

Espectroscopía de impedancia electroquímica, herramienta eficaz para el diagnóstico rápido microbiológico

✉ Nardo Ramírez¹, Angel Regueiro², Olimpia Arias³, Rolando Contreras¹

¹Dirección de Diagnóstico Microbiológico, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, CNIC
Ave. 25 esq. 158, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba

²Centro de Bioingeniería, CEBIO

³Instituto de Ciencia y Tecnología de Materiales, Universidad de La Habana, UH
E-mail: nardo.ramirez@cnic.edu.cu

RESUMEN

La espectroscopia dieléctrica o espectroscopia de impedancia electroquímica es empleada tradicionalmente en el registro y estudio de los procesos de corrosión y electrodeposición, en la evaluación de recubrimientos y en la caracterización de muchos tipos de sensores y semiconductores. En la última década se han ampliado notablemente sus aplicaciones en la Biotecnología para la caracterización de células biológicas, el diagnóstico de enfermedades y la caracterización del cultivo de células. Como principio de transducción, la técnica de impedancia ha sido aplicada en el campo de la microbiología como un medio para detectar y cuantificar microorganismos patógenos. El presente trabajo revisa el estado del arte de la microbiología de impedancia, el progreso y las aplicaciones en la detección de microorganismos patógenos incluido el uso de los microelectrodos interdigitados, el desarrollo de la miniaturización de la microbiología de impedancia y la integración de los biosensores de impedancia con otras técnicas como la dielectroforesis y la electropermeabilización. Se hace referencia a conceptos básicos, definiciones y fundamentos de esta técnica, así como se abordan los componentes, principios para el diseño del medio de cultivo y uso de circuitos equivalentes para el análisis de los sistemas basados en esta alternativa.

Palabras clave: detección de bacterias, diagnóstico, impedancia, microbiología

Biotecnología Aplicada 2009;26:65-71

ENFOQUE

ABSTRACT

Electrochemical impedance spectroscopy: an effective tool for rapid microbiologic diagnosis. Dielectric spectroscopy, also called electrochemical impedance spectroscopy, is traditionally used in monitoring corrosion and electro-deposition processes in the coating and characterization assessment of many kinds of sensors and semiconductors. Its application in biotechnology for the characterization of cell cultures has, however, been notably expanded in the last decade. As a transductional principle, impedance has been applied in the field of microbiology as a means of detecting and quantifying pathogenic bacteria. This paper reviews the state-of-the-art of Impedance Microbiology, its progress and its applications for the detection of foodborne pathogenic bacteria, including the use of interdigitated microelectrodes, the development of chip-based impedance microbiology and the integration of impedance biosensors along with other techniques such as dielectrophoresis and electropermeabilization. Reference is made to basic components, definitions and principles of this technique, as well as to the explanation of the components and principles for cell culture design and the use of equivalent circuits for the analysis of the systems based on this alternative.

Keywords: bacteria detection, diagnosis, impedance, microbiology

Introducción

El uso creciente de los sensores electroquímicos en aplicaciones ambientales, en la industria y en el ámbito médico ha creado la imperiosa necesidad de comprender las propiedades de la superficie y del conjunto en general de tan importantes sistemas analíticos. Todo parece indicar que la comunidad científica ha seleccionado la espectroscopia de impedancia para caracterizar un gran número de sistemas electroquímicos. La información obtenida a partir del empleo de esta técnica ha sido utilizada para la fabricación de sensores electroquímicos con excelentes propiedades (linealidad, estabilidad térmica y temporal, entre otros).

La espectroscopia de impedancia constituye una herramienta poderosa para lograr un rápido diagnóstico biomolecular y para el análisis en cultivos de células. Su superioridad sobre otras técnicas de laboratorio radica en que utiliza una pequeña señal, generalmente en modo de tensión, que minimiza las alteraciones de las propiedades del medio, es decir, que el estímulo aplicado no altera las condiciones de equilibrio del sistema.

La señal aplicada a las muestras permite relacionar las propiedades del líquido o sólido que se estudia, con las variaciones o cambios obtenidos en su impedancia característica. Ello se debe a la estructura física del material, a los procesos químicos que ocurren en él o a la combinación de ambos. Consecuentemente, la espectroscopia de impedancia electroquímica es una técnica *no destructiva* que proporciona mediciones robustas.

Microbiología de impedancia clásica: definición y conceptos básicos

La impedancia eléctrica como principio de transducción ha sido aplicada en una gran variedad de problemas biológicos, fisiológicos y médicos [1, 2].

Antes de comenzar a introducir en el tema de referencia es importante analizar algunos conceptos básicos. Se conoce que la resistencia eléctrica R , es la habilidad de un elemento del circuito de resistir el flujo

1. Geddes LA, Baker LE. Principles of applied biomedical instrumentation. New York: John Wiley & Sons. 1989.

2. Eden G, Eden R. Enumeration of microorganisms by their dynamic AC conductance patterns. IEEE Trans Biomed Eng. 1984;31(2):93-8.

de la corriente eléctrica. La ley de Ohm define esta resistencia como la relación entre la tensión y la corriente.

$$R = \frac{V}{I} \quad (1)$$

Donde:

V se corresponde con el valor de la tensión e I , con el valor de la corriente eléctrica.

El uso de la ecuación 1 se limita solamente a un elemento del circuito: el resistor ideal, el cual posee varias condicionantes: 1) cumple con la ley de Ohm en todos los niveles de tensión y corriente, 2) su valor de resistencia es independiente de la frecuencia y 3) las señales de tensión y corriente a través de un resistor están en fase.

El mundo real contiene elementos que presentan un comportamiento mucho más complejo. Estos elementos obligan a desechar el simple concepto de resistencia. En su lugar se utiliza el de impedancia, que es un parámetro del circuito mucho más general. Al igual que la resistencia, la impedancia es una medida de la habilidad de un circuito para resistir el flujo de la corriente eléctrica. A diferencia de la resistencia, la impedancia no está limitada por ninguna de las condicionantes expuestas anteriormente.

La impedancia electroquímica usualmente se obtiene aplicando un potencial de corriente alterna a una celda electroquímica y midiendo la corriente a través de la celda. La respuesta a este potencial sinusoidal de excitación es una señal de corriente alterna que puede ser analizada como la suma de funciones sinusoidales (series de Fourier).

Otro concepto a tener presente es el de la capacidad o capacitancia, la cual expresa la habilidad de un capacitor para almacenar carga eléctrica. Esta propiedad rigiere la relación existente entre la diferencia de potencial existente entre las placas del capacitor y la carga eléctrica almacenada en este, mediante la siguiente ecuación:

$$C = \frac{Q}{V} \quad (2)$$

Donde:

C es la capacidad, medida en faradios; unidad relativamente grande que suele utilizarse en submúltiplos como el microfaradio o picofaradio.

V es la diferencia de potencial, medida en voltios.

Q es la carga eléctrica almacenada, medida en culombios.

Por otra parte, la conductancia está directamente relacionada con la facilidad que ofrece un material cualquiera al paso de la corriente eléctrica. La conductancia G y la resistencia son inversamente proporcionales. El valor de la conductancia de un material se indica en siemens y se identifica con la letra S . Un siemens equivale a $1/\Omega$ o también a ohm^{-1} .

Una aplicación, con auge creciente, es el registro automático de impedancia en Microbiología. La microbiología de impedancia (MI) está compuesta por dos grandes técnicas: la MI clásica basada en las mediciones de impedancia bipolar o la resistencia del medio (sin considerar el fenómeno de dispersión) y la espectroscopía de impedancia, también llamada espectroscopía dieléctrica, que basa sus mediciones precisamente en la dispersión del medio.

La MI es el registro temporal de la variabilidad de la impedancia durante el crecimiento de microorganismos en una muestra y se realiza colocando un arreglo de electrodos metálicos, los cuales son sumergidos en un medio de cultivo inoculado (Figura 1A), de este modo se logra la medición entre los electrodos (impedancia bipolar) mientras crecen los microorganismos presentes. La técnica consiste en realizar mediciones de las componentes de impedancia, por ejemplo: conductancia, capacidad, módulo de impedancia o ángulo de fase y otras, mediante el método bipolar o el tetrapolar, con electrodos sumergidos en una celda que contiene un medio de cultivo inoculado mantenido a temperatura constante. Estas mediciones permiten registrar, detectar, cuantificar y aun identificar determinados microorganismos presentes en las muestras provenientes de la industria o de la práctica clínica.

Bases de la microbiología de impedancia

En MI, los cambios de impedancia son medidos típicamente con el empleo de un par de electrodos sumergidos en el medio de crecimiento o solución reactante (Figura 1A).

La medición puede realizarse en dos formas, directa o indirectamente. En la técnica directa, un par de electrodos metálicos son sumergidos en el medio inoculado con la bacteria que se desea medir. Los productos metabólicos creados durante el crecimiento de microorganismos modifican la composición del medio, cambiando el contenido iónico, lo cual a la vez origina un cambio de la conductividad del medio de cultivo. Estos cambios son registrados en el tiempo al producirse variaciones en la interfaz electrodo-electrolito-muestra. Tales modificaciones son proporcionales a la concentración de microorganismos vivos, que puede ser registrada mediante técnicas impedimétricas.

La liberación del ión por la bacteria a su medio de crecimiento (Figura 2) se debe a dos mecanismos principales [3]. El primer mecanismo está relacionado con el metabolismo energético (catabolismo) en el cual, la bacteria consume oxígeno y carbohidratos, y produce dióxido de carbono y ácidos orgánicos. Ejemplos simples indican que la conversión de glucosa de un sustrato

3. Owicki J, Parce J. Biosensors based on the energy metabolism of living cells: the physical chemistry and cell biology of extracellular acidification. *Biosens Bioelectron* 1992;7:257-72.

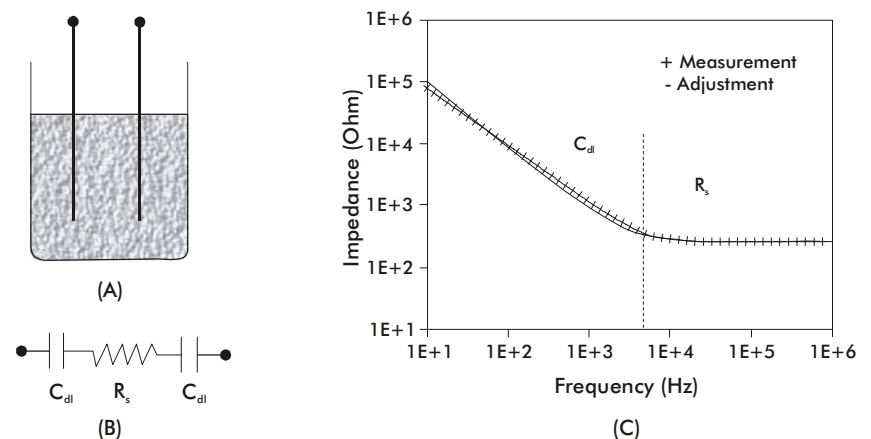


Figura 1. (A) Configuración típica de dos electrodos para la medición de impedancia (B) Circuito equivalente simplificado para un sistema de dos electrodos. C_{dl} - Impedancia del electrodo; R_s - Resistencia del electrodo. (C) Curva de impedancia vs. frecuencia.

no ionizado en dos moléculas de ácido láctico incrementará la conductividad del medio de cultivo. Además, el metabolismo tomará el ácido láctico y tres moléculas de oxígeno para producir ácido carbónico. El más pequeño y móvil ión bicarbonato es un conductor iónico más efectivo que el ión lactato. Los iones hidrógenos son casi siete veces más efectivos como conductor iónico que los iones sodio todo lo cual propicia la variación de impedancia a causa de esta acción de la bacteria [2]. El segundo mecanismo está relacionado con el intercambio de iones a través de la membrana celular (transporte activo). Iones como el sodio y el potasio, son activamente transportados a través de los canales iónicos de la membrana celular (doble capa de lípidos), los cuales sirven para regular el potencial de membrana y la diferencia de presión osmótica entre el interior y el exterior de las células.

A pesar de que el metabolismo energético es la causa principal de la liberación de iones desde la célula a su ambiente, el proceso de intercambio de iones también aporta una pequeña contribución. Lo que sí está esclarecido es que estos procesos de liberación de iones producen cambios en la composición iónica del medio de cultivo y en su conductividad, los cuales constituyen las bases para la medición de los cambios de impedancia.

A diferencia de la técnica directa, la técnica indirecta no mide directamente los cambios de impedancia en el medio de crecimiento bacteriano. Los electrodos, en lugar de ser sumergidos en el medio de crecimiento inoculado, se introducen en una solución separada (usualmente una solución de hidróxido de potasio). Los gases producidos por el metabolismo bacteriano (principalmente el CO₂) son absorbidos por la solución de hidróxido de potasio, lo cual provoca un decremento en la conductancia de la solución alcalina.

Para detectar bacterias, los sistemas de impedancia miden los cambios absolutos o relativos en la conductancia, capacitancia o impedancia, a intervalos regulares de tiempo durante el crecimiento de las bacterias a una temperatura y humedad controlada. Las señales eléctricas medidas son representadas gráficamente (amplitudes en el eje de las ordenadas vs tiempo de incubación en el eje de las abscisas) y se producen las curvas de variabilidad de impedancia.

La figura 3 muestra una curva de impedancia típica donde se aprecia que el valor de impedancia es bastante estable en la región inicial de la curva y luego, comienza a decrecer. El tiempo correspondiente al punto en el cual el valor de impedancia decrece y cruza determinado valor umbral se define como tiempo de detección, t_d . Generalmente, el tiempo de detección no aparece hasta que el número de bacterias alcanza aproximadamente entre 10^6 - 10^7 u.f.c./mL. El valor de impedancia finalmente alcanza su límite, en este punto las bacterias han alcanzado una alta concentración, aproximadamente 10^8 u.f.c./mL o más, y todos los recursos del medio han sido metabolizados y convertidos en productos finales. La forma de la curva de impedancia corresponde muy bien con las tres fases de crecimiento bacteriano típico: Fase I, donde la bacteria metaboliza pero no se multiplica; Fase II de crecimiento exponencial o logarítmico, donde la bacteria se multiplica exponencialmente, y Fase III estacionaria, donde la concentración celular se mantiene relativamente constante [4].

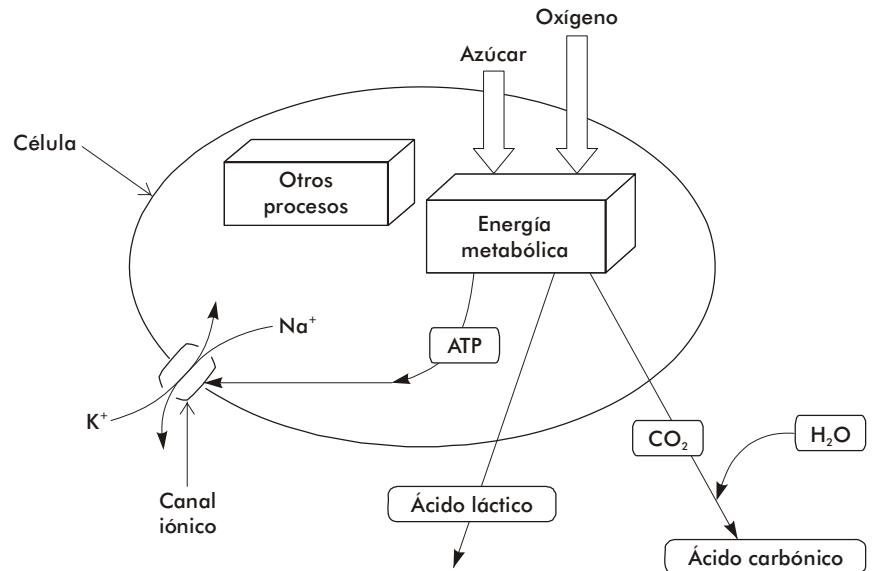


Figura 2. Representación esquemática de los dos mecanismos principales responsables de la liberación de especies iónicas por células vivas: metabolismo energético (catabolismo) e intercambio de iones a través de la membrana celular.

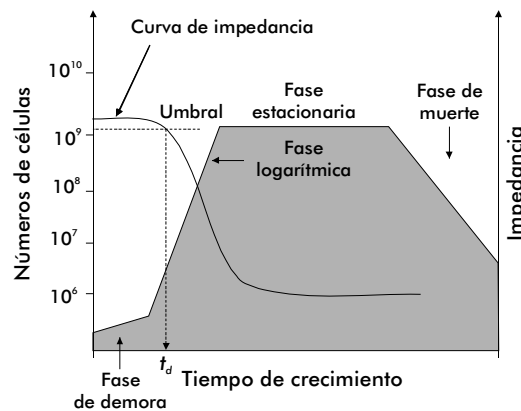


Figura 3. Curva de crecimiento de impedancia con el umbral y el tiempo de detección conjuntamente con las fases típicas del crecimiento bacteriano.

Un simple análisis teórico, confirmado por la observación experimental, muestra que el tiempo de detección t_d (tiempo necesario para que la impedancia cruce un umbral arbitrario) se relaciona con la concentración inicial de células C_0 por medio del modelo representado [5]:

$$\log(C_0) = -\alpha t_d + \beta \quad (3)$$

En esta expresión, α ($t > 0$) y β son constantes que dependen del tipo de microorganismo en particular, sus condiciones de crecimiento, etc. Eden y colaboradores [2] obtuvieron valores experimentales de estas constantes: $\alpha = 0.96$ y $\beta = 7.75$, para t_d en horas, y C_0 en ufc/mL en el medio de incubación.

La figura 4 muestra la representación del modelo (3) para los valores de las constantes anteriores, la cual indica que el intervalo del tiempo de detección va desde una hora para C_0 , aproximadamente igual a

4. Talaro KP. Foundations in microbiology. 5th ed. New York: McGraw-Hill. 2005.

5. Gómez R, Bashir R, Bhunia A. Microscale electronic detection of bacterial metabolism. Sensor Actuators B. 2002;86: 198-208.

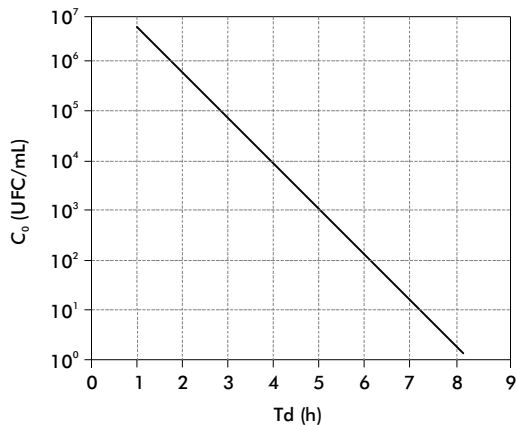


Figura 4. Relación entre el tiempo de detección (Td) y la concentración inicial de células (C_0).

10⁷ unidades formadoras de colonias por mililitro (u.f.c./mL), hasta ocho horas para C_0 , aproximadamente igual a 1 u.f.c./mL. Se entiende por unidad formadora de colonias al número mínimo de células separables sobre la superficie (o dentro de ella) de un medio de agar semisólido que da lugar al desarrollo de una colonia visible del orden de decenas de millones de células descendientes.

Microbiología de impedancia clásica: medio de cultivo y detección de salmonella

En el transcurso del tiempo, se han realizado muchos trabajos con el propósito de optimizar el desarrollo de medios de cultivo a causa de que la MI directa se basa en la observación de sus cambios de impedancia. Los principios para el diseño del medio de cultivo, tan importantes para la microbiología tradicional, son igualmente importantes para la MI. En primer lugar, el medio debe ser seleccionado acorde al crecimiento de la bacteria que se desea analizar, lo cual proporciona selectividad a los métodos microbiológicos de impedancia. En segundo lugar, el medio debe ser formulado de forma tal, que se pueda obtener óptima variabilidad de impedancia.

La bacteria *Salmonella* es la principal causa de las intoxicaciones alimentarias reportadas con mayor frecuencia. La salmonelosis es la infección causada por esta bacteria. De acuerdo con los centros de control y prevención de enfermedades (CDC), la salmonelosis causa solo en los Estados Unidos, un estimado de 1.4 millones de casos de intoxicaciones alimentarias y más de 600 muertes anualmente. Estas infecciones provocan, en gastos médicos directos e indirectos, un millón de millones de dólares al año [6]. Los métodos microbiológicos convencionales para la detección de *Salmonella* spp. necesitan de tres a cuatro días para obtener un resultado presuntivo y de cinco a siete días para su confirmación. Considerando los datos anteriores, la detección de *Salmonella* spp. ha sido uno de los temas principales de estudio de la MI.

Componentes de la impedancia

Mientras la mayor parte de los métodos microbiológicos de impedancia miden solamente la conduc-

tancia del medio a una frecuencia fija, usando un par de electrodos sumergidos en un medio inoculado, varios estudios han encontrado que la impedancia total durante el crecimiento bacteriano está compuesta por dos elementos que pueden medirse en intervalos de frecuencias diferentes: uno se refiere al medio, llamado impedancia del medio o del electrolito, y el otro es atribuido al electrodo y a la interfaz electrodo-electrolito, denominado impedancia de la interfaz o del electrodo [7].

Circuito equivalente para los componentes de impedancia

La impedancia del medio y la del electrodo así como sus contribuciones a la impedancia total, en dependencia de la frecuencia empleada, pueden ser bien interpretadas por medio de un circuito equivalente del sistema.

Los elementos del circuito equivalente, para que sean útiles, siempre deben tener su fundamento en la electroquímica física del sistema. Básicamente, la impedancia entre dos electrodos (Figura 1A) puede ser representada por un simple circuito en serie mostrado en la figura 1B, compuesto por la resistencia de la solución entre los dos electrodos (R_s) y los capacitores de la interfaz metal-muestra (uno para cada electrodo: C_{dl}).

Yang y col. en el 2003 [8] demostraron la factibilidad de usar un circuito equivalente para analizar el sistema de detección de impedancia para el crecimiento bacteriano. Ellos mostraron que el espectro de impedancia obtenido en un medio de crecimiento con 1.1×10^3 u.f.c./mL de *Salmonella typhimurium* corresponde con el espectro ajustado, representado en la figura 1C, lo que ratifica la validez del circuito equivalente utilizado para justificar los cambios de impedancia en el sistema.

Basado en el circuito equivalente, cuando un potencial sinusoidal de corriente alterna se aplica al sistema bajo estudio, la impedancia (z) de la sección entre los electrodos es una función de su resistencia (R_s), de su capacitancia (C_{dl}) y además, de la frecuencia aplicada (f), como se expresa en la ecuación 4:

$$|z| = \sqrt{R_s^2 + \left(\frac{1}{\pi f C_{dl}}\right)^2} \quad (4)$$

El modelo anterior explica lo que se observa en la curva de variabilidad de la impedancia (Figura 3), donde ésta siempre disminuye cuando la concentración de bacterias crece en el medio de cultivo. El decremento de la impedancia es ocasionado por dos causas: la disminución de R_s y el incremento de C_{dl} . Se entiende que las bacterias metabolizan moléculas grandes y sin carga en moléculas pequeñas y cargadas, lo cual ocasiona una disminución de la resistencia del medio (R_s). El aumento en la capacitancia de la interfaz electrodo-muestra se relaciona con el cambio de la composición iónica del medio en la vecindad más cercana a la superficie metálica, la cual fortalece la formación de una doble capa. El valor de capacitancia depende de muchos factores entre los que se incluyen el potencial del electrodo, la temperatura, la concentración iónica del medio, los tipos de iones y las propiedades de la

6. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C et al. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999;5:607-25.

7. Felice CL, Valentinuzzi ME. Medium and interface components in impedance microbiology. *IEEE Trans Biomed Eng.* 1999;46:483-7.

8. Yang L, Ruan C, Li Y. Detection of viable *Salmonella typhimurium* by impedance measurement of electrode capacitance and medium resistance. *Biosens Bioelectron* 2003;19:495-502.

superficie del electrodo (rugosidad del electrodo, absorción, etc.). En este caso, la capacitancia en la doble capa formada puede ser expresada de forma simple como:

$$C_{dl} = \frac{A\epsilon_{dl}}{d} \quad (5)$$

Donde:

ϵ_{dl} es la permisividad dieléctrica de la doble capa cargada; $\epsilon_{dl} = \epsilon_0 \epsilon_p$, ϵ_0 es la permisividad del espacio libre, y ϵ_p es la constante dieléctrica efectiva de la capa que separa las cargas iónicas del electrodo.

A es el área del electrodo

d es el grosor de la doble capa.

Antes del crecimiento de las bacterias, el medio contiene sustratos sin carga o débilmente cargados como la lactosa. En el crecimiento, estos compuestos son transformados en pequeños iones altamente cargados. Como resultado, el número de moléculas polares y el de pequeñas moléculas cargadas en la doble capa aumenta, lo cual incrementa la permisividad dieléctrica ϵ_{dl} , y al mismo tiempo disminuye el grosor (d) de la doble capa. Estos cambios combinados provocan un incremento en la capacitancia y como resultado, la impedancia disminuye.

La expresión (4) también da la mejor explicación sobre las propiedades de la medición de impedancia durante el crecimiento bacteriano, el cual depende de la frecuencia. Como se aprecia en la figura 1C, la impedancia total disminuye con el aumento de la frecuencia en el intervalo de bajas frecuencias, desde 10 Hz hasta 10 kHz, mientras que la impedancia se torna independiente de la frecuencia en el intervalo de altas frecuencias (entre 10 kHz y 1 MHz). En la zona de bajas frecuencias ($f < 10$ kHz), la capacitancia de la doble capa, en esencia, ofrece alta impedancia y la convierte en la fuente principal que contribuye a la impedancia total del sistema, de esta forma la resistencia del medio puede ser ignorada. Esta región se define como la región capacitiva de la doble capa, en la cual la impedancia del electrodo puede ser detectada (Figura 1C, región C_{dl}).

Por otra parte, en el intervalo de altas frecuencias ($f > 10$ kHz) no existe una contribución apreciable de la capacitancia de la doble capa. Así, la contribución más importante en la impedancia total del sistema a las altas frecuencias se relaciona con la resistencia del medio, la cual es independiente de la frecuencia. Esta región se define como la región resistiva en la cual, la conducción de iones en el medio es dominante (Figura 1C, región R_s). Por lo tanto, los cambios en la doble capa del electrodo y los cambios en el medio durante el crecimiento bacteriano pueden ser detectados mediante la medición de impedancia en diferentes frecuencias, lo que constituye un motivo de la investigación actual para desarrollar nuevos sistemas, capaces de mejorar los procesos de detección microbiológicos, en cuanto a resolución y tiempo de diagnóstico.

Antecedentes históricos y aplicaciones en la biotecnología

Puede considerarse que la última década del siglo XIX marca el inicio de la MI. Ya en 1890, el investigador norteamericano GN Stewart comenzó una serie de experimentos que introducían la conductancia y la conductividad como parámetros para estimar el tiempo

de circulación y el volumen cardíaco de eyección [9]. En julio de 1898, Stewart presentó ante la Asociación Médica Británica con sede en Edimburgo, el artículo titulado *Los cambios provocados por el crecimiento de bacterias en la concentración molecular y en la actividad eléctrica del medio de cultivo*, que dio origen a la bacteriometría de impedancia y fue publicado al año siguiente [10]. Las curvas de crecimiento que él obtuvo fueron muy similares a las que se obtienen en la actualidad con los sistemas de impedancia disponibles (Figura 5), con la notable diferencia de la extraordinaria rapidez de los sistemas actuales, mientras que Stewart estuvo midiendo por más de 30 días.

En 1957, el investigador Schwan publica un trabajo muy importante sobre las propiedades eléctricas de los tejidos y células en suspensión [11]; pero no fue hasta la década del 70 que la MI comenzó a expandirse, a partir de un número creciente de publicaciones que le dieron gran impulso y difusión internacional. En este período aparecieron trabajos muy notables de Ur [12, 13] y Cady [14, 15]. El trabajo de los grupos de Edens y Torry en los Estados Unidos fue el que sentó las bases de la MI, resultando en la introducción de los sistemas de medición Bactometer y Malthus, respectivamente [2, 16].

Desde 1975 hasta 1999 aparecieron nuevos trabajos sobre el tema y se destacaron los aportes de Felice y Valentinuzzi [7]. En este período, el número de publicaciones sobre aplicaciones prácticas del método estuvieron principalmente dirigidas a la industria de alimentos y derivados lácteos, donde fue utilizado como una herramienta para el control de la calidad. Algunas de estas aplicaciones de detección y cuantificación se realizaron en leche cruda de vaca o pasteurizada. Cady y col. [17] y Gnan-Luedecke [18], fueron de los primeros en proponer emplear la medición de impedancia como método alternativo de cuentas en placa.

La medición de impedancia también fue aplicada con éxito en el estudio y registro de la carga microbiana de una amplia gama de productos alimenticios: vegetales [19], cereales [20-21], dulces [22] y carne [23], por nombrar sólo algunos. Además, la técnica también se empleó para identificar grupos de microorganismos entre los que se incluyeron coliformes en carne [24], gram negativos en leche pasteurizada [25]

9. Stewart GN. Researches on circulation time and on the influences which affect it. IV. The output of the heart. *J Physiol* (London). 1897;XXII:25.

10. Stewart GN. The changes produced by the growth of bacteria in the molecular concentration and electrical conductivity of culture media. *J Exp Med* 1899;4: 235-43.

11. Schwan HP. Electrical properties of tissue and cell suspensions. *Adv Biol Med Phys* 1957;5:147-209.

12. Ur A. Determination of blood coagulation using impedance measurements. *Biomed Eng* 1970;5:342-5.

13. Ur A. The changes in the electrical impedance of blood during coagulation. *Nature* 1970;226:269-70.

14. Cady P. Instrumentation in food microbiology. *Food Product Development*. 1977;April:80-5.

15. Cady P. Progress in impedance measurements in microbiology. In: *Mechanizing Microbiology*: Sharp AN, Clark DS eds. Springfield (IL):1978. p.199-239.

16. Richards JCS, Jason AC, Hobbs G, Gibson DM, Christie RH. Electronic measurement of bacterial growth. *J Phys E: Sci Instrum* 1978;11:560-8.

17. Cady P, Hardy D, Martins S, Dufour SW, Kraeger SJ. Automated impedance measurements for rapid screening of milk microbial content. *J Food Prot* 1978;41(4): 277-83.

18. Gnan S, Luedecke LO. Impedance measurements in raw milk as an alternative to the standard plate count. *J Food Prot* 1982;45(1):4-7.

19. Hardy D, Kraeger SJ, Dufour SW, Cady P. Rapid Detection of Microbial Contamination in Frozen Vegetables by Automated Impedance Measurements. Palo Alto (California): Bactomatic, Inc. 94303. 1977.

20. Sorrells KM. Rapid detection of bacterial content in cereal grain. *J Food Prot* 1981;44:832-4.

21. Coppola K, Firstenberg-Eden R. Impedance based rapid method for detection of spoilage organisms in UHT low-acid foods. *J Food Sci* 1988;53:1521-7.

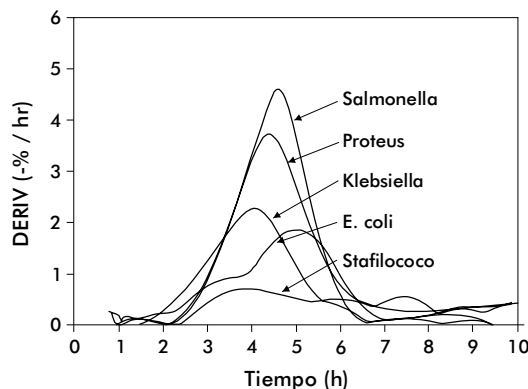


Figura 5. Se muestra la derivada de las curvas del módulo de impedancia para distintas bacterias de origen clínico en crecimiento en caldo BHI a 37 °C (Felice CJ, PhD Thesis, INSIBIO-UNT, Tucumán, Argentina, 1995).

y salmonella [26-28]; así como en la evaluación de antibióticos [29].

Las aplicaciones de detección y cuantificación han incluido también cerveza [30], vino [31], pescados [32], productos farmacéuticos y cosméticos [33] así como jugo de frutas [34]. También hubo aplicaciones en efluentes cloacales para detectar bacterias coliformes [35] y para detectar infecciones urinarias [36] o en sangre humana [37]. Una aplicación poco común ha sido en la investigación de antibiogramas [2]. En el caso de los antibiogramas, la turbidimetría ya dispone de equipos y experiencia al nivel comercial [38]; pero aún no existe ningún sistema comercial automatizado basado en la medición de impedancia que realice antibiogramas.

Varios instrumentos analíticos comerciales están basados en el principio de la MI clásica, por ejemplo: Malthus System (Malthus Instruments, Crawley, West Sussex, UK), Bactometer (bioMérieux, Hazelwood, MO, USA), técnica rápida automatizada para la medición de la impedancia bacteriana (RABIT) (Don Whitley Scientific Ltd., Shipley, UK) y BacTrac (Sy-Lab, Purkersdorf, Austria) [29, 39-41], respectivamente.

Las técnicas de impedancia también pueden ser utilizadas para supervisar la forma de crecimiento de las bacterias. En 1998, Fehlhaber y Kruger encontraron que diferentes especies de bacterias, bajo condiciones diferentes, presentaban curvas de crecimiento de impedancia específicas [42].

La aparición de los microelectrodos interdigitados ha revolucionado radicalmente las investigaciones en espectroscopia de impedancia (Figura 6A). Los microelectrodos poseen grandes ventajas sobre los electrodos convencionales para realizar mediciones analíticas, por su baja resistencia y alta relación señal-ruido, por alcanzar el estado estacionario más rápido y por utilizar pequeños volúmenes de solución [43]. En la última década, los microelectrodos en forma de arreglos interdigitados han recibido gran atención en las áreas de biosensores e inmunosensores impedimétricos [44-47].

La tendencia en las investigaciones actuales en la detección de elementos patógenos está centrada en la fabricación de biosensores para la medición de espectros de impedancia. Estos biosensores han sido

capaces de detectar uno en particular y las respuestas obtenidas han sido mucho más rápidas.

Aplicaciones que incluyen la determinación rápida de *S. typhimurium* han mostrado la factibilidad del uso de los microelectrodos interdigitados para realizar mediciones de impedancia con el objetivo de supervisar el crecimiento de bacterias [48]. El volumen de la muestra analizada puede ser reducido desde 10-15 mL a 1-2 mL. Además, el tiempo de detección para igual concentración inicial de bacterias se reduce a 3 ó 4 horas cuando se compara con el empleo del sistema de electrodos convencionales (Figura 7).

La miniaturización de los sistemas de impedancia conocidos como *biochip* o *lab-on-a-chip* para detectar bacterias, ha aumentado la esperanza de lograr una rápida detección del crecimiento bacteriano (Figura 6B). Gómez y col. [49] estuvieron entre los primeros en fabricar tales dispositivos para detectar los cambios de impedancia provocados por el metabolismo microbiano. La idea básica es confinar pocas células vivas en un volumen del orden de los nanos a los picolitros, de forma tal, que pocas células vivas en una solución tampón de baja conductividad puedan ser rápidamente detectadas por medio de la medición de impedancia mediante microelectrodos interdigitados. Otros trabajos abordan la aplicación de este novedoso método conocido como MI Dielectroforética (DEPIM), combinado con la electroporación que utiliza como soporte un chip. La dielectroforesis (DEP) es el movimiento electrocinético de partículas polarizadas dieléctricamente en un campo eléctrico "no uniforme" [50]. El progreso en el desarrollo de los arreglos de microelectrodos ha hecho de la DEP una técnica muy útil en la manipulación de las células biológicas en dispositivos microfluídicos, biochips y biosensores. Con este método, 10^2 ufc/mL fueron detectados en 3 horas [51-53].

La mayor parte de las aplicaciones de la MI han sido ampliamente revisadas por destacados investigadores [54-60].

Direcciones futuras

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la detección de microorganismos patógenos al combinar la espectroscopia de impedancia con técnicas nove-

22. Davda C, Pugh SJ. An improved protocol for the detection and rapid confirmation within 48h of Salmonellas in confectionary products. *Let Appl Microbiol* 1991;13: 287-90.

23. Firstenberg-Eden R. Rapid estimation of microorganisms in raw meat by impedance measurement. *Food Technol* 1983; 37:64-70.

24. Martins SB, Selby MJ. Evaluation of a rapid method for the quantitative estimation of coliforms in meat by impedimetric procedures. *Appl Environ Microbiol* 1980;39:518-24.

25. Nieuwenhof FFJ, Hoolwerf JD. Detection of post-pasteurization contamination of pasteurized milk with the Bioscreen, Nederlands Instituut voor Zuivelonderzoek, NIZO-EDE Report. 1205. Nov 1986:10.

26. Easter MC, Gibson DM. Rapid and automated detection of *Salmonella* by electrical measurement. *J Hyg* 1985;94: 245-62.

27. Gibson MD. Some modification to the media for rapid automated detection of Salmonellas by conductance measurement. *J Appl Bacteriol.* 1987;63:299-304.

28. Ogden ID. A conductance medium to distinguish between *Salmonella* and *Citrobacter* spp. *Int. J Food Microbiol* 1988;7:287-97.

29. Gould IM, Jason AC, Milne K. Use of the Malthus Microbial Growth Analyser to study the post antibiotic effect of antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1989;24(4): 523-31.

30. Evans HAV. A note on two uses for impedimetry in brewing microbiology. *J Appl Bacteriol* 1982;53:423-6.

31. Henschke PA, Thomas DS. Detection of wine yeast by electronic methods. *J Appl Bacteriol*1988;64:123-33.

32. Van Sprekens KJA, Stekelenburg FK. Rapid estimation of the bacteriological quality of fresh fish by impedance measurements. *Appl Microbiol Biotechnol* 1986; 24:95-6.

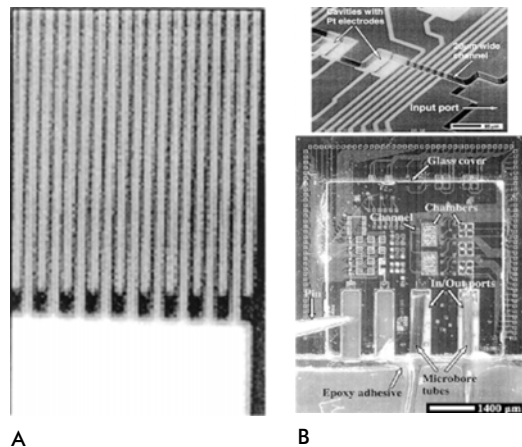


Figura 6. Microscopia de barrido electrónico de un microelectrodo interdigitado (A) y de los canales de un biochip de un dispositivo microfluídico (B).

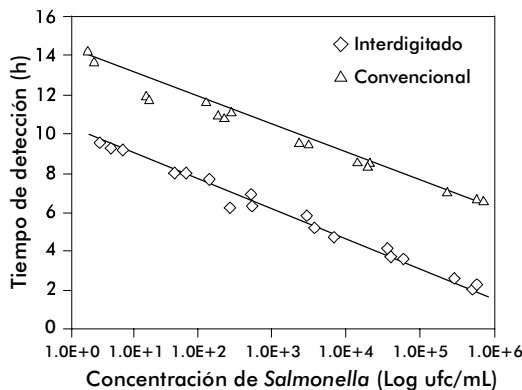


Figura 7. Comparación entre los tiempos de detección obtenidos a partir de un sistema de microelectrodos interdigitados y el sistema de electrodos convencionales para el crecimiento bacteriano.

dosas para la manipulación de células, y el empleo de volúmenes reducidos, se considera que la mayor limitación de esta técnica estriba en su corta edad. Avances en la microfabricación de dispositivos y biochips, capaces de almacenar volúmenes del orden de los nano y los picolitros donde se confinen muy pocas bacterias, son posibles; pero necesitarán al menos una década para materializarse. Otro problema sería la masificación de estos dispositivos al punto de que no fuera una técnica exclusiva para una pequeña élite. Un aumento de la sensibilidad de esta técnica es factible con el empleo de biosensores que tengan como base nuevas geometrías de electrodos interdigitados, unidos a un cambio en el procesamiento matemático de los datos.

Conclusiones

Como hemos podido apreciar, la MI y sus aplicaciones en la detección de microorganismos patógenos, junto con el uso actual de los microelectrodos interdigitados, el desarrollo de la miniaturización y la integración de los biosensores con otras técnicas como la dielectroforesis y la electropermeabilización, permitirán

desarrollos futuros. Dicha integración tiene como objetivo principal aumentar la sensibilidad de la detección mediante el empleo de un reducido volumen de muestra. Otros aspectos a implementar comprenden el replanteo de sus fundamentos teóricos, el desarrollo de nuevos componentes, principios para el diseño del medio de cultivo y el uso de circuitos equivalentes para el análisis de los sistemas de impedancia.

La técnica de impedancia como principio de transducción se ha convertido en un área promisoriosa para el desarrollo de métodos rápidos y efectivos con el objetivo de detectar el crecimiento microbiológico. A pesar de que la MI fue establecida hace más de 100 años, actualmente está entrando en una nueva etapa basada en dispositivos miniaturizados (nanociencias y nanoelectrónica). Los avances en la microfabricación han creado las condiciones para el desarrollo de microdispositivos y biochips, los cuales han probado su eficacia en maximizar la señal de impedancia, incrementar la sensibilidad y disminuir los tiempos de ensayo para la detección de los microorganismos patógenos. Esta tendencia corrobora que los métodos

33. Connolly P, Bloomfield SF, Denyer SP. The use of impedance for preservative efficacy testing of pharmaceuticals and cosmetic products. *J Appl Bacteriol* 1994;76: 68-74.
34. Deak T, Beuchat LR. Comparison of conductimetric and traditional plating techniques for detecting yeasts in fruit juices. *J Appl Bacteriol* 1993;75:546-50.
35. Silverman MP, Munoz EF. Automated electrical impedance technique for rapid enumeration of fecal coliforms in effluents from sewage treatment plants. *Appl Environ Microbiol* 1979;37:521-6.
36. Cady P, Dufour SW, Lawless P, Nunke B, Kraeger SJ. Impedimetric screening for bacteriuria. *J Clin Microbiol* 1978;7:273-8.
37. Buckland A, Kessock-Philip S, Bascomb S. Early detection of bacterial growth in blood culture by impedance monitoring with a Bactometer model 32. *J Clin Pathol* 1983;36: 823-8.
38. Contreras OR, Roura G, Novo F, Hernández S, Ramírez N, Ramírez I et al, inventors. Equipment, kit and method for microbiological diagnosis. US patent 6537772. 2003; March:25.
39. Bactometer.2008. [<http://industry.biome-rieux-usa.com/industry/food/bactometer/index.htm>, 24 oct 2008].
40. Don Whitley Scientific. 2008. [<http://www.dwscientific.co.uk/>, 24 oct 2008].
41. BacTrac.2008. [<http://www.sylab.com/bactrac.htm>, 24 oct 2008].
42. Fehlhaber K, Kruger G. The study of *Salmonella enteritidis* growth kinetics using rapid automated bacterial impedance technique. *J Appl Microbiol* 1998;84:945-9.
43. Stulik K, Amatore C, Holub K, Marecek V, Kutner W. Microelectrodes. Definitions, characterization, and applications. *Pure Appl Chem* 2000;72:1483-92.
44. Van Gerwen P, Laureyn W, Laureys W, Huyberechts G, Op De Beeck M, Baert K et al. Nanoscaled interdigitated electrode arrays for biochemical sensors. *Sens Actuators B*. 1998; 49:73-80.
45. Laureyn W, Nelis D, Van Gerwen P, Baert K, Hermans L, Magnee R et al. Nanoscaled interdigitated titanium electrodes for impedimetric biosensing. *Sens Actuators B*. 2000;68: 360-70.
46. Ruan C, Yang L, Li Y. Immunobiosensor chips for detection of *Escherichia coli* O157:H7 using electrochemical impedance spectroscopy. *Anal Chem* 2002;74:4814-20.
47. Varshney M, Li Y. Interdigitated array microelectrode based impedance biosensor coupled with magnetic nanoparticle-antibody conjugates for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in food samples. *Biosens Bioelectron* 2007;22:2408-14.
48. Yang L, Li Y. Detection of viable *Salmonella* using microelectrode-based capacitance measurement coupled with immunomagnetic separation. *J Microbiol Methods* 2006;64: 9-16.
49. Gómez R, Bashir R, Sarikaya A, Ladisch M, Sturgis J, Robinson J et al. Microfluidic biochip for impedance spectroscopy of biological species. *Biomed Microdev* 2001;3:201-9.
50. Pohl HA. Dielectrophoresis. London: Cambridge University Press. 1978.
51. Medoro G, Manaresi N, Leonardi A, Altomare L, Tartagni M, Guerrieri R. A lab-on-a-chip for cell detection and manipulation. Orlando (FL), USA: Sensors IEEE. 2002. p. 472-5.
52. Sengupta S, Battigelli DA, Chang HC. A micro-scale multi-frequency reactance measurement technique to detect bacterial growth at low bio-particle concentrations. *Lab Chip* 2006;6:682-92.
53. Suehiro J, Shutou M, Hatano T, Hara M. Improvement of electric pulse shape for electropermeabilization-assisted dielectrophoretic impedance measurement for high sensitive bacteria detection. *Sens Actuator B* 2005;109: 209-15.
54. Silley P, Forsythe S. Impedance microbiology-a rapid change for microbiologists. *J Appl Bacteriol* 1996;80:233-43.
55. Valentinuzzi ME, Morucci JP, Felice CJ. Monitoring of physiological events by impedance. *Bioelectrical Impedance Techniques in Medicine*. In: Bourne JR, ed. CRC Reviews in Biomedical Engineering. New York: Begell House. 1996:427-66.
56. Wawerla M, Stolle A, Schalh B, Eisgruber H. Impedance microbiology: applications in food hygiene. *J Food Prot* 1999;62:1488-96.
57. Guan JG, Miao YQ, Zhanga QJ. Impedimetric biosensors. *J Biosci Bioeng* 2004;97(4): 219-26.
58. K'Owino IO, Omowunmi AS. Impedance spectroscopy: a powerful tool for rapid biomolecular screening and cell culture monitoring. *Electroanalysis* 2005;17(23): 2101-13.
59. Pejčić B, De Marco R. Impedance spectroscopy: Over 35 years of electrochemical sensor optimization. *Electrochim Acta* 2006; 51(28):6217-29.
60. Yang L, Bashir R. Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of food-borne pathogenic bacteria. *Biotechnol Adv* 2008;26:135-50.

Recibido en junio de 2008. Aprobado en febrero de 2009.