



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA  
BARCELONATECH

Escola Superior d'Agricultura de Barcelona

# DESARROLLO DE BIOSENSORES PARA LA DETECCIÓN DE CIANOBACTERIAS EN MUESTRAS LÍQUIDAS DE SISTEMAS ACUAPÓNICOS

- Trabajo Final de Máster -

Tecnologías Facilitadoras de la Industria Alimentaria y Bioprocesos

Universidad Politécnica de Cataluña (UPC)

Castelldefels, Barcelona.

Julio de 2019

**Sandra Chacón Aparicio**



Tutor externo (IBM-CNM, CSIC)

**Dr. Sergi Brosel Oliu**

Tutor académico

**Dr. Daniel Rodríguez Rius**

La demanda actual de alimentos está generando una explotación excesiva de los recursos naturales, entre los que se encuentra el agua como recurso esencial. Solo la producción agrícola consume casi el 80% del agua dulce disponible en el mundo, por lo que es necesario implementar sistemas donde se pueda recuperar y reutilizar el agua. Una de estas técnicas es la acuaponía, donde se combina en un mismo ambiente la hidroponía y la acuicultura.

La acuaponía es un sistema cerrado y circular de producción alimentaria que presenta múltiples ventajas para la producción sostenible de alimentos donde se reaprovecha el agua. No obstante, uno de sus mayores problemas es la proliferación masiva de microorganismos no deseados, entre los que se encuentran las cianobacterias. Estas, pueden ser causantes de intoxicaciones mediante la producción de diferentes tipos de cianotoxinas, llegando a provocar la muerte de diferentes organismos.

Actualmente, hay multitud de métodos de detección de cianobacterias, pero la mayoría de ellos son costosos a nivel de instrumentación, con protocolos complejos y de difícil manejo. Además, la mayoría se emplean para detectar cianotoxinas por lo que estas técnicas no permiten una detección temprana de las cianobacterias y así poder evitar su proliferación antes de que causen problemas en el sistema de acuaponía.

Por ello, en este proyecto se propone el desarrollo de biosensores para llevar a cabo la detección de cianobacterias. Los biosensores, son dispositivos analíticos formados por un transductor y un elemento de bioreconocimiento que permiten detectar un determinado analito de interés de forma sensible y selectiva, en este caso las cianobacterias.

En este trabajo se han utilizado transductores impedimétricos basados en matrices de electrodos interdigitados (*InterDigitated Electrode Arrays*, IDEA) (bio)funcionalizados con diferentes estrategias como herramienta para detectar cianobacterias. La espectroscopia de impedancia electroquímica (*Electrochemical Impedance Spectroscopy*, EIS), es una técnica muy sensible que permite estudiar los cambios eléctricos en la superficie de un determinado electrodo. Dentro de los diferentes sensores impedimétricos los IDEA permiten detectar pequeños cambios superficiales de manera rápida, sensible, a bajo coste de producción y

fácil de manejar gracias a la detección directa de analitos sin necesidad de marcadores (*label-free detection*).

El objetivo principal de este estudio consiste en desarrollar un biosensor, mediante el uso de transductores impedimétricos del tipo IDEA para la detección de cianobacterias en muestras líquidas. En primer lugar, el proyecto se centró en la optimización de una metodología para realizar los ensayos de detección de cianobacterias, usando *Synechocystis sp.* PCC 6803 como cepa modelo. En segundo lugar, se estudió el uso de diferentes tipos de transductores IDEA para determinar cuál era más sensible. Y, por último, se ha estudiado la biofuncionalización de la superficie de los sensores mediante el método *layer-by-layer* para depositar diferentes capas de polielectrolitos y la lectina concanavalina A, como elemento de reconocimiento, obteniendo un límite de detección de 100 células/mL en solo 60 minutos de ensayo.

The current demand for food production is generating an overexploitation of natural resources, including water as an essential one. Agricultural production consumes almost the 80% of fresh water available in the world, so it is necessary to implement systems in which water can be recovered and reused. One of these techniques are aquaponics systems that combines hydroponics and aquaculture in the same environment.

Aquaponic are closed and circular systems that present many advantages for the sustainable production of food and the reuse of water. However, one of its main problems is the growth of microorganisms, including cyanobacteria. Cyanobacteria may produce intoxications by means of the generation of different types of cyanotoxins, even causing the death of different organisms.

Currently, there are several methods for the detection of cyanobacteria, but the majority of them require expensive instrumentation, complex protocols and trained personnel. In addition, most of them are used to detect only cyanotoxins. Thus, these techniques do not allow the early detection of cyanobacteria, preventing the proliferation and their presence in aquaponics.

In this sense, this study proposes the development of biosensors to carry out the detection of cyanobacteria. Biosensors are analytical devices formed by a transducer unit and a biorecognition element that allow to detect an analyte of interest with highly a sensitivity e and selectivity here cyanobacteria.

In this work, impedimetric transducers based on interdigitated electrode arrays (IDEA) (bio)functionalized with different strategies have been used as a tool to detect cyanobacteria. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) is a highly sensitive technique to study electrical changes on the surface of the electrode. Among different impedimetric sensors, IDEA permits to detect small surface changes in terms of fast response, sensitivity, low cost production, easy operation and label-free detection

The main objective of this study is to develop a biosensor using IDEA impedimetric transducers for the detection of cyanobacteria in liquid samples. First of all, the project was focused on the methodology optimization to perform cyanobacteria detection tests, using

*Synechocystis sp.* PCC 6803 as a model strain. Secondly, it was compared the response in terms of sensitivity of different types of IDEA transducer. Finally, the biofunctionalization of the sensor surface was studied using the *layer-by-layer* method to deposit different layers of polyelectrolytes and the lectin concanavalin A as the bioreceptor obtaining a limit of detection of 100 cells/mL in just 60 minutes.

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| <b><math>\Delta R_s</math></b> | Variación de la resistencia entre electrodos      |
| <b>3D-IDEA</b>                 | Three-Dimensional Interdigitated Electrode Array  |
| <b>ADN</b>                     | Ácido desoxiribonucleico                          |
| <b>ARN</b>                     | Ácido ribonucleico                                |
| <b>BG</b>                      | Blue Green medium                                 |
| <b>CBPs</b>                    | Carbohydrate Binding Proteins                     |
| <b><math>C_G</math></b>        | Capacidad geométrica                              |
| <b>Con A</b>                   | Concanavalina A                                   |
| <b><math>CPE_{DL}</math></b>   | Constant Phase Element Double Layer               |
| <b>DRIE</b>                    | Deep Reactive Ion Etching                         |
| <b><i>E. coli</i></b>          | Escherichia coli                                  |
| <b>EIS</b>                     | Electrochemical Impedance Spectroscopy            |
| <b>ELISA</b>                   | Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay                 |
| <b>FAO</b>                     | Food and Agriculture Organization                 |
| <b>Fig.</b>                    | Figura  |
| <b>HPLC</b>                    | High Performance Liquid Chromatography            |
| <b>IDEA</b>                    | Interdigitated Electrode Array                    |
| <b>IUPAC</b>                   | International Union of Pure and Applied Chemistry |
| <b>KCl</b>                     | Cloruro de potasio                                |
| <b>LBL</b>                     | Layerby-layer                                     |
| <b>LC</b>                      | Liquid Chromatography                             |
| <b>LOD</b>                     | Limit of detection                                |
| <b>LPCVD</b>                   | Low Pressure Chemical Vapor Deposition            |
| <b>LPS</b>                     | Lipopolisacárido                                  |
| <b>MALDI</b>                   | Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization       |

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| <b>MS</b>                        | Mass Spectrometry   |
| <b>OMS</b>                       | Organización Mundial de la Salud                                      |
| <b>PCB</b>                       | Printed Circuit Board   |
| <b>PCR</b>                       | Polymerase Chain Reaction   |
| <b>PEI</b>                       | Polietilenimina   |
| <b>PSS</b>                       | Poli-sodio-4-estirenosulfonato  |
| <b>qPCR</b>                      | quantitative Polymerase Chain Reaction                                |
| <b><math>R_{BULK}</math></b>     | Resistencia de la solución  |
| <b><math>R_C</math></b>          | Resistencia de contacto   |
| <b>RMN</b>                       | Resonancia Magnética Nuclear  |
| <b><math>R_S</math></b>          | Resistencia entre electrodos  |
| <b><math>R_{SURF}</math></b>     | Resistencia superficial   |
| <b>SEM</b>                       | Scanning Electron Microscope  |
| <b>SiO<sub>2</sub></b>           | Óxido de silicio  |
| <b>TaSi<sub>2</sub></b>          | Siliciuro de tántalo  |
| <b>TOF</b>                       | Time Of Flight  |
| <b>TRIS-HCl</b>                  | Tampón Tris (hidroximetil) aminometano ajustado con ácido clorhídrico |
| <b>V</b>                         | Voltaje/Potencial   |
| <b>Z</b>                         | Impedancia  |
| <b><math>Z_{im} / Z''</math></b> | Impedancia imaginaria   |
| <b><math>Z_{re} / Z'</math></b>  | Impedancia real   |
| <b><math>\phi</math></b>         | Fase  |

|                                    |                             |
|------------------------------------|-----------------------------|
| <b><math>\mu\text{g/mL}</math></b> | Microgramo por mililitro    |
| <b><math>\mu\text{m}</math></b>    | Micrómetro                  |
| <b><math>\mu\text{S/cm}</math></b> | Microsiemens por centímetro |
| <b>cel/mL</b>                      | Células por mililitro       |
| <b>Hz</b>                          | Hertzio o herzio            |
| <b>lx</b>                          | Lux                         |
| <b>M</b>                           | Molar                       |
| <b>mg/L</b>                        | Miligramo por litro         |
| <b>mg/mL</b>                       | Miligramo por mililitro     |
| <b>mL</b>                          | Mililitro                   |
| <b>mm</b>                          | Milímetro                   |
| <b>mV</b>                          | Milivoltio                  |
| <b>nm</b>                          | Nanómetro                   |
| <b>rpm</b>                         | Revoluciones por minuto     |
| <b><math>\Omega</math></b>         | Ohmio                       |



# CONTENIDO

---

|  |             |
|--|-------------|
| RESUMEN.....   | I           |
| SUMMARY .....  | II-IV       |
| LISTA DE ABREVIATURAS .....  | V-VI        |
| LISTA DE UNIDADES .....  | VII         |
| <b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>   | <b>1-16</b> |
| 1.1. SISTEMAS ACUAPÓNICOS Y SU NECESIDAD.....  | 1           |
| 1.1.1 LIMITACIONES DE LOS SISTEMAS ACUAPÓNICOS .....   | 3           |
| 1.2. CIANOBACTERIAS Y CIANOTOXINAS .....   | 3           |
| 1.2.1 PROBLEMAS CAUSADOS POR LAS CIANOBACTERIAS .....  | 4           |
| 1.2.2 CIANOTOXINAS .....   | 5           |
| 1.3. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE CIANOBACTERIAS Y CIANOTOXINAS EN MUESTRAS AMBIENTALES .....                                     | 6           |
| 1.3.1 MÉTODOS ESTÁNDARES DE DETECCIÓN .....  | 6           |
| 1.3.2 MÉTODOS ALTERNATIVOS DE DETECCIÓN.....   | 7           |
| 1.4. BIOSENSORES.....  | 8           |
| 1.4.1 CLASIFICACIÓN SEGÚN EL ELEMENTO DE BIORECONOCIMIENTO .....   | 8           |
| 1.4.1.1 ANTICUERPOS.....   | 8           |
| 1.4.1.2 APTÁMEROS .....  | 9           |
| 1.4.1.3 LECTINAS .....   | 9           |
| 1.4.1.4 BACTERIÓFAGOS .....  | 10          |
| 1.4.2 CLASIFICACIÓN EN FUNCIÓN DEL SISTEMA DE TRANSDUCCIÓN.....  | 10          |
| 1.5. TRANSDUCTORES IMPEDIMÉTRICOS.....   | 11          |
| 1.5.1. ESPECTROSCOPÍA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA (EIS) Y SU INTERPRETACIÓN .....   | 11          |
| 1.6. BIOSENSORES IMPEDIMÉTRICOS .....  | 13          |
| 1.6.1 ELECTRODOS INTERDIGITADOS ( <i>INTERDIGITATED ELECTRODE ARRAY, IDEA</i> ).....   | 13          |
| 1.6.2 CIRCUITOS EQUIVALENTES DE LOS IDEA EN MEDIDAS NO FARADAICAS.....   | 14          |
| 1.6.3 ELECTRODOS INTERDIGITADOS TRIDEIMENSIONALES ( <i>THREE-DIMENSIONAL INTERDIGITATED ELECTRODE ARRAY, 3D-IDEA</i> ) ..... | 16          |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>   | <b>17</b>   |
| 2.1. OBJETIVO GENERAL.....   | 17          |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....  | 17          |

|           |   |              |
|-----------|---|--------------|
| <b>3.</b> | <b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>   | <b>18-24</b> |
| 3.1       | DISEÑO Y FABRICACIÓN DEL ELECTRODO.....   | 18           |
| 3.2       | PRODUCTOS QUÍMICOS Y SOLUCIONES .....   | 20           |
| 3.3       | MODIFICACIONES DE LA SUPERFICIE DE LOS IDEA MEDIANTE EL MÉTODO LAYER-BY-LAYER ..... | 21           |
| 3.3.1     | MODIFICACIÓN CON POLIELECTROLITOS (PEI-PSS-PEI) .....                               | 21           |
| 3.3.2     | MODIFICACIÓN CON CONCAVALINA A (PEI-CON A) .....                                    | 21           |
| 3.4       | PREPARACIÓN DEL CULTIVO.....  | 21           |
| 3.5       | METODOLOGÍAS DE TRABAJO PARA LA DETECCIÓN DE <i>SYNECHOCYSTIS</i> .....             | 22           |
| 3.6       | MEDIDAS DE IMPEDANCIA .....   | 24           |
| <br>      |   |              |
| <b>4.</b> | <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>   | <b>25-38</b> |
| 4.1.      | CARACTERIZACIÓN Y FUNCIONALIZACIÓN DE LOS SENSORES IDEA.....                        | 25           |
| 4.1.1.    | FUNCIONALIZACIÓN DE IDEA PLANOS CON PEI-PSS-PEI .....                               | 26           |
| 4.1.2.    | FUNCIONALIZACIÓN DE IDEA PLANOS CON PEI-CON A.....                                  | 27           |
| 4.2.      | OPTIMIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE TRABAJO .....                                     | 28           |
| 4.3.      | COMPARACIÓN DE 3D-IDEA E IDEA-PLANOS.....   | 30           |
| 4.4.      | DETECCIÓN DE <i>SYNECHOCYSTIS</i> MEDIANTE 3D-IDEA CON PEI-PSS-PEI .....            | 31           |
| 4.5.      | DETECCIÓN MEDIANTE 3D-IDEA CON PEI- CON A.....                                      | 34           |
| 4.5.1.    | DETECCIÓN DE <i>SYNECHOCYSTIS</i> .....   | 36           |
| <br>      |   |              |
| <b>5.</b> | <b>CONCLUSIONES.....</b>  | <b>39-40</b> |
| <br>      |   |              |
| <b>6.</b> | <b>PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>   | <b>41</b>    |
| <br>      |   |              |
|           | <b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>   | <b>42-44</b> |

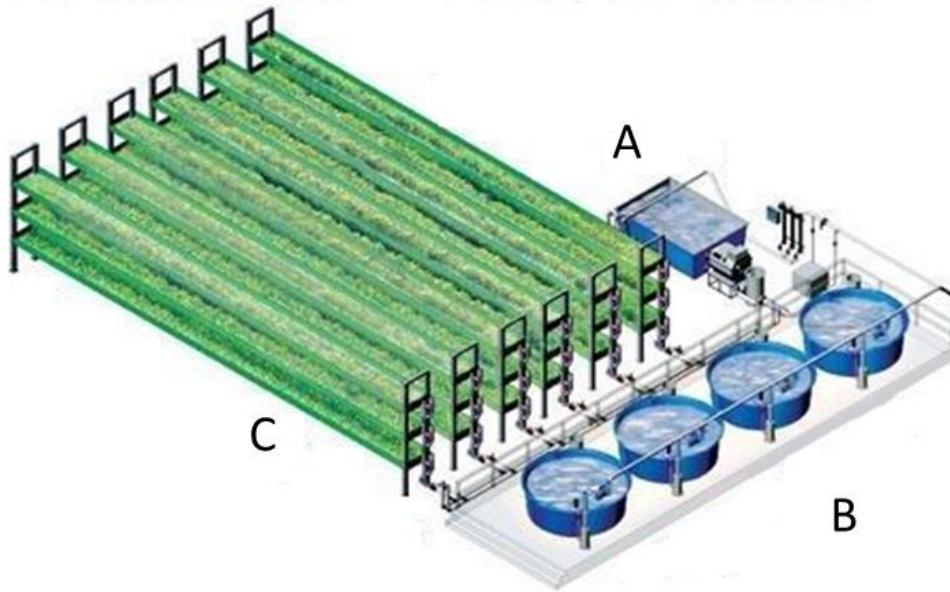
# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1. SISTEMAS ACUAPÓNICOS Y SU NECESIDAD**

Los sistemas acuapónicos son un modelo cerrado de producción de alimentaria donde se combina en un mismo ambiente la hidroponía y la acuicultura. A grandes rasgos, la hidroponía consiste en el cultivo de plantas sin tierra usando soluciones acuosas, mientras que la acuicultura se centra en el cultivo de organismos acuáticos en un sistema artificial. La finalidad de la acuaponía es el reaprovechamiento de los subproductos de ambos sistemas para la producción sostenible de alimentos [1].

El principio básico de estos sistemas (Figura 1), y por lo que se busca su desarrollo e implementación, radica en que los nutrientes requeridos por las plantas, para su correcto crecimiento, permiten ser adquiridos por estas mediante los desechos que producen algunos organismos acuáticos [2]. Por tanto, el objetivo es la obtención de un sistema de producción alimentario capaz de generar alimentos de forma sostenible, en el que el desecho de un subproducto (los residuos biológicos de los peces presentes en el agua) sirvan como nutriente para otro tipo de cultivo, el de plantas y vegetales. A esto se suma la posibilidad de reaprovechar el agua ya que en los sistemas de acuicultura convencionales esta es desechada. Además, en estos sistemas se debe garantizar los estándares de calidad y seguridad alimentaria [3].

Una de las partes más importantes de esta técnica es el sistema de biofiltración donde se encuentran las bacterias nitrificantes que se encargarán de transformar el amonio, procedente de las excreciones de los peces, en nitratos para que las plantas puedan usarlo como nutriente [1]. Un papel crucial lo juegan un grupo de bacterias conocidas como nitrificantes, transformando el amonio a nitrito. Mientras, otros géneros de dichas bacterias convierten el nitrito a nitrato para que las plantas sean capaces de incorporarlo.



**Figura 1.** Sistema acuapónico (A) los sistemas de biofiltración del agua que se obtiene de los tanques de peces, (B) los tanques donde crecen los peces y (C) el cultivo hidropónico al que se le bombea el agua rica en nutrientes. Adaptado a partir de [4].

El elemento clave en la interconexión de estos procesos biológicos y en la acuaponía es el agua. El agua es un recurso natural esencial y su abastecimiento es una de las problemáticas a nivel mundial, especialmente en los países en vías de desarrollo. De manera paulatina, se está convirtiendo en un producto muy escaso, donde la producción agrícola consume del 75% al 80% de agua dulce disponible en el mundo. A esto, se le suma que el empleo de fertilizantes y pesticidas para los cultivos van contaminando las aguas dulces de los acuíferos, lagos y ríos. Además, la acuicultura genera una alta cantidad de aguas residuales [5], que sin un tratamiento correcto no pueden ser reaprovechadas.

Así pues, la acuaponía favorece la recirculación del agua generando un sistema eficiente, rentable y simple de utilizar; ya que son circulares o cerrados [6], lo que supone otra ventaja para que sean implementados. Por otra parte, la creciente demanda de alimentos actual no podrá ser sostenida durante mucho más tiempo si la industria agroalimentaria continua con la misma forma de explotación de los recursos naturales, ya sea por como el uso abusivo del agua, la elevada producción de gases de efecto invernadero, la pérdida de la biodiversidad por sobrepesca o las deforestaciones [7]. Por estos motivos, se deben proponer tanto cambios en las tecnologías de producción de los alimentos como en los hábitos del consumidor [8].

### **1.1.1 LIMITACIONES DE LOS SISTEMAS ACUAPÓNICOS**

Son muchas las consideraciones a la hora de implementar correctamente un sistema de acuaponía. A nivel biológico, es esencial realizar la elección del cultivo vegetal así como las especies del pez más adecuados. Pero otro factor muy importante es el control de la calidad del agua, ya que será el entorno donde crezcan los peces y el sustrato nutritivo de las plantas [3].

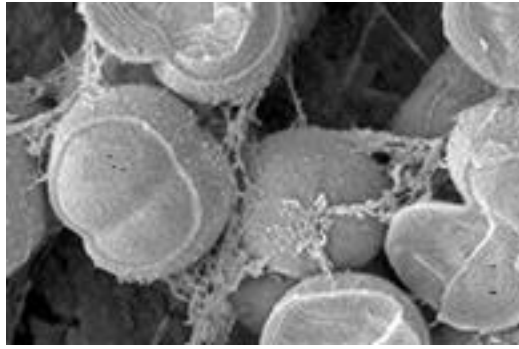
Para garantizar la calidad del agua hay ciertos parámetros que se deben controlar con regularidad como son: el pH, la temperatura, la tasa de oxígeno disuelto y los nutrientes, entre otros. La importancia de cada uno de estos factores radica en que sin un control óptimo hacen que pueda desencadenarse la proliferación de microorganismos no deseados, alterando el equilibrio del sistema [9].

Un aporte de nutrientes excesivo en estos sistemas es una de las causas directas para el crecimiento de organismos fotoautótrofos como plantas, algas y/o cianobacterias [10]. Por ejemplo, los sistemas de acuaponía comparten condiciones muy similares a las de crecimiento de las cianobacterias, como son el pH (en torno a 5,8 y 6,2), la temperatura (desde los 12°C a 28°C), la tasa de oxígeno disuelto (aproximadamente de 5 mg/L) y los nutrientes principales (como el fósforo y el nitrógeno), según datos aportados por la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura).

En este sentido, es esencial el desarrollo de métodos rápidos para la detección de microorganismos en el agua, entre ellos las cianobacterias, y así poder garantizar la calidad del agua de estos sistemas para potenciar su desarrollo.

### **1.2. CIANO BACTERIAS Y CIANOTOXINAS**

Las cianobacterias son organismos procariotas, Gram negativos, fotosintéticos y capaces de fijar el nitrógeno, siendo los únicos microorganismos fotoautótrofos capaces de hacerlo [11]. Las cianobacterias, también denominadas algas verde-azuladas, poseen membrana externa y algunas de ellas presentan capa S. Esta capa está compuesta generalmente de proteínas o glicoproteínas que se encuentran en la superficie de algunos procariotas y tienen como función principal protegerlas contra el estrés ambiental o el ataque de otros organismos [10]. De manera general, las cianobacterias son fotoautótrofos aerobios, pero algunas presentan crecimiento heterótrofo [12].



**Figura 2.** Células de *Synechocystis sp.* PCC 6803. Imagen tomada a partir de microscopía SEM de células congeladas. Adaptada a partir de [13].

Existe una amplia diversidad morfológica, pueden ser unicelulares aisladas (*Synechocystis*) (Figura 2) o agrupadas en colonias (*Microcystis*) o filamentosas, ramificadas (*Scytonema*) o sin ramificar (*Anabaena*) [11]. Además, presentan un crecimiento bastante rápido en medios acuáticos de aguas dulces donde se combinan condiciones de pH alcalino (generalmente entre pH de 6.0 y 9.0) y temperaturas que oscilan entre los 15°C y los 30°C. Por otra parte, la eutrofización de los ambientes acuáticos, proceso por el cual aumenta el número de microorganismos por una mayor concentración de nutrientes de las aguas [14], favorece su proliferación masiva [15]. Por eso, uno de los ambientes en los que son capaces de desarrollarse las cianobacterias son los sistemas acuapónicos.

### **1.2.1 PROBLEMAS CAUSADOS POR LAS CIANOBACTERIAS**

Este tipo de bacterias cuando proliferan excesivamente generan floraciones o *blooms*, debido a la reproducción acelerada y masiva de estos microorganismos [10]. El mayor problema de la aparición de los *blooms* es que se generan diferentes toxinas, las llamadas cianotoxinas, cuya ingesta puede ser perjudicial [12]. Se estima que más del 50% de estos *blooms* son tóxicos [15]. Por este motivo existe una preocupación respecto a las cantidades de cianobacterias que se acumulan en las aguas, ya que la OMS (Organización Mundial de la Salud) [14] cataloga que concentraciones superiores a 20.000 células/mL son altamente peligrosas para la salud humana. Además, dentro del marco europeo no hay legislación concreta que estipule concentraciones máximas de cianobacterias causantes de riesgo en la salud, únicamente están relacionadas con valores de cianotoxinas [16]. Por lo que, debido a su rápida proliferación es de sumo interés controlar su aparición en algunos ambientes acuáticos como los sistemas acuapónicos donde los productos que se generan van a ser consumidos como alimentos.

Uno de los mayores retos asociados a la detección de estas cianobacterias es poder distinguir unas especies de otras, ya que no todas las especies son tóxicas [11].

### 1.2.1 CIANOTOXINAS

Las cianotoxinas son metabolitos secundarios producidos por las cianobacterias que, de manera general, afectan negativamente sobre la salud de los animales que habitan en el mismo ambiente o a las personas que consuman el agua contaminada [17].

Las toxinas de las cianobacterias se agrupan en diferentes subcategorías: neurotoxinas, hepatotoxinas, citotoxinas y endotoxinas [18]. Las neurotoxinas afectan al sistema nervioso central, destacan las saxitoxinas producidas por géneros como *Anabaena*. Las hepatotoxinas como las microcistinas, generadas entre otras especies por *Microcystis*, tienen como diana el hígado. Por otra parte, las citotoxinas, al igual que las hepatotoxinas, actúan atacando al hígado como diferentes géneros de *Cylindrospermopsis*. Por último, las endotoxinas, también conocidas como lipopolisacáridos (LPS), inducen la respuesta inmune y así desencadenar un choque séptico. Además, los LPS son moléculas que están presentes en la membrana externa de las células Gram negativas y actúan como componente estructural y barrera de defensa [19].

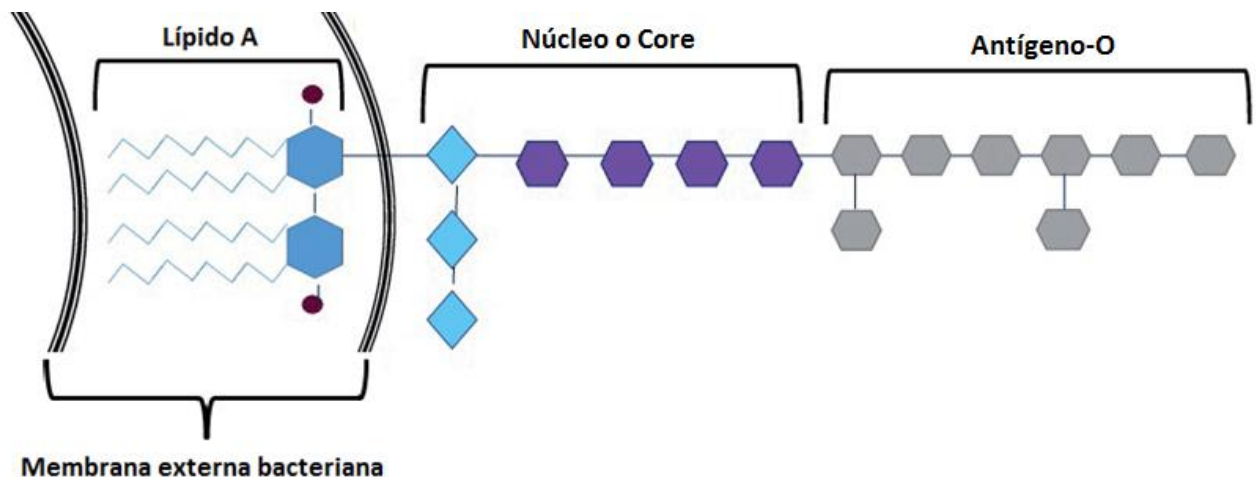


Figura 3. Estructura simplificada de un lipopolisacárido (LPS), adaptado de [20].

A nivel estructural los LPS (Figura 3) son glucolípidos anclados en la membrana externa que consta de tres regiones: un glucolípidos conocido como lípido-A insertado en la membrana externa, siendo la fracción biológicamente activa de la molécula, y responsable

de la toxicidad de las bacterias Gram negativas, el núcleo (o *core*), compuesto por varios oligosacáridos, y el antígeno-O formado por polisacáridos que varían para cada cepa, situado en la zona más externa de la célula [19, 21].

### **1.3. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE CIANOBACTERIAS Y CIANOTOXINAS EN MUESTRAS AMBIENTALES**

#### **1.3.1 MÉTODOS ESTÁNDARES DE DETECCIÓN**

Dentro de los métodos estándares de detección uno de los más empleados es el análisis por microscopía. Mediante diferentes técnicas microscópicas como las basadas en epifluorescencia o el uso del microscopio de luz invertida, permiten realizar un recuento de este tipo de células. Una de las ventajas es la posibilidad de identificar algunas especies de cianobacterias en base a su morfología de manera rápida y a bajo coste, pero el problema es la dificultad para determinar si la especie es o no es tóxica. Además, hay que tener en cuenta que son métodos inexactos por la baja precisión que tienen y, por tanto, a la hora de cuantificar *blooms* es prácticamente imposible [18].

Otras técnicas para detectar cianobacterias o cianotoxinas son a partir de fluorimetría o espectrofotometría ya que las cianobacterias poseen pigmentos fotosintéticos como la clorofila-a. La cuantificación de estos pigmentos permite relacionar la concentración de cianobacterias con la señal obtenida a través de una curva patrón. A pesar de ser métodos sencillos, ambas técnicas tienen una baja sensibilidad y selectividad, por lo que la cuantificación puede dar lugar a errores [18].

Existen otras formas de identificar y cuantificar la especie de cianobacterias mediante las técnicas moleculares. Dentro de ellas destacan las basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase-chain reaction*, PCR) que permite amplificar una región determinada del DNA y compararla con secuencias de especies ya conocidas, en este caso de diferentes cepas de cianobacterias o cianotoxinas. A partir de la qPCR (*quantitative or real-time polymerase chain reaction*), se puede identificar y cuantificar el DNA de una determinada muestra al mismo tiempo. A pesar de poder cuantificar, no siempre es un método específico, porque la presencia de un gen amplificado que codifica las toxinas no siempre corresponde a la transcripción y traducción del producto por cianobacterias. Por esta razón, los datos de la qPCR deben complementarse con técnicas químicas y bioquímicas [18].



Dentro de los ensayos bioquímicos uno de los más empleados es el ELISA, por sus siglas en inglés *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. Este inmunoensayo se basa en la unión de un antígeno determinado (en este caso la cianobacteria o cianotoxina) a un anticuerpo marcado con una enzima, la cual tras la reacción con un substrato generará un producto detectable como un cambio de color o fluorescencia. La OMS propone esta técnica como un método efectivo para el control y detección tanto de cianobacterias como de cianotoxinas en aguas [14, 18]. A pesar de ser ensayos rápidos, requieren un cierto nivel de experiencia y no son útiles para análisis *in situ* [11].

Finalmente, existen diversos métodos químicos para determinar cianobacterias o cianotoxinas. Entre los más destacables están el HPLC (*high performance liquid chromatography*), el RMN (*nuclear magnetic resonance*), LC-MS/MS (*liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry*), el MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight*) o LC-TOF-MS (*liquid chromatography – time-of-flight mass spectrometry*) [18]. En general, todos estos métodos suponen una desventaja por su alto coste de inversión y la necesidad de personal altamente cualificado para el manejo de los equipos, así como la correcta interpretación de los datos [11].

### **1.3.2 MÉTODOS ALTERNATIVOS DE DETECCIÓN**

Como ya se ha expuesto, la detección de las cianobacterias en aguas es crucial, ya que su proliferación genera cianotoxinas, causantes de enfermedades e incluso la muerte. Por lo que implementar nuevas tecnologías para detectar estos microorganismos mediante nuevos sistemas de bajo coste, con alta selectividad y sensibilidad, de fácil manejo y miniaturizados, es un reto considerable. En este sentido, el uso de biosensores es una alternativa real para su detección, además de suponer un gran avance dentro del sector la calidad ambiental y alimentaria, dotando a estas industrias de mejoras en la seguridad y sistemas de monitoreo *on-line* [22].

Actualmente, en algunos sectores de la industria alimentaria, como el láctico, ya se emplean biosensores para el control microbiológico como una alternativa más rápida y eficaz que la siembra y recuento de colonias en la leche, en concreto para *Salmonella thyphimurium* [23].

## **1.4. BIOSENSORES**

Un biosensor es un dispositivo analítico que integra un elemento biológico de reconocimiento con un transductor físico-químico para generar una señal proporcional a la concentración del analito de interés [24, 25]. El elemento de bioreconocimiento, también denominado bioreceptor, responde específicamente al analito y el transductor convierte esta respuesta biológica en una señal detectable, de modo que aporta sensibilidad al sistema. Comparados con otros métodos analíticos, el uso de biosensores ofrece sistemas de detección rápidos y económicos, además de su facilidad de uso y portabilidad, gracias a sus tamaños reducidos. El uso de los biosensores abarca múltiples aplicaciones analíticas desde el diagnóstico médico, la seguridad alimentaria o el control de riesgos ambientales. En este sentido, son una alternativa posible para la detección de bacterias patógenas y/o componentes bacterianos. Por lo tanto, los biosensores también sirven como alternativa en la detección de cianobacterias y cianotoxinas [21].

Los biosensores se consideran un subgrupo de los sensores químicos, pero debido a su gran relevancia en los últimos años se han tratado como una categoría propia [26]. En general se clasifican en función de dos principios: el elemento de bioreconocimiento o el mecanismo de transducción.

### **1.4.1 CLASIFICACIÓN SEGÚN EL ELEMENTO DE BIORECONOCIMIENTO**

Multitud de elementos de bioreconocimiento son empleados en la fabricación de biosensores que son seleccionados en función del analito de interés. Los principales requisitos a la hora de escoger uno u otro son la alta capacidad de unión, la selectividad frente al analito problema y su estabilidad durante el proceso de detección [27]. Por ejemplo, las enzimas son uno de los más usados debido a su alta especificidad y sensibilidad, pero presentan importantes limitaciones debido a su elevado coste de producción y purificación, sumado a las posibles interferencias en matrices complejas [21].

A continuación, presentamos algunos de los más utilizados para la detección de bacterias, los llamados bioreceptores de afinidad.

#### **1.4.1.1 ANTICUERPOS**

Este tipo de biosensores son los más empleados y también son conocidos en la literatura como inmunosensores [28]. Los anticuerpos son glicoproteínas con una parte variable y otra parte no variable, correspondientes a la zona específica y la zona no

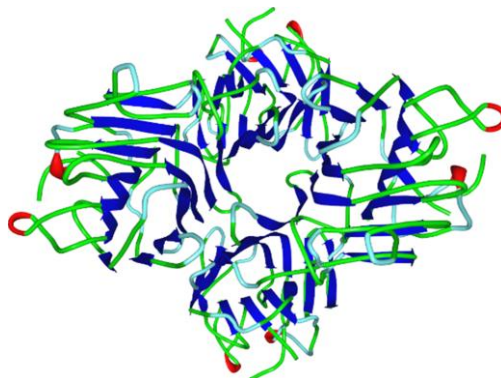
específica de interacción con el analito, respectivamente [23]. Se clasifican en dos tipos: monoclonales (solo se unirán a un epítipo, por lo cual serán muy selectivos) y policlonales (con posibilidad de unirse a más de un epítipo y, por lo tanto, serán menos selectivos) [28].

#### 1.4.1.2 APTÁMEROS

Los aptámeros son cadenas cortas de oligonucleótidos monocatenarios tanto de DNA como de RNA, con una longitud entre 30 a 100 pares de bases. Son sintetizados artificialmente y se caracterizan por tener una alta afinidad con el analito problema, además de ser más estables que los anticuerpos [21, 28]. Es destacable que se pliegan con una única conformación tridimensional otorgando así una alta selectividad por un único analito. Otras de sus ventajas son su bajo coste de producción y síntesis y su gran estabilidad a cambios de pH y/o temperatura [23, 21]. Los sensores modificados con aptámeros como elemento de bioreconocimiento se denominan, también, aptasensores.

#### 1.4.1.3 LECTINAS

Las proteínas de unión a carbohidratos o *carbohydrate binding proteins (CBPs)*, son las conocidas como lectinas [21]. Se trata de proteínas de unión (Figura 4) a los diferentes carbohidratos o glicoproteína y pueden ser producidos por diversos organismos. Reaccionan selectiva y reversiblemente con monosacáridos y oligosacáridos presentes en las membranas o paredes celulares. Aunque la interacción carbohidrato-proteína es mucho más débil que la interacción proteína-proteína como la de los anticuerpos, estas moléculas son más estables, más pequeñas y no se desnaturalizan tan fácilmente, manteniendo su actividad por más tiempo [29].



**Figura 4.** Estructura tridimensional de una molécula de concanavalina A, un tipo de lectina [21].

#### **1.4.1.4 BACTERIÓFAGOS**

Los bacteriófagos o fagos, son virus que infectan a las bacterias actuando como parásitos intracelulares obligados a usar la maquinaria biosintética del huésped. Por ello, otra característica destacable es que tienen la posibilidad de diferenciar entre microorganismos viables y no viables porque solo se multiplicarán en las células viables. Presentan ventajas adicionales sobre los anticuerpos en términos de estabilidad, estandarización y producción a bajo coste, además de ser más termoestables que los anticuerpos dando la posibilidad de funcionar incluso después de la exposición a altas temperaturas [21, 30].

#### **1.4.2 CLASIFICACIÓN EN FUNCIÓN DEL SISTEMA DE TRANSDUCCIÓN**

La clasificación de los biosensores se puede realizar en función de la tecnología en que se basa el transductor, la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) los divide en siete grupos diferentes [31]: ópticos, electroquímicos, *mass sensitive* (piezoeléctricos), eléctricos, térmicos o calorimétricos, magnéticos y de radiación.

En este trabajo nos centraremos en los biosensores de tipo electroquímicos ya que presentan numerosas ventajas como: bajo coste de producción, fácil manejo, portabilidad, alta sensibilidad, respuesta rápida y la posibilidad de trabajar con volúmenes de muestra muy reducidos.

##### **1.4.2.1 Sensores electroquímicos**

Estos sensores convierten el efecto de una interacción electroquímica, entre un analito y un electrodo, en una señal medible. Se clasifican dependiendo de la naturaleza del cambio electroquímico que se ocasiona en la superficie del electrodo, que será proporcional a la cantidad de analito en la muestra [32]. Según la naturaleza de la señal (corriente, potencial o impedancia) se distingue entre [21]:

Potenciométricos: el funcionamiento de estos transductores se basa en monitorear la diferencia de potencial eléctrico entre un electrodo indicador con un electrodo de referencia, separados por una membrana selectiva en la que apenas hay flujo de corriente. La diferencia de potencial entre ellos varía dependiendo de la actividad química o de la concentración de iones en la muestra de interés. El ejemplo más conocido es el electrodo de vidrio de pH [23].

Amperométricos: se basan en la medida del cambio de una corriente, resultante de la oxido-reducción de especies electroactivas, entre un electrodo de trabajo y el electrodo de referencia. Por lo general, se trabaja a un potencial constante, de manera que la corriente que se genera será directamente proporcional a la concentración del analito en la muestra [31].

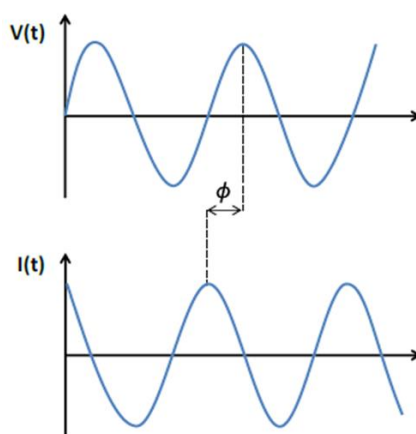
Impedimétricos: estos dispositivos permiten determinar las propiedades resistivas de un sistema al que se le aplica un potencial a un rango de frecuencias y monitoreando la respuesta correspondiente a la corriente [23, 33]. Los detalles de esta técnica se desarrollarán con mayor profundidad a continuación.

## 1.5. TRANSDUCTORES IMPEDIMÉTRICOS

### 1.5.1. ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA (EIS) Y SU INTERPRETACIÓN

La espectroscopía de impedancia electroquímica, EIS (*Electrochemical Impedance Spectroscopy*), es una técnica empleada en diversas aplicaciones como la caracterización de superficies o en los procesos de corrosión, pero también ha sido desarrollada en el ámbito de los biosensores, ya que permite obtener información sobre cambios en la interfase de la superficie de un electrodo concreto [21].

La impedancia ( $Z$ ) de un sistema, como el de una celda electroquímica, se determina aplicando una perturbación de voltaje (una onda sinusoidal y de pequeña amplitud) entre un electrodo de trabajo y un contraelectrodo, midiéndose la respuesta en forma de corriente alterna a diferentes frecuencias (Figura 5). Esta corriente depende de la frecuencia y se caracteriza por su amplitud y la fase.



**Figura 5.** Relación entre las variaciones de amplitud y fase entre potencial e intensidad aplicados.

Por tanto, la impedancia amplía el concepto de una resistencia pura a un sistema de corriente alterna, siendo el resultado del cociente entre el voltaje aplicado ( $V_t$ ) y la corriente resultante ( $I_t$ ) en función del tiempo [21]. Esta relación se muestra en la ecuación 1:

$$Z_t = \frac{V_t}{I_t} \quad (1)$$

Además, la impedancia es un valor complejo por lo que consta de una parte real y otra imaginaria, dando la posibilidad de ser representada gráficamente. Para ello, se representa la parte real en el eje de las abscisas ( $Z_{re}$  o  $Z'$ ) y la parte imaginaria en el eje de ordenadas ( $Z_{im}$  o  $Z''$ ), obteniendo el gráfico de Nyquist (Figura 6). Otra forma de representar la impedancia es mediante el diagrama de Bode, donde se representa el módulo de la impedancia ( $|Z|$ ) y la fase ( $\phi$ ) frente a la frecuencia.

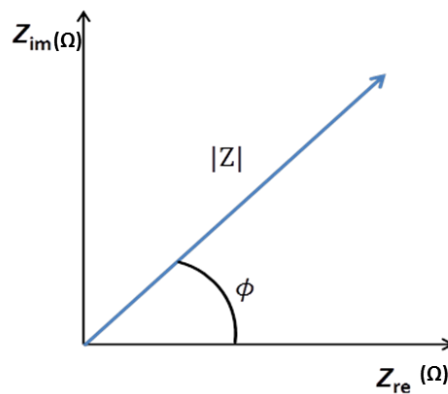


Figura 6. Gráfico de Nyquist [29].

Una de las partes más complicadas de la EIS es la correcta interpretación de la respuesta expresada en este tipo de espectros. Para un análisis eficaz, los fenómenos físicos o químicos del sistema se expresan mediante elementos eléctricos, representados en un circuito equivalente (*Equivalent Circuit*, EC) [34]. De manera general, el EC está formado por condensadores ( $C$ ) y resistencias ( $R$ ) combinados en serie y/o en paralelo en función de los fenómenos que ocurren en el sistema de estudio, siendo estos componentes el reflejo de las características fisicoquímicas del sistema planteado. A pesar de que no solo hay un único EC para cada espectro, deben ajustarse los parámetros a la realidad del modelo estudiado [29], por lo que se debe conocer con anterioridad algunas de las características del sistema y así elegir los componentes correctamente [21].

También, en algunos casos, hay elementos más complejos dentro de un EC como es el elemento de fase constante (*Constant Phase Element, CPE*). Este sirve para modelar el comportamiento de los capacitadores imperfectos, usualmente es la superficie de un electrodo sólido que se desvía de la idealidad a causa de las rugosidades presentes en la superficie. Una ventaja del uso de la impedancia como técnica analítica es que permite identificar, de manera muy sensible, los cambios que ocurren en la superficie de un electrodo. Por lo que, la integración de esta técnica junto con la tecnología de los biosensores en los últimos años ha derivado en el desarrollo de los biosensores impedimétricos, también aplicados al campo de la microbiología para la detección y cuantificación de bacterias [29].

Las medidas de impedancia con electrodos metálicos en una solución se pueden realizar en dos modos en la presencia o ausencia de una especie redox como mediador (por ejemplo, el  $\text{Fe}(\text{CN}_6)^{3-/4-}$ ). En el primer caso, la impedancia se denomina faradaica, mientras que en el segundo se conoce como no faradaica. En medidas no faradaicas la impedancia depende básicamente de la capacidad de interfase metal/solución y la impedancia de la propia solución [35]. En este trabajo, todas las medidas se han realizado en condiciones no faradaicas.

## **1.6. BIOSENSORES IMPEDIMÉTRICOS**

### **1.6.1 ELECTRODOS INTERDIGITADOS (*INTERDIGITATED ELECTRODE ARRAY, IDEA*)**

Un tipo de transductor que se usa como dispositivo para las medidas de impedancia en el estudio de las variaciones superficiales es la conocida matriz de electrodos interdigitados (*InterDigitated Electrode Array, IDEA*). Un IDEA está formado por electrodos coplanarios depositados sobre un substrato aislante [36], por lo que con este tipo de transductores es posible detectar tanto cambios en la superficie del electrodo, a través de la capacidad que se forma en la interfase, como modificaciones superficiales entre electrodos, mediante variaciones en la conductividad superficial [37].

Las actuales técnicas de fabricación basadas en la microelectrónica han posibilitado reducir el tamaño de estos dispositivos hasta haber conseguido la miniaturización de los electrodos, en la Figura 7 se puede observar la estructura de un sensor IDEA plano.

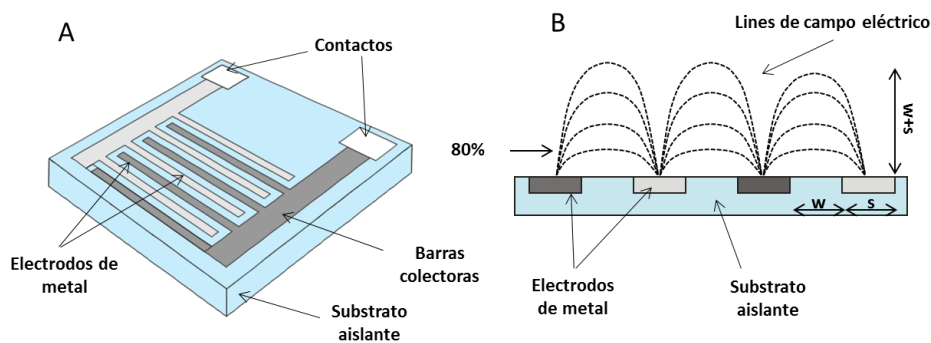


Figura 7. Matriz de un electrodo interdigitado plano, IDEA (A) y sección transversal de un sensor IDEA (B) [21].

La miniaturización de estos sensores, tanto del propio electrodo como del espacio entre los mismos, ha permitido aumentar la sensibilidad a los cambios superficiales ya que la penetración del campo eléctrico en la solución al aplicar un potencial en una medida impedimétrica es aproximadamente equivalente a la distancia entre los centros de dos dígitos (Figura 7). En diferentes estudios se ha demostrado que la mayoría del flujo de corriente, aproximadamente el 80%, pasa cerca de la superficie del electrodo [38], de modo que las reacciones que tienen lugar en esta superficie son fácilmente medibles ya que perturban el campo eléctrico.

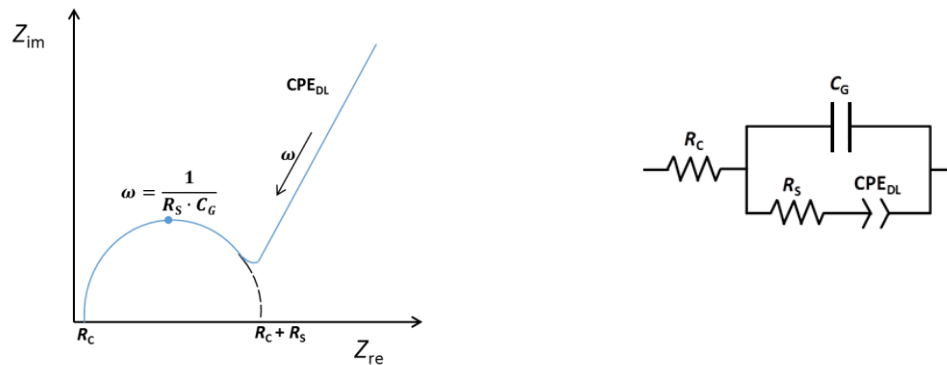
Los IDEA tienen otras ventajas como son: su alta sensibilidad, la rápida detección de analitos en aplicaciones reales, el bajo coste de producción, la posibilidad de integrar diferentes sensores en un solo chip y la detección directa de analitos (*label-free detection*), evitando el uso de marcadores [30]. Cabe destacar que, a diferencia de otro tipo de transductores, como los potenciométricos o amperométricos, en los IDEA no hay necesidad de incluir un electrodo de referencia, ya que los dígitos de los que se compone tienen la misma superficie y están fabricados con el mismo material; asumiéndose así que no hay diferencia de potencial electroquímico entre ambos. La mayor desventaja que presentan, igual que en otros sensores en los que se producen reacciones o cambios en la superficie, son las adsorciones inespecíficas, la reproducibilidad de la modificación superficial o la posibilidad de ser reutilizados [21].

### 1.6.2 CIRCUITOS EQUIVALENTES DE LOS IDEA EN MEDIDAS NO FARADAICAS

Los sensores IDEA están formados por electrodos simétricos, normalmente del mismo material y tamaño, de modo que la impedancia que se mide entre ellos es la suma individual de cada electrodo. En la Figura 8 se representa un gráfico de Nyquist en un



sistema no faradaico (como es el que se estudia en este trabajo) y el circuito equivalente que se puede utilizar para su correcta interpretación [35].

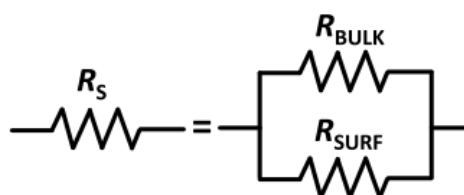


**Figura 8.** A la izquierda gráfico de Nyquist de un sensor IDEA y a la derecha el circuito equivalente (EC) de un sensor IDEA en procesos no faradaicos. Adaptado de [21].

Los elementos del circuito equivalente son:  $R_c$ , la resistencia de contacto introducida por los cables y conectores,  $R_s$  resistencia entre dos electrodos de la matriz,  $C_G$  correspondiente a la capacidad geométrica entre dos electrodos interdigitados en una solución acuosa y  $CPE_{DL}$ , el elemento de fase constante que está asociado a la capacitancia de doble capa eléctrica en la interfaz del electrodo.

Cuando el analito de interés, como por ejemplo una bacteria, interacciona con la superficie del electrodo este sufre una variación en la impedancia superficial, de modo que algunos elementos eléctricos como la  $R_s$  y el  $CPE_{DL}$  se verán afectados [21].

Es importante destacar que, en trabajos previos de, A. Bratov y colaboradores [40], demostraron que la  $R_s$  en los sensores IDEA consta de dos resistencias en paralelo (Figura 9):  $R_{BULK}$ , equivale a la resistencia de la disolución, y  $R_{SURF}$ , corresponde a la resistencia superficial del electrodo si esta contiene cargas. De este modo, a nivel experimental si se mantiene constante la  $R_{BULK}$ , es posible atribuir los cambios en  $R_s$  exclusivamente a las variaciones en  $R_{SURF}$ .



**Figura 9.** Esquematación de las resistencias  $R_{BULK}$  y  $R_{SURF}$ , que componen a  $R_s$  [21].

### 1.6.3 ELECTRODOS INTERDIGITADOS TRIDIMENSIONALES (THREE-DIMENSIONAL INTERDIGITATED ELECTRODE ARRAY, 3D-IDEA)

Como se había comentado anteriormente, aproximadamente el 80% del campo eléctrico generado entre los electrodos pasa cerca de la superficie con un espesor igual a la separación entre los centros de dos dígitos adyacentes [40]. Por lo que se deduce que si se reduce la anchura de los dígitos de los electrodos y el espacio entre ellos se podrá aumentar la sensibilidad. No obstante, en el proceso de fabricación de los sensores IDEA a escala nanométrica, la exposición a la contaminación es muy elevada fuera de ambientes de sala blanca y, por tanto, se producen problemas de cortocircuitos entre los electrodos adyacentes, reduciendo su la reproducibilidad y estabilidad [21].

Como alternativa, en estudios liderados por A. Bratov y colaboradores [40, 41] del grupo BioMEMS (IBM-CNM, CSIC) propusieron separar los electrodos con barreras de  $\text{SiO}_2$  para conseguir reducir el efecto de las contaminaciones. Además, mediante estas barreras se consiguió aumentar la sensibilidad, hasta en un orden de magnitud respecto a los IDEA planos. Esto se debe a que, con electrodos de simetrías equivalentes, la penetración del campo eléctrico en la solución de medida es la misma que en IDEA planos, pero el recorrido del campo eléctrico es más largo, aumentando la sensibilidad a nivel de cambios en la conductividad superficial. Este diseño se denominó matriz de electrodos interdigitados tridimensional (*Three-Dimensional InterDigitated Electrode Array, 3D-IDEA*), mostrado en la Figura 10.

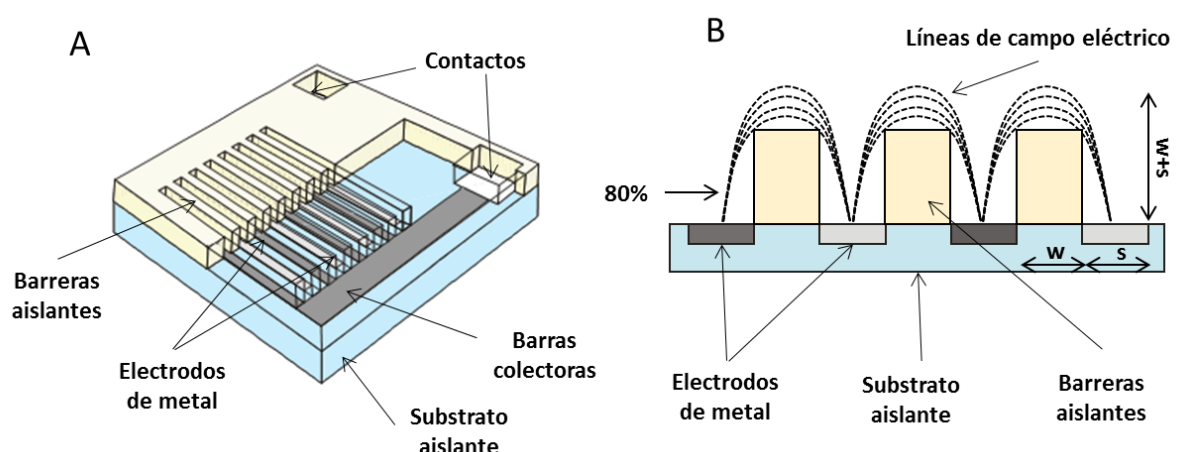


Figura 10. Matriz de un electrodo interdigitado tridimensional, 3D-IDEA (A) y sección transversal de un 3D-IDEA (B) [21].

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GENERAL**

El objetivo principal de este proyecto es desarrollar un biosensor, mediante el uso de transductores impedimétricos del tipo IDEA, para la detección de cianobacterias en muestras líquidas para su posible aplicación en sistemas acuapónicos.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Funcionalizar la superficie de los sensores impedimétricos del tipo IDEA mediante diferentes estrategias para favorecer la inmovilización y detección de cianobacterias. Para ello, se emplea el método del *layer-by-layer*, previamente utilizado en el grupo para otras finalidades. Como elemento de bioreconocimiento para detectar selectivamente las cianobacterias se emplea la concanvalina A, un tipo de lectina.
- 2) Desarrollar y optimizar una metodología de trabajo para efectuar los ensayos de detección de cianobacterias, con sensores impedimétricos IDEA, a partir de muestras de laboratorio con cianobacterias.
- 3) Realizar ensayos de detección de cianobacterias en paralelo con sensores IDEA planos y 3D-IDEA funcionalizados. De este modo, se pretende comparar los resultados con cada uno y seleccionar el que aporte mayor selectividad.
- 4) Determinar el límite y el tiempo de detección mediante el biosensor desarrollado para la detección de cianobacterias.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 DISEÑO Y FABRICACIÓN DE LOS IDEA**

Los sensores IDEA y 3D-IDEA empleados fueron fabricados en las instalaciones de sala blanca del Centro Nacional de Microelectrónica de Barcelona (IMB-CNM, CSIC) sobre obleas de silicio (de 4 pulgadas de diámetro) utilizando técnicas convencionales de microfabricación y procesos de litografía. Todo el proceso aparece esquematizado en la Figura 11.

El primer paso de fabricación es la formación de una capa aislante en una oblea de silicio mediante un proceso de oxidación húmeda a 950°C para formar una capa de dióxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ) de 2,5  $\mu\text{m}$  de espesor, aislando el silicio de la siguiente deposición de metales. El segundo paso es la deposición mediante pulverización magnética de una capa de 230 nm de siliciuro de tántalo ( $\text{TaSi}_2$ ), un material altamente conductor utilizado para formar los electrodos.

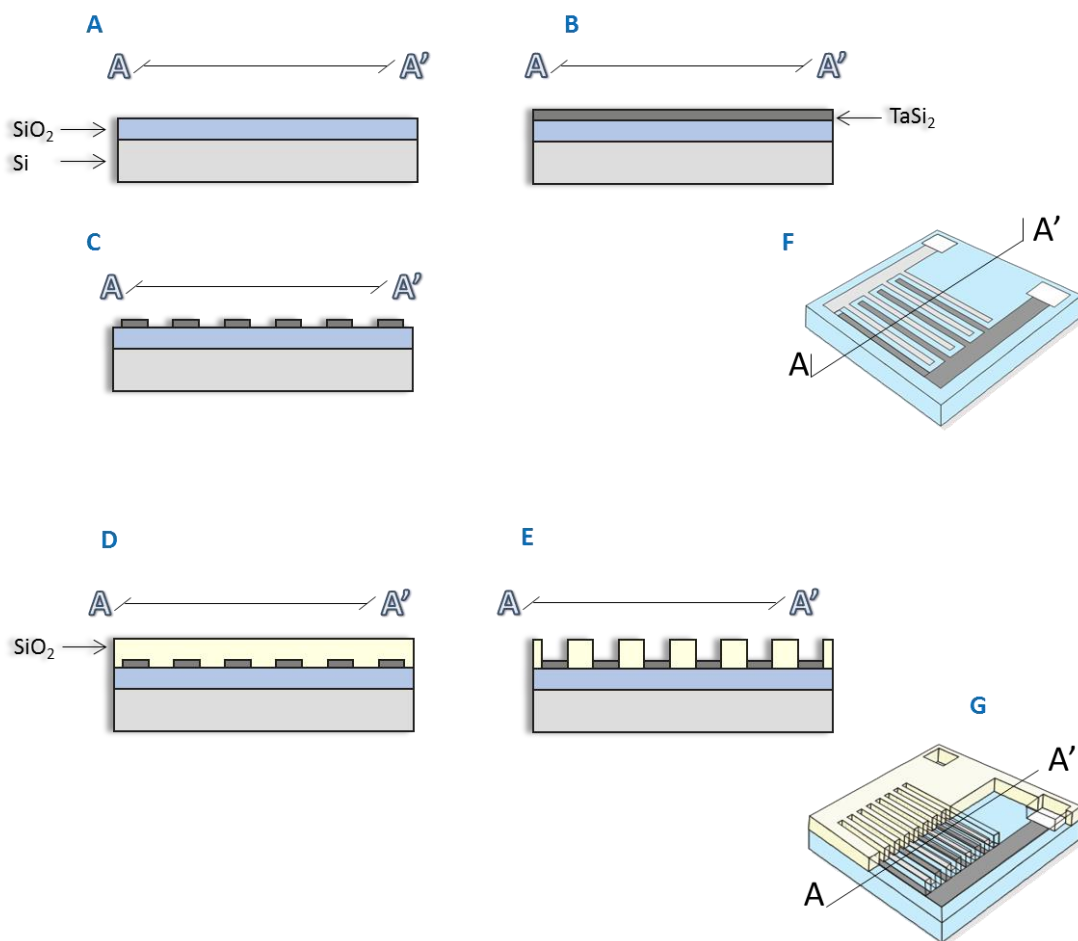
A continuación, mediante litografía convencional se modelan las barras colectoras y los dígitos de los dos electrodos coplanarios, donde tanto la geometría como las dimensiones de los electrodos se definen a través de una máscara. Como resultado se obtienen 216 dígitos de 3  $\mu\text{m}$  de ancho y 3  $\mu\text{m}$  de separación entre cada electrodo, la longitud de los dígitos es de 1,5 mm siendo la longitud total entre los electrodos de 301 mm, de esta manera se obtiene la matriz o *array* de electrodos interdigitados (IDEA). Finalmente, para conectar las barras colectoras se deposita de 1  $\mu\text{m}$  de aluminio utilizando pasos fotolitográficos y de grabado, formando los puntos de contacto.

En este punto hay algunas diferencias en la fabricación de los sensores planos IDEA y 3D-IDEA. En el caso de la IDEA planos, el paso final es cubrir la oblea con una capa fina de dióxido de silicio por LPCVD (*low pressure chemical vapor deposition*) de 700 nm de espesor donde se hacen aperturas en el área de los dígitos de los electrodos y los contactos.

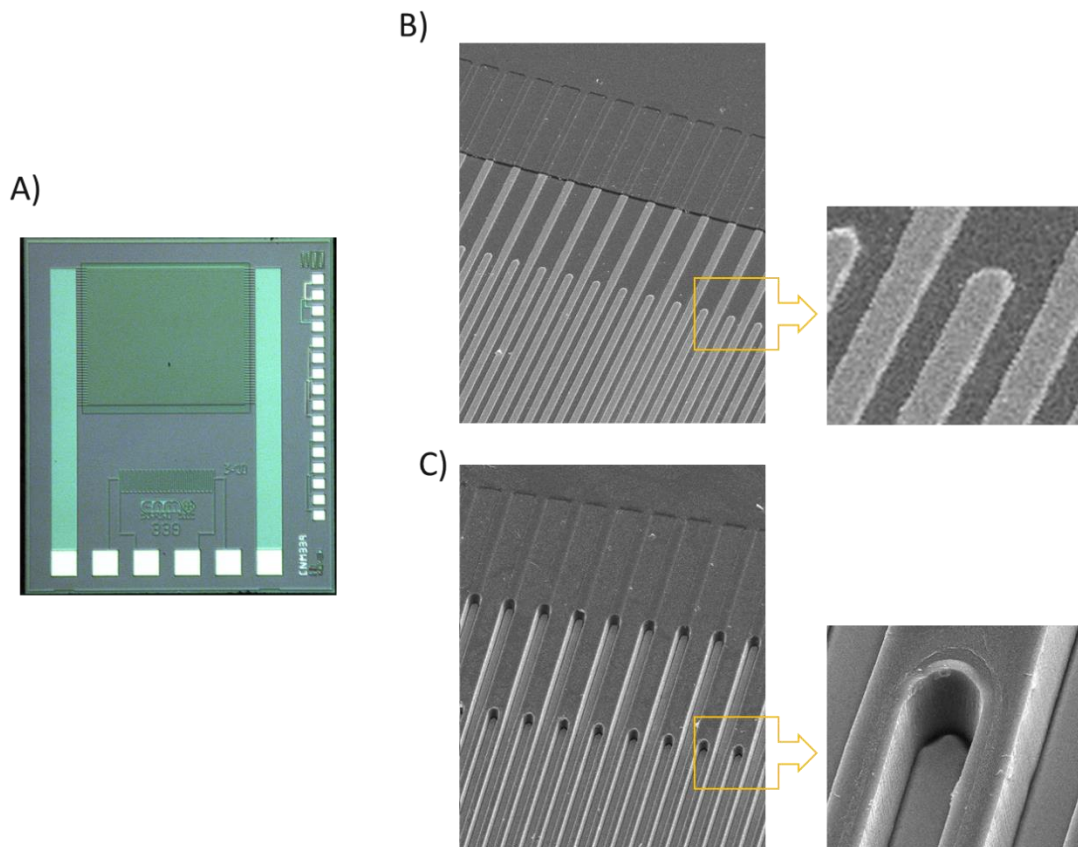
En los 3D-IDEA se requiere un paso adicional para la formación de la barrera, donde la oblea con los electrodos interdigitados se recubre con una capa de dióxido de silicio 4  $\mu\text{m}$  mediante LPVCD, que definirá la altura de las barreras. Esta medida de espesor fue determinada en trabajos previos de A. Bratov y colaboradores, donde estudiaron diferentes tamaños de barrera [42]. Por último, mediante grabado con DRIE (*deep reactive ion etching*) se abren las zonas donde están los dígitos de los electrodos formándose las barreras de 4  $\mu\text{m}$

de altura con paredes casi verticales que separan los dígitos de los electrodos. La distancia entre las barreras es de  $3\ \mu\text{m}$  y la anchura de la barrera es también de  $3\ \mu\text{m}$ .

Finalmente, se corta la oblea y los sensores individuales se acoplan a un sustrato PCB (*printed circuit board*) que permitirá realizar las conexiones con el analizador de impedancias, uniéndose mediante un cable a las conexiones eléctricas. Los contactos y los cables se encapsularon utilizando resina epoxi. En la Figura 12 podemos observar imágenes de microscopía de barrido (*Scanning Electron Microscopy, SEM*) de los IDEA planos y de los 3D-IDEA.



**Figura 11.** Formación de la capa aislante de  $\text{SiO}_2$  (A), deposición de la capa de  $\text{TaSi}_2$  (B), apertura de los electrodos del sensor IDEA (C), recubrimiento de  $\text{SiO}_2$  por LPVCD (D) y apertura de los electrodos del sensor 3D-IDEA (E). Esquema final del sensor IDEA (F) y del 3D-IDEA (G) [21].



**Figura 12.** Imagen obtenida mediante microscopía óptica de la superficie de un sensor IDEA (A), imagen SEM de un sensor IDEA (B) e imagen SEM de un sensor 3D-IDEA con 4  $\mu\text{m}$  de barrera (C) [21].

### 3.2 PRODUCTOS QUÍMICOS Y SOLUCIONES

La polietilenimina (PEI, ramificado y con un peso molecular de 25000) y el poli (-sodio-4-estireno sulfonato) (PSS, con peso molecular de 70000), fueron preparadas en agua desionizada a una concentración de 1,5 mg/mL y 2,0 mg/mL, respectivamente. Dichas concentraciones fueron seleccionadas gracias a estudios previos de Y. Lvov y colaboradores [43]. La solución de la concanavalina A (Con A, de *Canavalia ensiformis*) a 1000, 100, 50, 25 y 10  $\mu\text{g/mL}$  fue preparada en 0.05 M de TRIS-HCl a un pH de 7,4. Esta concentración fue estudiada previamente tras realizar diversos ensayos con distintas concentraciones de concanavalina A que se explicarán a continuación en el presente trabajo. Por último, la solución de KCl fue preparada a partir de un stock de KCl  $10^{-1}$  M diluida con agua desionizada hasta llegar a la concentración de KCl  $10^{-5}$  M.

Todos los productos que se emplearon fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, España.

### **3.3 MODIFICACIONES DE LA SUPERFICIE DE LOS IDEA MEDIANTE EL MÉTODO LAYER-BY-LAYER**

Para la funcionalización de los sensores impedimétricos IDEA y 3D-IDEA se empleó el método *layer-by-layer* (LBL) o capa por capa. Esta técnica se basa en la deposición alternada de capas finas con carga opuesta en una superficie. Para ello, se sumerge una determinada superficie, por ejemplo, la de un electrodo, en soluciones con diferentes compuestos de carga opuesta, y se alterna con lavados en agua desionizada entre cada etapa. En este trabajo se empleó este método, tanto para la funcionalización de la superficie con diferentes polielectrolitos (PEI y PSS), como para la inmovilización de la lectina concanavalina A como elemento de bioreconocimiento.

#### **3.3.1 MODIFICACIÓN CON POLIELECTROLITOS (PEI-PSS-PEI)**

Los sensores se modificaron inicialmente en una solución con PEI, cargado positivamente, durante 20 minutos para formar la primera capa homogénea en el SiO<sub>2</sub>. A continuación, se sumergieron los electrodos en la solución de PSS durante 20 minutos, que al presentar cargas negativas, este interacciona con el PEI formando una segunda capa. Como etapa final, se volvió a sumergir el sensor en la solución de PEI durante 20 minutos más. Tras las modificaciones los electrodos se lavaron agua desionizada y se secaron con nitrógeno gas.

#### **3.3.2 MODIFICACIÓN CON CONCAVALINA A (PEI-CON A)**

Para la preparación de la modificación con la lectina concanavalina A, primero se preparó la superficie del sensor modificándola con una capa de PEI (de igual manera que la descrita anteriormente). Posteriormente se inmovilizó la Con A sobre la superficie del sensor tras sumergir el electrodo durante 60 minutos con diferentes concentraciones de Con A (1000, 100, 50, 25 y 10 µg/mL). Entre cada modificación, y al final de las mismas, los electrodos eran lavados con agua desionizada y secados en nitrógeno.

### **3.4 PREPARACIÓN DEL CULTIVO**

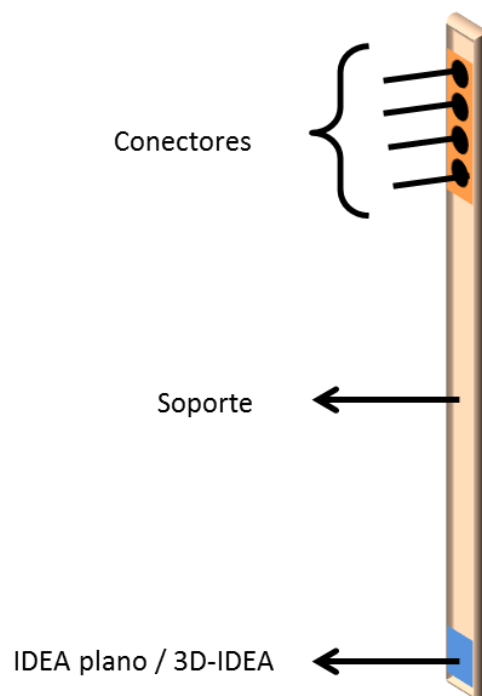
En este trabajo se empleó la cepa *Synechocystis sp.* PCC 6803 como cianobacteria modelo para los ensayos de detección. *Synechocystis* se hizo crecer en medio líquido BG-11 (*blue green medium*) junto con un medio mix A5 con trazas de metales. Ambos medios se compraron en *Sigma-Aldrich*. Al tratarse de bacterias fotosintéticas se alternaban ciclos de luz (12 horas a 6082 lx) y oscuridad (12 horas) manteniéndose a una temperatura de 18 °C.

Para recuperar las células se centrifugaba 1mL de cultivo a 4 °C y 8000 rpm durante 5 minutos en tubos eppendorff de 1,5 mL. Se eliminaba el sobrenadante, en este caso el medio de cultivo de las bacterias, y se añadía 1mL de KCl 10<sup>-5</sup> M estéril, resuspendiendo el contenido con ayuda de una pipeta y un vórtex. El proceso se repetía hasta tres veces para eliminar los restos del medio de cultivo, y mantener las bacterias en una solución estéril de KCl 10<sup>-5</sup> M donde se realizarían las medidas de impedancia.

A continuación, se preparan los cultivos con las diferentes concentraciones de cianobacteria desde 10<sup>1</sup> hasta 10<sup>4</sup> cel/mL.

### 3.5 METODOLOGÍAS DE TRABAJO PARA LA DETECCIÓN DE *SYNECHOCYSTIS*

Siguiendo la línea de trabajo del equipo de BioMEMS donde ya se habían realizado ensayos y publicaciones empleando los sensores IDEA (Figura 13) para la detección de bacterias como *Escherichia coli* [35], se intentó optimizar el método de trabajo a uno más simple y rápido. De manera que se realizaron 3 tipos de ensayo diferentes con los IDEA planos funcionalizados con PEI-PSS-PEI y a distintas concentraciones de *Synechocystis*.

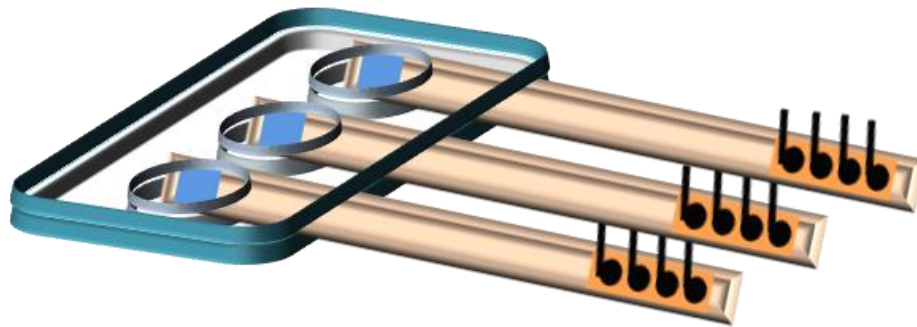


**Figura 13.** Estructura simplificada de un soporte del sensor IDEA, los conectores y el sensor interdigitado.

La primera metodología se basó en un sistema diseñado para la precipitación de *Synechocystis* sobre el electrodo y así poder medir los cambios de impedancia que se produjeran a nivel superficial a medida que se depositaban las bacterias en la superficie.

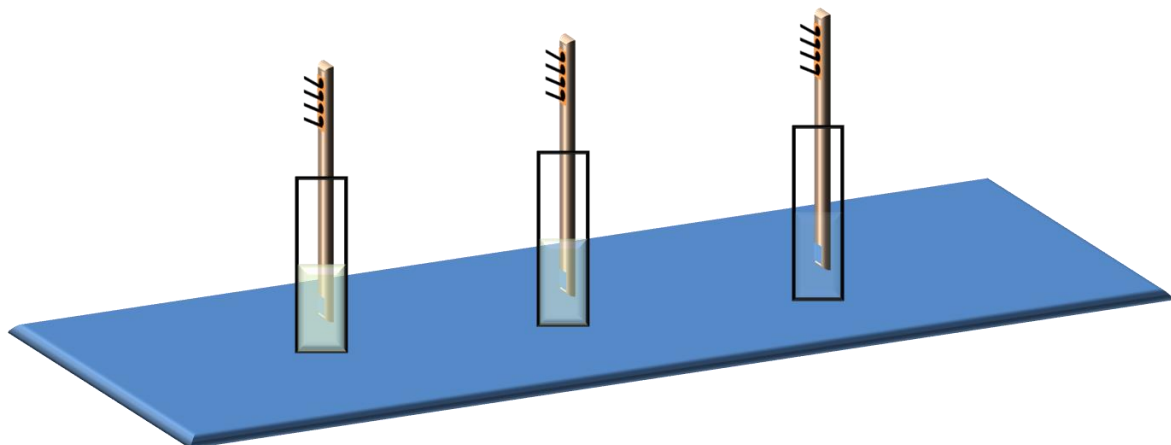


Para ello se utilizó un soporte (*holder*) especialmente diseñado para introducir el IDEA en unos pocillos con una capacidad de 200  $\mu\text{L}$  de la muestra con *Synechocystis* a distintas concentraciones (desde  $10^1$  hasta  $10^4$  cel/mL). Los pocillos donde se depositaba la muestra estaban cerrados herméticamente y tapados evitando cualquier posible contaminación exterior que alterase la detección de *Synechocystis*. El diseño del *holder* con los electrodos aparece representado en la Figura 14.



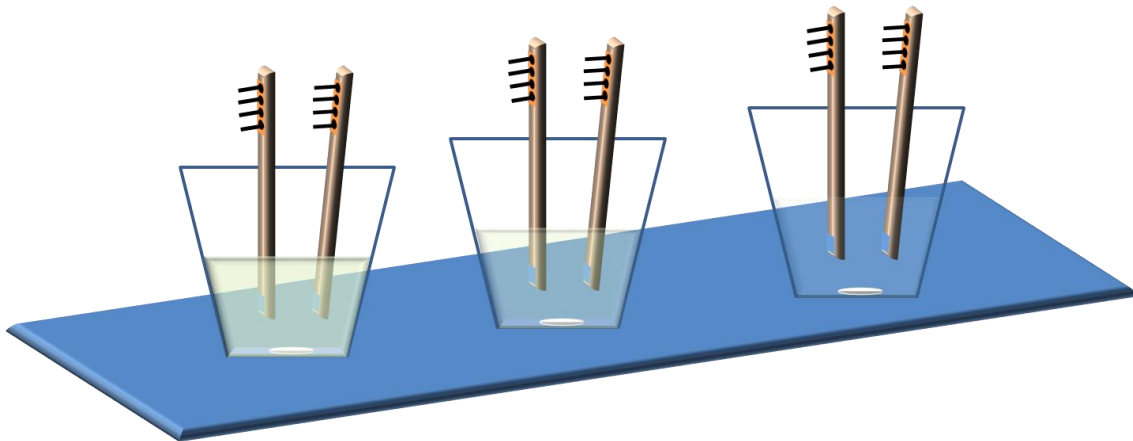
**Figura 14.** *Holder* con los sensores IDEA modificados con PEI-PSS-PEI en pocillos de 200  $\mu\text{L}$  de volumen con diferentes concentraciones de *Synechocystis*.

La segunda metodología desarrollada empleaba volúmenes más grandes que la anterior, donde los IDEA con PEI-PSS-PEI se sumergían en 1 mL de muestra en viales con capacidad de 2 mL. Se prepararon tantos viales como distintas concentraciones de *Synechocystis* (desde  $10^1$  hasta  $10^4$  cel/mL) y se mantuvieron en agitación constante. Para realizar las medidas de impedancia se paraba la agitación, con el fin de evitar interferencias. Los viales permanecían en todo momento cerrados para que no hubiera posibilidad de contaminación y alteración de las muestras. En la Figura 15 se representa esquemáticamente los viales con los IDEA en un multiagitador.



**Figura 15.** Sensores IDEA modificados con PEI-PSS-PEI en viales de 2 mL de volumen, con diferentes concentraciones de *Synechocystis*, sobre un multiagitador.

Por último, se realizaron pruebas con la misma metodología utilizada previamente por el grupo de trabajo, como se ha mencionado anteriormente. En este caso, se introducían dos electrodos en una celda de vidrio con agitación constante, donde se incluía 1 mL de *Synechocystis* a la concentración (cel/mL) deseada en 50 mL de KCl  $10^{-5}$  M (Figura 16). Las celdas estaban tapadas para evitar cualquier tipo de contaminación. Para realizar las medidas de impedancia los electrodos se sacaban de la celda y se sumergían en una solución de KCl  $10^{-5}$  M para poder controlar la conductividad del medio.



**Figura 16.** Sensores IDEA modificados con PEI-PSS-PEI en celdas de vidrio, con diferentes concentraciones de *Synechocystis*, sobre un multiagitador.

En los 3 tipos de ensayo, las medidas de impedancia se realizaron a diferentes tiempos: 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 90, 120 y 180 minutos.

### **3.6 MEDIDAS DE IMPEDANCIA**

Para medir la impedancia se empleó un analizador LCR QuadTech 7600 Plus de alta precisión, aplicando un potencial de 100 mV de amplitud y fijando un rango de frecuencia entre  $10^2$  Hz y  $10^6$  Hz. Las medidas se realizaron en modo no faradaico sin un potencial de corriente continua.

Todas las mediciones de impedancia se realizaron a temperatura ambiente ( $25 \pm 0,5$  °C) y en una solución de KCl  $10^{-5}$  M con una conductividad de la solución de  $2,5 \mu\text{S}/\text{cm}$  controlada mediante un conductímetro comercial (EC-Meter GLP 31+, Crison).

Respecto al tratamiento de los espectros de impedancia y el ajuste mediante un circuito equivalente, se utilizó el software Z-Plot / Z-View (Scribner Associates, Southern Pines, NC, EE. UU.). Todos los experimentos se realizaron con al menos dos sensores en las mismas condiciones.

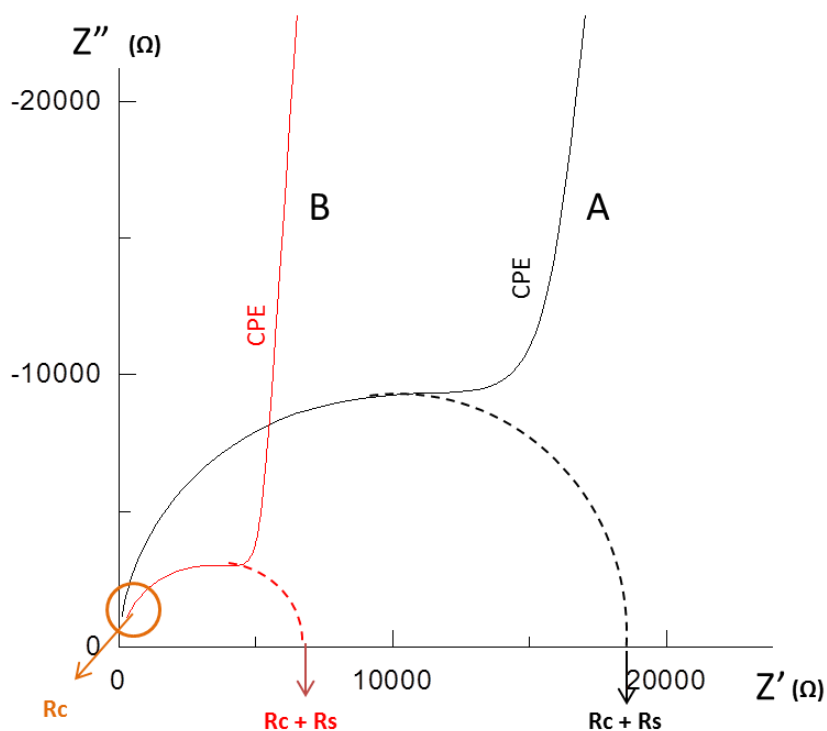
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. CARACTERIZACIÓN Y FUNCIONALIZACIÓN DE LOS SENSORES IDEA

En soluciones con elevada concentración de electrolitos, las medidas de la respuesta impedimétrica de los IDEA depende básicamente de la conductividad de la solución. Pero en soluciones de baja conductividad estos sensores, en especial los 3D-IDEA, la resistencia superficial juega un papel crucial. La  $R_S$  obtenida en el espectro de impedancia, tal y como hemos visto previamente, está formada por la combinación en paralelo de  $R_{BULK}$  (resistencia a la solución o *bulk*) y la  $R_{SURF}$  (resistencia superficial). De manera que si fijamos  $R_{BULK}$ , usando una solución de conductividad fija, los cambios que se produzcan en  $R_S$  se podrán atribuir a la  $R_{SURF}$ . Por este motivo, todos los experimentos que se realizaron fueron en soluciones de KCl  $10^{-5}$  M a una conductividad controlada de  $2,5 \mu\text{S/cm}$ .

En la Figura 17 se observa el gráfico de Nyquist correspondiente a un espectro de impedancia de un sensor IDEA plano sin modificar y la respuesta del mismo después de modificarlo con PEI. En ambos casos aparece un semicírculo a altas frecuencias que corresponde a la  $R_S$  en paralelo con la  $C_G$ . La intersección con el eje X a altas frecuencias (parte izquierda del gráfico) es el valor de la  $R_C$ , mientras que la intersección en ese mismo eje, pero en la parte derecha corresponde a la  $R_C+R_S$  (donde  $R_S$  es la combinación de  $R_{BULK}$  y  $R_{SURF}$ , como hemos mencionado anteriormente). La parte lineal a bajas frecuencias se debe al CPE que representa la capacidad de interfase. Por lo tanto, debido a las distintas modificaciones de la superficie, los dos parámetros que se verán más afectados serán la  $R_S$  y la  $CPE_{DL}$ .

No obstante, en este trabajo nos centraremos solo los cambios en la impedancia a nivel superficial mediante las variaciones en  $R_S$ , ya que presentan una mayor reproducibilidad.



**Figura 17.** Gráfico de Nyquist (A) del IDEA plano sin modificar en una solución de KCl  $10^{-5}$  M y (B) es el espectro de impedancia tras la modificación del IDEA plano con PEI en una solución de KCl  $10^{-5}$  M.

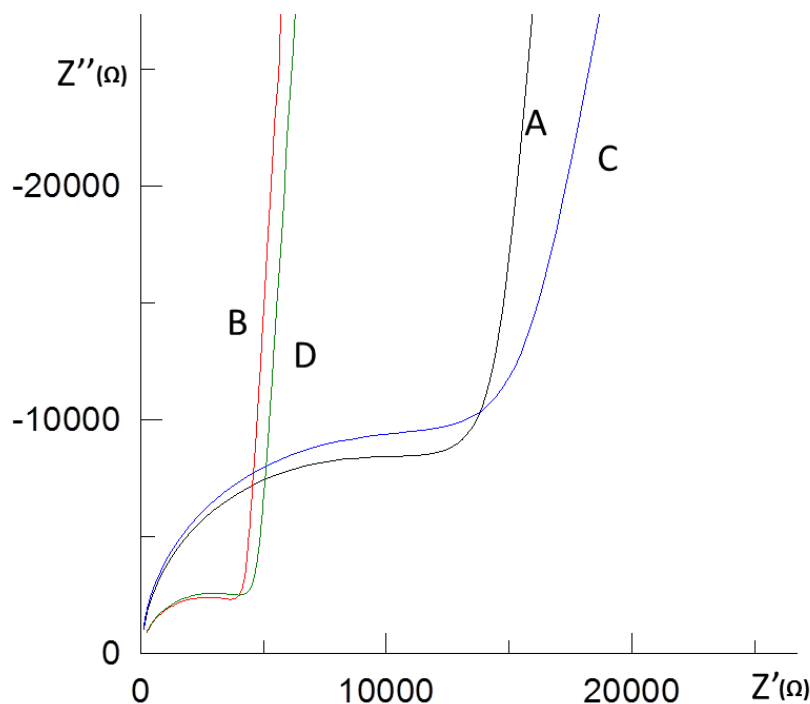
Para llevar a cabo los posteriores ensayos de detección de *Synechocystis* con sensores IDEA, se modificaron mediante 2 estrategias a partir del método *layer-by-layer*: PEI-PSS-PEI y PEI-Con A.

#### 4.1.1. FUNCIONALIZACIÓN DE IDEA PLANOS CON PEI-PSS-PEI

En primer lugar la superficie de los IDEA planos se modificaron con diferentes capas de polielectrolitos. Como primer paso se inmovilizó el PEI que actúa como una capa de anclaje para el posterior ensamblado de las siguientes capas [44]. Todos estos cambios se pueden observar en la Figura 18.

El PEI es un polication, por lo que tiene carga positiva, y es capaz de interactuar de manera estable con la superficie de óxido de silicio del sensor gracias a los grupos hidroxilos presentes [45]. Para demostrar la adsorción del PEI a la superficie se realizaron las medidas de impedancia en KCl  $10^{-5}$  M, observando que  $R_s$  sufre una disminución debido a un aumento en la conductividad superficial. Una vez funcionalizada la superficie con el PEI se depositó el PSS (un polianión), cuyas cargas negativas interactúan directamente con las positivas del PEI. Debido a la compensación de las cargas, se produce un aumento de la  $R_s$  que se observa en el espectro de impedancia, siendo espectros similares a los del electrodo

sin modificar. Por último, se vuelve a modificar la superficie del electrodo con PEI con la consecuente disminución de  $R_s$ .



**Figura 18.** Gráfico de Nyquist de un IDEA plano, (A) previo a la modificación, (B) modificado con PEI, (C) modificado con PEI+PSS y (D) modificado con PEI+PSS+PEI.

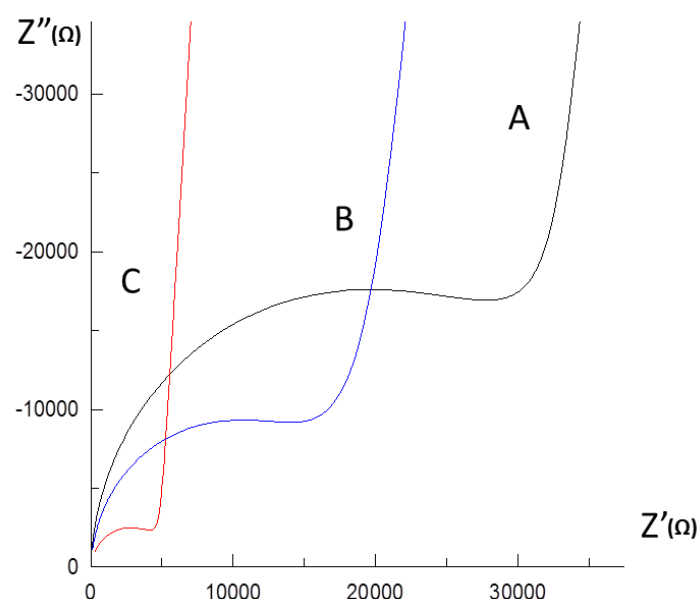
La funcionalización de los sensores IDEA planos con PEI-PSS+PEI se había desarrollado previamente en el grupo para la detección de otro tipo de bacterias, en concreto *E. coli*. Pero en este trabajo se ha investigado la posibilidad de emplear la misma estrategia para detectar cianobacterias mediante la interacción de la superficie, cargada positivamente por la capa del PEI, con la membrana celular de las bacterias, cargada negativamente de forma parcial.

#### **4.1.2. FUNCIONALIZACIÓN DE IDEA PLANOS CON PEI-CON A**

En segundo lugar, el mismo tipo de sensor IDEA plano fue modificado con PEI y Con A. En este caso, el uso de la Con A es de especial interés ya que está descrito que reacciona de manera selectiva con las endotoxinas presentes en la membrana de las bacterias Gram negativas [27, 43], como es el caso de las cianobacterias [46].

El PEI, se empleó de nuevo como capa de anclaje para la Con A, la cual a un pH de 7,4 se comporta como un polianión otorgando la posibilidad de interactuar con las cargas positivas del PEI. Se aprecia en la Figura 19 la variación que sufre la  $R_s$  cuando los IDEA son modificados con el PEI, donde la  $R_s$  disminuye, y cuando son funcionalizados con Con A hay

una compensación de las cargas positivas y la  $R_s$  sufre un aumento. De igual manera que en las modificaciones con PEI-PSS-PEI todas las medidas se realizaron en KCl  $10^{-5}$  M y con una conductividad controlada de  $2,5 \mu\text{S}/\text{cm}$ .



**Figura 19.** Gráfico de Nyquist de una modificación de un IDEA plano, (A) previo a la modificación, (B) modificado con PEI y (C) modificado con PEI-Con A.

Otro de los puntos importantes en esta modificación es el tiempo y la concentración de Con A que se deben usar para que esta sea efectiva. Tras diversos ensayos (se explican más adelante) variando las concentraciones de Con A y el tiempo de modificación del sensor, se estableció que a 60 minutos y a  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  de concentración la modificación estaba optimizada.

#### **4.2. OPTIMIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE TRABAJO**

Previamente a la realización de los ensayos de detección de cianobacterias con los electrodos funcionalizados, se compararon tres metodologías diferentes de trabajo. Para ello se seleccionó un tipo de sensor impedimétrico, los IDEA planos, y una única modificación, con PEI-PSS-PEI. En la Figura 20, se comparan las respuestas en  $R_s$  para cada una de las metodologías.

El primer ensayo se realizó con el *holder* de cuatro pocillos, donde se introducían los soportes de los sensores IDEA modificados con PEI-PSS-PEI. En cada uno se depositaron  $200 \mu\text{L}$  de muestra de *Synechocystis* a las distintas concentraciones ( $10^1$  y  $10^4$  cel/mL). Para tener una referencia y poder comparar los resultados, se realizaron controles con electrodos

modificados donde había KCl  $10^{-5}$  M sin bacterias. En los resultados, mostrados en la Figura 19, se observa que los cambios en  $R_S$  son prácticamente imperceptibles en todas las concentraciones, a pesar que a nivel visual se observó que las cianobacterias iban precipitando progresivamente.

En el siguiente ensayo se eligieron volúmenes de 1mL de muestra en viales de 2mL y en agitación constante, empleándose concentraciones desde  $10^1$  a  $10^4$  cel/mL de *Synechocystis sp.* También, en este caso, las diferencias de las  $R_S$  resultaron ser poco significativas.

Por ende, se descartaron ambas metodologías ya que prácticamente no se observó ningún cambio significativo ni reproducible en la respuesta impedimétrica ( $R_S$ ) para realizar la detección de cianobacterias. Una posible explicación es que en las dos metodologías, tanto la incubación como la medida, se realizaban en la misma solución, de modo que era imposible controlar la conductividad de esta. Cabe recordar que, el  $R_S$  depende del  $R_{SURF}$  y  $R_{BULK}$ , de modo que si el  $R_{BULK}$  se encuentra con a una alta conductividad de la solución, es muy difícil distinguir los cambios en  $R_{SURF}$ . Por lo que en estos casos la  $R_S$  podía estar condicionada a  $R_{BULK}$ .

Finalmente, el método óptimo que permitió estudiar los cambios de impedancia derivados de la detección de las bacterias era mediante la tercera metodología. En ella se utilizaron las celdas de vidrio con volúmenes de 50 mL de KCl  $10^{-5}$  M y con concentraciones variables de *Synechocystis* entre  $10^1$  y  $10^4$  cel/mL, donde también se realizaron los blancos sin ésta bacteria. En este caso, tal y como observamos en la misma Figura 19 hay cambios de  $R_S$  a mayor concentración de *Synechocystis*.

En este caso, después de la inmovilización de las cianobacterias en el IDEA con PEI-PSS-PEI en la celda, los electrodos se pasaron por una solución de KCl con una conductividad controlada de  $2,5 \mu\text{S/cm}$ . De este modo los cambios que podemos ver en el  $R_S$ , sí que se pueden atribuir a los cambios de  $R_{SURF}$  y no al efecto de la solución,  $R_{BULK}$ . También, se pudieron apreciar cambios entre las concentraciones a lo largo del tiempo, incluso en la de muestra de menor concentración y el control, como se explicará más adelante en el trabajo.

Como ya se ha mencionado anteriormente, esta metodología fue implementada anteriormente para detectar *Escherichia coli* en uno de los trabajos del grupo [35].

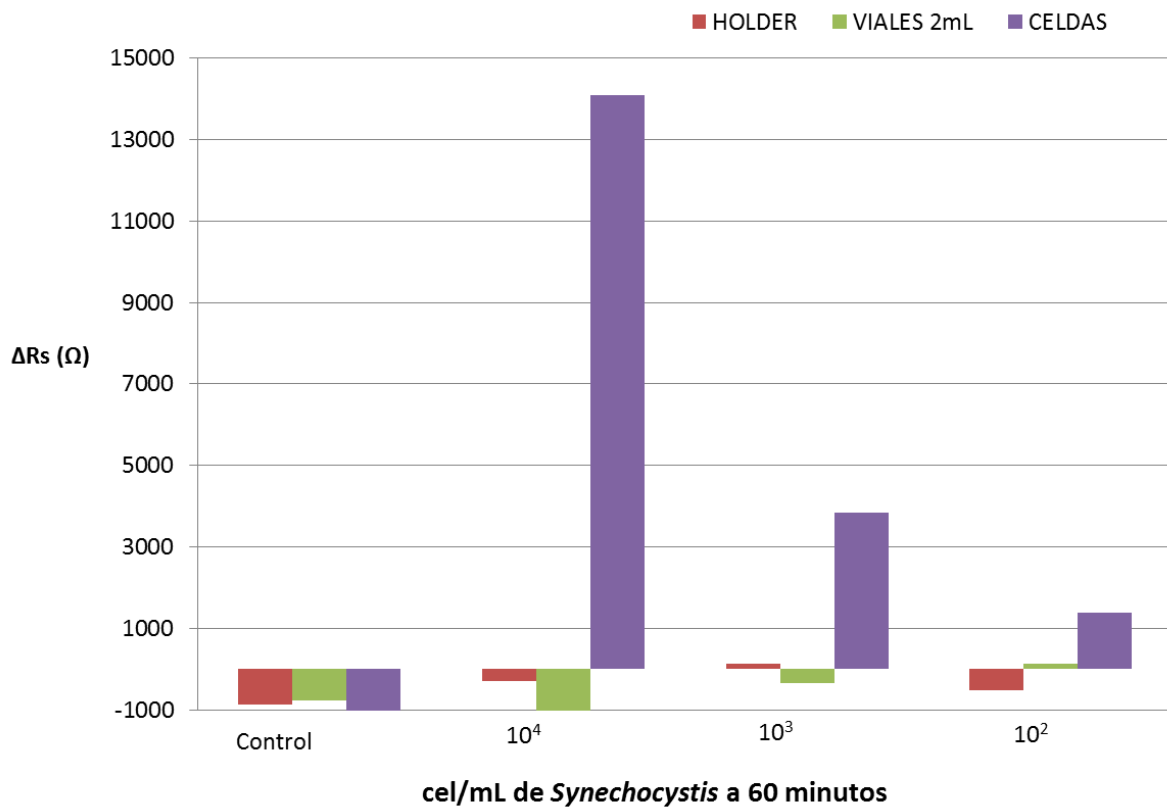


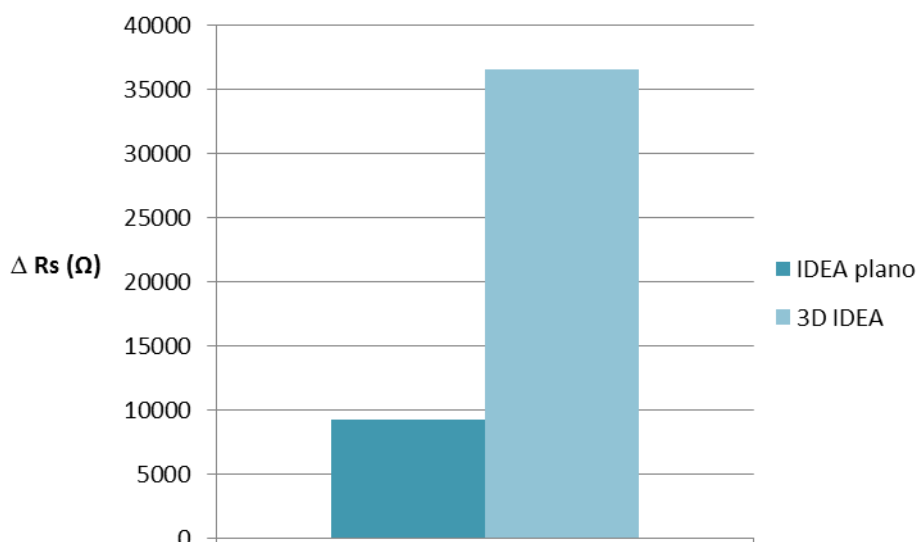
Figura 20. Comparativa de las tres metodologías: el *holder*, los viales de 2 mL y en la celda de vidrio.

### 4.3. COMPARACIÓN DE 3D-IDEA E IDEA PLANOS

Una vez seleccionada la metodología de trabajo más adecuada, se estudió el tipo de sensor impedimétrico más efectivo para los ensayos, discutiendo entre los IDEA planos o 3D-IDEA.

Para ello, se realizaron ensayos con estos dos tipos de sensores interdigitados, ambos modificados con PEI-PSS-PEI y en las mismas condiciones. Se emplearon celdas de vidrio, con concentraciones de 10<sup>4</sup> cel/mL de *Synechocystis* en agitación constante. En la Figura 21 se observa la respuesta impedimétrica mediante los cambios en la  $R_s$  de ambos sensores a los 30 minutos de incubación. Claramente se puede distinguir que la respuesta en el caso de los 3D-IDEA es mucho mayor, prácticamente muestra una respuesta 4 veces superior que en los IDEA planos. Esto sugiere que los 3D-IDEA pueden aportar mayor sensibilidad la hora de detectar *Synechocystis*.





**Figura 21.** Comparación de los sensores IDEA y 3D-IDEA modificados con PEI-PSS-PEI y en celdas de vidrio *Synechocystis*  $10^4$  cel/mL en solución de KCl  $10^{-5}$  M en agitación.

De hecho en diferentes estudios del grupo, como se ha mencionado también en la introducción del presente trabajo, se conoce que los 3D-IDEA tienen mayor sensibilidad para registrar reacciones bioquímicas y cambios a nivel superficial del sensor [20, 37, 46]. Pero, además, mediante este ensayo, también se confirma a nivel experimental que la funcionalización de los 3D-IDEA permiten detectar con facilidad este tipo de bacterias, las cianobacterias, ya que en los estudios previos se había trabajado básicamente con *E. coli*.

Así pues, se concluyó que para los ensayos de detección a diferentes concentraciones, los 3D-IDEA podían permitir detectar concentraciones más bajas de *Synechocystis* que mediante los IDEA planos. Por tanto, los últimos experimentos se enfocaron exclusivamente al uso de 3D-IDEA.

#### **4.4. DETECCIÓN DE SYNECHOCYSTIS MEDIANTE 3D-IDEA CON PEI-PSS-PEI**

Una vez demostrada la mayor sensibilidad de los 3D-IDEA modificados con PEI-PSS-PEI mediante el método *layer-by-layer*, se hicieron distintos ensayos para poder estudiar la posibilidad de detectar concentraciones de cianobacterias, empleándose *Synechocystis sp.* como cepa modelo.

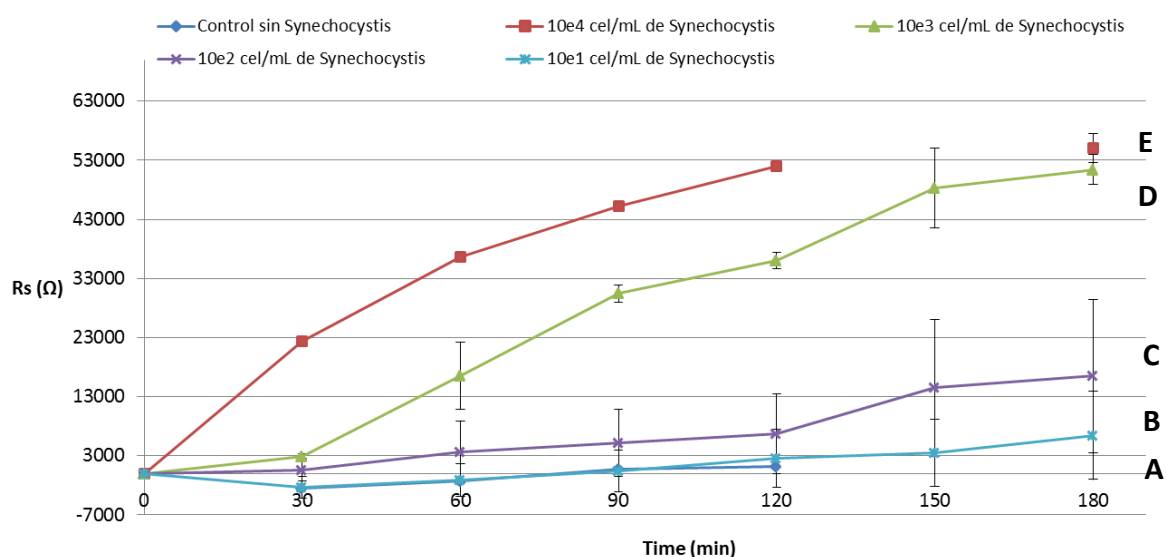
Se debe tener en cuenta que la membrana externa de las bacterias posee diferentes moléculas con grupos cargados negativamente por lo que al funcionalización con PEI puede favorecer su interacción. En el caso de las bacterias Gram negativas los LPS favorecen la presencia de cargas superficiales negativas. De igual manera ocurre con las cianobacterias,

se espera que el PEI interactúe con los LPS y de esta manera inmovilizar y detectar las cianobacterias.

En la Figura 22 se observa la respuesta del sensor 3D-IDEA modificado con PEI-PSS-PEI en soluciones de KCl  $10^{-5}$  M con *Synechocystis* en un rango de concentraciones de  $10^1$  hasta  $10^4$  cel/mL durante 3 horas de incubación. En la ecuación 2 se detalla cómo se calculó el  $\Delta R_s$  en todas las mediciones:

$$\Delta R_s = R_{S \text{ ciano}}(t=x) - R_s(t=0) \quad (2)$$

Donde  $R_{S \text{ cianos}}(t=x)$  corresponde al valor de la resistencia después de la incubación con cianobacterias a un cierto tiempo, mientras que  $R_s(t=0)$  corresponde al valor inicial de cada 3D-IDEA después de modificarlos con PEI-PSS-PEI.



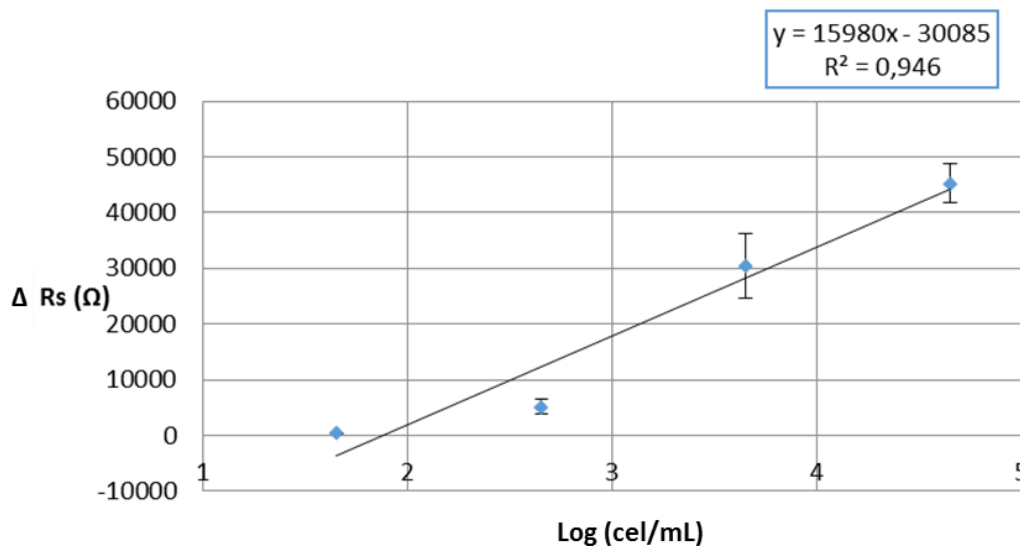
**Figura 22.** Variaciones de  $R_s$  en  $\Omega$  de los 3D-IDEA modificados con PEI-PSS-PEI y sumergidos en soluciones con *Synechocystis* sp. PCC 6803. (A) Control con el electrodo modificado en KCl  $10^{-5}$  M sin *Synechocystis* sp. (a los tiempos 150 y 180 minutos no hay valores por problemas durante las mediciones), (B) Concentración de  $10^1$  cel/mL; (C) Concentración de  $10^2$  cel/mL; (D) Concentración de  $10^3$  cel/mL; (E) Concentración de  $10^4$  cel/mL (a 150 minutos no hay datos por problemas durante la medición). Aparecen representadas las barras de error correspondientes a las desviaciones estándar ( $n=2$ ).

Se observa claramente que la respuesta de la impedancia, en términos de  $R_s$ , incrementa en todas las concentraciones de *Synechocystis* a lo largo del tiempo. Además, cuanto mayor es la concentración, más rápido se produce este incremento. Puede apreciarse la diferencia de concentraciones a lo largo de las 3 horas del ensayo donde las de mayor concentración (Fig. 21 D y E) dan respuestas de  $R_s$  muy cercanas a los 60000  $\Omega$  y el control (Fig. 21 A), electrodos modificados con PEI-PSS-PEI en soluciones de solo KCl  $10^{-5}$  M, se encuentra en valores prácticamente de 0  $\Omega$  y sin cambios a lo largo del tiempo.

Por otro lado, en la mayoría de las concentraciones, la señal se estabiliza entre los 90 y 120 minutos de incubación, indicando que la superficie del sensor deja de experimentar cambios por la adhesión de las cianobacterias y, por tanto, la respuesta de impedancia queda prácticamente saturada. Sin embargo, en el caso de las concentraciones más bajas de  $10^1$  cel/mL (Fig. 21 B) apenas hay diferencia de impedancia respecto del control. Se debe a que la cantidad de cianobacterias que se adhieren a la superficie no es muy alta y el distinguir entre señal y ruido es difícil. Aun así, en concentraciones con un orden de magnitud mayor, de  $10^2$  cel/mL, (Fig. 21 C) se aprecian cambios significativos respecto al control.

En general, las modificaciones con PEI-PSS-PEI permiten la posibilidad de detectar concentraciones de *Synechocystis* a tiempos cortos y con una gran sensibilidad.

Una vez estudiada la respuesta a lo largo del tiempo y a diferentes concentraciones, se evaluó la respuesta del sensor frente a la concentración de cianobacterias a los 90 minutos en donde la respuesta comenzaba a estabilizarse. La correspondiente recta de calibrado se expresó como una la relación entre el logaritmo de la concentración de las cianobacterias (*Synechocystis*) respecto al incremento en  $R_s$ , tal y como se ve en la Figura 23.



**Figura 23.** Curva de calibrado de  $R_s$ , expresado como función logarítmica de *Synechocystis* sp. PCC 6803 a concentraciones entre  $10^1$  y  $10^4$  cel/mL.

Los resultados muestran que entre el rango de  $10^1$  y  $10^4$  cel/mL, la respuesta es proporcional entre el logaritmo de la concentración de *Synechocystis* con un coeficiente de

correlación  $R^2$  de 0.946 y una sensibilidad de 15980  $\Omega$  por orden de magnitud, marcada por la pendiente de la recta.

Además, se calculó el límite de detección (*limit of detection*, LOD), siendo esta la mínima cantidad de analito detectable en una muestra, en este caso la cianobacteria en cuestión. Se realizó a partir de la recta de calibración y conociendo la concentración inicial de bacterias de *Synechocystis*. El LOD se puede definir por la fórmula  $LOD=X_{b1}+3S_{b1}$  [47], donde  $X_{b1}$  es el promedio del blanco en ausencia de bacterias y  $S_{b1}$  corresponde a la desviación estándar del control. En este caso, el límite de detección que se obtuvo con los 3D-IDEA funcionalizados con PEI-PSS-PEI fue de  $1,13 \times 10^2$  cel/mL (113 cel/mL). Demostrándose así, que con tan solo 90 minutos se podían detectar concentraciones muy bajas de cianobacterias.

A pesar del bajo límite de detección obtenido, hay que considerar que las modificaciones de los 3D-IDEA con PEI-PSS-PEI carecen de ningún tipo de selectividad, ya que por el efecto del PEI otros compuestos cargados negativamente también podrían interactuar con la superficie del sensor. Por lo tanto, no se puede hablar de un biosensor al uso, ya que no se utiliza ningún elemento de bioreconocimiento que aporte selectividad al sistema. Sin embargo, sí que es una metodología analítica útil en muestras controladas, en donde se pueda garantizar que únicamente haya un tipo de bacteria.

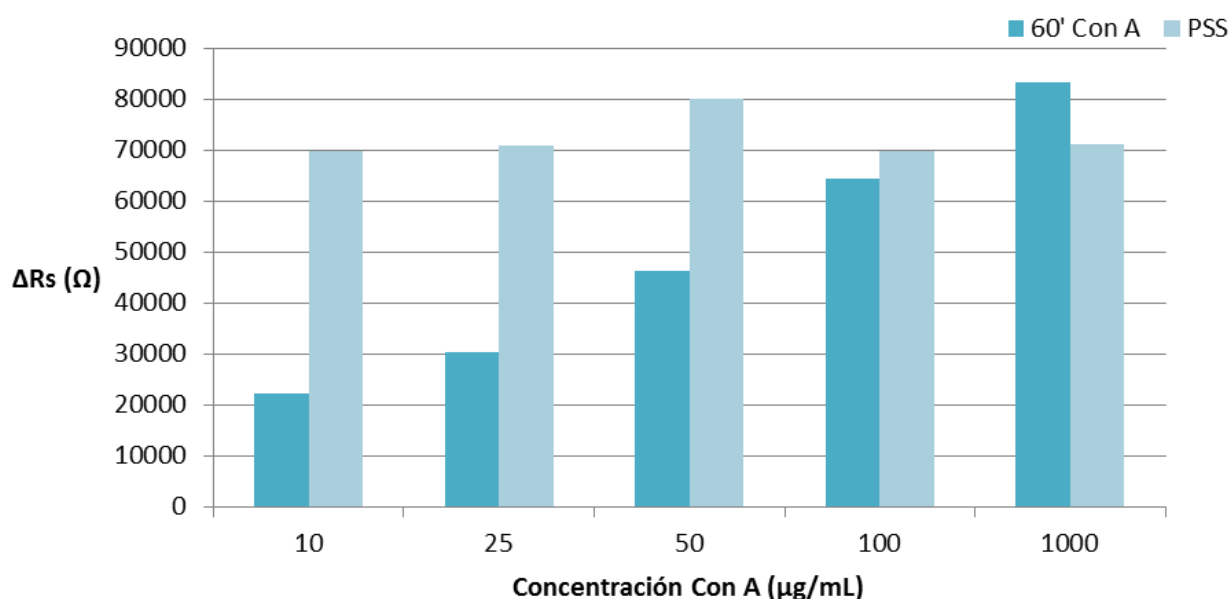
#### **4.5. DETECCIÓN MEDIANTE 3D-IDEA CON PEI-CON A**

En este caso, se usó la concanavalina A (Con A) como elemento de bioreconocimiento para interactuar de forma más selectiva con las cianobacterias. La Con A es una lectina que reconoce específicamente los grupos  $\alpha$ -D-glucosa y  $\alpha$ -D-manosa y, previamente, se ha demostrado que interactúa específicamente con los LPS de bacterias Gram negativas [27, 43]. Por lo tanto, se espera que también interactúe con los LPS de la membrana de las cianobacterias.

Para la inmovilización de la Con A previamente se modificó la superficie del biosensor con PEI, actuando como capa de anclaje de distintas moléculas. No obstante, el uso del PEI puede resultar contraproducente, porque como se ha visto, interactúa con los compuestos cargados negativamente como son los LPS, observado en trabajos previos y en la sección anterior [21]. Para solventar esta limitación fue necesario optimizar la concentración de Con A y, de esta manera, asegurar que el PEI quedase totalmente apantallado, para que

*Synechocystis* interaccionase exclusivamente con Con A dando lugar a un sistema selectivo. Para ello, se realizaron ensayos con distintas concentraciones de Con A (1000, 100, 50, 25 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) con sensores 3D-IDEA modificados con PEI. Además, en todos los casos se realizaron tiempos de modificación durante 30, 60 y 90 minutos en la solución de Con A.

En segundo lugar, para demostrar que no había una posible interacción del PEI, se incubaron los sensores tras haberse realizado las dos modificaciones de PEI y Con A en una solución con PSS (2  $\text{mg}/\text{mL}$ ). El PSS, al estar cargado negativamente, solamente interacciona con el PEI [43, 44].



**Figura 24.** Modificaciones del sensor tras 20 minutos en PEI y 60 minutos en Con A a distintas concentraciones. Comparadas con el apantallamiento de PSS durante 20 minutos.

En la Figura 24, se representa la respuesta en  $R_s$  de los 3D-IDEA con PEI-Con A (tras 60 minutos para la inmovilización de la lectina con el PEI), y después de la incubación en PSS. Se observa que con concentraciones de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  no hay un aumento significativo de la  $R_s$  después de añadir el PSS, demostrándose que el PEI se ve totalmente cubierto por la Con A. Por otro lado, en concentraciones más bajas (50, 25 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Con A) la  $R_s$  aumenta significativamente cuando se modifica con PSS, de modo que en estos casos no toda la superficie del PEI está apantallada a través de la Con A, y todavía cabe la posibilidad de que interaccione con el PSS. Por tanto, a concentraciones de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  el PEI queda totalmente cubierto y las reacciones que tengan lugar en la superficie del electrodo serán exclusivamente con la Con A como elemento de bioreconocimiento.

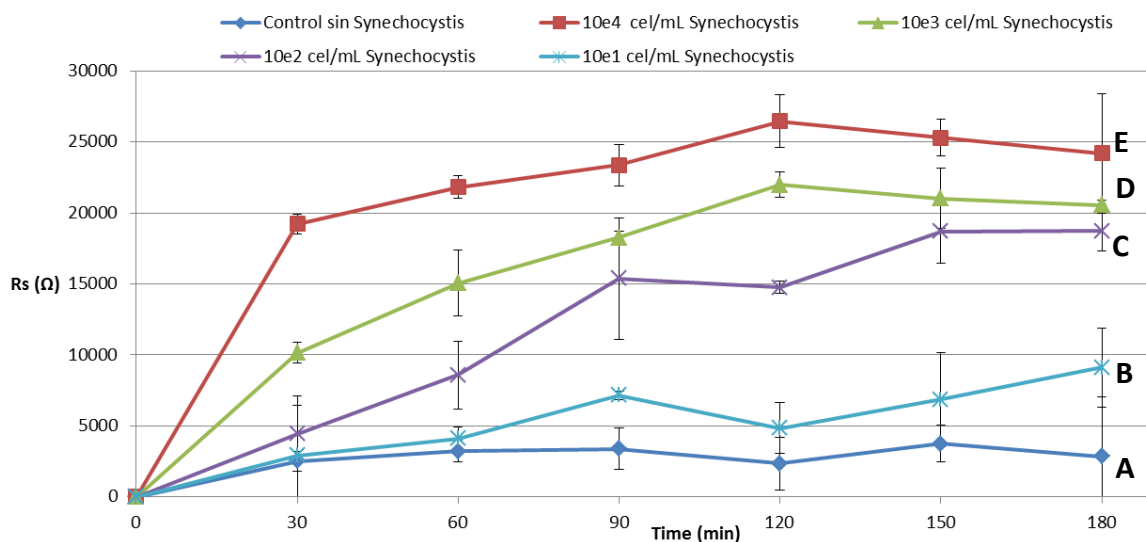
En resumen, se determinó que a la concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Con A durante 60 minutos era la óptima para efectuar la biofuncionalización y obtener el correspondiente el biosensor para los ensayos de detección de *Synechocystis*.

Cabe mencionar que también se comprobó la reproducibilidad de las modificaciones con las condiciones fijadas de 20 minutos en PEI (1,5  $\text{mg}/\text{mL}$ ) y 60 minutos en Con A a una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , obteniéndose una reproducibilidad en términos de  $R_s$  de los 3D-IDEA del 86% ( $n=29$ ).

#### 4.5.1. DETECCIÓN DE SYNECHOCYSTIS

Una vez biofuncionalizados los sensores 3D-IDEA con la Con A se procedió al ensayo de la detección de *Synechocystis sp.* PCC 6803. Se trata de una cianobacteria Gram negativa, de modo que en su membrana extracelular se encuentran los LPS que pueden interactuar con la Con A de manera selectiva. Como en el caso de los ensayos con las modificaciones de PEI-PSS-PEI se estudió la respuesta del biosensor a distintas concentraciones de *Synechocystis* a lo largo de 3 horas (180 minutos), como se muestra en el la Figura 25.

En este caso, las variaciones en  $R_s$  se calcularon del mismo modo que en la ecuación 2, pero aquí hay que considerar que el que  $R_s$  ( $t=0$ ) corresponde al valor inicial de cada 3D-IDEA después de modificarlos con PEI-Con A.



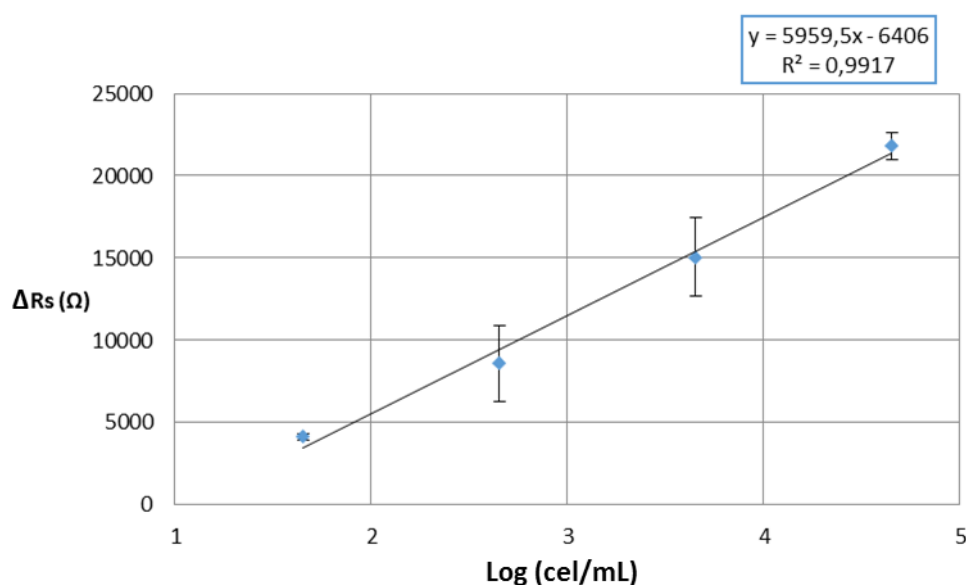
**Figura 25.** Variaciones de  $R_s$  en  $\Omega$  de los 3D-IDEA modificados con PEI-Con A y sumergidos en una solución con *Synechocystis sp.* PCC 6803. (A) Control con el electrodo modificado en  $\text{KCl } 10^{-5} \text{ M}$  sin *Synechocystis sp.*, (B) Concentración de  $10^1 \text{ cel}/\text{mL}$ ; (C) Concentración de  $10^2 \text{ cel}/\text{mL}$ ; (D) Concentración de  $10^3 \text{ cel}/\text{mL}$ ; (E) Concentración de  $10^4 \text{ cel}/\text{mL}$ . Aparecen representadas las barras de error correspondientes a las desviaciones estándar ( $n=2$ ).

En la Figura 25, también, se observa como la respuesta de  $R_s$  incrementa proporcionalmente cuanto mayor es la concentración de *Synechocystis* y cuanto más tiempo

se mantiene en incubación el biosensor. En el primer tiempo de detección, a los 30 minutos, hay un gran incremento de las  $R_s$  en todos los casos, y seguidamente la señal se va estabilizando a lo largo de los 180 minutos de detección, de modo que los cambios más significativos se producen en tiempos cortos. En el caso del control, los electrodos modificados con PEI-Con A sin presencia de cianobacterias, la impedancia no varía significativamente a lo largo de los 180 minutos, demostrando la estabilidad de los mismos. Cabe destacar, las variaciones de  $R_s$  entre el control y la concentración del cultivo de  $10^1$  cel/mL (Fig. 20 A y B, respectivamente), son difíciles de diferenciar a tiempos largos de incubación (a partir de los 120 minutos). Por otro lado, en cada una de las concentraciones vemos que hay diferencias importantes entre ellas a los 90 minutos, que por otra parte es el tiempo en el que la señal comienza a estabilizarse.

A diferencia de los 3D-IDEA modificados con PEI-PSS-PEI si evaluamos la respuesta en términos de variación de  $R_s$  se observa que los cambios son más pequeños en el sistema PEI-Con A, pero cabe recordar que el uso de la Con A aporta al sistema una mayor selectividad, esencial en el desarrollo de un biosensor.

Finalmente, en base a estos resultados se estableció una recta de calibración para poder determinar la relación entre la concentración logarítmica de *Synechocystis* respecto a los cambios en  $R_s$  a los 60 minutos, como se puede ver en la Figura 26. En paralelo, la misma recta de calibración se utilizó para determinar la sensibilidad del sistema y el límite de detección (LOD) que fue calculado igual que con los 3D-IDEA modificados con PEI-PSS-PEI.



**Figura 26.** Curva de calibrado de  $R_s$ , expresado como función logarítmica de *Synechocystis* sp. PCC 6803 a concentraciones entre  $10^1$  y  $10^4$  cel/mL.

La recta resultante presenta un  $R^2$  de 0.9917 y una sensibilidad de 5959  $\Omega$  (correspondiente a la pendiente de la recta) por orden de magnitud. Por último, el límite de detección que se obtuvo en este caso fue de  $1 \times 10^2$  (100 cel/mL) en tan solo 60 minutos, incluso algo más bajo que en el caso anterior, demostrando la efectividad de este sistema

Como consideración general podemos afirmar que los sensores 3D-IDEA modificados con PEI-PSS-PEI proporcionan una detección de las cianobacterias con una alta sensibilidad, pero no permiten la detección selectiva de las cianobacterias, ya que el PEI interacciona de manera inespecífica con aquellas moléculas cargadas negativamente. Por ello, las modificaciones de los sensores 3D-IDEA con PEI-Con A sí que permiten una detección más selectiva de *Synechocystis*, ya que la Con A reacciona de manera específica con los LPS de la membrana extracelular, dando lugar a un método de detección más efectivo y fiable.



## 5. CONCLUSIONES

En este trabajo se han presentado diferentes metodologías y la aplicación de distintas estrategias de (bio)funcionalización para diseñar un biosensor. Dicho biosensor se ha desarrollado para la detección de cianobacterias en muestras líquidas de manera rápida, selectiva y a bajas concentraciones, dando con la posibilidad de ser aplicado en muestras de agua procedentes de sistemas acuapónicos.

El uso de transductores impedimétricos basados en matrices de electrodos interdigitados, los IDEA, especialmente los tridimensionales (3D-IDEA) funcionalizados con la técnica *layer-by-layer* (mediante el uso de polielectrolitos y la concanavalina A) han resultado ser muy efectivos y sensibles para la detección de *Synechocystis sp. PCC 6308*, como cepa modelo. Gracias a la técnica de la espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) se registraron cambios a nivel de resistencia superficial, tanto en el proceso de biofuncionalización como en los ensayos de detección.

La metodología para estos ensayos de detección mediante el uso de cultivos preparados en 50 mL de KCl  $10^{-5}$  M en celdas de vidrio y con agitación constante resultó ser la idónea para detectar bajas concentraciones de cianobacterias. Además, se demostró la mayor sensibilidad de los 3D-IDEA comparados con los IDEA planos.

Los 3D-IDEA funcionalizados capas PEI-PSS-PEI permite inmovilizar las cianobacterias en la superficie del sensor a través de la atracción electrostática entre el PEI, cargado positivamente, y los compuestos de la membrana externa de las cianobacterias con cargas negativas. Este es un sistema muy sensible, pero no presenta ningún tipo de reconocimiento específico siendo difícilmente aplicable a muestras reales. Por otro lado, el uso de los 3D-IDEA empleando PEI-Con A otorgaba al sistema de detección una mayor selectividad mediante la interacción con los LPS/endotoxinas de la membrana.

Finalmente, se ha demostrado que los 3D-IDEA funcionalizados con PEI-Con A son un método muy robusto y reproducible capaz de detectar bajas concentraciones de cianobacterias en muestras líquidas, de manera selectiva y rápida, con un límite de detección muy bajo de 100 cel/mL en solo 60 minutos de ensayo. .

Esto trabajo abre nuevas posibilidades de usar estos biosensores para muestras procedentes de sistemas acuapónicos u otros ambientes naturales que puedan estar contaminados con cianobacterias. Al inicio de este trabajo se ha mencionado la OMS

determina que en aguas con concentraciones superiores a  $2 \times 10^4$  cel/mL suponen un alto riesgo para la salud, por lo que el uso del sistema desarrollado permitiría detectar fácilmente concentraciones muy por debajo de este rango, alrededor 100 células/mL. Por ello, mediante una detección temprana y a concentraciones bajas, se podrían aplicar tratamientos de corrección para evitar el desarrollo de los *blooms* y la generación de citotoxinas.

## 6. PERSPECTIVAS FUTURAS

El desarrollo de los biosensores mediante transductores impedimétricos del tipo IDEA, en concreto los tridimensionales (3D-IDEA), para la detección de cianobacterias en muestras líquidas puede suponer un gran avance dentro del campo de la calidad ambiental y alimentaria.

Actualmente, dentro del marco europeo, solo se cuenta con legislación centrada en concentraciones máximas de cianotoxinas que causan problemas en la seguridad de las aguas de consumo por la aparición de los *blooms*. Sin embargo, la detección temprana y a bajas concentraciones de cianobacterias, como se ha conseguido en este trabajo (100 células/mL en 60 minutos), significa subir un escalón donde poder garantizar la seguridad y calidad del agua en aquellos sistemas vulnerables a estos microorganismos, puesto que la OMS cataloga que a concentraciones superiores a 20.000 células/mL de cianobacterias implican un alto riesgo en la salud.

No obstante, todavía se debe optimizar el sistema ya que la concanavalina A, es específica para los lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas, también puede interactuar con otro tipo de cepas bacterianas. Por tanto, en trabajos futuros se propone funcionalizar los 3D-IDEA con moléculas de bioreconocimiento que doten al sistema de una mayor selectividad, como son los anticuerpos o los aptámeros específicos para diferentes cepas de cianobacterias.

En resumen, esta tecnología es una alternativa real para implementarse en la industria agroalimentaria en procesos de control donde el agua que se emplea esté destinada al consumo humano o a la producción de alimentos. Además, debido a su tamaño miniaturizado se puede facilitar la realización de medidas *in-situ* sin alterar la calidad de los productos, ni la seguridad del consumidor al evitar contaminaciones. Convirtiéndose en un campo con un gran futuro.

- [1] N. Navarré Sanz, *Plan de negocio para la creación de una empresa de acuaponía*, Trabajo fin de grado, Escuela técnica superior de ingeniería agronómica y del medio natural, Universitat Politècnica de València. Valencia, 2018.
- [2] R. Martínez-Yáñez, *Puntos críticos de control en sistemas acuapónicos*, en Primer Congreso nacional de sanidad e inocuidad agrícola, 2014.
- [3] S. Diver, *Aquaponics: integration of hydroponics whit aquaculture*, National Sustain. Agric. Inf. Serv., pp. 1–28, 2010.
- [4] P. M. Rolchigo, *Innovating at the Nexus of Food , Water & Energy*, PENTAIR, Minesota. United States, 2015.
- [5] A. Jiménez, *Manual de buenas prácticas para la producción de tenguayaca (Petenia splendida) con el método de acuaponía*, PNUD (Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo), México, 2017.
- [6] Y. S. Al-Hafedh, A. Alam and S. M. Beltagi, *Food Production and Water Conservation in a Recirculating Aquaponic System in Saudi Arabia at Different Ratios of Fish Feed to Plants*, *WORLD Aquac. Soc.*, vol. 39, no. 4, pp. 510–520, 2008.
- [7] PNUMA (Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente), *Avances y progresos científicos en nuestro cambiante medio ambiente*. Reino Unido, 2010.
- [8] B. König, J. Janker, T. Reinhardt, M. Villarroel and R. Junge, *Analysis of aquaponics as an emerging technological innovation system*, *J. Clean. Prod.*, vol. 180, pp. 232–243, 2018.
- [9] P. Candarle, *Técnicas de Acuaponia*, Centro Nacional de Desarrollo Acuícola (CENADAC), Argentina, 2006.
- [10] J. P. Valderrama, *Afloramientos de cianobacterias marinas bentónicas en San Andrés, Providencia y las Islas del Rosario (Caribe colombiano): Caracterización y evaluación de su posible papel ecológico*, Universidad Nacional de Colombia, 2013.
- [11] G. Carvajal, *Ocurrencia de floraciones de cianobacterias tóxicas en cuerpos de agua dulce en Argentina*, Universidad Nacional de La Plata, 2011.
- [12] WHO (World Health Organization), *Guías para la calidad del agua potable*, Organ. Mund. la Salud, vol. 1, p. 408, 2008.
- [13] A. M. L. Van De Meene, M. F. Hohmann-Marriott, W. F. J. Vermaas, and R. W. Roberson, *The three-dimensional structure of the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803*, *Arch. Microbiol.*, vol. 184, no. 5, pp. 259–270, 2006.
- [14] WHO (World Health Organization), *Guías para la calidad del agua de consumo humano: cuarta edición que incorpora la primera adenda*, p. 636, 2011.
- [15] J. Roset, S. Aguayo, and M. Muñoz, Revisión: *Detección de cianobacterias y sus toxinas*, *Rev. Toxicol.*, vol. 18, pp. 65–71, 2001.
- [16] A. Quesada, D. Carrasco, and S. Cirés, *Cianobacterias en aguas de consumo y de recreo: un problema de todos*, Ponencia en Centro de Estudios y Experimentación de Obras Públicas (CEDEX), Universidad Autónoma de Madrid, 2006.
- [17] A. D. Chatziefthimiou, J. S. Metcalf, W. B. Glover, S. A. Banack, S. R. Dargham, and R. A. Richer, *Cyanobacteria and cyanotoxins are present in drinking water impoundments and groundwater wells in desert environments*, *Toxicon*, vol. 114, pp. 75–84, 2016.
- [18] I. Sanseverino, D. Conduto António, R. Loos, and T. Lettieri, *Cyanotoxins: methods and approaches for their analysis and detection*, EUR 28624; doi:10.2760/36186, European Commision, JRC Technical Reports, 2017.
- [19] C. A. Iregui and S. Romero, *El Lipopolisacárido*, *Rev. Med. Vet.*, no. 19, pp. 37–45. Bogotá, 2010.

- [20] Y. R. Méndez Fandiño and M. C. Barrera C., *Fisiopatología de la sepsis por bacterias Gramnegativas: bases moleculares*, Rev. Cuarzo, vol. 21, no. 2, p. 88, 2017.
- [21] S. B. Oliu, *Interdigitated Electrode Arrays (IDEA) Impedimetric Transducer For Bacterial Biosensing Applications*, PhD, Departamento de Genética y Microbiología, UAB, Barcelona, 2018.
- [22] L. Dornelles Mello and L. Tatsuo Kubota, *Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries*, Anal. Nutr. Clin. Methods, vol. 77, pp. 237–256, 2002.
- [23] A. L. Furst and M. B. Francis, *Impedance-Based Detection of Bacteria*, Chem. Rev., vol. 119, no. 1, pp. 700–726, 2019.
- [24] A. P. F. Turner, *Biosensors: sense and sensibility*, Chem. Soc. Rev., vol. 42, no. 8, pp. 3184–96, 2013.
- [25] L. Su, W. Jia, C. Hou, and Y. Lei, Review: *Microbial biosensors*, Biosens. Bioelectron., vol. 26, no. 5, pp. 1788–1799, 2011.
- [26] J. R. Niina and H. Brian Halsall, *Electrochemical biosensors*, Chem. Soc. Rev., vol. 39, pp. 1747–1763, 2010.
- [27] B. Serra, M. Gamella, A. J. Reviejo, and J. M. Pingarrón, *Lectin-modified piezoelectric biosensors for bacteria recognition and quantification*, Anal. Bioanal. Chem., vol. 391, no. 5, pp. 1853–1860, 2008.
- [28] L. Farzin, M. Shamsipur, L. Samandari, and S. Sheibani, Review: *Advances in the design of nanomaterial-based electrochemical affinity and enzymatic biosensors for metabolic biomarkers*, Microchim. Acta, vol. 185, no. 5, 2018.
- [29] S. Brosel-Oliu, N. Uria, N. Abramova, and A. Bratov, *Biosensors - Micro and Nanoscale Applications, Impedimetric Sensors for Bacteria Detection*, ed. 1, Intech Open, 2015, cap. 9, p. 257-288.
- [30] M. Varshney and Y. Li, *Interdigitated array microelectrodes based impedance biosensors for detection of bacterial cells*, Biosens. Bioelectron., vol. 24, no. 10, pp. 2951–2960, 2009.
- [31] A. Hulanicki, S. Geab, and F. Ingman, *Chemical sensors definitions and classification*, Int. union pure Appl. chemistry, vol. 63, no. 0, pp. 1247–1250, 1991.
- [32] L. Lechuga and A. Calle, *Biosensores: los dispositivos analíticos del futuro*, Plásticos Mod., vol. 471, pp. 232–242, 1995.
- [33] Y. Chen, Z. Wang, Y. Liu, X. Wang, Y. Li, P. Ma, B. Gu, and H. Li, *Recent advances in rapid pathogen detection method based on biosensors*, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., vol. 37, no. 6, pp. 1021–1037, 2018.
- [34] G. Song, *Equivalent circuit model for AC electrochemical impedance spectroscopy of concrete*, Cem. Concr. Res., vol. 30, no. 11, pp. 1723–1730, 2000.
- [35] S. Brosel-Oliu, R. Ferreira, N. Uria, N. Abramova, R. Gargallo, F. X. Muñoz-Pascual, and A. Bratov, *Novel impedimetric aptasensor for label-free detection of Escherichia coli O157:H7*, Sensors Actuators, B Chem., vol. 255, pp. 2988–2995, 2018.
- [36] A. V. Mamishev, K. Sundara-Rajan, and F. Yang, *Interdigital sensors and transducers*, Proc. IEEE, vol. 92, no. 5, pp. 808–845, 2004.
- [37] A. Guimerà, G. Gabriel, E. Prats-Alfonso, N. Abramova, A. Bratov, and R. Villa, *Effect of surface conductivity on the sensitivity of interdigitated impedimetric sensors and their design considerations*, Sensors Actuators, B Chem., vol. 207, no. PB, pp. 1010–1018, 2015.
- [38] P. Van Gerwen, W. Laureys, G. Huyberechts, M. De Baeck, K. Baert, J. Suis, A. Varlan, W. Sansen, L. Hermans, and R. Mertens, *Nanoscaled interdigitated electrode arrays for biochemical sensors*, Sensors Actuators B Chem., vol. 49, no. October 2015, pp. 73–80, 1998.
- [39] A. Bratov, S. Brosel-Oliu, and N. Abramova, *Label-Free Biosensing: Advanced Materials, Devices and Applications Label-Free Impedimetric Biosensing Using 3D Interdigitated Electrodes*, Eds. Cham: Springer International Publishing, 2018, pp. 179–198.

- [40] A. Bratov, N. Abramova, M. P. Marco, and F. Sanchez-Baeza, *Three-Dimensional Interdigitated Electrode Array as a Tool for Surface Reactions Registration*, *Electroanalysis*, vol. 24, no. 1, pp. 69–75, 2012.
- [41] M. Bäcker, F. Kramer, C. Huck, A. Poghossian, A. Bratov, N. Abramova, and M. J. Schöning, *Planar and 3D interdigitated electrodes for biosensing applications: The impact of a dielectric barrier on the sensor properties*, *Phys. Status Solidi Appl. Mater. Sci.*, vol. 211, no. 6, pp. 1357–1363, 2014.
- [42] A. Bratov, N. Abramova, J. Ramón-Azcón, A. Merlos, F. Sánchez-Baeza, M. P. Marco, and C. Domínguez, *Characterisation of the interdigitated electrode array with tantalum silicide electrodes separated by insulating barriers*, *Electrochem. commun.*, vol. 10, no. 10, pp. 1621–1624, 2008.
- [43] Y. Lvov, K. Ariga, I. Ichinose, and T. Kunitake, *Molecular film assembly via layer-by-layer adsorption of oppositely charged macromolecules (linear polymer, protein and clay) and concanavalin A and glycogen*, *Thin Solid Films*, vol. 284–285, pp. 797–801, 1996.
- [44] M. Kolasińska, R. Krastev, and P. Warszyński, *Characteristics of polyelectrolyte multilayers: Effect of PEI anchoring layer and posttreatment after deposition*, *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 305, no. 1, pp. 46–56, 2007.
- [45] R. Mészáros, L. Thompson, M. Bos, and P. De Groot, *Adsorption and electrokinetic properties of polyethylenimine on silica surfaces*, *Langmuir*, vol. 18, no. 16, pp. 6164–6169, 2002.
- [46] A. Bratov, J. Ramón-Azcón, N. Abramova, A. Merlos, J. Adrian, F. Sánchez-Baeza, M. P. Marco, and C. Domínguez, *Three-dimensional interdigitated electrode array as a transducer for label-free biosensors*, *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, no. 4, pp. 729–735, 2008.
- [47] A. Shrivastava and V. Gupta, *Review: Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods*, *Chronicles Young Sci.*, vol. 2, no. 1, p. 21, 2011.