Universidad Iberoamericana Puebla

Repositorio Institucional **http://repositorio.iberopuebla.mx**

ExpoIbero Primavera 2024

Identificación de biosensor para detección temprana de bacteria Candidatus Liberibacter asiaticus como factor de conservación de la biodiversidad y de la industria de cítricos

León Díaz, Hannah Giselle

2024

https://hdl.handle.net/20.500.11777/6000

http://repositorio.iberopuebla.mx/licencia.pdf

Identificación de biosensor para detección temprana de bacteria *Candidatus* Liberibacter *asiaticus* como factor de conservación de la biodiversidad y de la industria de cítricos

Hernández Vázquez Jorge (sexto semestre en Ingeniería en Biotecnología)[1], León Díaz Hannah Giselle (cuarto semestre en Ingeniería en Biotecnología)[1, *], López Ramírez David (segundo semestre en Ingeniería Mecatrónica)[1], Moctezuma Baltazar Grecia Lisseth (quinto semestre en Ingeniería Mecánica-Automotriz)[1], Salazar Amador María del Rubí (profesora responsable)[1].

[1]*Universidad Iberoamericana Puebla, San Andrés Cholula, Puebla, México.*

Resumen

La plaga Huanglobing (HLB) que se desarrolló por causa de la bacteria *Candidatus* Liberbicarter *spp*, es una de las plagas que más afectó los cultivos cítricos y generó una problemática en la industria agrícola a nivel global. A partir del método analítico-sintetico y la revisión de documentación científica se identificaron y compararon los limites de detección y tiempos promedio de los diferentes métodos para la detección temprana de la especie *Candidatus* Liberibacter *asiaticus*. Se analizaron los biosensores como una alternativa prometedora para la detección sensible y rápida de patógenos en los cultivos. Y se demostraron que las mejores características de los biosensores para una identificación temprana de la plaga HLB, se relacionan con su tiempo de reacción. De esta manera, se estableció al biosensor electroquímico capacitivo como un metodo de detección eficaz y efectivo, seguido del amperométrico y potenciométrico.

Palabras clave: Biosensor, HLB, *Ca*Las, citricos.

[*]**Autor Corresponsal:** hannah.leon@iberopuebla.mx

Introducción

La propagación del Huanglongbing (HLB), una enfermedad devastadora causada por la bacteria *Candidatus* Liberibacter *asiaticus* (*Ca*Las) y transmitida por el psílido asiático (*Diaphorina citri*), representa uno de los desafíos más significativos en la historia de la producción de cítricos [1]. El problema amenaza la estabilidad económica y social del sector agrícola y la biodiversidad de los ecosistemas.

La importancia de abordar este tema radica en su repercusión directa en la seguridad alimentaria y la economía global. Con el 17.5% de la producción mundial de frutas compuesta por cítricos, y países como México ocupando el 5º lugar a nivel global en producción de cítricos, las pérdidas causadas por el HLB representan una amenaza significativa para la subsistencia de las comunidades agrícolas y la sostenibilidad de la producción de cítricos a nivel mundial [2]. Además, la preservación de la biodiversidad y la estabilidad de los ecosistemas también están en juego debido a la posible extinción de especies de cítricos.

La literatura existente sobre el HLB destaca su propagación global y el impacto devastador en la producción de cítricos. Desde su aparición en China a finales del siglo XIX hasta su expansión a América en la década de 2000, la enfermedad ha causado pérdidas económicas significativas y plantea desafíos insuperables para su detección y control [2]. Los métodos tradicionales de detección, como la inspección visual y la PCR en tiempo real, son costosos y consumen mucho tiempo, lo que lleva a la búsqueda de alternativas más eficientes, como los biosensores [3].

Ante esta problemática, surge la pregunta fundamental: ¿Cuáles son los parámetros identificables que debe tener un biosensor para la detección temprana de *Ca*Las? Se plantea la hipótesis de que los biosensores ofrecen una solución prometedora debido a su rapidez, especificidad, lo que podría mejorar significativamente la capacidad de detección y control del HLB.

Así, el objetivo principal de este estudio es identificar el biosensor más eficaz y eficiente para la detección temprana de *Ca*Las y con ello contribuir al desarrollo de herramientas innovadoras para la preservación de la citricultura y la biodiversidad.

Los resultados clave de esta investigación destacan la importancia de los biosensores como una alternativa prometedora para la detección del HLB. Su capacidad para detectar el patógeno en tiempos breves y a un costo accesible los posiciona como una herramienta crucial en la lucha contra esta enfermedad. Además, se evidencia la relación directa entre la conservación de los cítricos y el logro de los Objetivos de Desarrollo Sostenible, especialmente en lo referente a la producción y consumo responsables y la vida en ecosistemas terrestres.

Metodología

La investigación se desarrolla a partir de un estudio documental de tipo básico con alcance correlacional, abarcando un tiempo transversal desde el siglo XXI. Se emplearán tanto enfoques cualitativos como cuantitativos, otorgando mayor peso al primero. El muestreo será no probabilístico para el estudio de los cítricos y probabilístico para los biosensores. Se adoptará un diseño de teoría fundamentada, utilizando como instrumentos documentos, registros, bases de datos y estudios de caso.

En el enfoque cualitativo se analizarán en profundidad los objetivos específicos para integrar la información de manera coherente y confiable.

En el enfoque cuantitativo se seguirá una investigación no experimental con un diseño transeccional descriptivo para investigar los tiempos y valores resultantes del proceso de lectura en los biosensores y otros métodos de detección. Se compararán y describirán, utilizando pruebas estandarizadas y diferenciales semánticos.

Se aplicará el método analítico-sintético, el cual involucra dos procesos intelectuales inversos: análisis y síntesis. Este método permite descomponer el objeto de estudio en sus partes constitutivas para luego recomponerlo y comprenderlo en su totalidad [4], tal y como se indica enseguida.

Observación

Se realiza una preselección de documentos, registros, bases de datos y estudios de caso relevantes para el estudio del comportamiento del patógeno y de los biosensores.

Descripción

Se detallan los elementos constitutivos del fenómeno estudiado.

Examen crítico

Se evalúan críticamente los instrumentos cualitativos seleccionados, considerando la importancia del tema, la literatura contemplada, la metodología de la investigación, los análisis de resultados, las discusiones e implicaciones, y las conclusiones y comentarios finales.

Descomposición del fenómeno

Se descompone el objeto de estudio en sus partes constitutivas para un análisis más detallado [5].

Enumeración de las partes

Se nombra y diferencia cada parte constitutiva del fenómeno [6].

Ordenamiento

Se organiza la información recopilada de acuerdo con su enumeración [7].

Clasificación

Se clasifican los elementos constitutivos del fenómeno según sus relaciones, priorizando las referencias que aborden todos los elementos.

Síntesis

Se identifica el sistema que contiene al objeto de estudio, se explica el comportamiento del sistema y se analiza el papel del objeto de estudio dentro del sistema [8].

Para llevar a cabo este proceso, se establecen los alcances de revisión de documentación científica y el análisis comparativo de los métodos de detección del HLB con el biosensor.

Resultados y Discusión

Para el análisis de datos cualitativos se utilizó la codificación.

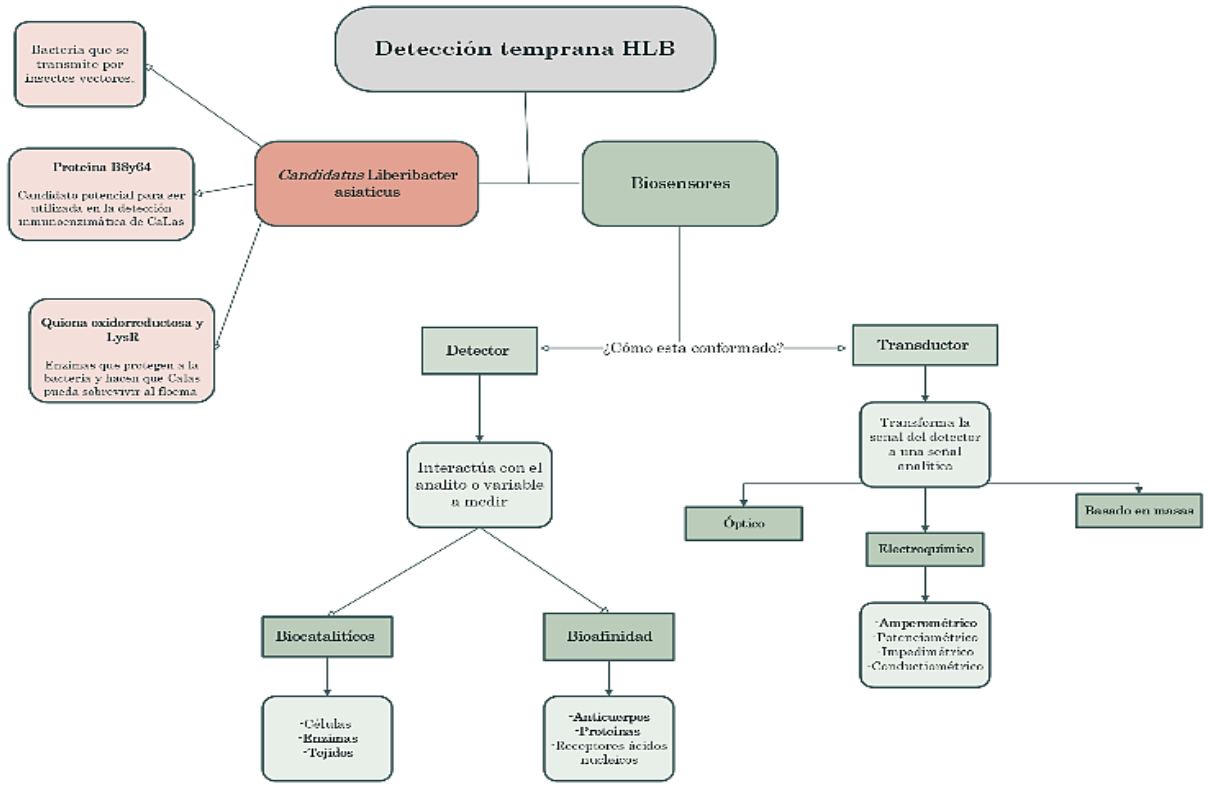

Fig. 1. Codificación [9], [10], [11].

Por otro lado, a partir de la técnica de sistematización de la información se recopilaron los tiempos de los métodos más comunes en la detección del HLB. Es decir, la inspección visual y la prueba qrt-PCR, así como los biosensores en diferentes áreas.

Biosensores		**qrt-PCR**		**Inspección visual**		**Referencias**
Aplicación	Tiempo (s)	Aplicación	Tiempo (min)	Aplicación	Tiempo (días)	
Glucosa con ZnO	2	CMV	90	Cultivo de microalgas	6	[12], [13], [14]
Glucosa	20	PCR LightCycler	120	Conservas de pescado	6	[15], [16], [17]
Glucosa con Gox	60	*Camellia sinensis*	960	Lesiones de caries	7	[15], [18], [19]
T. thioparus en alignato de sodio	72	SARS-CoV-2	1440	*Listeria monocytogenes* a 25°	7	[20], [21], [22]
T. thioparus en agarosa	120	Infecciones fúngicas invasivas	1440	*Listeria monocytogenes* a 4°	30	[20], [23], [22]
Escherichia coli	900	Transcripción inversa	1,740	Guadua A.K	330	[24], [25], [26]

Tabla 1. Tiempos de detección de los métodos más comunes.

Patógeno objetivo	**Método electroquímico**	**Límite de detección**	**Referencia**
V. cholerae	Amperométrico	8 CFU/mL	[27]
E. coli	Amperométrico	10 CFU/mL	[27]
E. coli	Amperométrico	103 CFU/mL	[27]
E. coli	Amperométrico	100 CFU/mL	[27]
S. aureus	Amperométrico	100 CFU/mL	[27]
E. coli	Amperométrico	100 CFU/mL	[27]
S. aureus	Amperométrico	100 CFU/mL	[27]
E. coli	Amperométrico	5×10^3 CFU/mL	[27]
S. typhimurium	Amperométrico	0.1 CFU/mL	[27]
E. coli	Capacitivo	12 CFU/mL	[27]
E. coli	Capacitivo	70 CFU/mL	[27]
S. aureus	Conductimétrica	1×10^4 cells/mL	[27]
Helicobacter pylori	Conductimétrica	100 cells	[27]
B. subtilis	Conductimétrica	100 CFU/mL	[27]
E. coli	Potenciométrico	9×10^5 CFU/mL	[27]
S. typhimurium	Potenciométrico	0.2 CFU/mL	[27]
E. coli	Potenciométrico	6 CFU/mL	[27]
S. aureus	Potenciométrico	1 CFU/mL	[27]
L. monocytogenes	Potenciométrico	10 CFU/mL	[27]

Tabla 2. Límites de detección de biosensores electroquímicos.

Adicionalmente, utilizando los datos extraídos de tablas y gráficas, se realiza la conversión de todos los tiempos a minutos para compararlos. Se utilizaron la Ecuación (1) y (2).

$$t_m = \frac{t_s}{60} \quad (1)$$

$$t_m = t_d \cdot 1440 \quad (2)$$

Donde la Ecuación (3), (4) y (5) definen cada termino.

$$t_d = Tiempo\ en\ días \quad (3)$$

$$t_m = Tiempo\ en\ minutos \quad (4)$$

$$t_s = Tiempo\ en\ segundos \quad (5)$$

Lo que permite integrar la Tabla 3 y la Figura 2.

Métodos de detección	Tiempo promedio (min)
Biosensor	3.26
qrt-PCR	965
Inspección visual	92640

Tabla 3. Tiempos de detección promedio de los métodos más comunes y los biosensores.

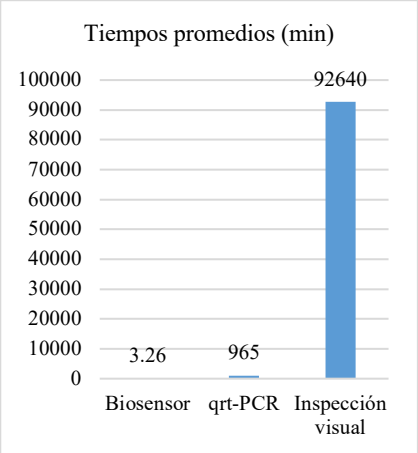

Fig. 2. Tiempos de detección promedio de los diferentes métodos.

De la misma manera, se integra la Tabla 4 y su respectiva gráfica, que es la Figura 3, para los limites de detección.

Método electroquímico	Límite de detección (CFU/mL)
Amperométrico	689.14
Capacitivo	41
Conductimétrica	3400
Potenciométrico	450000.1

Tabla 4. Límites de detección promedio de biosensores electroquímicos.

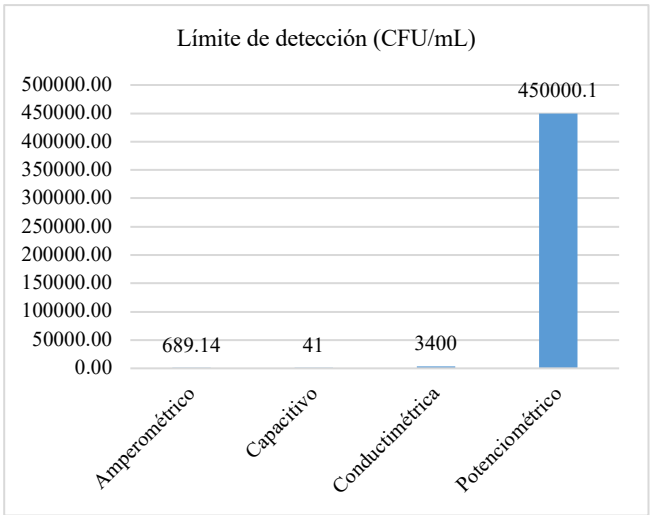

Fig. 3. Límites de detección promedio.

Para la interpretación de datos cualitativos, se tiene la Figura 1, donde se emplea la exploración de conexiones y relaciones entre los datos, que permite identificar relaciones entre *Ca*Las y los biosensores: la proteína B8y64 y la enzima Quiona oxirreductosa y la LysR. Con este enfoque, se observa que la bacteria CaLas tiene tanto enzimas como proteínas, lo que la hace candidata para ser detectada con biosensores catalíticos o de afinidad. Asimismo, la revisión de la documentación indica que, para la detección de bacterias con biosensores, se utilizan transductores electroquímicos, siendo el de mayor índice de uso el amperométrico.

Por otro lado, se utiliza el análisis estadístico descriptivo para interpretar los datos cuantitativos recopilados. Los resultados muestran que el tiempo de detección de los biosensores, en promedio, es de 3.26 minutos, mientras que la prueba qrt-PCR ppptiene un tiempo promedio de 965 minutos y la inspección visual de 92,640 minutos.

De la misma manera, los límites de detección de los biosensores indican que el más eficiente es el capacitivo, necesitando 41 CFU/mL. Sin embargo, los datos sobre biosensores electroquímicos capacitivos reflejan una mayor confiabilidad en biosensores electroquímicos amperométricos con un límite de detección promedio de 689.14 CFU/mL, debido a que los limites detección indican la muestra mínima que puede detectar un biosensor de manera confiable.

Como se observa en el Tabla 4, los biosensores electroquímicos amperométricos son los más comunes en la detección de patógenos de la industria alimentaria, a su vez, son los segundos con un menor límite de detección lo que indica que requiere una menor muestra para detectar el patógeno de manera confiable.

Conclusiones, perspectivas y recomendaciones

A partir de la codificación para el análisis cualitativo se logra caracterizar la bacteria *Ca*Las para conocer las potenciales enzimas o proteínas usables para detectar dicho patógeno. Además, se define el funcionamiento de los biosensores, estableciendo al elemento de reconocimiento y al transductor como los componentes más importantes. Sin embargo, la revisión de la documentación demuestra que, tanto los biosensores catalíticos como los biosensores de afinidad se adaptan correctamente a las necesidades de detección de la bacteria, por lo que no se discierne sobre cuál de los dos presenta mayor eficacia; lo que podría develarse de manera experimental.

La comparación de los tiempos promedio de reacción entre los métodos más comunes utilizados en la detección del HLB y los biosensores, muestra una diferencia significativa de eficacia entre dichos tiempos, por lo que, se establece al biosensor como un método de detección temprana eficaz.

También se identifica al biosensor como un método efectivo para la detección del patógeno *Ca*Las. Sin embargo, no es posible identificar al biosensor con mayor eficacia debido a la falta de documentación sobre los tiempos promedio de los diferentes métodos electroquímicos utilizados.

Por otro lado, la Tabla 4 indica que el método electroquímico más eficiente es el capacitivo. Sin embargo, como este

resultado deriva sólo de dos datos, parece una opción más probable, por el número superior de referencias que lo respaldan, establecer como más eficiente al método amperométrico, seguido del potenciométrico.

Se recomienda llevar a cabo estudios que permitan analizar el tiempo de detección de los biosensores en los patógenos. Así como una profundización en el estudio de las proteínas de la bacteria *Ca*Las para obtener una variedad mucho más detallada de cómo se conforma la bacteria. De la misma manera, un estudio más amplio acerca de los biosensores.

Referencias

[1] J. Hyuk Suh, X. Tang, Y. Zhang, F. G. Gmitter Jr. y Y. Wang, «Metabolomic Analysis Provides New Insight Into Tolerance of Huanglongbing in Citrus,» 3 Agosto 2021. [En línea]. Available: https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2021.710598/full. [Último acceso: 8 Febrero 2024].

[2] Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, «Huanglongbing Candidatus Liberibacter spp. Ficha técnica No. 78,» Mayo 2019. [En línea]. Available: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/463426/78._Ficha_t_cnica_Huanglongbing._Mayo_2019..pdf. [Último acceso: 2024 Febrero 13].

[3] J. J. Garza-Saldaña, S. Varela-Fuentes y W. Gómez-Flores, «Métodos para la detección presuntiva de Huanglongbing (HLB) en cítricos,» *CienciaUAT,* vol. 11, nº 2, pp. 93-104, 2017.

[4] A. O. Pérez Jacinto y A. Rodríguez Jiménez, «Métodos científicos de indagación y de construcción del conocimiento,» *Revista EAN,* nº 82, pp. 179-200, 2017.

[5] J. D. Lopera Echavarria, C. A. Ramírez Gómez, M. U. Zuluaga Aristazábal y J. Ortiz Vanegas, «El método analítico como método natural,» *Nómadas. Critical Journal of Social and Juridical Sciences,* vol. 25, nº 1, 2010.

[6] C. Giani, «Enumeración,» Enciclopedia de Lenguaje, 8 Diciembre 2023. [En línea]. Available: https://lenguaje.com/enumeracion/. [Último acceso: 2024 Febrero 15].

[7] E. Maya, Métodos y técnicas de investigación, Distrito Federal: Universidad Nacional Autónoma de México, 2014.

[8] J. C. Osorio Gómez, «Análisis versus síntesis: "contrarios o complementarios",» *Scientia Et Technica,* vol. XVII, nº 47, pp. 39-43, 2011.

[9] C. Jiménez y D. E. León. P., «Biosensores: aplicaciones y perspectivas en el control y calidad de procesos y productos alimenticios,» *VITAE, revista de la facultad de química farmacéutica,* vol. 16, nº 1, pp. 144-154, 2009.

[10] E. W. Carter, O. Guerra Peraza y N. Wang, «The protein interactome of the citrus Huanglongbing pathogen Candidatus Liberibacter asiaticus,» *Nature Communications,* vol. 14, nº 7838, 2023.

[11] C. G. Rodríguez Quibrera, I. H. Almeyda-León, F. R. Flores-de la Rosa y J. L. Hernández, «Identificación de proteínas en Candidatus Liberibacter asiaticus para desarrollar un método de detección inmunoenzimático,» *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas,* vol. 13, nº 8, pp. 1489-1494, 2022.

[12] Z. Yang, Z. Ye, B. Zhao, X. Zong y P. Wang, «A rapid response time and highly sensitive amperometric glucose biosensor based on ZnO nanorod via citric acid-assisted annealing route,» *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures,* vol. 42, nº 6, pp. 1830-1833, 2010.

[13] I. M. Mackay, K. E. Arden y A. Nitsche, «Real-time PCR in virology,» *Nucleic Acids Research,* vol. 30, nº 6, pp. 1292-1305, 2002.

[14] B. O. Arredondo-Vega y D. Voltolina, «Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento,» de *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalga*, La Paz, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., 2007.

[15] X. Ren, X. Meng, D. Chen, F. Tang y J. Jiao, «Using silver nanoparticle to enhance current response of biosensor,» *Biosensors and Bioelectronics,* vol. 21, nº 3, pp. 433-437, 2005.

[16] C. Gachon, A. Mingam y B. Charrier, «Real-time PCR: what relevance to plant studies?,» *Journal of Experimental Botany,* vol. 55, nº 402, pp. 1445-1454, 2004.

[17] G. A. Vasquez la Torre, «Propuesta de implementación de un metodo de muestreo de aceptación para mejorar la eficiencia del proceso de inspección visual de conservas de pescado,» Universidad San Ignacio de Loyola, Lima, 2016.

[18] J. Wang, L. Liu, Q. Tang, K. Sun, L. Zeng y Z. Wu, «Evaluation and selection of suitable qRT-PCR reference genes for light responses in tea plant (Camellia sinensis),» *Scientia Horticulturae,* vol. 289, 2021.

[19] I. I. Mella Peña, «Comparación entre método clínico directo e indirecto para a detección de lesiones de caries interproximales cavitadas en adultos : estudio in vivo,» Universidad de Chile, Chile, 2015.

[20] A. Vosoughi, F. Yazdian, G. Amoabediny y M. Hakim, «Investigating the effect of design parameters on the response time of a highly sensitive microbial hydrogen sulfide biosensor based on oxygen consumption,» *Biosensors and Bioelectronics,* vol. 70, pp. 106-114, 2015.

[21] Cochrane Iberoaméricana, «¿Qué nuevas evidencias hay sobre la precisión de los test rápidos para diagnosticar la covid-19?,» *Diagnóstico | Covid-19,* Marzo 2021.

[22] S. Martínez Rivera, «Capacidad deterioradora y de formación de biopelículas de bacterias ácido lácticas aisladas de una planta procesadora de jamón cocido rebanado y su interacción con Listeria monocytogenes,» *Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos,* 2014.

[23] C. Valero, L. De la Cruz Villar, Ó. Zaragoza y M. J. Buitrago, «New Panfungal Real-Time PCR Assay for Diagnosis of Invasive Fungal Infections,» *Journal of Clinical Microbiology,* vol. 54, nº 12, pp. 2910-2918, 2016.

[24] S. Malhotra, D. Song Pham, M. P. H. Lau, A. H. Nguyen y H. Cao, «A Low-Cost, 3D-Printed Biosensor for Rapid Detection of Escherichia coli,» *Sensors (Basel),* vol. 22, nº 6, p. 2382, 2022.

[25] J. Bachman, «Chapter Two - Reverse-Transcription PCR (RT-PCR),» *Methods in Enzymology,* vol. 530, pp. 67-74, 2013.

[26] L. R. Patiño León, M. Marinez y W. Barreto, «Comparación de guadua angustifolia kunth expuesta a agentes atmosféricos, protegida y sin protección, mediante inspección visual y microscopía,» *Citas,* vol. 7, nº 1, 2021.

[27] E. Cesewski y B. N. Jonhson, «Electrochemical biosensors for pathogen detection,» *Biosensors and Bioelectronics,* vol. 159, 2020.