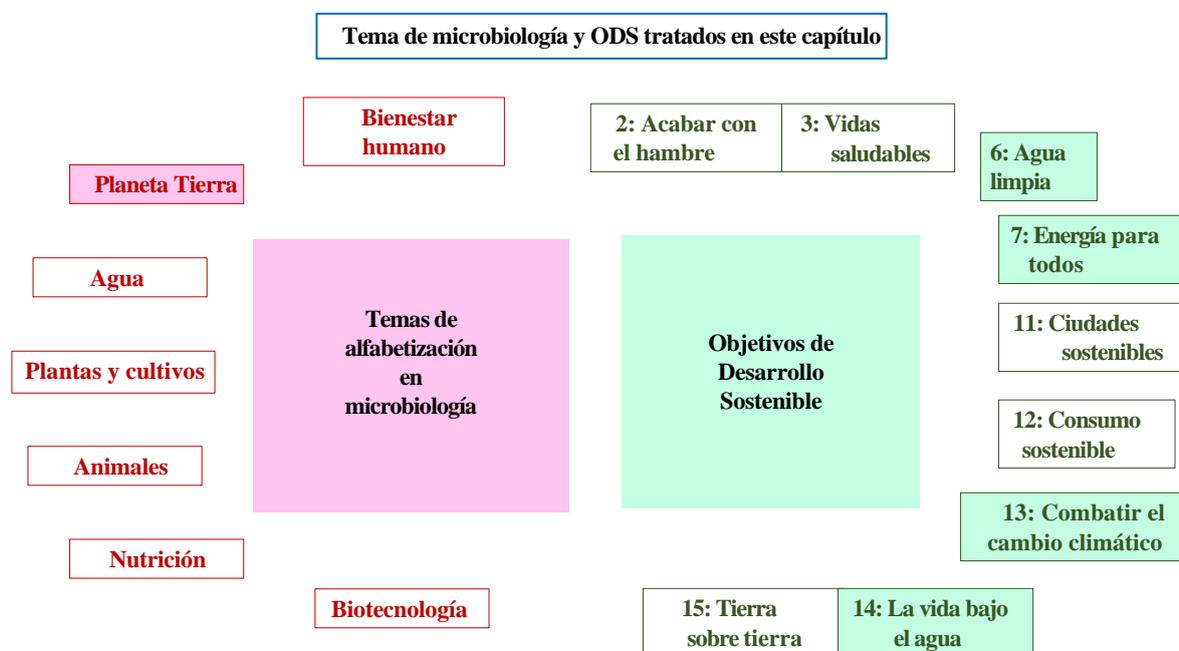
## Un marco educativo en microbiología centrado en la niñez

### Sinopsis

El medio ambiente es heterogéneo: cuando observamos los campos de cultivo, en uno crece trigo para alimentarnos, en otro maíz para alimentar al ganado y a las gallinas, y en otro heno para alimentar a los caballos. En cada campo podemos observar las distintas poblaciones de plantas que crecen y producen cosas distintas para nosotros. Pero los microbios no se pueden ver, así que para averiguar cuáles están presentes en un entorno determinado y qué están haciendo, necesitamos reemplazar nuestros ojos por instrumentos especiales. Unos poderosos son los microsensores, que nos permiten medir lo que está sucediendo a nivel microscópico.

### La microbiología y el contexto social

*La microbiología:* Microbiología ambiental, microsensores, micromanipulación, biopelículas, cables bacterias, gases de efecto invernadero. Cuestiones de sostenibilidad: seguimiento de los gases de efecto invernadero y de los tóxicos ambientales.



### Microsensores: la microbiología

1. **La necesidad de describir el entorno de los microbios.** Cuando queremos ver bacterias y otros microbios necesitamos usar un microscopio. El primero en hacerlo y en darse cuenta de la existencia y diversidad de microbios fue Antonie van Leeuwenhoek alrededor de 1675. Pudo hacerlo porque fue capaz de fabricar microscopios sencillos pero funcionales. Pero ¿cómo podemos saber qué están haciendo, qué están comiendo y cómo se sienten en las condiciones en las que viven? Para ello, necesitamos poder describir el entorno inmediato de los microbios –sus componentes químicos y biológicos– y, sobre todo, cómo cambia en tiempo real y en respuesta a cambios ambientales, naturales e impuestos experimentalmente.

## Un marco educativo en microbiología centrado en la niñez

2. **Sistemas homogéneos versus heterogéneos.** Si colocas una gota de tinte en un recipiente de agua, se dispersa rápidamente por toda el agua, dando un color uniforme. Se dice que el color es homogéneo o uniformemente distribuido. Si midieras sus concentraciones en diferentes partes del recipiente, siempre serían las mismas. Ahora piense en un patio de recreo de la escuela: cuando los niños salen a jugar, se reúnen en grupos para charlar o persiguen una pelota. Su distribución en el patio no es homogénea; ¡es heterogénea! Si una persona cumple años y trae una bolsa de dulces, todos corren hacia esa persona, lo que hace que la distribución sea aún más heterogénea.

3. **Los entornos microbianos son heterogéneos y varían enormemente a nivel microscópico.** Como los niños en un parque infantil se sienten atraídos por alguien que lleva una bolsa de caramelos, los microbios pueden desplazarse hacia fuentes de alimento o alejarse de condiciones ambientales que no les gustan, por lo que se distribuyen de forma heterogénea en sus hábitats. Y, como los microbios metabolizan las sustancias químicas de su entorno inmediato, lo modifican. Por tanto, cuanto mayor sea la heterogeneidad de la distribución de los microbios (por ejemplo, una alta densidad de células en una parte concreta del hábitat debido a la disponibilidad de una gran cantidad de un alimento y/o fuente de energía especialmente apetitosos), mayor será la heterogeneidad de las condiciones ambientales. Por tanto, una medición en una parte del hábitat no dice nada sobre ninguna otra parte del hábitat. Tenemos que tomar medidas precisamente donde los microbios están haciendo lo que nos interesa. Y, como los microbios son muy pequeños, necesitamos hacer mediciones en distancias muy pequeñas, microdistancias, en tiempo real, para poder describir los microambientes de los microbios.

4. **Las mediciones del microambiente se hicieron posibles con la invención de los microsensores.** Recién en 1980 aproximadamente fue posible observar la actividad química. Microambiente dentro de comunidades microbianas densas, como las babas microbianas (placas, biopelículas) que recubren nuestros dientes. Las invenciones que hicieron esto posible fueron microsensores para sustancias químicas como el oxígeno ( $O_2$ ) y sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) y parámetros físico-químicos como la acidez (pH), etc. En la actualidad, se han desarrollado microsensores para un gran número de aplicaciones medioambientales. Especies químicas, y por lo tanto podemos observar en tiempo real el consumo y la producción microbiana, es decir, las transformaciones mediadas biológicamente, de muchos productos químicos en biopelículas, sedimentos, suelos, etc. Tal transformación podría ser, por ejemplo, la formación de oxígeno debido a la fotosíntesis o el consumo de oxígeno debido a la respiración.

5. **¿Cómo es un microsensor?** Arriba se muestra un ejemplo de microsensar. Observe lo fina que es la punta. Un microsensar de oxígeno típico tiene un diámetro de punta de  $10\ \mu m$  ( $1\ mm = 1000\ \mu m$ ). Un cabello humano tiene un diámetro de aproximadamente  $70\ \mu m$  y, por lo tanto, es 7 veces más grueso que la punta de un microsensar de oxígeno típico. Y es posible fabricar algunos tipos de microsensares con un diámetro de hasta aproximadamente  $1\ \mu m$ , que es el mismo diámetro que una bacteria típica.

6. **¿Y cómo funciona un microsensar?** Diferentes microsensares funcionan de manera diferentes formas pero, en el caso de un microsensar de oxígeno, medimos la corriente eléctrica producida por la reducción de  $O_2$ . La reducción del oxígeno es básicamente la misma reacción que ocurre dentroEl cuerpo humano respira oxígeno porque es un químico muy oxidante y reactivo que reacciona fácilmente con muchos tipos de reductores para producir

## Un marco educativo en microbiología centrado en la niñez

mucha energía que necesitamos para crecer y hacer todas las cosas que disfrutamos. Los reductores son químicos que quieren deshacerse de los electrones y, por lo tanto, se oxidan. En el microsensor de oxígeno, no tenemos un reductor químico que puede donar electrones, pero tenemos una superficie de oro que está cargada negativamente con electrones de una batería, y esta superficie de oro es capaz de reducir el oxígeno:



Cuando la superficie de oro (el cátodo) dona electrones mediante el proceso de reducción de oxígeno, estos electrones deben ser reabastecidos por la batería, y obtenemos una corriente eléctrica en un circuito entre el cátodo de oro y un ánodo de plata (conectado al polo positivo de la batería) dentro del sensor (el ánodo de plata no se muestra en la figura). La corriente en este circuito es proporcional a la concentración de oxígeno fuera de la membrana de silicona permeable al oxígeno en la punta. La membrana de silicona garantiza un entorno químico estable en el líquido (electrolito) dentro del microsensor y evita la entrada de especies químicas que podrían alterar el funcionamiento del microsensor. El diseño básico de sensores a macroescala similares fue inventado ya en 1954 por un fisiólogo británico, LC Clark, y por eso dichos sensores se denominan sensores Clark o electrodos Clark.

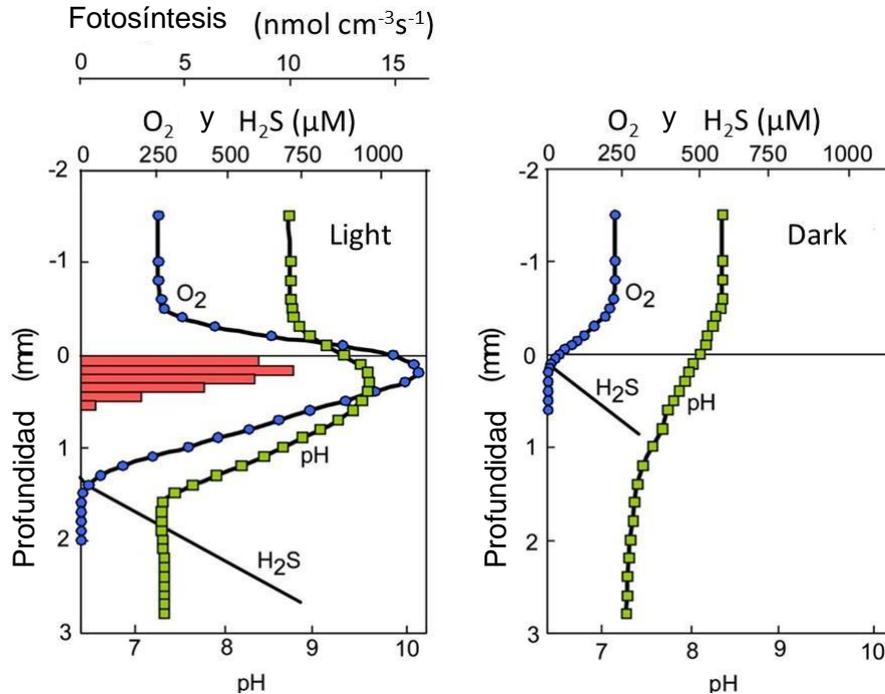
7. ***Los microsensors deben ser operados con precisión por un micromanipulador.*** Para examinar la variación de los niveles de un parámetro como el oxígeno en un microambiente determinado, es necesario introducir el microsensor en el sustrato de forma gradual y muy controlada. En primer lugar, los microsensors son muy delicados y no queremos romperlos, pero también es necesaria la precisión, ya que, por ejemplo, la concentración de oxígeno puede cambiar mucho en distancias mucho menores a un milímetro. Por ello, los microsensors suelen montarse en un dispositivo llamado micromanipulador, mediante el cual el microsensor se puede mover de forma incremental en pasos de hasta 1  $\mu\text{m}$  en una muestra o hábitat. Esto nos permite "escanear" el hábitat moviendo el sensor y tomando lecturas en cada posición, y así "mapear" los cambios en los niveles de oxígeno en el espacio y en el tiempo.

En la figura anterior se muestra la inserción de dos microsensors sostenidos por un micromanipulador de este tipo mientras se introducen en una biopelícula microbiana fotosintética. Para este tipo de análisis ambiental, es normal introducir los sensores en pasos de 0,1 mm (100  $\mu\text{m}$ ) y luego esperar unos segundos en cada profundidad para obtener una lectura estable.

8. ***¿Qué tipo de cosas podemos hacer con los microsensors? Por ejemplo, investigar una biopelícula fotosintética.*** Como se indicó anteriormente, los microbiólogos quieren saber qué son los microbios lo que hacen en determinadas condiciones, como cuando producen o consumen gases de efecto invernadero. Un conjunto de datos sobre el oxígeno ( $\text{O}_2$ ), sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ) y acidez (pH) medida en una biopelícula fotosintética se muestra en la figura siguiente. La profundidad cero marca la superficie de la biopelícula. Se puede ver que cuando la biopelícula se mantuvo en la oscuridad, el oxígeno en el agua suprayacente disminuyó. Cuanto más se acerca el microsensor a la biopelícula, más se vuelve cero a 0,2 mm dentro de la biopelícula. Sin embargo, cuando se iluminó la biopelícula, la concentración de oxígeno aumenta a medida que el microsensor se acerca a la biopelícula, alcanzando un pico a 0,2 mm dentro de la biopelícula que es 5 veces la concentración del agua suprayacente saturada de aire, y se vuelve cero a una profundidad de solo 1,5 mm. Esto se debe a que los microbios en la biopelícula realizaron la fotosíntesis cuando se iluminaron y produjeron oxígeno. Las tasas de fotosíntesis a varias profundidades se pueden calcular a partir de los datos del microsensor de

## Un marco educativo en microbiología centrado en la niñez

oxígeno y se muestran como barras en la figura. La fotosíntesis se pudo detectar hasta 0,6 mm de profundidad, por debajo de la cual la intensidad de la luz se volvió demasiado baja. La intensidad de la luz dentro de dichos sustratos se puede medir mediante varios tipos de microsensores de fibra óptica.



Distribución en profundidad del oxígeno ( $O_2$ ), sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) y acidez (pH) en una biopelícula fotosintética durante la iluminación (izquierda) y la oscuridad (derecha). Dibujo original de Bo Barker Jørgensen.

Como también se puede observar, la acidez (pH) subió y bajó más o menos al ritmo del oxígeno. Iluminación, dióxido de carbono ( $CO_2$ , en el agua que se encuentra parcialmente en forma de ácido carbónico,  $H_2CO_3$ ) se consumió por la fotosíntesis, por lo que el pH fue más alto en la capa fotosintética. Durante la oscuridad, el  $CO_2$  se produjo por la respiración microbiana y el pH disminuyó.

El sulfuro de hidrógeno y  $O_2$  sólo coexistían dentro de una zona muy estrecha de la biopelícula. Esta zona de superposición suele tener menos de 0,1 mm de espesor, y en ella viven bacterias especializadas que obtienen su energía mediante la oxidación del  $H_2S$ . El  $H_2S$  se desplaza hacia la capa óxica mediante un proceso llamado difusión, y el oxígeno también se desplaza hacia la zona de superposición  $O_2/H_2S$  mediante difusión. La difusión es el proceso de movimiento aleatorio de moléculas/iones individuales en líquidos y gases; da como resultado el transporte neto de moléculas/iones desde regiones de alta concentración a regiones de menor concentración. Este transporte difusional de sustancias químicas es comparable al transporte de calor desde capas con alta temperatura a capas con baja temperatura: si sumerges una cucharilla de metal en té caliente, pronto sentirás que el mango se calienta.

9. **El descubrimiento de las bacterias del cable.** En 2012 se hizo un descubrimiento muy importante cuando los datos de microsensores mostraron que el  $O_2$  y  $H_2$ . Los perfiles S en un sedimento marino no se superponían, de hecho, estaban bien separados. ¿Cómo podría ser posible que  $H_2S$  se oxidaría si no hubiera oxígeno? ¿Está disponible? Resultó que los filamentos largos de bacterias, compuestos por más de 10.000 células unidas de extremo a extremo, conectaban las capas óxicas superficiales y las capas sulfídicas más profundas que

## Un marco educativo en microbiología centrado en la niñez

estaban separadas por una distancia de aproximadamente 1 cm. Y, sorprendentemente, estos filamentos transportaron electrones del  $\text{H}_2\text{S}$  al  $\text{O}_2$ , creando una corriente eléctrica en el sedimento. La interacción de  $\text{H}_2\text{S}$  y  $\text{O}_2$  que resulta en la oxidación de  $\text{H}_2\text{S}$  y la reducción del  $\text{O}_2$  implicaba reacciones físicamente separadas. En el momento de escribir esto, aún no se ha aclarado en qué consisten los hilos eléctricos. Los filamentos microbianos conductores de electricidad son solo un ejemplo de cómo el uso de microsensors ha cambiado nuestra comprensión del funcionamiento de la naturaleza.

10. ***Existen microsensors para la medición de muchos parámetros físico-químicos.*** El oxígeno, el sulfuro de hidrógeno y la acidez son sólo ejemplos de parámetros físicoquímicos que se pueden medir con microsensors. Otras especies químicas biológicamente importantes que se pueden medir con microsensors son los nutrientes vegetales y microbianos nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), nitrito ( $\text{NO}^-$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), y el principal portador de energía del futuro, el hidrógeno ( $\text{H}_2$ ).

Gracias a la construcción a microescala, se han podido fabricar microsensors en los casos en que no existían versiones a macroescala. La razón principal del éxito de la construcción a microescala es que el transporte de moléculas e iones a lo largo de las cortas distancias dentro del sensor es muy rápido. De este modo, los reactivos y los productos de desecho de las reacciones se transportan de forma eficiente hacia o desde la punta del sensor por difusión. Un ejemplo de ello es el microsensor de óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ). No es posible medir el  $\text{N}_2\text{O}$  con un electrodo si hay  $\text{O}_2$  presente, pero el  $\text{O}_2$  se puede eliminar con ácido ascórbico alcalino. El nuevo ácido ascórbico se suministra a la punta del microsensor por difusión y el ácido ascórbico oxidado y consumido se elimina mediante el mismo proceso.

11. ***Los microsensors pueden informar sobre la producción y el consumo de gases de efecto invernadero.*** Existen microsensors para el gas de efecto invernadero dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), óxido nitroso (gas de la risa,  $\text{N}_2\text{O}$ ) y metano ( $\text{CH}_4$ ), y por lo tanto representan herramientas clave para investigar la producción y el consumo de estos agentes del calentamiento global. Como gas de efecto invernadero, el óxido nitroso representa casi el 300 por ciento de la producción mundial de gases de efecto invernadero a veces más potente que el dióxido de carbono, por lo que sus emisiones procedentes de todo tipo de fuentes deben minimizarse.

Las plantas de tratamiento de aguas residuales son una fuente importante de  $\text{N}_2\text{O}$ . La razón es que las aguas residuales contienen grandes cantidades de nitrógeno en forma de compuestos celulares como proteínas que, en la planta, se convierten en aminoácidos, luego amoníaco, luego óxidos de nitrógeno (el proceso de nitrificación) y, finalmente, nitrógeno gaseoso (el proceso de desnitrificación) que escapa a la atmósfera. Sin embargo, no todo el nitrógeno de las aguas residuales se convierte en nitrógeno gaseoso, y una parte termina como  $\text{N}_2\text{O}$ , que también se libera a la atmósfera como gas de efecto invernadero. La cantidad de  $\text{N}_2\text{O}$  que se forma está determinada por las condiciones de funcionamiento de la planta, que a su vez influyen en las actividades microbianas involucradas en la producción de  $\text{N}_2\text{O}$ . La rápida adaptación de estas condiciones de funcionamiento para minimizar la producción de  $\text{N}_2\text{O}$  requiere una medición precisa, continua y en tiempo real de los niveles de producción de  $\text{N}_2\text{O}$ . El microsensor de óxido nitroso es un ejemplo de un sensor para el que no se ha creado un análogo a escala macroscópica y que ahora se utiliza ampliamente para monitorear y controlar la emisión de óxido nitroso de las plantas de tratamiento de aguas residuales, como se muestra en la figura siguiente.

12. ***Los microsensors se están utilizando en muchos entornos diferentes.*** Los microsensors químicos han ampliado nuestros conocimientos en muchas áreas. Por ejemplo, se han utilizado ampliamente para explorar el fondo marino a profundidades de hasta 11.000

## Un marco educativo en microbiología centrado en la niñez

m. A menudo se afirma que sabemos menos sobre las profundidades oceánicas que sobre la Luna, pero los instrumentos robóticos ("landers") equipados con microsensors para realizar mediciones en los sedimentos han proporcionado conocimientos valiosos. La imagen siguiente muestra un instrumento de este tipo antes de su despliegue en las profundidades del océano Pacífico. Un banco de microsensors está montado en el cilindro electrónico resistente a la presión en el centro inferior del marco. El instrumento puede ascender a la superficie mediante la liberación del lastre una vez finalizadas las mediciones.

Los microsensors también se han utilizado ampliamente para la exploración de la fisiología animal y vegetal.



Microsensor de medición de  $N_2O$  en los tanques de una planta de tratamiento de aguas residuales donde las bacterias mediaban la degradación de los componentes de las aguas residuales. La señal de la caja electrónica se transmite a la sala de control de la planta. La espuma en la superficie del agua se crea mediante un vigoroso burbujeo con aire. Ilustración de Unisense A/S, con autorización.



Despliegue de un "módulo de aterrizaje" en aguas profundas en el Océano Pacífico. El módulo está equipado con microsensors para el análisis de los sedimentos de las profundidades marinas. El módulo de aterrizaje fue construido por R.N. Glud, de la Universidad del Sur de Dinamarca.

Fotografía por Niels Peter Revsbech.

## Un marco educativo en microbiología centrado en la niñez

### Relevancia para Objetivos de Desarrollo Sostenible y Grandes Desafíos

- **Objetivo 6. Garantizar la disponibilidad y la gestión sostenible del agua y el saneamiento para todos.** Las alcantarillas se degradan por la corrosión causada por el sulfuro de hidrógeno, lo que provoca enormes pérdidas económicas cada año. Se utilizan macrosensores que son microsensores en una carcasa gruesa para ayudar a mitigar la acumulación de sulfuro de hidrógeno (<https://sulfilogger.com/wastewater/>). El tratamiento de aguas residuales se puede controlar mediante el uso de biosensores a microescala para nitrato y nitrito, pero se necesita más investigación para obtener la estabilidad del sensor a largo plazo requerida.
- **Objetivo 7. Asegurar acceso a asequible, confiable, sostenible y moderno energía para todos nosotros.** Se espera una futura “economía del hidrógeno”, y la investigación en transformaciones de hidrógeno, por ejemplo en plantas de biogás, se ve facilitada por microsensores de H<sub>2</sub>.
- **Objetivo 13. Adoptar medidas urgentes para combatir el cambio climático y sus efectos.** Microsensores para los gases de efecto invernadero permiten no sólo medir su producción y consumo por parte de sistemas biológicos, y su seguimiento en sistemas de ingeniería como las plantas de tratamiento de aguas residuales, sino también comprender mejor sus mecanismos de producción. Todo ello será relevante para controlar y reducir su producción y liberación a la atmósfera.
- **Objetivo 14. Conservar y utilizar de manera sostenible los océanos, los mares y los recursos marinos para el desarrollo sostenible.** Los microsensores se han utilizado para dilucidar las transformaciones de los nutrientes de las algas en océanos y mares. Los microsensores también pueden utilizarse para prevenir la acumulación tóxica de H<sub>2</sub>S en acuicultura.

### La Base de Evidencia, Lecturas Complementarias y Material Didáctico

- Kühl, M., y NP Revsbech. 2000. Microsensores biogeoquímicos para estudios de la capa límite. En: La capa límite bentónica: procesos de transporte y biogeoquímica (P. Boudreau y BB Jørgensen, eds.), págs. 180-210. Oxford University Press. Oxford.
- Revsbech, NP 2021. Sensores simples que funcionan en diversos entornos naturales: el micro-Clark Familia de sensores y biosensores. Sens. Actuators B: Chem. 329, 129168 <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.129168>
- Pfeffer, C, S.Larsen, S, et al. 2012. Las bacterias filamentosas transportan electrones a distancias de centímetros. Nature 491: 218-221

### Glosario

**Ánodo:** Un electrodo cargado positivamente

**Biopelícula:** Matriz compuesta por microorganismos y los compuestos viscosos que estos excretan. La placa dental es un buen ejemplo.

**Biosensor:** Un sensor donde un componente biológico como enzimas o células vivas crea la señal.

**Cátodo:** Un electrodo cargado negativamente

**Gases de efecto invernadero:** Gases que absorbe y emite radiación de calor y, por lo tanto, menor emisión de calor desde nuestro globo al espacio.

**Micromanipulador:** Dispositivo que se utiliza para posicionar, por ejemplo, la punta de un microsensor con forma de aguja con gran precisión. Un micromanipulador puede ser operado manualmente o por control informático de pequeños motores eléctricos que se mueven en una, dos o tres dimensiones.