

## Biosensores ópticos para la detección de contaminación en aguas y efluentes

---

**Autores:** Nisenbaum, Melina; Guzmán, Marcelo Nicolás; Agustinelli, Silvina; Murialdo Silvia Elena

**Contacto:** [rmsampaio@sp.gov.br](mailto:rmsampaio@sp.gov.br)

**País:** Argentina

### Resumen

La contaminación del agua es un importante problema de salud pública en todo el mundo, y los métodos de detección eficientes, precisos y rápidos son esenciales para garantizar un suministro de agua seguro y para monitorear el vertido de efluentes industriales. Los métodos tradicionales de detección de contaminación química o microbiológica a menudo consumen mucho tiempo, son costosos, requieren de un equipo especializado, y de personal capacitado. Los biosensores ópticos ofrecen una alternativa prometedora, de alta sensibilidad, selectividad y de un rápido tiempo de respuesta. El Biospeckle láser es una técnica óptica que ha demostrado un gran potencial y sensibilidad en la detección de cambios biológicos en la muestra. En este estudio, presentamos esta técnica novedosa apuntando al desarrollo de un biosensor óptico capaz de detectar contaminación microbiológica y química en aguas y efluentes. El biosensor utilizará la movilidad de los microorganismos como indicadores de carga microbiana viable y contaminación química, permitiendo establecer el grado de contaminación del agua según el grado de movimiento de los microbios.

Nuestros resultados indican que los biosensores basados en *speckle* láser ofrecen un método potencialmente automatizado, no invasivo y representativo para detectar la contaminación en agua y efluentes. Este enfoque tiene un significativo potencial para el monitoreo de la calidad del agua y efluentes en entornos industriales o municipales, y contribuye a reducir el riesgo de enfermedades transmitidas por aguas contaminadas.

**Palabras claves:** análisis en tiempo real; monitoreo; control de calidad; agua, biospeckle..

### 1. Introducción

La calidad del agua potable y recreativa es fundamental para promover el crecimiento económico y la preservación del medio ambiente (UNESCO, Programa Mundial de Evaluación de los Recursos Hídricos de las Naciones Unidas, 2015). No obstante, en los países que carecen de infraestructura adecuada, la evaluación de la calidad del agua es un verdadero desafío (Adu-Manu et al., 2018). Junto con programas efectivos de saneamiento y tratamiento de aguas residuales, es extremadamente importante establecer métodos para el análisis de la calidad del agua que no requieran equipos de laboratorio costosos y/o personal calificado, pero que brinden una respuesta rápida y tengan funcionalidad en el sitio (United Nations Environment Programme, 2010).

Existen métodos directos e indirectos para determinar la presencia de microorganismos en el agua. Los métodos directos incluyen el recuento de células al microscopio, el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) (Contois, 1959) y el número más probable (NMP) (Madigan, 2009). Sin embargo, estos métodos tienen limitaciones en términos de tiempo, medios de cultivo selectivos y recuento de microorganismos no cultivables (Meyer et al., 1985). Por otro lado se han desarrollado métodos rápidos e indirectos, como la estimación de bacterias a través de la densidad óptica (Myers et al., 2013). Las técnicas de dispersión de luz (turbidimetría) son herramientas útiles, pero presentan limitaciones en respuesta lineal e interferencias.

Para el monitoreo de contaminantes ambientales existen métodos químicos, físicos y biológicos. Los métodos químicos ofrecen una detección cualitativa y cuantitativa, pero no reflejan directamente el efecto tóxico ni permiten el monitoreo en tiempo real. Los métodos físicos son complejos y costosos, y se utilizan principalmente en sensores remotos (Glasgow et al., 2004). Los métodos biológicos utilizan organismos para evaluar sustancias tóxicas, como microorganismos, plantas, invertebrados y peces. Estos métodos son ampliamente utilizados debido a su simplicidad, rapidez y reproducibilidad. La elección de un bioensayo depende de la sensibilidad, el costo y la respuesta requerida.

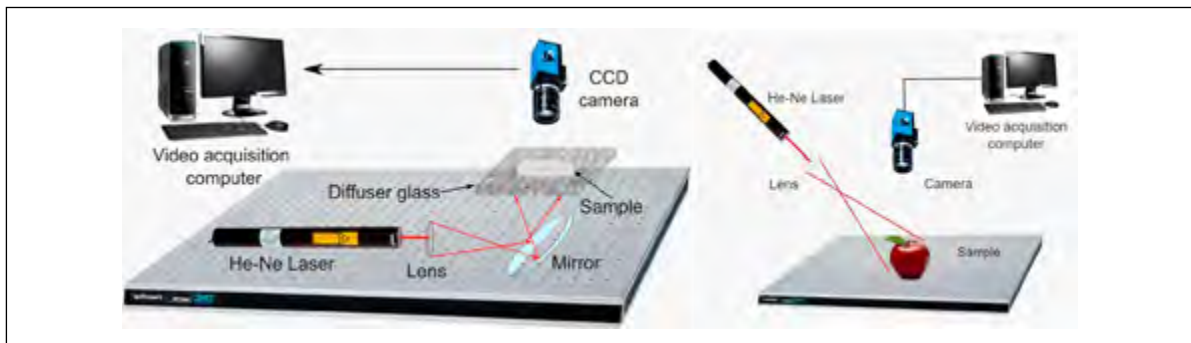
Desde la invención del microscopio, las técnicas ópticas han sido instrumentos fundamentales para observar, analizar y prever comportamientos biológicos en distintos tipos de muestras (Havlik et al., 2022; Lei et al., 2022; Teague et al., 2022). Los métodos ópticos resultan una herramienta con gran potencial, dada su fácil aplicación, economicidad, y rápida velocidad de respuesta, siendo no destructivos y disminuyendo el contacto operador-muestra. El *speckle* de láser dinámico (BSL) es un fenómeno óptico que ocurre cuando la luz coherente de un láser interactúa con una superficie rugosa o una muestra que varía en el tiempo, generando un patrón de interferencia aleatorio y granuloso. Este efecto se utiliza para obtener información sobre propiedades estructurales y funcionales de tejidos biológicos (*biospeckle*) de alta resolución y a tiempo real (Rabal y Braga, 2009). La capacidad de medir la actividad biológica a través de índices indirectos que superan el consumo de tiempo, las pruebas físico/químicas, y el juicio humano, definidas como Gold Standards (Braga Júnior, 2017), es una fortaleza destacada.

Aunque el potencial del BSL es alto y la demanda crece en la industria, se ha investigado poco su aplicación en la evaluación de la calidad del agua. En este trabajo mencionamos las investigaciones que se están llevando a cabo en nuestro grupo de investigación para la determinación de la calidad microbiológica y química del agua utilizando BSL y la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* como bioindicador.

## 2. Metodología

Los arreglos básicos de láser y óptica para conseguir la señal de biospeckle son: 1) dispersión frontal (*forwardscattering*) y 2) retrodispersión (*backscattering*) (Figura 1). La configuración de dispersión frontal solo es posible cuando la muestra es transparente y el láser la puede atravesar, llevando información a la cámara. Sin embargo, esta configuración presenta una menor sensibilidad que la configuración de retrodispersión (Rabal y Braga Jr., 2009), que se puede aplicar tanto a muestras transparentes como opacas. La evolución de esta actividad se caracteriza por múltiples descriptores, que aportan información cualitativa y cuantitativa sobre los procesos que provocan cambios dinámicos en la muestra objeto de estudio (Ansari et al., 2016). Los fotones retrodispersados son registrados por una cámara equipada con un sensor de imagen sensible en el rango de onda corta visible e infrarrojo cercano del espectro electromagnético. La idea principal de utilizar el fenómeno biospeckle para monitorear la actividad biológica es la creación de un índice (índice de biospeckle), que indirectamente puede coincidir con los movimientos biológicos, químicos o físicos de los dispersores en las muestras iluminadas (Braga et al., 2016).

FIGURA 1. Arreglos láser para captura de imágenes de biospeckle. Izquierda: dispersión frontal o fowardscattering; derecha: retrodispersión o backscattering



Las técnicas de adquisición y procesamiento de videos de *speckle* láser dinámico (SLD) se utilizan ampliamente en muchas aplicaciones en biología, biomedicina, industria, etc. Las señales generadas por los cambios de intensidad en cada píxel a través de la secuencia de imágenes de *speckle* se procesan para identificar la actividad subyacente de la muestra. en este trabajo se utiliza una placa de Petri con la solución a testear. Se iluminó con un láser de HeNe expandido y atenuado, desde la parte inferior a través de un difusor de vidrio esmerilado. Una cámara CCD conectada a una PC registra la secuencia de imágenes de 400 frames y la almacena en la computadora.

### 3. Desarrollo

#### 3.1. Preparación de muestras y adquisición de imágenes

Se utilizaron cultivos puros de bacterias (*Pseudomonas aeruginosa*) en fase exponencial de crecimiento. A partir de un cultivo madre se prepararon distintas concentraciones de células, utilizando solución fisiológica (SF, NaCl 0.9% (v/v)) estéril como diluyente y como blanco, utilizando un espectrofotómetro UV/Vis a 600 nm (OD600). Una vez procesados estos datos se eligió una concentración de microorganismos a utilizar para evaluar su actividad (movilidad y viabilidad) en presencia de las siguientes sustancias tóxicas (kerosene, deceno, undeceno, dodeceno, pentaclorofenol, 2,4,5-triclorofenol, 2,4,5,6-tetraclorofenol y 2,4,6-triclorofenol).

Para tomar las imágenes de estas muestras se colocaron 5 ml de cultivo de cada concentración a medir en una placa Petri de 55 mm de diámetro.

#### 3.2. Metodología de procesamiento del video

A partir de las secuencias de imágenes de los patrones de *speckle* generados por las muestras, se ensamblaron las series temporales correspondientes al nivel de intensidad de cada píxel (tantas series como la resolución de la imagen = 640 x 480 píxeles).

Los resultados fueron procesados utilizando diversos algoritmos y posteriormente se compararon estadísticamente, contrastando la actividad de *speckle* en las muestras con la medición de solución fisiológica estéril o la presencia de microorganismos en un medio no tóxico como control.

## 4. Resultados

### 4.1. Aplicación en biospeckle a la determinación de concentraciones bacterianas en agua

La evaluación de muestras de agua con distintas concentraciones bacterianas medidas en un espectrofotómetro a 600 nm. y su correlación con la actividad de *speckle* láser dinámica monitoreada se muestra en la Figura 2. Se observa una muy buena correlación de la actividad medida entre 0 y 1 unidad de absorbancia a 600 nm. Esta técnica permite discernir inequívocamente entre agua estéril y agua contaminada con microorganismos, lo cual en un principio esta técnica óptica serviría como sensor de esterilidad en líquidos. La actividad medida con la configuración y el procesamiento utilizado sería apta para determinar la densidad de microorganismos en muestras de agua. Por otro lado, las muestras se evaluaron con un algoritmo alternativo para obtener imágenes cualitativas y *pseudo* coloreadas que indican la contaminación microbiana en agua (Figura 3). Estos ensayos se llevaron a cabo con dos microorganismos distintos: *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) y *Staphylococcus aureus* (STA). Se puede observar que cualitativamente se observan imágenes similares a una misma concentración microbiana para ambas bacterias. Así mismo, también se observa en colores una mayor carga microbiana en las fotografías a OD=0.8 que a OD=0.2.

FIGURA 2. Correlación entre la actividad de biospeckle y las concentraciones bacterianas testeadas. Las mismas fueron determinadas por turbidez en un espectrofotómetro a 600 nm.

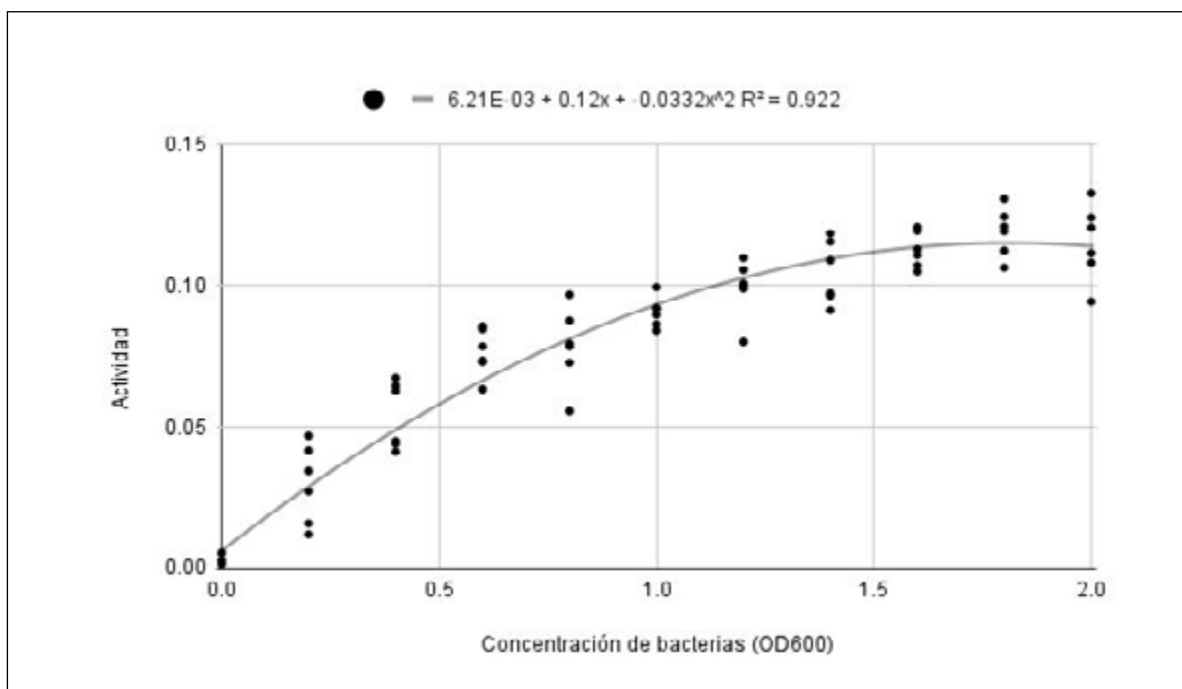
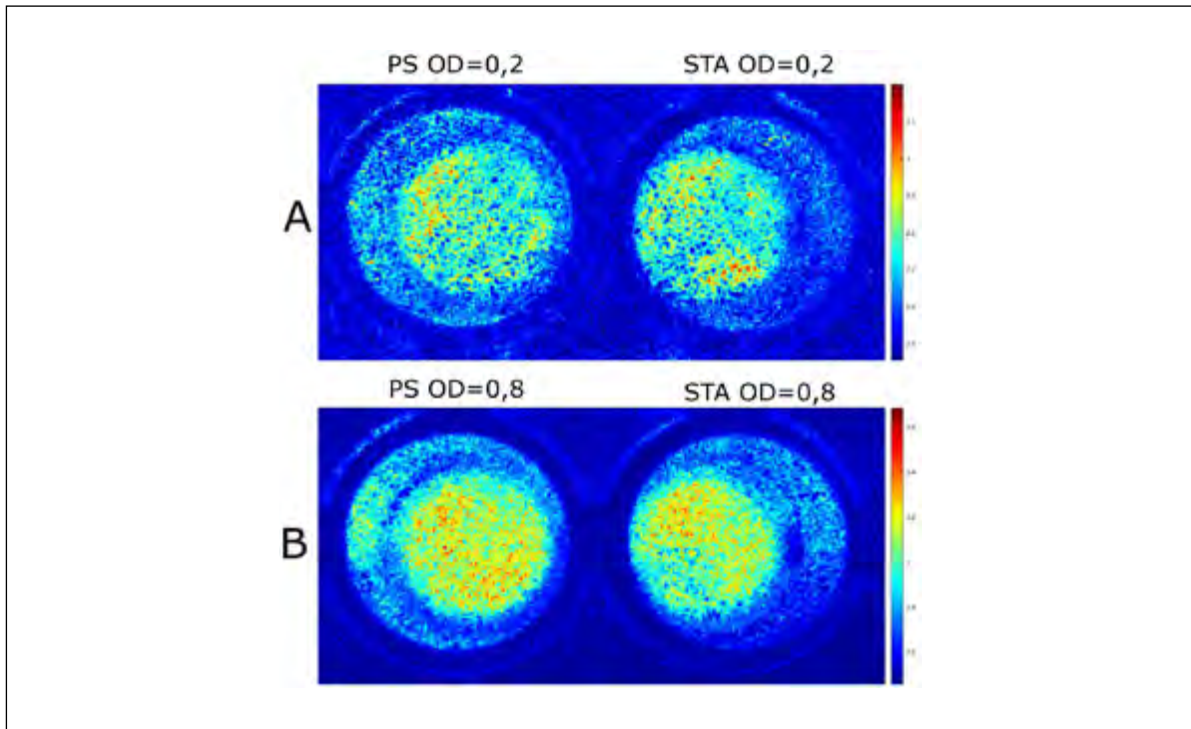


FIGURA 3. Imágenes cualitativas que representan la concentración de bacterias en medio acuoso colocadas en dos pocillos de placa de Elisa. A. concentración bacteriana  $OD_{600}=0,2$ . B. concentración bacteriana  $OD_{600}=0,2$ . Los pocillos de la izquierda contienen solución salina con *Pseudomonas aeruginosa*. Los pocillos de la derecha contienen solución salina con *Staphylococcus aureus*. La barra de color indica la mayor actividad (concentración bacteriana) en rojo y la menor en azul.

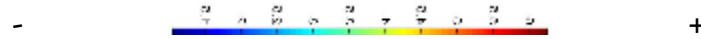


#### 4.2. Aplicación del BSL a la determinación de toxicidad química en agua con *Pseudomonas aeruginosa* como bioindicador

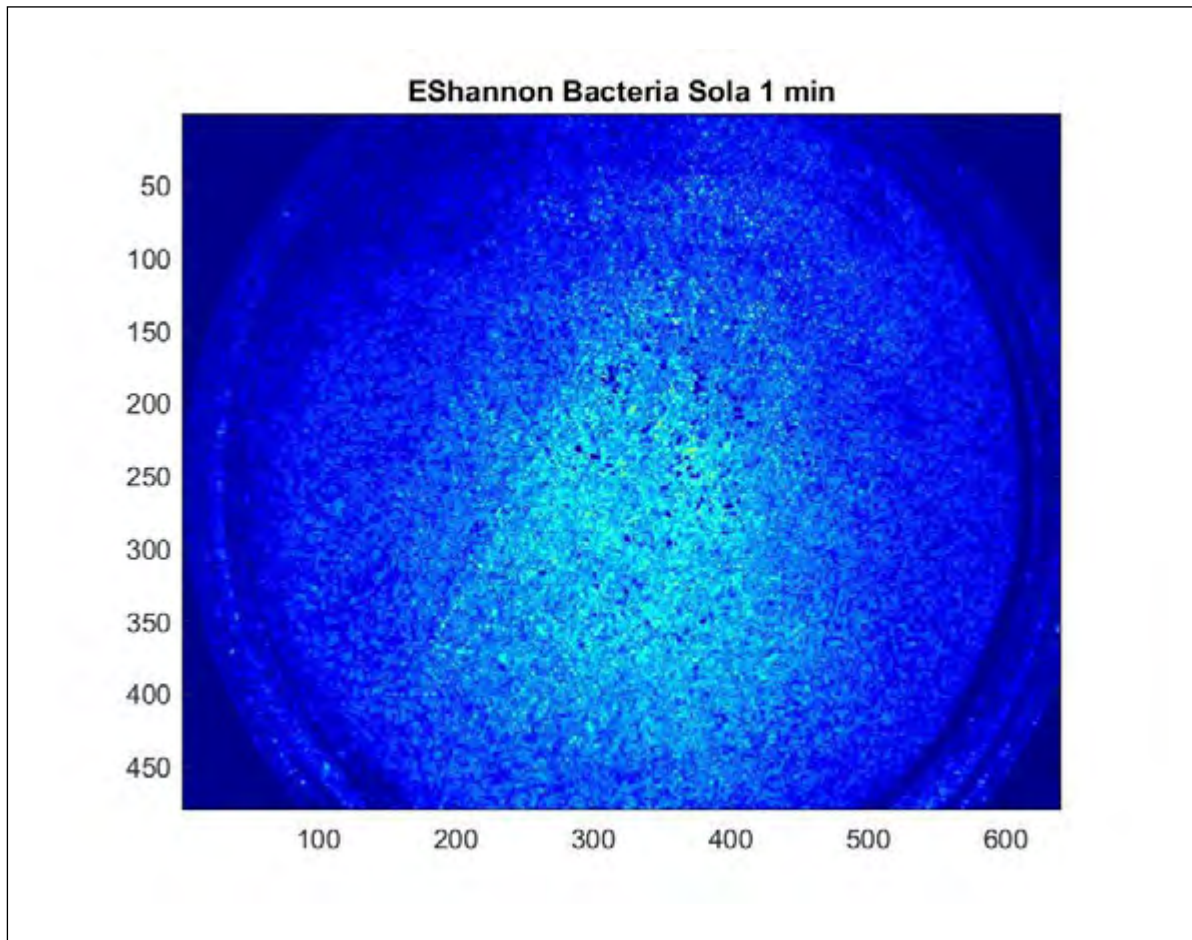
La natación y la quimiotaxis bacteriana (la atracción positiva o negativa hacia determinados compuestos) permite a las bacterias dirigir su movimiento de acuerdo con el entorno químico. *Pseudomonas aeruginosa* es quimiotáctica y degradadora de hidrocarburos y clorofenoles (Nisenbaum et al., 2013; Okada et al., 2017), por ello se eligieron estos sustratos para testear la aplicación del SLD al monitoreo del movimiento de estos microorganismos es presencia o ausencia de estos tóxicos. En la Figura 4 se observa la actividad de biospeckle medida para una misma concentración de bacteria ( $OD=0,4nm$ ) en presencia o ausencia de distintos hidrocarburos y clorofenoles. Se puede observar que el speckle láser es capaz de evaluar diferencias de movilidad de estos microorganismos en distintos sustratos. Con estos resultados parciales podemos suponer que esta técnica sería útil para poder desarrollar un sensor de toxicidad química con el uso de bacterias móviles adecuadas.

FIGURA 4. Actividad de biospeckle medida para muestras con *Pseudomonas aeruginosa* (OD=0.4nm) en presencia o ausencia de distintos contaminantes.

Escala de actividad (movimiento bacteriano):



## 5. Discusión y análisis



Nuestro grupo se encuentra investigando recientemente la implementación del biospeckle en el monitoreo microbiano de muestras de agua a nivel de laboratorio. En particular, nos enfocamos en el monitoreo microbiológico utilizando *Pseudomonas aeruginosa* como microorganismo modelo. Mediante esta técnica hemos logrado discriminar entre muestras de agua estéril y aquellas con concentraciones mínimas de bacterias. También estamos avanzando con el uso de esta técnica para el desarrollo de un bioensayo para la detección de contaminantes en el agua mediante el uso de un microorganismo como bioindicador.

Viana y colaboradores (2017) aplicaron el biospeckle para evaluar la eficiencia de la desinfección de efluentes mediante cloración. Pero a pesar de las muchas aplicaciones reportadas (Braga Júnior, 2017; Zdunek y Herppich, 2012), la principal limitación del uso de SLD es su uso limitado en laboratorios ópticos y, por lo tanto, la baja accesibilidad para los usuarios finales. Por lo tanto, el principal desafío es trasladar los equipos SLD de los laboratorios ópticos al diseño de dispositivos portátiles. El desarrollo de la electrónica

digital y de las fuentes láser abrió nuevas puertas con respecto al fenómeno del láser biospeckle y a las posibilidades de construir equipos confiables. Catalano y col. (2019) reportaron recientemente las condiciones clave para adoptar el SLD utilizando un dispositivo móvil, un teléfono inteligente, para capturar y analizar los datos. Las pruebas demostraron que el SLD se puede implementar de manera factible en los teléfonos inteligentes, pudiendo ensamblar imágenes con la calidad y la velocidad necesarias, así como también, pudiendo ejecutar los métodos principales en un tiempo razonable, sin interrupciones. Por lo tanto, presentado todos estos esfuerzos científicos, el principal desafío de utilizar sistemas láser biospeckle es su migración al campo o incluso su uso fuera de los laboratorios ópticos.

## 6. Conclusiones

Según la bibliografía citada, la técnica de monitoreo de biospeckle láser ha demostrado tener una amplia gama de aplicaciones con un enorme potencial en el monitoreo ambiental y el análisis de aguas. En este artículo, nos enfocamos en explorar los principios y las aplicaciones limitadas del método en el monitoreo del agua, y presentamos nuestra contribución al desarrollo de esta aplicación y los principales desafíos asociados. Nuestra investigación demuestra el gran potencial de esta técnica para el monitoreo microbiológico y de toxicidad en agua, utilizando movilidad bacteriana como indicadores. Esto hace que la técnica sea altamente prometedora para el desarrollo de biosensores dedicados al monitoreo ambiental en tiempo real.

## Referencias bibliográficas

- Adu-Manu, K. S.; Adam, N.; Tapparello, C.; Ayatollahi, H. y Heinzelman, W. (2018). Energy-Harvesting Wireless Sensor Networks (EH-WSNs): A Review. *ACM Trans. Sen. Netw.*, 14(2). <https://doi.org/10.1145/3183338>
- Ansari, M. Z.; Ramírez-Miquet, E. E.; Otero, I.; Rodríguez, D. y Darías, J. G. (2016). Real time and online dynamic speckle assessment of growing bacteria using the method of motion history image. *Journal of Biomedical Optics*, 21(6), 066006. <https://doi.org/10.1117/1.jbo.21.6.066006>
- Azizullah, A. y Häder, D. P. (2018). Ecotox. *Bioassays: Advanced Methods and Applications*, 199–219. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811861-0.00010-3>
- Braga Júnior, R. A. (2017). When noise became information: State-of-the-art in biospeckle laser. *Ciência e Agrotecnologia*, 41(4), 359–366. <https://doi.org/10.1590/1413-70542017414000317>
- Braga, R. A. y González-Peña, R. J. (2016). Accuracy in dynamic laser speckle: optimum size of speckles for temporal and frequency analyses. *Optical Engineering*, 55(12), 121702. <https://doi.org/10.1117/1.oe.55.12.121702>
- Braga, R. A. J.; Rivera, F. P. y Moreira, J. (2016). *A Practical Guide to Biospeckle Laser Analysis. Theory and Software*. EDITORA UFPA.
- Catalano, M. D.; Rivera, F. P. y Braga, R. A. (2019). Viability of biospeckle laser in mobile devices. *Optik*, 183(July 2018), 897–905. <https://doi.org/10.1016/j.ijleo.2019.02.055>
- Contois, D. E. (1959). Kinetics of bacterial growth: relationship between population density and specific growth rate of continuous cultures. *Journal of General Microbiology*, 21, 40–50. <https://doi.org/10.1099/00221287-21-1-40>
- Havlik, I.; Beutel, S.; Scheper, T. y Reardon, K.F. (2022). On-Line Monitoring of Biological Parameters in Microalgal Bioprocesses Using Optical Methods. *Energies*, 15, 875. <https://doi.org/10.3390/en15030875>
- Glasgow, H. B.; Burkholder, J. M.; Reed, R. E.; Lewitus, A. J. y Kleinman, J. E. (2004). Real-time remote monitoring of water quality: a review of current applications, and advancements in sensor, telemetry, and

computing technologies. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 300(1–2), 409–448. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.02.022>

- Guzmán, M. N.; Nisenbaum, M.; Ayala, E. C. y Passoni, L. I. (2020). Aplicación de Speckle Láser Dinámico para el monitoreo microbiológico de agua. *XXI Congreso Argentino de Bioingeniería (SABI 2020)*.
- Guzmán, M. N.; Nisenbaum, M.; Cuyano Ayala, E.; Murialdo, S. E. y Passoni, L. I. (2019). Determinación de la concentración bacteriana en cultivos líquidos por medio de Bio-Speckle. *104a Reunión de La Asociación Física Argentina*, 311.
- Guzmán, M. N.; Nisenbaum, M.; Murialdo, S. E. y Meschino, G. J. (2022). Determinación de la Carga Microbiana en Agua por Medio del Análisis de Patrones de Speckle Dinámico. *XXIII Congreso Argentino de Bioingeniería (SABI 2022)* (p. 138).
- Häder, D. P. y Erzinger, G. S. (2018). Daphniatox. *Bioassays: Advanced Methods and Applications*, 221–240. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811861-0.00011-5>
- Jin, X. W.; LI, Z. Y.; XU, P. P.; ZHANG, X. Y.; REN, N. Q.; Kurilenko, V. V. y SUN, K. (2019). Advances in Microfluidic Biosensors Based on Luminescent Bacteria. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 47(2), 181–189. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(19\)61139-4](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(19)61139-4)
- Li, L.; Chen, S.; Deng, M. y Gao, Z. (2022). Optical techniques in non-destructive detection of wheat quality: A review. *Grain & Oil Science and Technology*, 5(1), 44–57. <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2021.12.001>
- Loutfi, H.; Pellen, F.; Le Jeune, B.; Lteif, R.; Kallassy, M.; Le Brun, G. y Abboud, M. (2020a). Interpretation of the bacterial growth process based on the analysis of the speckle field generated by calibrated scattering media. *Optics Express*, 28(19), 28648. <https://doi.org/10.1364/oe.400909>
- Loutfi, H.; Pellen, F.; Le Jeune, B.; Lteif, R.; Kallassy, M.; Le Brun, G. y Abboud, M. (2020b). Real-time monitoring of bacterial growth kinetics in suspensions using laser speckle imaging. *Scientific Reports*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57281-2>
- Madigan, M. T. (2009). *Brock, biología de los microorganismos*. Pearson Educación. <https://books.google.com.ar/books?id=YlnBcQAACAAJ>
- Meyer, A. A.; Crass, R. A.; Lim Robert C. J.; Jeffrey, R. B.; Federle, M. P. y Trunkey, D. D. (1985). Selective Nonoperative Management of Blunt Liver Injury Using Computed Tomography. *Archives of Surgery*, 120(5), 550–554. <https://doi.org/10.1001/archsurg.1985.01390290032005>
- Myers, J. A.; Curtis, B. S. y Curtis, W. R. (2013). Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density. *BMC Biophysics*, 6(1), 4. <https://doi.org/10.1186/2046-1682-6-4>
- Nisenbaum, M.; Sendra, G. H.; Cerdá Gilbert, G. A.; Scagliola, M.; Froilán González, J. y Murialdo, S. E. (2013). Hydrocarbon biodegradation and dynamic laser speckle for detecting chemotactic responses at low bacterial concentration. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 25(3), 613–625.
- Okada, E.; Nisenbaum, M.; Martínez Arca, J. y Murialdo, S. E. (2017). Chemotaxis detection towards chlorophenols using video processing analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 142(June), 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.08.015>
- Rabal, H. J. y Braga Jr., R. A. (2009). *Dynamic Laser Speckle and Applications* (1a ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315219080>
- Teague, J.; Megson-Smith, D.A.; Allen, M.J.; Day, J.C.C. y Scott, T.B. (2022). A Review of Current and New Optical Techniques for Coral Monitoring. *Oceans*, 3, 30–45. <https://doi.org/10.3390/oceans3010003>
- United Nations Environment Programme y P. I. (2010). *Clearing the Waters: A Focus on Water Quality Solu-*



tions. <http://hdl.handle.net/20.500.11822/7906>.

Viana, D. C., Pires, J. F. y Braga, R. A. (2017). Biospeckle laser technique applied for estimating disinfection accomplishment of wastewaters subjected to chlorination. *Process Safety and Environmental Protection*, 109, 670–676. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.05.017>

Zdunek, A. y Herppich, W. B. (2012). Relation of biospeckle activity with chlorophyll content in apples. *Postharvest Biology and Technology*, 64(1), 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.09.007>