



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**Dispositius impedimètrics per a la detecció  
directa de microorganismes**

Memòria presentada per a aspirar al grau de Doctora per

**MARIA MALLÉN ALBERDI**

Programa de doctorat en Biotecnologia

Tesi doctoral - 2016

Dr. Antoni Baldi Coll

(Director)

Dr. César Fernández Sánchez

(Director)

Dr. Jordi Mas Gordi

(Tutor acadèmic)



silicon  
technologies  
for sensing



**CSIC**

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



# Resum

La detecció de bacteris patògens en medis aquosos és d'alta importància en diversos camps. Un diagnòstic ràpid de la qualitat de les aigües és fonamental per evitar exposar la població a patògens. Els mètodes de detecció tradicionals requereixen períodes d'incubació d'entre 18 a 96 hores i, per tant, fins que no se sàpiguen els resultats hi ha risc d'infecció. Els biosensors es caracteritzen per ser senzills d'utilitzar i per no requerir grans equips per realitzar-ne les mesures. A més, són fàcils d'integrar a sistemes de flux i els resultats es poden obtenir de manera instantània i serien idonis per assolir unes mesures a temps real.

Per aquest motiu, en aquest treball es planteja l'ús de biosensors elèctrics basats en impedància no faradaica per assolir l'objectiu de detectar bacteris en medis aquosos. Aquest tipus de biosensors permeten la detecció directa sense la necessitat d'afegir cap reactiu addicional i la distinció entre bacteris vius i morts.

Aquest treball de tesi parteix d'un treball previ en el què es proposava la detecció de bacteris mitjançant mesures de la capacitat de la solució ( $C_s$ ) i s'atribuïa la diferenciació entre cèl·lules vives i mortes a la diferència de volums i propietats elèctriques dels diferents tipus de cèl·lula. En aquesta tesi es fa un replantejament d'aquests estudis i es proposa que la distinció entre cèl·lules vives i mortes recau en la diferència de la conductivitat del seu medi intern i que, com a conseqüència de la seva estructura, les cèl·lules vives poden actuar com a partícules conductores o aïllants en funció de la freqüència en què es mesurin. Partint d'aquestes hipòtesis es plantegen diferents objectius que comprenen des d'estudis mitjançant simulacions per elements finits (FEA), a mesures experimentals amb IDEs de diferents geometries, fins l'obtenció d'un nou dispositiu amb un sistema microfluídic integrat per automatitzar les mesures.



Mitjançant estudis de simulacions FEA s'avalua l'afectació que suposa el posicionament del bacteri i la conductivitat del medi de mesura. També s'estudia la relació òptima entre la mida del bacteri i la dels elèctrodes interdigitats.

Es realitzen mesures per la detecció d'*E. coli* sobre IDEs de  $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}$  i de *S. cerevisiae* sobre IDEs de  $6 \times 6 \mu\text{m}$ . En les mesures d'*E. coli* s'observa que aquestes responen seguint un patró espectral d'impedància que és únic i es diferencia de la resposta obtinguda per les mesures d'altres esdeveniments que també alteren la impedància. En canvi, pel cas dels llevats, s'observa que actuen com a partícules purament conductores i s'obté una relació lineal entre la cobertura de l'IDE per llevats i el senyal negatiu de Z.

Finalment es realitza el disseny i fabricació d'una nova geometria d'IDE per detectar microorganismes sub-micromètrics. Per aquest nou xip es dissenya un encapsulat amb un sistema microfluídic integrat i un imant amb diferents posicions per facilitar la captació immunomagnètica de la mostra. S'optimitzen tots els paràmetres per realitzar les mesures mitjançant la utilització de tècniques com la microscòpia confocal i, finalment, es realitzen mesures directes i indirectes del bacteri i s'analitza la raó dels diferents resultats obtinguts amb les mesures.

# Summary

Bacterial pathogens are important targets for detection and identification in medicine, food safety, public health, and security. A rapid diagnostic of water quality is fundamental to avoid population exposure to pathogens. Traditional bacterial detection methods need large incubation times (between 18 and 96 hours) during which time people are at risk. Biosensors are easy to use and no complex equipment are needed to use them. Moreover, they are easy to integrate with fluidic systems and the results can be achieved instantaneously.

For this reason, this thesis considers the use of electrical biosensors based on non-faradaic impedance to achieve the objective of detecting bacteria in aqueous media. Such biosensors allow direct detection without adding any additional reagent and they permit the distinction between live and dead bacteria.

This work is based on a previous work in which was proposed the detection of bacteria by measurements of the capacity of the solution ( $C_s$ ). The differentiation between dead and living cells was attributed to the difference of volumes and electric properties of each type of cell. This thesis is a rethinking of these studies and it is proposed that in the difference in the conductivity of its internal medium lies the distinction between dead and living cells. Indeed, as a result of its structure, living cells can act as conductive or insulating particles depending on the measured frequency. Based on these assumptions the following studies are performed.

Using FEA simulations, we can evaluate the effect of bacteria positioning and the conductivity of measurement medium. The optimum relation between bacteria and interdigitated electrodes size is studied as well.

Moreover, measures to detect *E. coli* with  $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}$  IDEs and *S. cerevisiae* with IDEs de  $6 \times 6 \mu\text{m}$  are performed. A differential impedance spectrum representation is used to study the unique fingerprint that arises when microorganisms attach to

the surface of IDEs. For *E. coli*, that fingerprint shows the dual electrical behavior, insulating and conductive, at different frequency ranges. However, in the case of yeast, it is observed that it acts as purely conductive particle.

The design and manufacture of a new geometry of IDE to detect sub-micrometer microorganisms is performed. This new chip is designed with a microfluidic channel and a magnet integrated in the encapsulation to perform immunomagnetic catchment. All settings are optimized using techniques such as confocal microscopy and, finally, direct and indirect measurements of bacteria are carried out and the reason for the different results obtained are analyzed.

“La ciència és, de llarg, massa important per  
deixar-la per complet als científics”

Walt Federer (1915-2008), bioestadístic

# Taula de continguts

Símbols i abreviacions.....	1
Capítol 1: Introducció.....	5
1. Detecció de microorganismes en aigües.....	6
2. Biosensors per detecció bacteriana.....	12
2.1 Biosensors òptics	12
2.2 Biosensors mecànics	14
2.3 Biosensors elèctrics	14
3. Introducció a la impedància elèctrica: desxifrant aquesta tècnica <i>complexa</i> .....	18
3.1 Aplicant un voltatge, mesurant una intensitat de corrent	19
3.2 Impedància complexa: Resistències i reactàncies	21
3.3 Ajustament de circuits elèctrics equivalents (CEE) al senyal experimental	25
3.4 CPE: el comodí perfecte per ajustar al nostre CEE?	27
4. Detecció de bacteris mitjançant biosensors d'impedància no faradaica: estat de la qüestió.....	28
4.1 Mètodes de detecció	28
4.2 Elèctrodes interdigitats	30
5. Conceptes bàsics de microfabricació.....	31
6. Referències	35
Capítol 2: Hipòtesis de partida i objectius.....	41
1. Hipòtesis de partida.....	42
1.1 Distinció entre cèl·lules viables i mortes mitjançant la detecció dels canvis impedimètrics en el volum proper a la superfície dels elèctrodes	42
1.2 Ambivalència elèctrica bacteriana: aïllants i conductors	44

2. Objectius.....	47
3. Referències.....	48
Capítol 3: Simulació de la impedància del sistema IDEs-bacteris per anàlisi d'elements finits.....	49
1. Introducció.....	50
1.1 Anàlisi d'elements finits	50
1.2 Model de les tres capes per <i>E. coli</i>	53
2. Comprovació del model de Bai amb simulacions per elements finits.....	54
3. Simulacions d'IDEs de 1.5 x 1.5 µm.....	56
3.1 Disseny bàsic del model: optimització de la cel·la mínima	57
3.2 Mallat	60
3.3 Detecció bacteriana	61
3.4 Partícula aïllant, conductora i disminució de Cif	67
3.5 Canvi de la conductivitat del medi	68
4. Optimització de les mides dels interdigitats en funció de les mides de l'anàlit.....	70
5. Conclusions.....	74
6. Referències.....	75
Capítol 4: Detecció impedimètrica de microorganismes sobre elèctrodes interdigitats.....	77
1. Detecció d' <i>Escherichia coli</i> per immunoassaig sobre IDEs de 1.5 x 1.5 µm...	78
1.1 Reactius i solucions	78
1.2 Materials i mètodes	78
1.3 Resultats i discussió	82
2. Detecció de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> per adsorció sobre IDEs de 6 x 6 µm	94
2.1 Reactius i solucions	95
2.2 Materials i mètodes	95
2.3 Resultats i discussió	96
Capítol 5: Optimització de la geometria dels elèctrodes interdigitats i integració d'un sistema microfluídic.....	107

1. Disseny i fabricació del dispositiu.....	108
1.1 Elèctrodes de silici policristal·lí sobre oblies de silici	110
1.2 Encapsulat amb integració microfluídica: disseny i fabricació	122
2. Estudis previs de caracterització i optimització dels diferents paràmetres necessaris per a realitzar les mesures d'impedància bacterianes.....	126
2.1 Reactius i solucions	126
2.2 Materials i mètodes	126
2.3 Resultats i discussió	132
3. Mesures impedimètriques dels bacteris.....	143
3.1 Reactius i solucions	143
3.2 Materials i mètodes	143
3.3 Resultats i discussió	145
4. Conclusions.....	158
5. Referències.....	159
Capítol 6: Conclusions i treball futur.....	161
1. Conclusions.....	162
2. Treball futur.....	163

# Símbols i abreviacions

2D: Dues dimensions.

3D: Tres dimensions.

ADN: Àcid desoxiribonucleic.

APTMS: (3-aminopropil)trimetoxisilà.

ARN: Àcid ribonucleic.

BSA: Sigles en anglès d'albumina de sèrum boví.

C: Capacitat.

CA: Corrent altern.

CEE: Circuits elèctrics equivalents.

$C_{if}$ : Capacitat de la interfície.

CPE: Sigles en anglès de element de fase constant.

$C_s$ : Capacitat de la solució.

Cy3: Cianina 3 (compost fluorescent sintètic).

ELISA: Sigles en anglès de *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*.

EM: Espectrometria de masses.

EUA: Estats Units d'Amèrica.

$f$ : Freqüència.

$\varphi$ : Fase o desfasament entre senyals sinusoidals.

$f_c$ : freqüència crítica en que els corrents penetren dins l'interior cel·lular.

FEA: Sigles en anglès d'anàlisi per elements finits.

I: Intensitat de corrent.

IDE: Sigles en anglès d'elèctrode interdigitat.

$j$ : Número complex  $\sqrt{-1}$ .

KCl: clorur de potassi.

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ : Fosfat de monopotassi.

L: Inductància.

LPS: Lipopolisacàrid.

MEMS: Sigles en anglès de sistemes microelectromecànics.

NaCl: Clorur de sodi.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : Hidrogen fosfat de sodi.

NHS: N-hidroxisuccinimida.



---

NMP: Número més probable.

V: Voltatge o potencial.

OMS: Organització Mundial de la Salut.

$\omega$ : Freqüència angular.

PB: Sigles en anglès de tampó fosfat.

X: Reactància.

PBS: Sigles en anglès de tampó fosfat salí.

$X_C$ : Reactància capacitiva.

$X_L$ : Reactància inductiva.

PB-T: Tampó fosfat amb Tween 20.

Z: Impedància.

PCR: Sigles en anglès de la Reacció en Cadena per la Polimerasa.

$Z_W$ : Impedància de Warburg.

PEG: Polietilenglicol.

R: Resistència.

$R_{ct}$ : Resistència de transferència de càrrega.

RI: Rajos infrarojos.

RL: Recta de regressió lineal.

rpm: revolucions per minut.

RPS: Ressonància de plasmó superficial.

$R_s$ : Resistència de la solució.

RT-PCR: PCR en temps real.

SEM: Sigles en anglès de microscopi electrònic de rastreig.

$t$ : Temps.

TEM: Sigles en anglès de microscopi electrònic de transmissió.

ufc: unitats formadores de colònies.





# CAPÍTOL 1

## Introducció

En aquest capítol s'introdueixen els conceptes bàsics necessaris per poder entendre el treball.

Per una banda, es destaca la importància de la detecció de microorganismes en medis aquosos i les tècniques que tradicionalment s'han dut a terme per assolir aquest objectiu. La majoria d'aquestes metodologies tenen desavantatges que els biosensors són capaços de superar.

Repassem els diferents tipus de biosensors i diferents exemples en l'ús d'aquests per a detecció cel·lular, fent especial èmfasi en els biosensors elèctrics basats en impedància no faradaica.

Tot seguit s'aprofundeix en la teoria bàsica de la impedància i en les diferents vies d'aplicació d'aquesta tècnica per la detecció bacteriana.

Finalment s'introdueixen certes bases sobre les tècniques de microfabricació per l'obtenció de xips.

## 1. Detecció de microorganismes en aigües

La detecció de bacteris patògens en medis aquosos és d'alta importància en diversos camps com la medicina, la indústria alimentària, la salut pública i la seguretat (Ahmed et al. 2014).

L'any 2012, les infeccions bacterianes van ser dins les set primeres causes de mortalitat mundial segons dades de l'OMS (World Health Organization 2015). Un diagnòstic ràpid de la qualitat de les aigües és fonamental per evitar exposar la població a patògens.

El sistema de detecció ideal hauria de consistir en un mètode simple i ràpid en què les mesures es duguessin en terme a temps real i en continu. És a dir que, a mesura que un sistema necessita més etapes com, per exemple, un pretractament o una preconcentració de la mostra o de l'addició de marcadors i reactius, augmenta la seva complexitat i, per tant, esdevé menys ideal. La simplificació d'aquests sistemes es tradueix, bàsicament, en un estalvi econòmic ja que es pot prescindir de personal tècnic especialitzat, de la compra de reactius, de temps i d'equipament voluminos i car. A més a més, cal fer constar l'impacte mediambiental que ocasionen totes les metodologies basades en material d'un sol ús i, en molts casos tòxic o, com a mínim, no biodegradable. Així mateix, la simplificació de la detecció permetria la descentralització de l'anàlisi i, en conseqüència l'estalvi en el transport i processat de les mostres a un laboratori. Finalment, cal fer constar que es podria augmentar la freqüència de l'anàlisi i fer així estudis de seguiment d'aquests microorganismes.

Els mètodes de detecció tradicionals requereixen períodes d'incubació d'entre 18 a 96 hores i, per tant, fins que no se sàpiguen els resultats hi ha risc d'infecció (Noble and Weisberg 2005). Tradicionalment, la monitorització d'indicadors de contaminació de les aigües s'ha portat a terme mitjançant mètodes de laboratori que, a part de necessitar temps llargs de processament, manquen de sensibilitat i especificitat. A més, requereixen personal especialitzat i usuaris entrenats, fet que pot resultar prohibitiu per a molts dels països amb menys recursos. En el cas dels indicadors fecals, que són els emprats per a la determinació de contaminació bacteriana aquàtica, les tècniques tradicionals consisteixen en la tecnologia basada en microscòpia i cultius cel·lulars (ja sigui en plaques de petri o en medi líquid), els assajos bioquímics, els tests immunològics o les anàlisis genètiques (Ahmed et al. 2014).

La **microscòpia** comprèn la tinció dels bacteris i la posterior observació de la seva morfologia i el seu patró de tinció. És una tècnica relativament ràpida però no totalment específica. Per altra banda, el cultiu bacterià en medi selectiu i a les temperatures idònies del microorganisme permet una major selectivitat però els temps d'incubació s'allarguen unes 24 hores en la majoria dels casos. Per evitar el carregós recompte de colònies també es pot utilitzar l'aproximació del número més probable (NMP) que és aplicable fàcilment amb articles comercials. Però en tot cas, segueix sent necessària la incubació de la mostra. Les cèl·lules detectades forçosament són les viables que hi ha a la mostra que són les que tenen capacitat d'infecció. Així mateix, s'ha de tenir en compte que no tots els bacteris es poden cultivar al laboratori.

Els **assajos bioquímics** inclouen la detecció d'enzims concrets que són específics de certs bacteris. Aquests assajos no permeten distingir entre cèl·lules viables i mortes ja que la funcionalitat dels enzims es pot mantenir durant cert temps intacta malgrat la no viabilitat de la cèl·lula que els conté.

Dins els **tests immunològics** s'inclourien l'ELISA<sup>1</sup>, la versió miniaturitzada que serien els immunobioxips<sup>2</sup> o bioxips de proteïnes, i els assaigs d'aglutinació, en els quals el que es detecta són determinats epítops de la superfície cel·lular mitjançant l'ús d'anticossos. Aquests procediments són llargs i costosos tant pels reactius i equips necessaris com pel personal qualificat que els du a terme. En la majoria d'aquests mètodes no es pot fer distinció de viables ja que els anticossos detectarien els mateixos epítops de la membrana bacteriana tant si la cèl·lula està morta com si és viable.

L'ús de tècniques moleculars com l'**anàlisi genètica** és més recent tot i que ja fa un parell de dècades de la seva popularització. Aquests mètodes permeten una identificació més ràpida de les diferents soques bacterianes però és necessària una lisi cel·lular com a tractament previ perquè el que s'analitza és el material genètic (intracel·lular) i també, normalment, una purificació per extreure les restes cel·lulars. Per tant, no es poden distingir les cèl·lules viables i no viables de la mostra ja que s'han de matar totes per fer-ne l'anàlisi. Dins aquest grup es

---

<sup>1</sup> ELISA: sigles en anglès de *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*.

<sup>2</sup> Bioxip: traducció del terme anglès *microarrays*

troba la PCR<sup>3</sup> que consisteix en una replicació de certes seqüències d'ADN o ARN de la mostra mitjançant l'addició de l'enzim polimerasa d'àcids nucleics (vegeu Figura 1-1). És una tècnica molt sensible que permet identificar els microorganismes en funció de la seva seqüència genètica i no necessita cap cultiu ni enriquiment previ perquè amb una mínima quantitat de material genètic ja es pot donar l'amplificació. El principal problema d'aquest mètode és l'elecció dels encebadors i el seu bon aparellament. Els encebadors són petits oligonucleòtids necessaris per a l'enzim polimerasa per iniciar la replicació de la seqüència. Aquests es polimeritzen sintèticament i s'afegeixen a la mostra. Es dissenyen perquè interaccionin específicament amb la soca bacteriana d'interès. No obstant això, es poden donar interaccions inespecífiques que es traduirien en falsos positius. També, es podria donar el cas que el bacteri diana just patís una petita mutació en la regió d'interacció de l'encebador i que, per tant, no es donés hibridació entre la seqüència i l'encebador, és a dir, un fals negatiu. Finalment, cal constatar que es tracta d'un procediment car i que en alguns casos pot durar dies. Per altra banda, la RT-PCR (PCR en temps real) pot assolir resultats en escasses hores però també es necessita equipament especialitzat. Els bioxips d'ADN també s'utilitzen amb el mateix objectiu però, en aquest cas, amb un de sol es poden analitzar milers de microorganismes a la vegada. Però el principal desavantatge és que necessiten igualment una PCR prèvia i l'escaneig dels bioxips s'ha de dur a terme amb escàners especials i costosos.

---

<sup>3</sup> PCR: sigles en anglès de la Reacció en Cadena per la Polimerasa

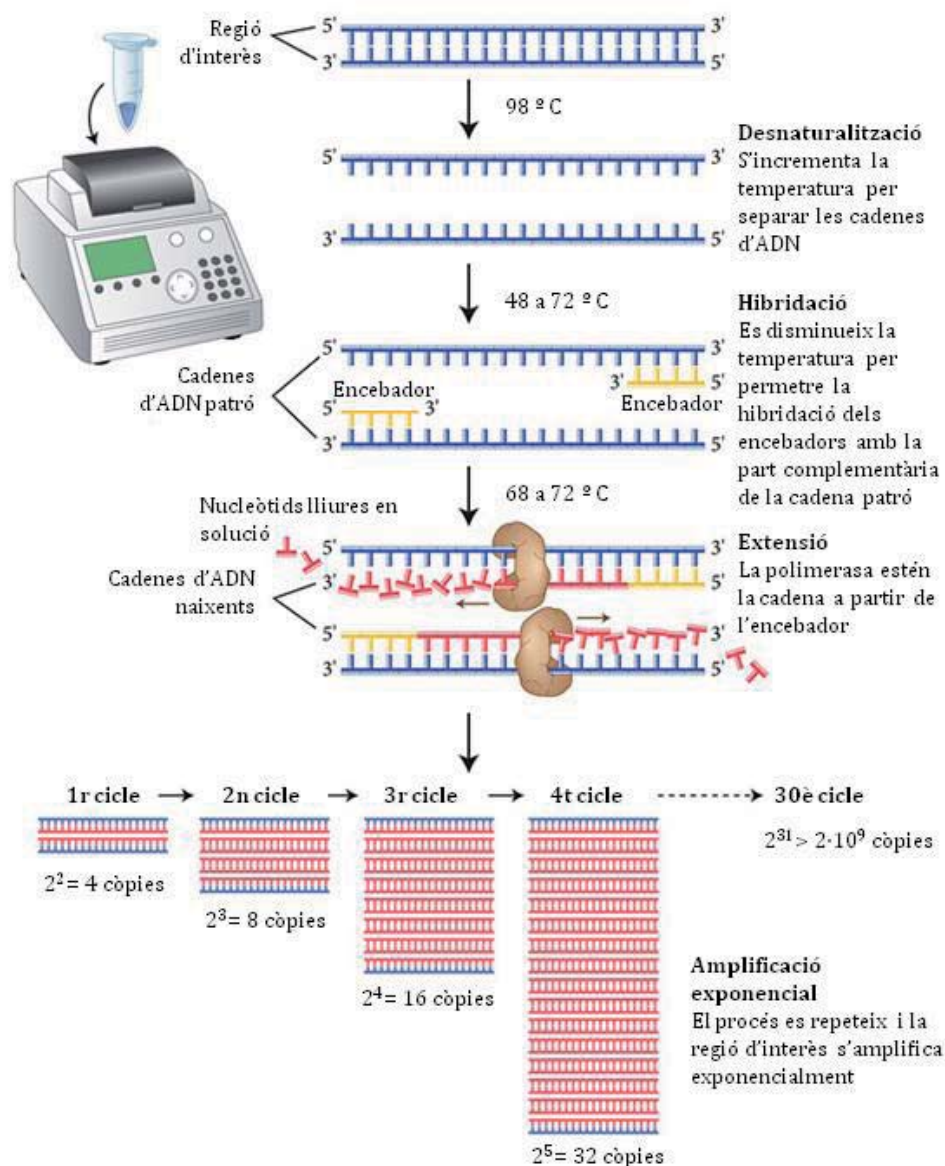


Figura 1-1: Representació gràfica del procés d'una PCR. Basat en esquema de New England Biolabs, Inc. (New England Biolabs 2016)

Hi ha altres tècniques que s'han usat per a detecció de microorganismes de manera més marginal a causa de les seves limitacions, com les mesures amb **rajos infrarojos (RI)** i **l'espectrometria de masses (EM)**. En el primer cas, s'obtenen els espectres d'absorbància a aquestes longituds d'ona. El principal problema és que a nivell molecular, moltes vegades, no es pot distingir la composició química dels bacteris respecte del medi en què es troben. L'EM s'ha usat per detectar *B. anthracis* però no és una tècnica sensible i, a més, un espectrofotòmetre de masses és un aparell car i no és portable (Ferguson et al. 2004).



Finalment, es podria destacar la **citometria de flux** com una de les tècniques més interessants i més usades actualment. En aquest mètode les cèl·lules d'interès es tenyeixen amb un fluorofor i s'injecten dins un flux que les envolta perquè se situïn al centre. Les cèl·lules de la mostra s'acceleren i es fan passar individualment a través d'un raig de llum làser. Quan les cèl·lules travessen el feix de llum, una part d'aquesta llum incident queda absorbida i una altra part reflectida. Aquesta llum dispersada a causa de la interacció entre cèl·lula i feix làser es capta i es dirigeix per una lent cap als detectors òptics. Els detectors tradueixen en senyal elèctric aquesta llum rebuda i, per tant, el resultat final és un senyal que dóna informació sobre la mida, forma i estructura cel·lulars. Per altra banda, les cèl·lules marcades amb fluorofor emeten fluorescència. Així es poden distingir les cèl·lules específiques que es volien detectar de la resta que també es trobin presents a la mostra (vegeu Figura 1-2). La tècnica de citometria de flux és molt pràctica per al comptatge bacterià tant en l'àmbit clínic com mediambiental o fins i tot per a la indústria biotecnològica. A més, actualment s'estan millorant els equips per aquest tipus de metodologia però, tot i així, la majoria segueixen tenint un cost i unes despeses de manteniment alts (Shabani et al. 2015).

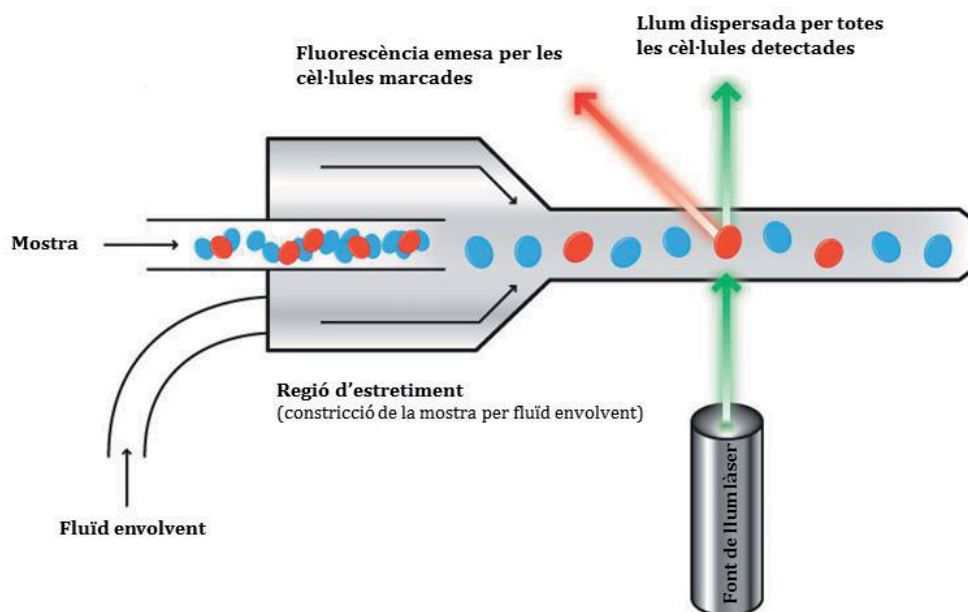


Figura 1-2: Esquema de funcionament simplificat d'un dispositiu de citometria de flux. Basat en figura de web de la Universitat d' Alberta, Canada (Burshtyn, Rieger, and Kratochwil-Otto 2015).

Com a conclusió, es pot observar com és de difícil ajustar cap d'aquestes tècniques al sistema ideal de detecció que es plantejava en un inici. En la majoria dels casos es necessita una preparació de la mostra i, per tant, és complicat que les mesures es puguin fer en temps real. A

més a més, també hi ha moltes metodologies que requereixen un marcador, és a dir, un indicador o etiquetat que s'uneixi al microorganisme o a la part que se n'analitza (ADN o enzim/proteïna concreta) i que permeti visualitzar-lo sense que interfereixi al sistema (Nič et al. 2009). En altres casos, també es necessita de l'addició de reactius. I, majoritàriament, el personal que pot realitzar-ho ha de ser especialitzat (vegeu resum a la Taula 1-1).

Mètodes convencionals	Marcador	Reactius	Temps	Personal preparat	Comptatge de viables	Equipament car i/o voluminós	En continu	Generació de residus	Especificitat
Microscòpia	+	+/-	< 6 h	+	+/-	-	-	+/-	-
Cultiu en medi selectiu	-	-	> 18 h	+	+	+	-	+	+/-
Assajos bioquímics	-	+	< 6 h	+	-	+	-	+/-	+/-
Tests immunològics: ELISA, immunobioxips, t. aglutinació	+	+	< 6 h	+/-	-	+/-	-	+	+
PCR	+	+	> 24 h	+	-	+	-	+	+
RT-PCR	+	+	< 6 h	+	-	+	-	+	+
Bioxips d'ADN	+	+	< 6 h	+	-	+	-	+	+
IR	-	-	< 6 h	+	+/-	+	+	-	-
EM	-	+	< 6 h	+	+/-	+	-	+	-
Citometria de flux	+	+	< 1 h	+	+/-	+	+	+/-	+/-

Taula 1-1: Anàlisi dels requeriments de les diferents tècniques de detecció de microorganismes. Els requeriments marcats amb el símbol "+" són necessaris per aquest tipus de tècnica i els "-" no ho són. Els casos en què es troben ambdós símbols és perquè la mateixa tècnica té variants i es pot portar a terme amb l'aplicació o no d'aquest requeriment. Marcats en color vermell hi ha els símbols que suposen un avantatge en cada cas.

A partir d'aquest context, té sentit el plantejar-se l'ús de biosensors per assolir l'objectiu de detectar bacteris en medis aquosos. Els biosensors són dispositius que integren un element biològic de reconeixement, el bioreceptor (per exemple, enzims, anticossos, ADN, aptòmers o microorganismes), immobilitzat en íntim contacte amb un transductor físic (elèctric, òptic, tèrmic o mecànic). El bioreceptor reconeix específicament l'anàlit o anàlits d'interès de la mostra i aquesta interacció biològica es transforma mitjançant el transductor en un senyal proporcional a la concentració de l'anàlit (Lagarde and Jaffrezic-Renault 2011).

Els biosensors es caracteritzen per ser senzills d'utilitzar i per no requerir grans equips per realitzar-ne les mesures. A més a més, són fàcils d'integrar a sistemes de flux i els resultats es poden obtenir de manera instantània. Per tant, serien idonis per assolir unes mesures a temps real.

## 2. Biosensors per detecció bacteriana

Els biosensors es poden classificar segons el tipus de transducció en què es basin. A la literatura s'observa que els que s'han utilitzat més per a detecció de microorganismes són els basats en transducció òptica, mecànica i elèctrica. A continuació s'analitzen aquests tres tipus de biosensors.

### 2.1. Biosensors òptics

Els transductors dels sensors òptics permeten mesurar les variacions de les propietats de la llum quan es produeix la interacció de l'anàlit amb el bioreceptor. Aquestes variacions, en funció del tipus de transductor, es poden detectar en els diferents paràmetres de la llum: intensitat, fase, polarització o longitud d'ona. Per tant, es pot parlar de sensors basats en diferents tècniques com l'absorció, la luminescència, l'espectroscòpia de Raman o l'índex de refracció (Dante 2014).

Segons el protocol de detecció, aquest tipus de biosensors es divideix en els basats en fluorescència i en els que no necessiten marcatge amb fluorocrom. Els darrers, com es comentava anteriorment, són més atractius ja que, tot i que els fluorimètrics són molt sensibles, el procés de marcatge és laboriós i fa que augmenti la complexitat del sistema. En

canvi, en els casos en que es prescindeix de marcatge, els bacteris es poden detectar en la seva forma natural. Dins d'aquest grup, els biosensors òptics que estan tenint més èxit actualment són els basats en l'índex de refracció: els sensors de camp o ona evanescent.

L'exemple més popular d'aquest tipus de biosensors són els basats en el mètode de **Ressonància de Plasmó Superficial** (RPS). Aquests es basen en la detecció de la variació dels diferents paràmetres del feix de llum que es reflecteix. Aquest canvi és directament proporcional a la quantitat d'anàlit que interacciona amb el receptor. La superfície d'aquests sensors està formada per una fina capa de metall, normalment, d'or. Aquesta superfície es modifica per immobilitzar les biomolècules d'unió. El fenomen de ressonància de plasmó s'assoleix fent incidir un feix de fotons que queda retingut a la superfície, concretament a la interfície metall-aigua (medi de mesura dels bacteris). El bioreconeixement del bacteri a la superfície del sensor es dona a la fase aquosa d'aquesta interfície. Per tant, quan succeeix aquesta interacció, varia l'índex de refracció d'aquest medi i, aquest fet, provoca un canvi en l'índex de refracció efectiu d'aquest camp evanescent. Aquestes variacions que es registren donen informació sobre la unió dels bacteris a la superfície (vegeu Figura 1-3).

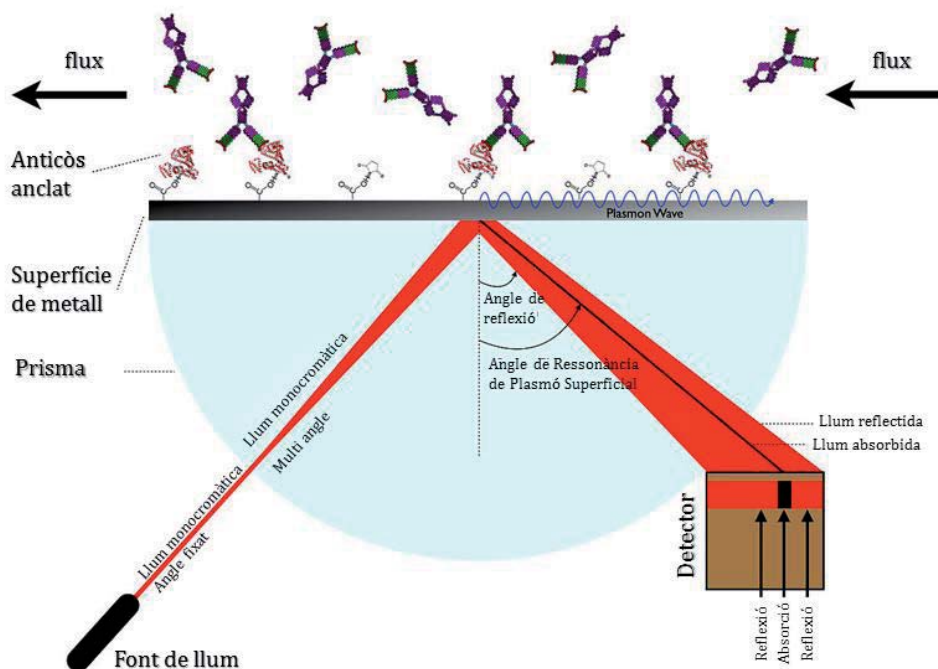


Figura 1-3: Esquema de funcionament d'un sistema RPS. Basat en figura de S. Sabban (Sabban, Ye, and Helm 2013).

El problema principal d'aquesta tècnica recau en què l'equipament que necessita està format per components òptics i electrònics molt fràgils (làsers, fotodíodes, amplificadors o lents) que estan calibrats sota unes condicions específiques. (Berbel 2008). Tot i així, s'ha de dir que hi ha molts treballs en què s'ha utilitzat aquesta tecnologia per a detectar bacteris i que, en alguns d'ells, s'ha reeixit en aconseguir límits de detecció inferiors a 10 cfu/mL (Torun et al. 2012).

### 2.2. Biosensors mecànics

En general, els sensors mecànics consisteixen en una superfície de transducció piezoelèctrica on s'immobilitzen els elements de reconeixement que uniran el bacteri. Quan es dona la unió del bacteri amb el receptor, la massa en aquesta superfície augmenta, fet que es tradueix en una variació de la freqüència de ressonància. El material més emprat per aquest tipus de biosensors és el quarz que és un material car, tot i que també poden ser d'altres materials més econòmics com el silici. El principal avantatge és que no es necessita cap marcador, tot i que es pot utilitzar per amplificar el senyal. No obstant, pel cas concret de la detecció bacteriana en medi aquàtic, cal esmentar un desavantatge important que és la limitació de treballar en medi aquós ja que el medi òptim d'operació d'aquests sensors és l'aire (Longo et al. 2013).

### 2.3. Biosensors elèctrics

Aquests biosensors en la majoria dels casos també vénen referenciats com a electroquímics més que no pas elèctrics. El motiu d'aquest canvi proposat en la seva nomenclatura és a causa que alguns d'ells incompleixen els requisits bàsics per anomenar-se electroquímics. Concretament, els que fan referència als utilitzats en aquest treball: els basats en impedància no faradaica. Per tant, dins dels biosensors elèctrics es pot parlar dels sensors electroquímics i dels basats en impedància no electroquímica.

Els biosensors electroquímics utilitzen les tècniques electroquímiques basades en l'estudi dels fenòmens interfacials mesurant la diferència de potencial elèctric (volts) i/o corrent elèctric (ampers) després d'haver aplicat un potencial o corrent. És a dir que els canvis que s'analitzen

són els que tenen lloc a la regió més immediatament propera a la superfície de l'elèctrode de treball, a la interfície.

En el cas concret de la detecció bacteriana, els biosensors electroquímics més usats són els potenciomètrics i els voltamperomètrics.

Els **biosensors potenciomètrics** necessiten dos elèctrodes per mesurar la diferència de potencial entre ambdós de manera passiva, és a dir, sense aplicar cap corrent. Un elèctrode és el de referència que té un potencial constant i l'altre és l'indicador que és el que està modificat per ser selectiu a l'anàlit de mesura. Usualment, els anàlits que es detecten amb aquests sensors són diferent tipus de ions (Gründler 2007). Per tant, aquests dispositius no permeten una mesura directa dels bacteris sinó indirecta a través de la mesura de ions. La concentració d'aquests ions informa indirectament de la concentració bacteriana ja sigui perquè s'obtenen com a producte del seu metabolisme o a causa d'un marcador enzimàtic. Existeix bibliografia, però no gaire extensa, relativa a sensors potenciomètrics per a la detecció de diferents tipus de bacteris com bacteris marins patogènics (Wan, Zhang, and Hou 2010), *Staphylococcus aureus* (Zelada-Guillén et al. 2012) o *Escherichia coli* (Ercole et al. 2002; Gehring, Patterson, and Tu 1998).

Els **biosensors voltamperomètrics** amb més aplicació dins l'àmbit bacterià són els amperomètrics. Aquesta metodologia requereix un sistema de tres elèctrodes: el de treball, l'auxiliar i el de referència. En aquest cas, activament s'aplica un potencial constant que provoca l'oxidació o la reducció d'una espècie electroactiva. Amb l'elèctrode de treball es mesura la intensitat de corrent resultant de la reacció redox que s'està donant a la superfície d'aquest elèctrode. És a dir que a l'elèctrode de treball és on té lloc la reacció d'interès i sobre el qual es mesura el pas de corrent. L'elèctrode auxiliar s'utilitza per tancar el circuit elèctric i és l'elèctrode que aplica el potencial constant mitjançant un potenciòstat. Amb l'elèctrode de referència es mesura la diferència de potencial entre la solució i l'elèctrode de treball, i permet al circuit del potenciòstat mantenir aquest potencial constant i del valor desitjat (Wang 2006).

Un dels problemes principals d'aquesta tècnica és que l'ús de potencials elevats pot provocar l'oxidació inespecífica dels components biològics de la mostra. Per tant, el més usual és

utilitzar potencials baixos propers a 0 V i afegir una espècie electroactiva que sigui la que reaccioni a aquests potencials. Mitjançant diferents estratègies es pot aconseguir que la intensitat de corrent registrada, a causa de la reacció de l'espècie electroactiva afegida, doni informació sobre la concentració de bacteris a la mostra (Kim et al. 2006). Com a alternativa, també és freqüent l'ús de marcadors enzimàtics com la peroxidasa (Laczka et al. 2011), la fosfatasa alcalina (Gehring et al. 1996) o la glucosa oxidasa (Wang 2001) que catalitzen reaccions redox i que, per tant, generen transferència d'electrons. En tot cas, es pot constatar com és necessari l'ús de marcadors o de l'addició de reactius (espècie electroactiva) per dur a terme la mesura. Aquest fet complica el sistema i fa que aquest tipus de biosensors s'allunyi del concepte de detector ideal que s'ha plantejat a l'inici del treball.

Per altra banda, cal parlar dels **biosensors basats en impedància (o biosensors impedimètrics)**. Quan el que es té és un sistema de dos elèctrodes submergits en un electròlit, en aplicar un voltatge sinusoidal entre ambdós elèctrodes i mesurar el corrent s'obté un valor d'impedància. Aquesta impedància correspon a l'impediment del pas del corrent entre ambdós elèctrodes ocasionat per l'electròlit y per les molècules, partícules, micro-organismes o qualsevol altre element que hi hagi a sobre i entre els elèctrodes.

La impedància entre elèctrodes es pot mesurar en presència d'espècies electroactives o en la seva absència. Per tant, es poden distingir dos tipus de tècniques impedimètriques: la **faradaica o electroquímica** i la **no faradaica o no electroquímica**, respectivament (Yang, Li, and Erf 2004).

Hi ha una extensa bibliografia referida al desenvolupament de biosensors que utilitzen la impedància faradaica per a detecció de bacteris. Tot i que els autors parlen de sistemes sense ús de marcador, cal constatar que en tots els casos s'hi ha d'afegir una espècie electroactiva a la solució electroactiva (com per exemple el  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ) per obtenir una transferència d'electrons.. A la superfície dels elèctrodes s'hi immobilitza l'element de reconeixement dels bacteris, normalment un anticòs. En la presència de bacteris a la mostra, aquests s'uneixen específicament i bloquegen la superfície i, en conseqüència, en dificulten la transferència de càrrega. El resultat d'aquest bloqueig es tradueix en un augment de la resistència de transferència de càrrega ( $R_{tc}$ ) (Barreiros dos Santos et al. 2015; Ruan, Yang, and Li 2002).

A la secció 4 s'aprofundirà en l'estat de la qüestió de la detecció bacteriana mitjançant l'ús de biosensors d'impedància no faradaica.

L'avantatge comú d'ambdós tipus de tècniques impedimètriques és que es pot prescindir d'un elèctrode de referència, cosa que no es pot dir dels sensors potenciomètrics ni voltamperomètrics. Tot i així, en el cas de la impedància faradaica és necessari afegir una espècie electroactiva. Per tant, es pot concloure que és aquest el principal desavantatge de les tècniques electroquímiques. A més, cal remarcar que aquestes tècniques tampoc són específiques de cèl·lules viables ja que, com es definia en un inici, amb els mètodes electroquímics només s'estudien els fenòmens que succeeixen a la zona interfacial, no a la resta de volum més llunyà de l'elèctrode. Per altra banda, la impedància no electroquímica permet la detecció directa sense la necessitat d'afegir cap reactiu addicional.

La Taula 1-2 mostra un resum dels avantatges i inconvenients esmentats dels diferents tipus de biosensors.



Tipus de biosensors		Avantatges	Desavantatges	
Òptics (RPS)		<ul style="list-style-type: none"> <li>- No marcadors</li> <li>- Detecció directa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Components fràgils</li> </ul>	
Mecànics		<ul style="list-style-type: none"> <li>- No marcadors</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mesures òptimes en sec</li> </ul>	
Elèctrics	Electroquímics	Potenciomètrics	<ul style="list-style-type: none"> <li>- No marcadors</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Elèctrode de referència</li> <li>- Mesures bacterianes indirectes (ions)</li> <li>- No distinció de viables</li> </ul>
		Voltamperomètrics	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Versatilitat en geometries dels transductors</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Elèctrode de referència</li> <li>- Ús d'espècie electroactiva o marcador</li> <li>- No distinció de viables</li> </ul>
		Impedimètrics faradaics	<ul style="list-style-type: none"> <li>- No elèctrode de referència</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ús d'espècie electroactiva</li> <li>- No distinció de viables</li> </ul>
	Impedimètrics no faradaics		<ul style="list-style-type: none"> <li>- No elèctrode de referència</li> <li>- No marcadors</li> <li>- Detecció directa</li> <li>- Possibilitat de distinció de viables</li> </ul>	

Taula 1-2: Resum d'avantatges i desavantatges dels diferents biosensors descrits en aquest apartat.

### 3. Introducció a la impedància elèctrica: desxifrant aquesta tècnica *complexa*

Tant pel cas dels biosensors impedimètrics faradaics com pels no faradaics, per realitzar les mesures s'aplica un potencial en corrent altern (CA) i s'obté una intensitat de corrent. El valor de la impedància s'obté d'aplicar la llei d'Ohm (fórmula 1.1). On  $V$  és el voltatge (o potencial) mesurat en volts (V),  $I$  corrent mesurat en amperes (A) i  $Z$  la impedància mesurada en ohms ( $\Omega$ ):

---

1.1.  $Z = \frac{V}{I}$

El fet de treballar en CA implica que tant el voltatge com el corrent són senyals sinusoidals i, en conseqüència, la impedància obtinguda també ho és. Es parla doncs, de magnituds que tenen una amplitud i una fase variant. L'eina matemàtica més pràctica a l'hora de treballar amb senyals de tipus sinusoidal són els números complexos. Per aquest motiu, quan es fa referència a la impedància, aquesta sempre ve representada amb part real i imaginària.

### 3.1. Aplicant un voltatge, mesurant una intensitat de corrent

Experimentalment, la impedància es pot mesurar aplicant un potencial en CA o una intensitat de corrent en CA i mesurant l'altra variable. Normalment s'utilitza un analitzador d'impedàncies per fer aquest tipus de mesures.

La Figura 1-4 mostra la diferència entre voltatge i intensitat en funció de la seva amplitud i fase. Aquesta representació gràfica, matemàticament ve definida per les funcions 1.2 i 1.3 on  $\omega$  és la freqüència angular del senyal sinusoidal,  $t$  el temps i  $\varphi$  la fase o desfasament entre senyals:

1.2.  $v = V \sin (\omega t)$

1.3.  $i = I \sin (\omega t + \varphi)$

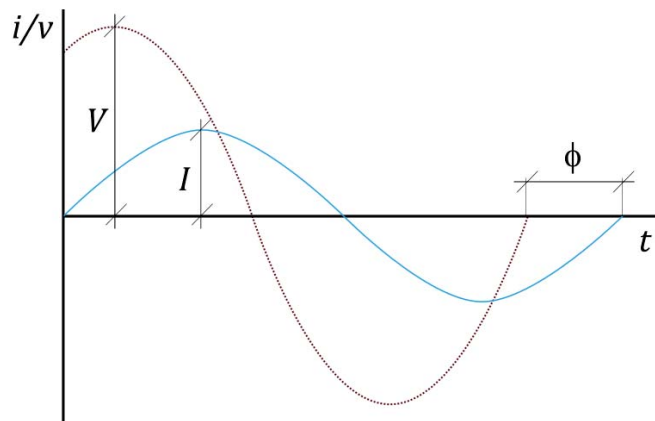


Figura 1-4: Representació sinusoïdal de la relació entre voltatge i intensitat de corrent en CA. On  $V$  i  $I$  són les amplituds del voltatge i la intensitat respectivament, i la  $\varphi$  representa el desfasament entre les magnituds.

Per tant, com s'explicava anteriorment, la impedància es calcula aplicant la llei d'Ohm (vegeu fórmula 1.1), i per tant, la impedància  $Z(\omega)$  té una magnitud o mòdul equivalent al valor de  $V/I$  i un desfasament o fase de  $\varphi$ . Per altra banda, també es pot representar en nombres complexos (vegeu fórmules 1.4 i 1.5).

$$1.4. \quad \text{Real}(Z) = \frac{V}{I} \cos \varphi$$

$$1.5. \quad \text{Imaginària}(Z) = \frac{V}{I} \sin \varphi$$

L'espectroscòpia d'impedància consisteix en repetir el procés de mesura per diferents freqüències obtenint així un espectre d'impedàncies  $Z(\omega)$ .

En el camp dels biosensors d'impedància el voltatge que s'aplica és d'amplitud reduïda, normalment 10 mV, bàsicament pels dos motius que es detallen a continuació. Primerament, perquè la relació entre voltatge i intensitat normalment només és lineal per pertorbacions petites i, en conseqüència, només en aquesta situació de linearitat, la impedància es pot calcular utilitzant la llei d'Ohm. L'altre motiu és per evitar el dany a les molècules presents a la superfície de l'elèctrode (als anticossos o als bacteris mateix) (Daniels and Pourmand 2007).

Hi ha variacions sobre l'espectroscòpia d'impedància clàssica com, per exemple, l'excitació simultània a múltiples freqüències, que permeten disminuir el temps de mesures però es pot comprometre la relació lineal entre voltatge i corrent (Garland, Pettit, and Roy 2004).

### 3.2. Impedància complexa: Resistències i reactàncies

Quan el potencial i el corrent es troben en fase, és a dir que  $\varphi$  és 0, ens trobem en el cas en que la impedància és purament **real**. En aquests casos, la impedància que es mesura és una **resistència (R)** i el seu valor deriva de l'equació 1.6 en unitats d' $\Omega$ .

$$1.6. \quad R = \frac{V}{I}$$

Per altra banda, quan la fase no és zero, és a dir, quan hi ha un desfasament entre intensitat i voltatge, es parla de component de **reactància (X)**. La reactància és la impedància **imaginària** i com a tal té unitats d'Ohm. Per tant, la impedància complexa s'expressa com es mostra a l'equació 1.7 on  $j$  és  $\sqrt{-1}$  i indica el terme imaginari del número complex.

$$1.7. \quad Z = R + jX$$

Hi ha dos tipus de reactàncies: la capacitiva ( $X_C$ ) i l'inductiva ( $X_L$ ). Quan  $X < 0$  la reactància és capacitiva i quan  $X > 0$  la reactància és inductiva.

Quan es parla d'un circuit elèctric, la impedància introduïda per un **condensador** és una reactància capacitiva de  $\varphi = -90^\circ$  i el seu mòdul deriva de l'equació 1.8 (on  $f$  és la freqüència en Hertz i  $C$  la capacitat en farads).

$$1.8. \quad X_C = \frac{1}{\omega C} = \frac{1}{2\pi f C}$$

En canvi, si en aquest circuit elèctric el que es té és una **bobina**, la seva impedància és una reactància inductiva de  $\varphi = 90^\circ$  i mòdul derivat de l'equació 1.9 (on  $L$  és la bobina en henrys).

$$1.9. \quad X_L = \omega L = 2\pi f L$$

Les dues gràfiques més esteses a l'hora de representar la impedància són el diagrama de Bode i el diagrama de Nyquist. En el primer cas es representen per separat el mòdul de la impedància i la seva fase en funció de la freqüència. En canvi, al diagrama de Nyquist es representa la impedància imaginària en funció de la real. La Figura 1-5 mostra aquestes representacions per una resistència de 1000  $\Omega$ . I per altra banda, la Figura 1-6 i la Figura 1-7 mostren ambdós diagrames per un condensador de 1 nF i una bobina de 0.1 H respectivament.

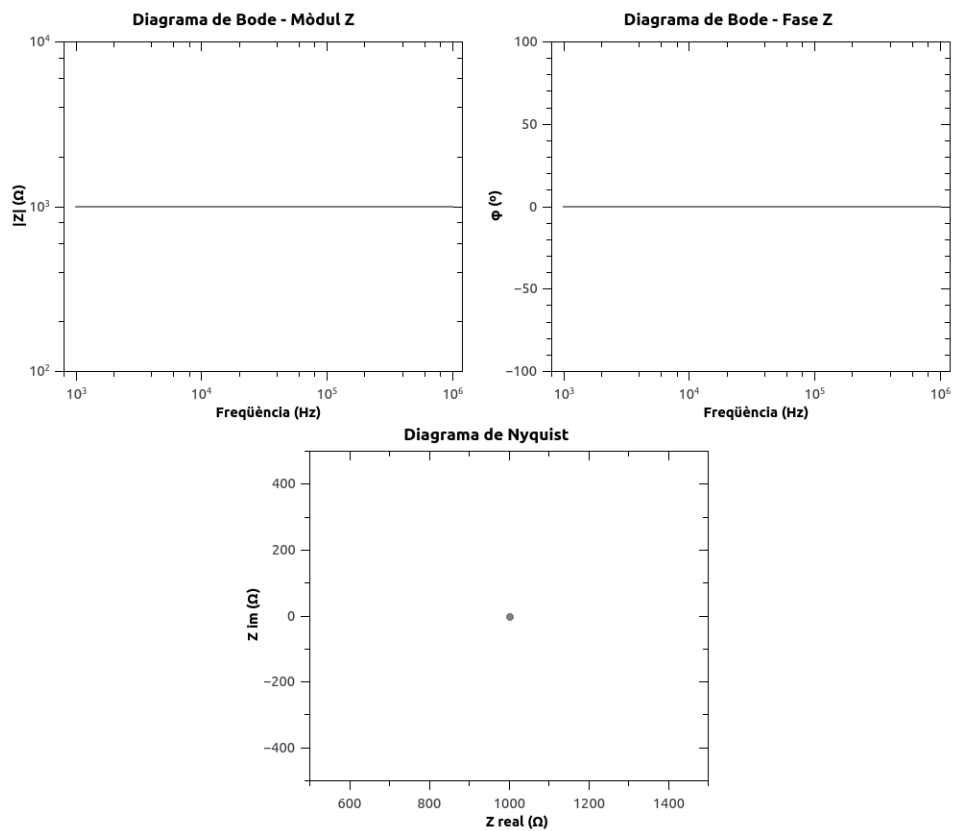


Figura 1-5: Representació gràfica de la impedància causada per una resistència de 1000  $\Omega$ .

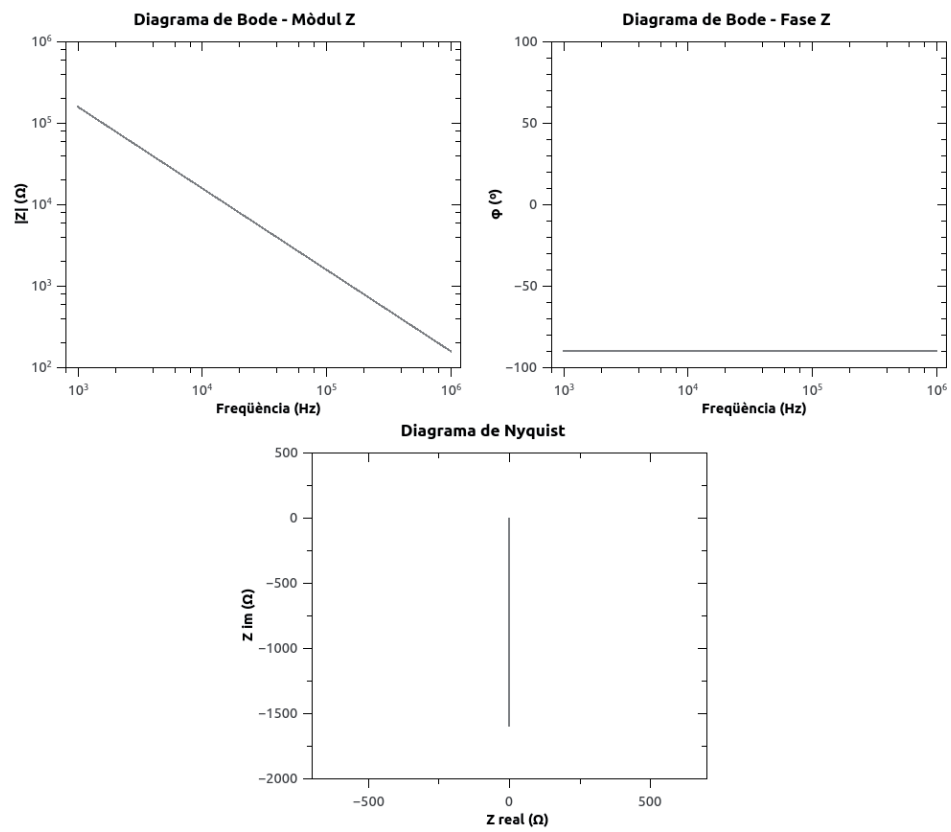


Figura 1-6: Representació gràfica de la impedància causada per un condensador d'1 nF.

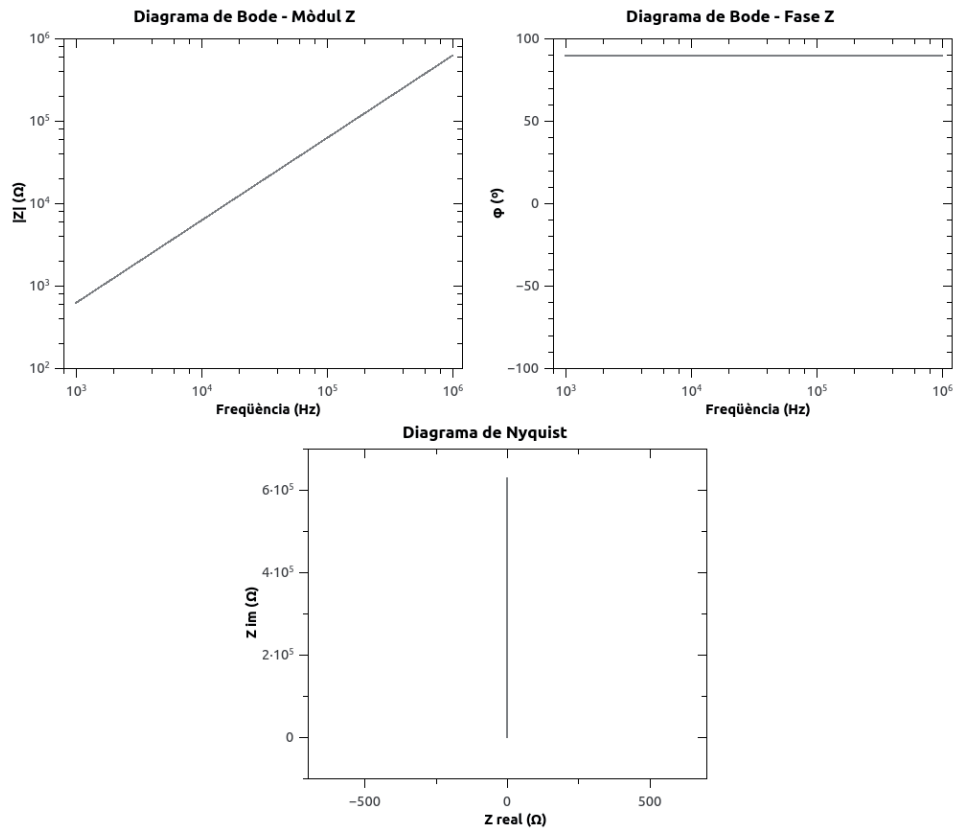


Figura 1-7: Representació gràfica de la impedància causada per una bobina de 0.1 H.

A continuació, la Taula 1-3 presenta un resum de tota la teoria sobre impedància explicada fins aquest punt.

<b>Impedància (Z)</b> $Z = R + jX$  <b>S'obté de llei d'Ohm:</b> $Z = \frac{V}{I}$	Real	Resistència (R) $\varphi=0$	$R = \frac{V}{I} \sin \omega t$	
	Imaginària	Reactància (X) $\varphi \neq 0$	Capacitiva ( $X_C$ ) $X < 0$	$X_C = \frac{1}{\omega C}$
Inductiva ( $X_L$ ) $X > 0$			$X_L = \omega L$	

Taula 1-3: Esquema resum de la teoria bàsica d'impedància. Totes les impedàncies tenen unitats d'Ohm,  $\varphi$  és el desfasament o fase entre potencial i intensitat,  $\omega$  és la freqüència angular del senyal sinusoidal de la impedància,  $C$  és la capacitat amb unitats de farads i  $L$  la inductància amb unitats de henrys.

### 3.3. Ajustament de circuits elèctrics equivalents (CEE) al senyal experimental

Per simplificar la interpretació de les dades en les mesures impedimètriques s'utilitzen els anomenats **circuits elèctrics equivalents** (vegeu la Figura 1-8). Per a cada tipus d'anàlisi es plantegen models de circuits diferents que pretenen explicar els fenòmens elèctrics i/o electroquímics que es donen durant la mesura d'impedància amb components elèctrics discrets. Per exemple, en absència d'espècies electroactives, les càrregues no poden travessar la interfície elèctrode/electròlit i per tant, aquesta interfície té un comportament similar al d'una **capacitat**.

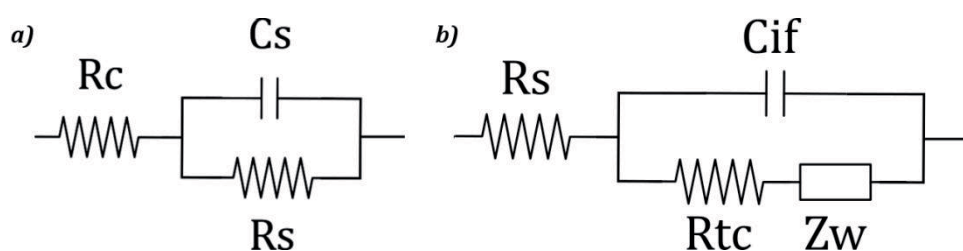


Figura 1-8: Exemples de models de circuits equivalents per interfícies no faradaïques (a) i faradaïques (b). Basada en figura de J. Daniels (Daniels and Pourmand 2007).

En el cas de la impedància faradaica, en afegir una espècie electroactiva (com per exemple el  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ) es pot considerar el fenomen de la **resistència de transferència de càrrega** a la superfície de l'elèctrode ( $R_{tc}$ ) i de la seva difusió fins a la superfície, anomenada **impedància de Warburg ( $Z_w$ )**



Per poder fer l'ajustament, prèviament s'ha d'haver escollit un CEE que servirà per extreure valors discrets de resistències i capacitats. No hi ha un únic model si no que cadascú planteja la hipòtesi que creu més adient en funció del sistema mesurat. L'explicació que es dóna a l'hora de justificar un CEE deriva de l'anàlisi del comportament fisicoquímic del sistema (Randles 1947).

Per fer l'ajustament, s'utilitza el **mètode dels mínims quadrats** per números complexos i tendència no linear. Aquesta és una tècnica d'estimació paramètrica que consisteix en la minimització de la suma del quadrat dels errors respecte del model de senyal assumit (Mateu Martínez and Corbella Sanahuja 2007). Hi ha diferents paquets de programari que permeten l'ajustament per aquest mètode. Un exemple seria el paquet comercial *Zview* (Scribner Associates Inc., Southern Pines, EUA) que és l'usat en aquest treball.

En funció de la freqüència del voltatge aplicat, la impedància que predomina es deu a un fenomen o un altre. Per exemple, en el cas de la impedància no faradaica, a freqüències baixes, la **capacitat de la interfície** elèctrode/electròlit ( $C_{if}$ ) és la que impedeix més el pas de corrent, per tant, és la impedància predominant. En canvi, a freqüències més altes hi predomina la **resistència de la solució** ( $R_s$ ). A part, cal afegir que, depenent de la geometria dels elèctrodes, a freqüències més altes es poden mesurar altres fenòmens com la **capacitat de la solució** ( $C_s$ ) (vegeu la Figura 1-9).

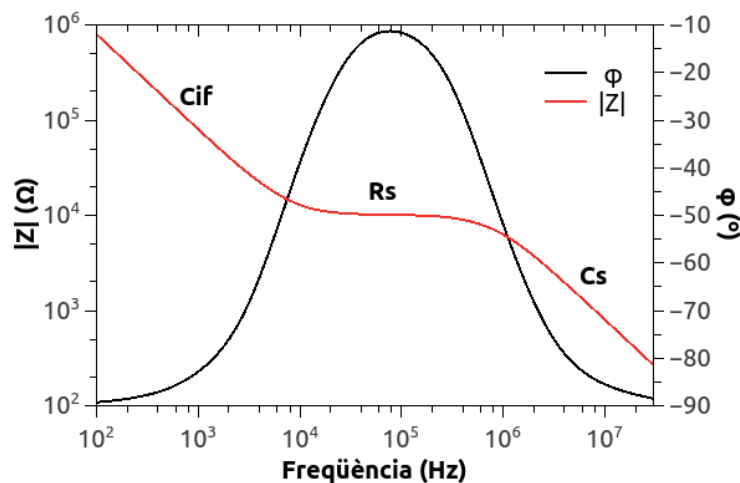


Figura 1-9: Diagrama de Bode on es representa la resposta impedimètrica d'un sistema amb una impedància interfacial corresponent a una  $C_{if}$  de  $10^{-10}$  F que apareix a les freqüències baixes ( $< 10^4$  Hz); una  $R_s$  de  $10^6$  Ω que apareix a les freqüències intermèdies ( $10^4$  a  $10^6$  Hz); i una  $C_s$  de  $3 \cdot 10^{-12}$  F que apareix a les freqüències més altes ( $> 10^6$  Hz).

Però cal dir que tal com diferents autors discuteixen, massa sovint, interpretar els espectres d'impedància és més un art que una ciència (Dominguez-Benetton et al. 2012; Orazem, Agarwal, and Garcia-Rubio 1994).

Experimentalment, és freqüent trobar-se que la mesura d'elèctrodes en solució dóna una resposta que es desvia del que seria una capacitat pura. La major part de la literatura assenjala com a causa d'aquesta desviació la rugositat de la superfície dels elèctrodes. En aquests casos, s'usa un nou component elèctric anomenat **l'element de fase constant** (CPE de les seves sigles en anglès).

### 3.4. CPE: el comodí perfecte per ajustar al nostre CEE?

Matemàticament, la CPE es descriu amb la següent equació 1.10 on  $\alpha$  i  $Q$  són constants independents de la freqüència:

$$1.10. \quad Z_{CPE} = \frac{1}{(j\omega)^{\alpha} Q}$$

El paràmetre  $\alpha$  està relacionat amb la  $\phi$ . Per  $\alpha = 1$ , la constant  $Q$  representaria una **capacitat pura** (superfície totalment llisa). Per  $\alpha = 0$  s'obtidria la impedància d'una **resistència**. I,

finalment, per  $\alpha = -1$  es parlaria d'una **reactància inductiva**. Pels valors entremetjats es tindria un comportament que no correspon a cap component elèctric discret, però que representa de manera acceptable el d'un elèctrode rugós en solució.

La CPE té unitats de  $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-(1-\alpha)}$  o  $\text{F s}^{(\alpha-1)} \text{cm}^{-2}$ , és a dir, que les seves unitats depenen del paràmetre  $\alpha$ . Com que  $\alpha$  canvia d'ajustament en ajustament, si es vol operar amb les CPE s'ha de tenir molt en compte de fixar el paràmetre  $\alpha$ . Per exemple, és un error comú fer increments de CPE ( $\text{CPE}_{\text{final}} - \text{CPE}_{\text{inicial}}$ ) partint de CPEs de diferents ajustaments amb  $\alpha$  diferents. Aquest procedir és matemàticament incorrecte perquè seria equiparable a restar unitats de longitud (m) a unitats de superfície ( $\text{m}^2$ ). Un altre error típic és definir la CPE amb valors de capacitat (farads) en casos en que  $\alpha \neq 1$  (Dominguez-Benetton et al. 2012).

Per tant, a l'hora de treballar amb CPE és necessari tenir en compte aquests factors i ser rigorós en el seu ús.

## 4. Detecció de bacteris mitjançant biosensors d'impedància no faradaica: estat de la qüestió

### 4.1. Mètodes de detecció

El mètode més simple per la quantificació bacteriana és la **monitorització** del seu **creixement**. Com a conseqüència del metabolisme de les cèl·lules vives, s'alliberen metabòlits iònics que augmenten la **conductivitat del medi** i, per tant, es pot mesurar un decrement en la impedància.

Els sistemes impedimètrics comercials existents es basen en aquest principi. En són exemples Bactometer® de Biomerieux (Cadi and Welch 1973), Bactrac® de Sy-Lab (SY-LAB Geräte GmbH 2016) i RABIT® de Don Whitley Scientific (Don Whitley Scientific Limite 2016).

No obstant, tot i que aquestes tècniques basades en el creixement bacterià són fiables i permeten la detecció de les cèl·lules viables, no són específiques i es necessiten temps llargs d'incubació, sobretot si es parteix d'una mostra poc concentrada (Shabani et al. 2015).

Per altra banda, la majoria de biosensors impedimètrics que es troben a la literatura estan basats en les propietats d'**aïllant elèctric** que té la **membrana cel·lular**.

Dins d'aquests, el més comú és mesurar el **bloqueig a la interfície**. Aquest bloqueig es dona a mida que augmenta la cobertura de la superfície d'elèctrodes per cèl·lules. Quan la interfície queda bloquejada per membrana cel·lular, la impedància en aquesta regió va augmentant proporcionalment fins al punt de saturació (Radke and Alocilja 2005). Aquestes mesures es realitzen a freqüències baixes i, quan s'analitzen mitjançant CEE, el paràmetre que s'estudia és la  $C_{if}$ .

Per altra banda, una altra aproximació és la detecció dels canvis en impedància produïts pels bacteris en el **volum més proper** a la superfície dels elèctrodes però més enllà de la interfície (de la Rica et al. 2009). En funció dels elements de reconeixement usats es pot distingir específicament entre bacteris de diferents espècies o soques i, mesurant la impedància del volum, es pot diferenciar entre cèl·lules viables i no viables.

Depenent de la geometria dels elèctrodes la distància de penetració del camp elèctric és diferent. En aquest treball s'han utilitzat elèctrodes interdigitats que, com s'explica a continuació, permeten mesurar la impedància d'aquest volum proper.

A continuació, la Taula 1-4 resumeix els tres mètodes explicats en aquest subapartat.

Principi de detecció	Avantatges	Desavantatges
Conductivitat del medi (freqüències mitjanes)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Detecció de cèl·lules viables.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Detecció indirecta a través de productes del metabolisme.</li> <li>– Temps d'incubació llargs.</li> <li>– Inespecífic d'espècie i soca bacteriana.</li> </ul>
Impedància a la interfície (freqüències baixes)		<ul style="list-style-type: none"> <li>– No distinció entre viables i mortes.</li> </ul>
Impedància del volum proper a la superfície dels elèctrodes (freqüències mitjanes i altes)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Possibilitat de distinció entre viables i mortes.</li> <li>– Detecció directa dels bacteris.</li> </ul>	

Taula 1-4: Taula resum dels mètodes de detecció bacteriana per impedància no faradaica.

## 4.2. Elèctrodes interdigitats

Una de les característiques de la geometria dels elèctrodes interdigitats (**IDEs**, de les seves sigles en anglès) és que tenen una penetració de camp elèctric curta. Concretament, a l'estudi de Van Gerwen et al. (Van Gerwen et al. 1998) es conclou que un 80% del corrent es troba confinat a una distància de la superfície de la meitat del *pitch*<sup>4</sup> (vegeu

Figura 1-10).

Per exemple, per un elèctrode amb dígit de gruix homogeni de 6 µm, distanciats entre ells 6 µm, el *pitch* seria de 12 µm. Així que en el volum confinat entre la superfície dels elèctrodes fins a 6 µm de distància d'aquests (meitat del *pitch*), es trobaria el 80% del corrent elèctric.

Per aquest motiu aquesta configuració dels elèctrodes és especialment atractiva a l'hora de mesurar el comportament impedimètric d'aquest volum immediatament proper a la superfície.

<sup>4</sup> *Pitch*: Distància de la meitat d'un dígit de l'elèctrode interdigitat a la meitat de l'altre dígit.

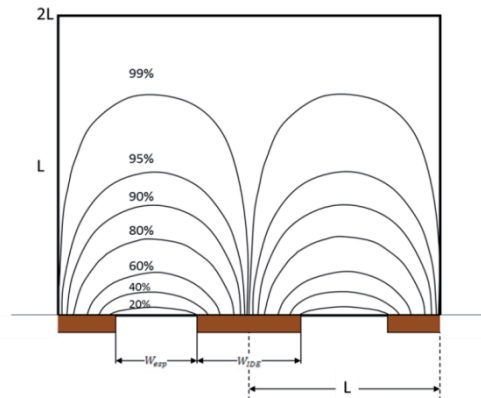


Figura 1-10: Càlcul de la distribució del corrent elèctric en elèctrodes interdigitats.  $w_{sp}$  és la distància entre elèctrodes,  $w_{DE}$  el gruix dels elèctrodes i  $L$  el pitch.

Si es redueixen les mides dels dígit i l'espaiat entre ells es redueix aquest volum mesurable.

Una altra característica destacable d'aquest tipus d'elèctrodes és que permeten mesurar la capacitat de l'electròlit, no només la seva resistència.

## 5. Conceptes bàsics de microfabricació

Durant aquest treball es dissenyen i fabriquen uns elèctrodes interdigitats mitjançant tècniques de microfabricació.

La microfabricació és el procés de fabricació d'estructures miniaturitzades normalment a escala de micròmetre o més petit. Dels sistemes fabricats amb aquestes tècniques se'n diuen microsistemes o sistemes microelectromecànics (MEMS de les seves sigles en anglès).

Les principals etapes per dur a terme processos de microfabricació són el creixement o deposició de capes fines, la fotolitografia i el gravat (Bhushan 2004; Franssila 2010).

Depenent de la funció que ha de complir el dispositiu dissenyat convé la **deposició de capes** d'un tipus de material amb unes característiques elèctriques o òptiques concretes. Hi ha diferents mètodes per aconseguir-ho com són l'oxidació tèrmica, la deposició química de vapor, la deposició física de vapor i l'epitàxia o creixement epitaxial.

La **fotolitografia** és el procés en que es transfereix un patró geomètric d'una màscara o reticle a una resina fotosensible mitjançant llum ultraviolada. Aquesta màscara o reticle consisteix en

una pel·lícula opaca amb forats o zones transparents que defineixen el patró que es vol transferir.

Posteriorment a la deposició o creixement d'una capa, per fer la fotolitografia aquesta es cobreix amb una resina fotosensible. Després es col·loca la màscara sobre la resina i el conjunt s'irradia amb llum ultraviolada. La part de la resina que ha estat exposada a través de les parts transparents de la màscara canvia de propietats. Normalment després de la irradiació s'elimina la resina exposada a la llum amb un líquid de revelatge. Hi ha resines però, que en el procés de revelatge s'elimina la part no exposada. També hi ha variants que fan servir feixos d'electrons o raigs X en lloc de llum (Mateu Martínez and Corbella Sanahuja 2007).

Hi ha diferents tipus de fotolitografia: de contacte, de proximitat i de projecció (vegeu Figura 1-11). La **impressió de contacte** és el sistema més simple i consisteix en posar la màscara en contacte directe amb l'oblia. A la **impressió de proximitat** es deixa un petit espai entre l'oblia i la màscara. Tot i així, en ambdós casos la màscara cobreix tota l'oblia i, per tant, en una irradiació es marca tota la superfície. També es necessita que la intensitat de la llum sigui uniforme a tots els punts de l'oblia. Entre aquestes dues tècniques la impressió de contacte ofereix millor resolució.

Per altra banda, a la **fotolitografia de projecció** s'utilitzen màscares de projecció que es coneixen amb el nom de reticles que, a diferència de les màscares de proximitat, amb aquests només es cobreix un camp de l'oblia. A més, les mides del patró al reticle són proporcionals però superiors a les mides que realment es volen imprimir a l'oblia. Els sistemes d'impressió per projecció projecten els motius concrets del reticle sobre l'oblia tantes vegades com es necessiti per crear el patró complet. Entre el reticle i l'oblia hi ha unes lents de reducció que ajusten el patró a les mides que es desitgen.

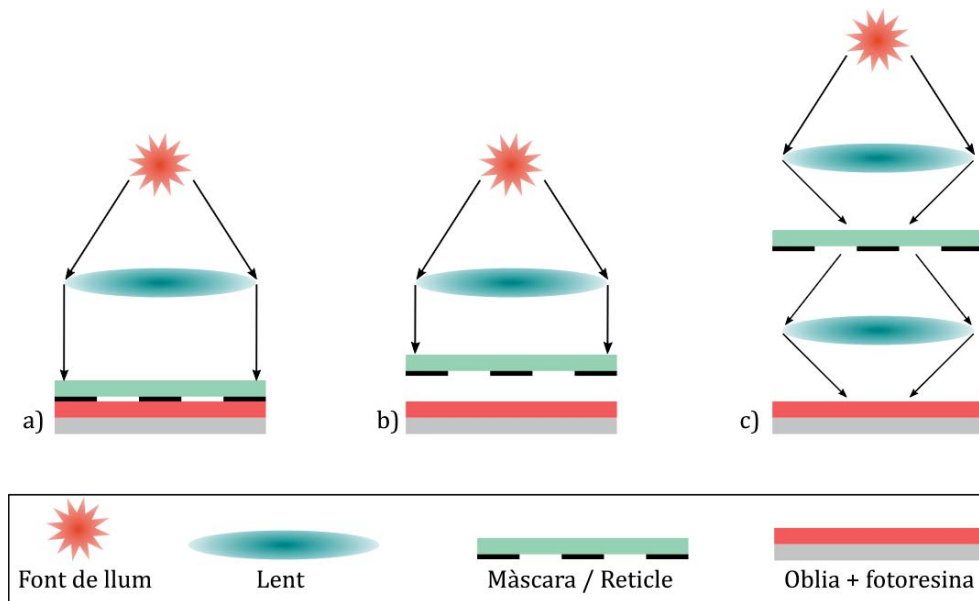


Figura 1-11: Esquema gràfic dels diferents tipus de fotolitografies. a) Fotolitografia de contacte. b) Fotolitografia de proximitat. c) Fotolitografia de projecció.

Finalment, un cop s'ha revelat la resina es grava l'oblia. El **gravat** consisteix en l'eliminació de la part de capa dipositada que no està protegida per la resina fotosensible. Hi ha dues tècniques de gravat: el gravat humit i el sec.

El **gravat humit o químic** consisteix en submergir l'oblia en un medi líquid d'un compost que reacciona específicament amb el material de la capa a gravar (normalment són combinacions d'àcids). Aquest gravat acostuma a ser isotròpic, és a dir, que erosiona el substrat per igual en totes direccions. La característica principal dels gravats isotròpics és que les obertures que es produeixen tenen unes parets arrodonides i que es perden dimensions a causa de l'atac lateral que es produeix en els motius per sota de la resina.

Per altra banda, el **gravat sec o gravat amb plasma** consisteix en un bombardeig contra la superfície de l'oblia amb ions accelerats per camps elèctrics o magnètics alterns. La càmera on es produeix el gravat conté una mescla de gasos que varia en funció del material que es vol gravar perquè sigui més específic. Aquest tipus de gravat acostuma a ser anisotròpic ja que és direccional (normalment perpendicular a la superfície de l'oblia). Per tant, les parets de les obertures que es produeixen amb aquests gravats són més verticals i no es perden o es perden menys les dimensions dels motius originals.



## ***CAPÍTOL 1***

---

Aquests processos són els principals en tot procés de microfabricació però també n'hi ha d'altres com el dopatge, la implantació iònica o el rentat de l'oblia (preparació de la superfície) que són necessaris ja sigui per condicionar l'oblia per la següent etapa com per aportar noves característiques als materials.

## 6. Referències

Ahmed, Asif, Jo V. Rushworth, Natalie A. Hirst, and Paul A. Millner. 2014. "Biosensors for Whole-Cell Bacterial Detection." *Clinical Microbiology Reviews* 27(3):631–46.

Barreiros dos Santos, M. et al. 2015. "Label-Free ITO-Based Immunosensor for the Detection of Very Low Concentrations of Pathogenic Bacteria." *Bioelectrochemistry* 101:146–52. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567539414001558>).

Berbel, Xavier Muñoz. 2008. "Microsystems Based on Microbial." Universitat Autònoma de Barcelona. Retrieved (<http://hdl.handle.net/10803/3587>).

Bhushan, Bharat, ed. 2004. *Springer Handbook of Nanotechnology*. 1st ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Retrieved (<http://link.springer.com/10.1007/3-540-29838-X>).

Burshtyn, Debby, Aja Rieger, and Dorothy Kratochwil-Otto. 2015. "Flow Cytometry." *Faculty of Medicine and Dentistry, University of Alberta, Canada*. Retrieved January 15, 2016 (<http://flowcytometry.med.ualberta.ca/>).

Cadi, Paxton and William J. Welch. 1973. "Microbiological Detection Apparatus."

Daniels, Jonathan S. and Nader Pourmand. 2007. "Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges." *Electroanalysis* 19(12):1239–57. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2174792&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).

Dante, S. 2014. "All-Optical Phase Modulation for Advanced Interferometric Point-of-Care Biosensors." Universitat Autònoma de Barcelona. Retrieved (<http://hdl.handle.net/10803/285191>).

Dominguez-Benetton, Xochitl, Surajbhan Sevda, Karolien Vanbroekhoven, and Deepak Pant. 2012. "The Accurate Use of Impedance Analysis for the Study of Microbial Electrochemical Systems." *Chemical Society reviews* 41(21):7228–46. Retrieved January 14, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22885371>).

Don Whitley Scientific Limite. 2016. "Rapid Automated Bacterial Impedance Technique (RABIT)." Retrieved February 3, 2016 (<http://www.dwscientific.co.uk/rabit/>).

Ercole, C. et al. 2002. "A Biosensor for Escherichia Coli Based on a Potentiometric Alternating Biosensing (PAB) Transducer." *Sensors and Actuators, B: Chemical* 83:48–52.

Fergenson, David P. et al. 2004. "Reagentless Detection and Classification of Individual Bioaerosol Particles in Seconds." *Analytical Chemistry* 76(2):373–78. Retrieved (<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac034467e>).

Franssila, Sami. 2010. *Introduction to Microfabrication*. 2nd ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. Retrieved (<http://doi.wiley.com/10.1002/9781119990413>).

Garland, J. E., C. M. Pettit, and D. Roy. 2004. "Analysis of Experimental Constraints and Variables for Time Resolved Detection of Fourier Transform Electrochemical Impedance Spectra." *Electrochimica Acta* 49(16):2623–35.

Gehring, a G., D. L. Patterson, and S. I. Tu. 1998. "Use of a Light-Addressable Potentiometric Sensor for the Detection of Escherichia Coli O157:H7." *Analytical biochemistry* 258(2):293–98.

Gehring, Andrew G., C. Gerald Crawford, Ralph S. Mazenko, Lisa J. Van Houten, and Jeffrey D. Brewster. 1996. "Enzyme-Linked Immunomagnetic Electrochemical Detection of Salmonella Typhimurium." *Journal of Immunological Methods* 195(1-2):15–25. Retrieved (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022175996000762>).

Van Gerwen, Peter et al. 1998. "Nanoscaled Interdigitated Electrode Arrays for Biochemical Sensors." *Sensors and Actuators B: Chemical* 49(1-2):73–80. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400598001282>).

Gründler, Peter. 2007. *Chemical Sensors*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Retrieved (<http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-45743-5>).

Kim, Hyung Joo, H. Peter Bennetto, Mahmoud a. Halablab, Changho Choi, and Sukmin Yoon. 2006. "Performance of an Electrochemical Sensor with Different Types of Liposomal

Mediators for the Detection of Hemolytic Bacteria.” *Sensors and Actuators, B: Chemical* 119(1):143–49.

de la Rica, Roberto, Antonio Baldi, César Fernández-Sánchez, and Hiroshi Matsui. 2009. “Selective Detection of Live Pathogens via Surface-Confined Electric Field Perturbation on Interdigitated Silicon Transducers.” *Analytical chemistry* 81(10):3830–35. Retrieved January 14, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2888026&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).

Laczka, Olivier et al. 2011. “Improved Bacteria Detection by Coupling Magneto-Immunocapture and Amperometry at Flow-Channel Microband Electrodes.” *Biosensors and Bioelectronics* 26(8):3633–40.

Lagarde, Florence and Nicole Jaffrezic-Renault. 2011. “Cell-Based Electrochemical Biosensors for Water Quality Assessment.” *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400(4):947–64.

Longo, G. et al. 2013. “Rapid Detection of Bacterial Resistance to Antibiotics Using AFM Cantilevers as Nanomechanical Sensors.” *Nature Nanotechnology* 8(7):522–26. Retrieved (<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nnano.2013.120>).

Mateu Martínez, Rosa and Ignasi Corbella Sanahuja. 2007. “Diccionari de Telecomunicacions.” 72–74. Retrieved ([http://cataleg.upc.edu/record=b1307602~S1\\*cat](http://cataleg.upc.edu/record=b1307602~S1*cat)).

New England Biolabs. 2016. “DNA Amplification & PCR.” Retrieved January 15, 2016 ([https://www.neb.com/~media/NebUs/Page Images/Applications/DNA Amplification and PCR/pcr.jpg](https://www.neb.com/~media/NebUs/Page%20Images/Applications/DNA%20Amplification%20and%20PCR/pcr.jpg)).

Nič, Miloslav, Jiří Jirát, Bedřich Košata, Aubrey Jenkins, and Alan McNaught, eds. 2009. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. Research Triangle Park, NC: IUPAC. Retrieved (<http://goldbook.iupac.org>).

Noble, Rachel T. and Stephen B. Weisberg. 2005. “A Review of Technologies for Rapid Detection of Bacteria in Recreational Waters.” *Journal of water and health*. 3(4):381–92.

Orazem, Mark E., Pankaj Agarwal, and Luis H. Garcia-Rubio. 1994. "Critical Issues Associated with Interpretation of Impedance Spectra." *Journal of Electroanalytical Chemistry* 378(1-2):51–62.

Radke, Stephen M. and Evangelyn C. Alocilja. 2005. "A High Density Microelectrode Array Biosensor for Detection of E. Coli O157:H7." *Biosensors and Bioelectronics* 20(8 SPEC. ISS.):1662–67.

Randles, J. E. B. 1947. "Kinetics of Rapid Electrode Reactions." *Discussions of the Faraday Society* 1:11–19. Retrieved (<http://xlink.rsc.org/?DOI=df9470100011>).

Ruan, Chuanmin, Liju Yang, and Yanbin Li. 2002. "Immunobiosensor Chips for Detection of Escherichia coli O157: H7 Using Electrochemical Impedance Spectroscopy." *Analytical chemistry* 74(18):4814–20. Retrieved (<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac025647b>).

Sabban, Sari, Hongtu Ye, and Birgit Helm. 2013. "Development of an in Vitro Model System for Studying the Interaction of Equus Caballus IgE with Its High-Affinity Receptor FcεRI." The University of Sheffield. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.01.008>).

Shabani, Arghavan, Christophe A. Marquette, Rosemonde Mandeville, and Marcus F. Lawrence. 2015. "Modern Probe-Assisted Methods for the Specific Detection of Bacteria." *Journal of Biomedical Science and Engineering* 08(02):104–21. Retrieved (<http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/jbise.2015.82011>).

SY-LAB Geräte GmbH. 2016. "BacTrac 4300 Microbiological Impedance Analyser." Retrieved February 3, 2016 (<http://microbiology.sylab.com/products/p/show/Product/product/bactrac-4300.html>).

Torun, Özlem, Ismail Hakki Boyaci, Erhan Temür, and Uğur Tamer. 2012. "Comparison of Sensing Strategies in SPR Biosensor for Rapid and Sensitive Enumeration of Bacteria." *Biosensors and Bioelectronics* 37(1):53–60.

---

Wan, Yi, Dun Zhang, and Baorong Hou. 2010. "Selective and Specific Detection of Sulfate-Reducing Bacteria Using Potentiometric Stripping Analysis." *Talanta* 82(4):1608–11. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20801381>).

Wang, Joseph. 2001. "Glucose Biosensors: 40 Years of Advances and Challenges." *Electroanalysis* 13(12):983–88.

Wang, Joseph. 2006. *Analytical Electrochemistry, Third Edition*. 3rd ed. edited by WILEY-VCH. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

World Health Organization. 2015. *World Health Statistics 2015*. Luxemburg.

Yang, Liju, Yanbin Li, and Gisela F. Erf. 2004. "Interdigitated Array Microelectrode-Based Electrochemical Impedance Immunosensor for Detection of Escherichia Coli O157:H7." *Analytical chemistry* 76(4):1107–13. Retrieved January 14, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14961745>).

Zelada-Guillén, Gustavo a, José Luis Sebastián-Avila, Pascal Blondeau, Jordi Riu, and F. Xavier Rius. 2012. "Label-Free Detection of Staphylococcus Aureus in Skin Using Real-Time Potentiometric Biosensors Based on Carbon Nanotubes and Aptamers." *Biosensors & bioelectronics* 31(1):226–32. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22154169> \n <http://dx.doi.org/10.1021/jf300395z>).



# CAPÍTOL 2

## Hipòtesis de partida i objectius

Aquest treball de tesi parteix d'un treball previ en el què es proposava la detecció de bacteris mitjançant mesures de la capacitat de la solució (Cs) i s'atribuïa la diferenciació entre cèl·lules vives i mortes a la diferència de volums i propietats elèctriques dels diferents tipus de cèl·lula.

En aquesta tesi es fa un replantejament d'aquests estudis i es proposa que la distinció entre cèl·lules vives i mortes recau en la diferència de la conductivitat del seu medi intern i que, com a conseqüència de la seva estructura, les cèl·lules vives poden actuar com a partícules conductores o aïllants en funció de la freqüència en què es mesurin.

Partint d'aquestes hipòtesis es plantegen diferents objectius que comprenen des d'estudis mitjançant simulacions per elements finits, a mesures experimentals amb IDEs de diferents geometries, fins l'obtenció d'un nou dispositiu amb un sistema microfluídic integrat per automatitzar les mesures.



## 1. Hipòtesis de partida

### 1.1. Distinció entre cèl·lules viables i mortes mitjançant la detecció dels canvis impedimètrics en el volum proper a la superfície dels elèctrodes

El doctor Roberto de la Rica, junt amb els seus col·laboradors, va realitzar un treball innovador en que es demostrava que es podien detectar bacteris viables selectivament (respecte als morts) mitjançant la mesura impedimètrica amb elèctrodes interdigitats (de la Rica et al. 2009).

La importància d'aquesta distinció recau en el fet que els microorganismes patògens vius són els únics que tenen capacitat d'infecció, i per tant, els que realment són interessants de detectar.

Fins aquell moment, la majoria dels treballs que feien referència a la detecció bacteriana amb impedància no electroquímica es basaven en la mesura dels canvis a la interfase elèctrode-solució per la presència de les cèl·lules.

En aquest treball, en canvi, de la Rica defensava la possibilitat de detectar els bacteris immobilitzats específicament a la superfície dels elèctrodes mesurant a freqüències en que la impedància dominant corresponia a les propietats elèctriques del medi que hi havia sobre seu. És a dir, que els canvis d'impedància detectats estarien causats per les propietats elèctriques de les cèl·lules i no només pel bloqueig que provocaven en els corrents que travessaven la interfície elèctrode-solució.

**De la Rica** considerava les **cèl·lules** com a **partícules aïllants** per les mesures dutes a terme a **freqüències inferiors a 1 MHz**. També atribuïa la **diferenciació** entre **cèl·lules vives i mortes** a la **diferència de volums i de propietats elèctriques**. Com que en morir la cèl·lula, el potencial de membrana es trenca, aquesta passa a ser permeable a ions. A més, les cèl·lules mortes també poden perdre volum com a conseqüència d'aquest procés.

En el seu treball assoleix límits de detecció de  $3 \cdot 10^2$  ufc/mL (calculat com el doble de la desviació estàndard de la concentració 0).

En el **nostre treball** però, tot i també creure en la importància de mesurar aquest volum proper per poder distingir entre bacteris viables i morts, es replantegen les hipòtesis de partida de de la Rica.

Primerament es creu que la principal **diferència entre cèl·lules vives i mortes** estarà en la **conductivitat del seu medi intern** i no tant en el seu comportament com a partícules aïllants degut a la membrana no conductora que els envolta. Perquè tal com es comentava, en morir la cèl·lula, la seva membrana passa a ser permeable a ions. Per tant, tot i canviar les cèl·lules de medi, les vives mantindran la conductivitat interna pràcticament constant. En canvi, la conductivitat interna de les mortes anirà canviant en funció de la del medi. És a dir que la conductivitat interna dels bacteris morts tendirà a ser la mateixa que la del medi extern (Lang et al. 2007). Donat que el comportament de la membrana es capacitiu, és raonable pensar que a freqüències prou elevades els corrents penetraran dins les cèl·lules i aquestes ja no es comportaran com a objectes aïllants. En principi, la impedància mesurada a aquestes freqüències hauria de dependre de la conductivitat del medi intern de les cèl·lules, i per tant, s'hauria de poder distingir entre vives i mortes.

## 1.2. Ambivalència elèctrica bacteriana: aïllants i conductors

Una de les hipòtesis d'aquest treball consisteix en la idea que en funció de la freqüència de mesura, el **bacteri** es pot comportar com una partícula **aïllant o conductora**.

Això seria causat per la seva estructura cel·lular que bàsicament comprèn la membrana plasmàtica, la paret bacteriana i el citosol (vegeu Figura 2-1). Cada component cel·lular té diferents característiques elèctriques. Per exemple, les membranes lipídiques són aïllants; en canvi, la paret bacteriana està formada per un polímer carregat negativament (el peptidoglicà) que és molt permeable a ions i que, per tant, és un bon conductor elèctric; també ho és el citosol ja que conté altes concentracions salines.

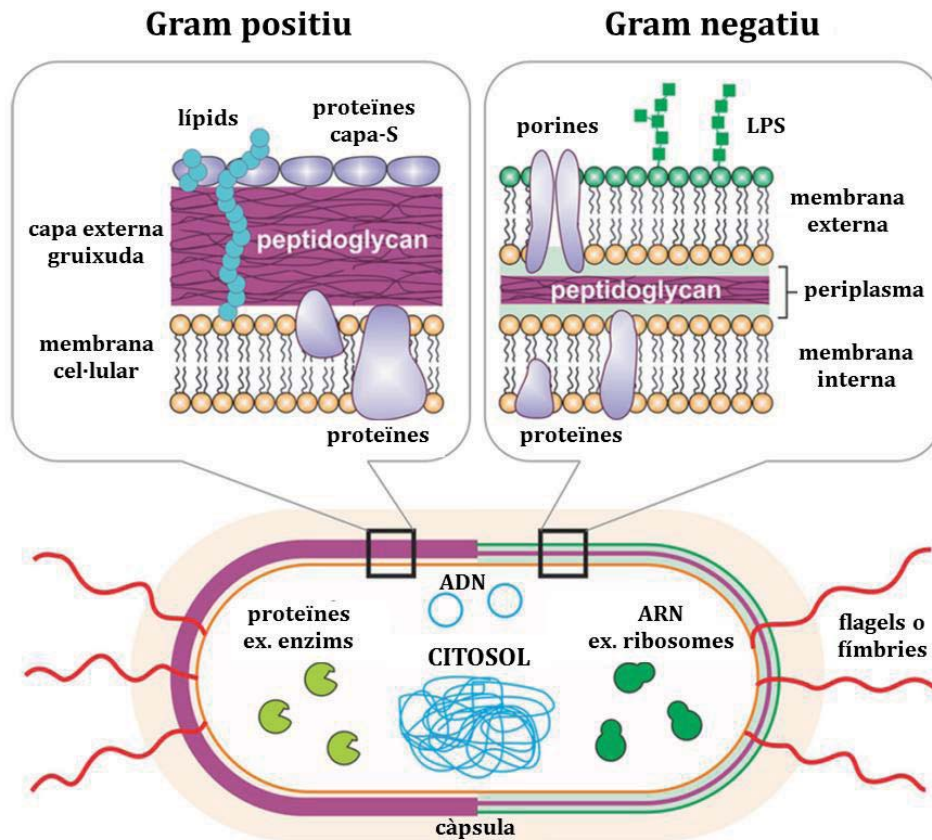


Figura 2-1: Estructura bacteriana on LPS són els lipopolisacàrids. Basat en figura 2 d'Ahmed et al. (Ahmed et al. 2014).

Com es comentava anteriorment, en aquest treball es vol estudiar la detecció bacteriana basada en la mesura dels canvis d'impedància a freqüències en què aquesta està dominada pel què hi ha en un volum proper a la superfície dels elèctrodes.

Si les mesures es duen a terme en **medi de baixa conductivitat**, notablement inferior a la del medi intern dels bacteris, s'hauria de poder detectar un decrement de la impedància perquè aquests actuarien com a **partícules conductores**.

En canvi, si es treballa amb un **medi de conductivitat més alta** que l'element més conductor de la cèl·lula, el bacteri només es podria detectar com a **partícula menys conductora que el medi**, i que per tant produiria un augment de la impedància.

Per tant, la presència d'uns pocs bacteris sobre uns elèctrodes interdigitats, depenent de la conductivitat del medi, alteraria de manera significativa la impedància mesurada entre aquests elèctrodes.

## **2. Objectius**

En aquest treball de recerca es plantegen els següents objectius:

1. Estimar els canvis d'impedància que pot causar la presència de bacteris, en tot el rang de freqüències, per mitjà de simulacions basades en el mètode d'anàlisi d'elements finits (FEA).
2. Optimitzar mitjançant aquestes simulacions la geometria dels elèctrodes que permeten una millor detecció de bacteris.
3. Validar la metodologia de simulació comparant els valors obtinguts amb mesures fetes amb geometries d'IDEs ja fabricades anteriorment pel grup de recerca.
4. Estudiar la possibilitat de distingir específicament cèl·lules vives de cèl·lules mortes i d'altres tipus d'objectes que es puguin adherir a la superfície.
5. Dissenyar i fabricar una nova geometria d'IDEs per optimitzar la detecció bacteriana (la més adequada segons els resultats de les simulacions).
6. Integrar els IDEs en un sistema microfluídic i de captació selectiva dels bacteris per automatitzar les mesures.

### 3. Referències

- Ahmed, Asif, Jo V. Rushworth, Natalie A. Hirst, and Paul A. Millner. 2014. "Biosensors for Whole-Cell Bacterial Detection." *Clinical Microbiology Reviews* 27(3):631–46.
- de la Rica, Roberto, Antonio Baldi, César Fernández-Sánchez, and Hiroshi Matsui. 2009. "Selective Detection of Live Pathogens via Surface-Confined Electric Field Perturbation on Interdigitated Silicon Transducers." *Analytical chemistry* 81(10):3830–35. Retrieved January 14, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2888026&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Lang, Florian et al. 2007. "Cell Volume Regulatory Ion Channels in Cell Proliferation and Cell Death." *Methods in Enzymology* 428:209–25.





# CAPÍTOL 3

## Simulació de la impedància del sistema IDEs-bacteris per anàlisi d'elements finits

En aquest capítol es realitzen diferents estudis mitjançant simulacions per anàlisi d'elements finits utilitzant el programa COMSOL Multiphysics®. L'objectiu d'aquests estudis és, per una banda, preveure el comportament del nostre sistema de mesura en diferents condicions i, per altra, entendre millor els fenòmens que s'estan duent a terme durant les mesures.

Com a model de bacteri s'utilitza el model de les tres capes de Bai (Bai, Zhao, and Asami 2006) i com a transductor uns elèctrodes interdigitats de  $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}$ .

S'avalua l'afectació que suposa el posicionament del bacteri i la conductivitat del medi de mesura.

Finalment, es realitza un estudi per conèixer la relació òptima entre la mida del bacteri i la dels elèctrodes interdigitats.



# 1. Introducció

## 1.1. Anàlisi d'elements finits

Com a eina per l'anàlisi d'elements finits s'ha usat COMSOL Multiphysics®. Aquest paquet de programari s'utilitza per diferents tipus d'aplicacions on intervenen fenòmens de naturalesa elèctrica, mecànica, de dinàmica de fluids o química. (Littmarck and Saeidi 2016).

Existeixen varis mòduls específics de COMSOL Multiphysics® que permeten diferents tipus de simulacions (vegeu Figura 3-1). En aquest treball s'ha utilitzat el **mòdul de corrent altern i corrent directe (AC/DC)** per realitzar totes les simulacions.

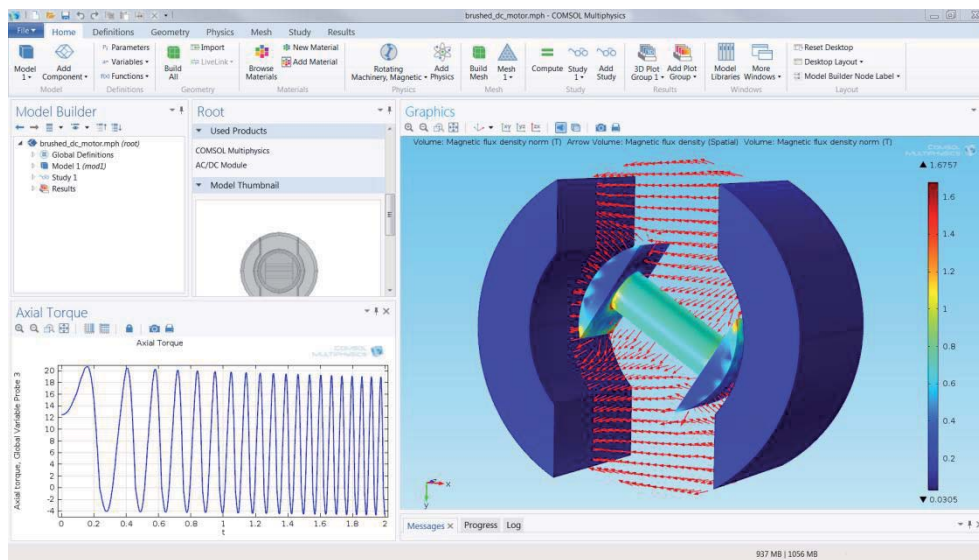


Figura 3-1: Mòduls de COMSOL Multiphysics® (Littmarck and Saeidi 2016).

Aquest mòdul s'utilitza per simular camps elèctrics, magnètics i electromagnètics per aplicacions en estàtic i a freqüències baixes. Exemples de les aplicacions més típiques serien la simulació de capacitats, inductors, motors, actuadors i **sensors**. A més, té una eina per extreure certs paràmetres com la resistència, la capacitància, la inductància, la impedància, la força i el moment resultant de la força.

En aquest mòdul els materials es defineixen en termes de permetivitat, permeabilitat, conductivitat i inducció romanent. També permet que aquestes propietats dels materials variïn amb la distància, que siguin dependents del temps, anisotròpiques, o que tingui pèrdues.

A més a més, inclou camps magnètics i elèctrics estacionaris i dinàmics tant en 2D com 3D. La base del seu funcionament consisteix en formular i resoldre les equacions de Maxwell<sup>1</sup> combinant-les amb les propietats dels materials i les condicions de contorn<sup>2</sup>. Les equacions es resolen mitjançant el **mètode d'elements finits**. Les diferents formulacions permeten simulacions estàtiques, controlades per la freqüència o pel temps. Finalment es presenten els resultats a la finestra gràfica. La representació gràfica dels resultats es pot modificar a desig de l'usuari. Hi ha l'opció de representar el camp elèctric, el corrent o el voltatge com a expressió de les seves quantitats físiques o com a quantitats derivades. Per exemple, es pot representar la intensitat de corrent, el camp elèctric, el potencial elèctric i altres paràmetres amb gradacions de color o amb fletxes, segons la seva intensitat en cada punt, tant en un pla com en un volum (vegeu Figura 3-2).



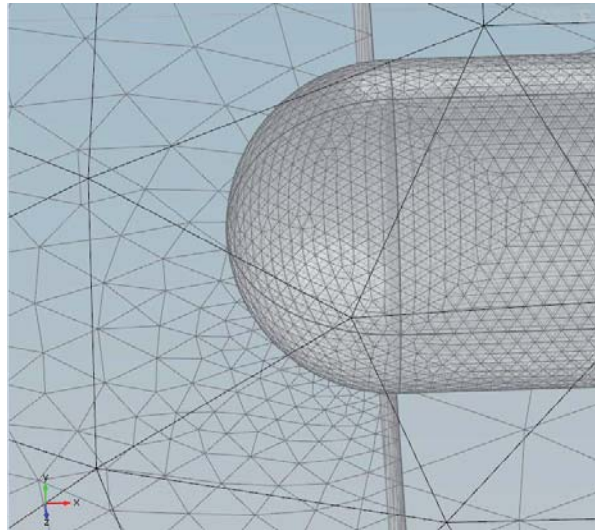
*Figura 3-2: Interfície gràfica de COMSOL Multiphysics®. A la dreta es pot veure la finestra gràfica on es mostren els resultats de la simulació. En els diferents volums es representa la densitat de flux magnètic normal i la llegenda amb l'equivalència dels colors respecte la intensitat. La densitat de flux magnètic espacial ve representada amb fletxes vermelles amb longitud proporcional a la magnitud de la densitat en cada punt. Imatge obtinguda de la pàgina web oficial de COMSOL (Littmarck and Saeidi 2016).*

El mètode d'anàlisi d'elements finits és una eina de càlcul que s'utilitza principalment per aplicacions d'enginyeria. Aquest mètode consisteix en simplificar els objectes d'estudi complexos a subdivisions més petites i simples que s'anomenen elements finits. Aquesta

<sup>1</sup> Equacions de Maxwell: Conjunt d'equacions bàsiques de la teoria electromagnètica que regeixen el comportament espacial i temporal dels camps elèctrics i magnètics, i les interrelacions entre ells i amb les càrregues i els corrents elèctrics. Van ser formulades per J.C. Maxwell entre 1862 i 1873 (Mateu Martínez and Corbella Sanahuja 2007).

<sup>2</sup> Contorn: En anglès *boundary*. Es refereix a les superfícies dels diferents cossos representats a la simulació.

divisió geomètrica en subdominis interrelacionats s'anomena **mallat** (vegeu Figura 3-3). Les equacions simples que modelen aquests elements finits es munten fins formar el sistema complex i així poder resoldre el problema complet.



*Figura 3-3: Exemple de malla d'elements finits per un problema 3D. Es pot observar com la malla és més densa al voltant de l'objecte d'interès.*

Derivat del mallat s'obtenen els diferents **elements finits i nodes**. En aplicar el mètode, s'obté una solució per a cada node. Per tant, l'aproximació serà més bona com més densa sigui la malla (més nodes). Però també es necessitarà més potència de càlcul si hi ha una gran densitat de nodes. Per tant, s'ha de trobar un compromís entre una malla suficientment densa a les regions amb més variacions de les propietats electromagnètiques i més simplificada a les regions menys crítiques.

En aquest treball es desenvolupen una sèrie d'estudis de simulacions per elements finits pels diferents motius detallats a continuació. Per una banda, per preveure el comportament del nostre sistema de mesura en diferents condicions un cop validat el model. Per altra banda, aquests estudis també permeten entendre millor els fenòmens que s'estan duent a terme durant les mesures. A més, mitjançant les simulacions també es poden afinar els paràmetres a l'hora de realitzar la mesura i, fins i tot, optimitzar la geometria dels elèctrodes.

Experimentalment requereix un gran esforç i recursos (tant de temps com econòmics, per l'ús de reactius) el fet d'efectuar proves diverses per conèixer l'afectació dels diferents paràmetres al sistema i ajustar-los. En canvi, fent ús d'aquesta eina es poden obtenir

aproximacions que ens permeten estalviar-nos i minimitzar el nombre de proves experimentals.

## 1.2. Model de les tres capes per *E. coli*

Wei Bai junt amb els seus col·laboradors va realitzar un treball en que s'estudiava un model per simular les propietats dielèctriques del procariota gram negatiu més popular, l'*Escherichia coli* (Bai et al. 2006).

En aquest treball s'estudien els principals components cel·lulars d'aquests bacteris en termes de permitivitat relativa ( $\epsilon_r$ ) i conductivitat ( $\sigma$ ).

Resolen un model en que a cada component se li assigna un valor per ambdós paràmetres i es comprova que experimentalment el model s'ajusta a la resposta real dels bacteris (vegeu Taula 3-1).

Component cel·lular	$\epsilon_r$	$\sigma$ (S/m)
Membrana externa	10	0
Periplasma	60	3
Membrana interna	6	0
Citoplasma	81	0.22

Taula 3-1: Valors de  $\epsilon_r$  i  $\sigma$  pels components principals de les cèl·lules d'*E. coli* que s'estudien. Obtinguts del treball de Bai i col·laboradors (Bai et al. 2006).

Aquest model assigna a la cèl·lula una forma d'el·lipsoide prolat (allargat) on el radi superior és de 2  $\mu\text{m}$  i els dos radis inferiors són iguals i de 0.5  $\mu\text{m}$ . El gruix d'ambdues membranes és de 7 nm i el gruix del periplasma és de 10 nm. S'anomena model de les tres capes perquè a diferència d'altres aproximacions anteriors (Asami, Hanai, and Koizumi 1980; Carstensen et al. 1965), aquest model incorpora les dues membranes dels bacteris gram negatius i l'espai periplasmàtic comprès entre elles.

Per realitzar les simulacions d'aquesta tesi s'utilitza el model del treball de Bai però modificant la forma d'el·lipsoide per la de bacil. En el treball de Bai s'usa l'aproximació de l'el·lipsoide per poder resoldre matemàticament les equacions i obtenir una solució analítica

per la impedància resultant. Les simulacions per elements finits, en canvi, permeten ajustar-se millor a la geometria real.

## 2. Comprovació del model de Bai amb simulacions per elements finits

Abans de realitzar les simulacions del nostre sistema d'interès (elèctrodes interdigitats), es comprova que som capaços de reproduir els resultats del treball de Bai utilitzant el seu model amb el programa COMSOL Multiphysics®.

Les mesures experimentals de Bai van ser dutes a terme per una suspensió de cèl·lules usant unes plaques de platí paral·leles com a elèctrodes, i a un rang de freqüències entre 1 kHz i 110 MHz.

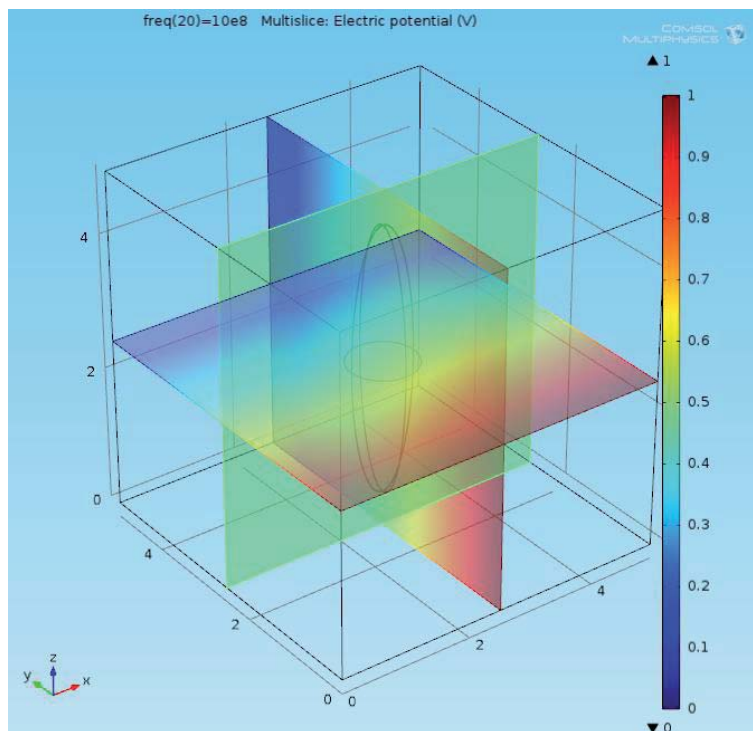


Figura 3-4: Representació gràfica del potencial elèctric (V) per la freqüència de  $10^8$  Hz. La cel·la consisteix en un cub de  $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ .

A la Figura 3-4 es pot apreciar el disseny del model de les tres capes dins d'una cel·la quadrada de  $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ . En els plans XZ que limiten el cub es troben les plaques paral·leles amb les que s'aplica un potencial d'1 V d'amplitud en un rang de freqüències d'entre 10 kHz i 100 MHz.

Per comprovar la coherència del model mitjançant COMSOL, es proven les mateixes variacions de  $\epsilon_r$  i  $\sigma$  per cada component cel·lular i es representen els resultats en funció de la freqüència de la mateixa manera que a la figura 2 del treball de Bai (vegeu Figura 3-5 i Figura 3-6).

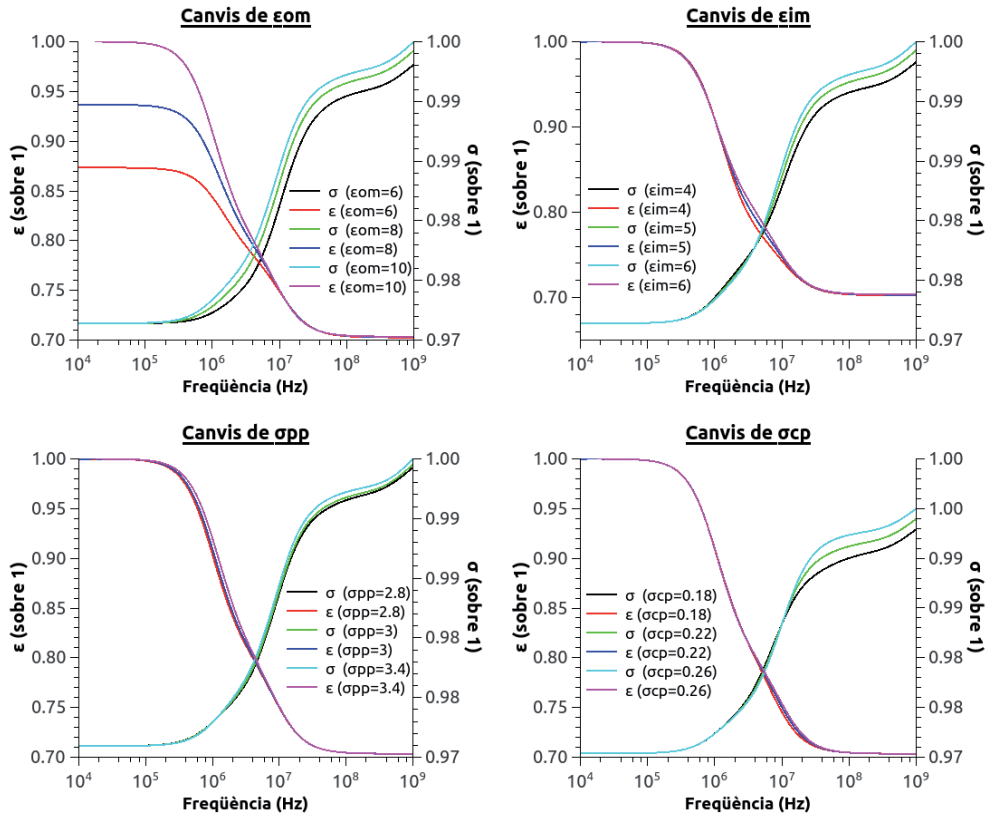


Figura 3-5: Representació de la permitivitat i la conductivitat del sistema en el cas de variació de diferents paràmetres: permitivitat de la membrana externa ( $\epsilon_{om}$ ), permitivitat de la membrana interna ( $\epsilon_{im}$ ), conductivitat del periplasma ( $\sigma_{pp}$ ) i conductivitat del citoplasma ( $\sigma_{cp}$ ). La permitivitat és adimensional però les diferents conductivitats que es proven estan en unitats de S/m.



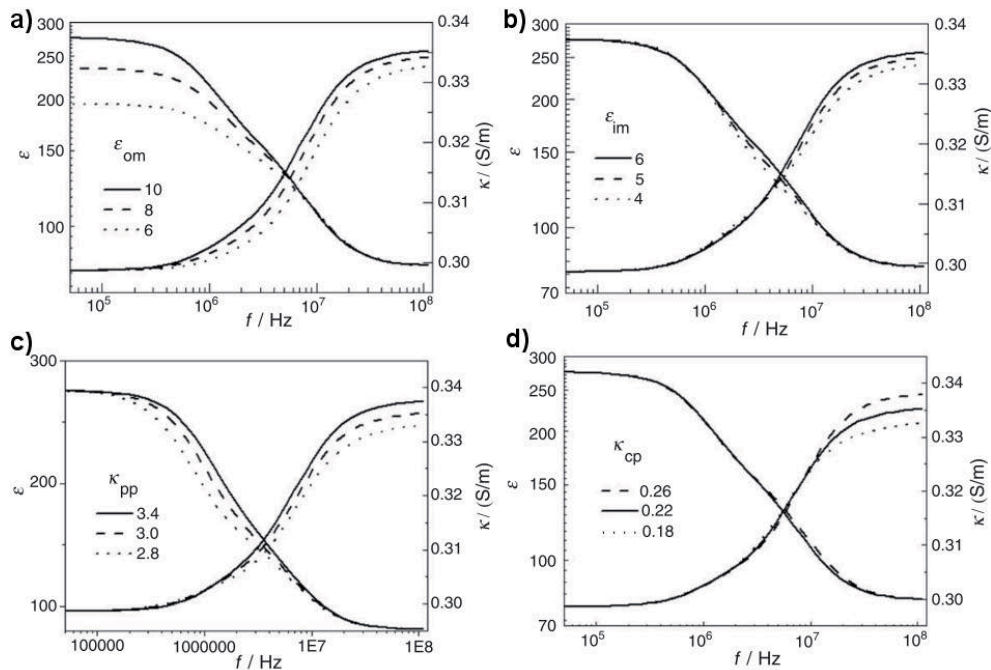


Figura 3-6: Gràfiques extretes de la figura 2 del treball de Bai i col·laboradors (Bai et al. 2006). Les gràfiques estan disposades d'igual manera que les seves gràfiques anàlogues a la Figura 3-5 per facilitar la comparació.

Si es comparen les gràfiques de la Figura 3-6 amb les de la Figura 3-5 es pot observar com s'obté la mateixa tendència exactament que a les simulacions de COMSOL.

El model de Bai que utilitza un mètode analític no numèric queda validat mitjançant estudis experimentals. Veient la concordança de resultats, es conclou que la metodologia de simulació per elements finits és correcta per l'ús d'aquest model i que es pot utilitzar per les aplicacions d'interès d'aquesta tesi. A continuació es detalla la metodologia emprada per realitzar aquests estudis per elements finits.

### 3. Simulacions d'IDEs de $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}$

El nostre grup de recerca, Grup de Transductors Químics (GTQ), prèviament a l'inici d'aquest treball ja havia desenvolupat diverses geometries de IDEs de polisilici. La geometria de mides més reduïdes fabricada era la de dígit d' $1.5 \mu\text{m}$  d'amplada i  $1.5 \mu\text{m}$  d'espaiat. És per aquest motiu que es comença explorant aquesta geometria.

### 3.1. Disseny bàsic del model: optimització de la cel·la mínima

El primer model que s'elabora consisteix en una cel·la amb dues meitats de dígit i un bacteri en forma de bacil (no d'el·lipsoide) contactant amb ambdós dígit (vegeu Figura 3-7 a). Als diferents components del bacil se li assignen els valors segons l'estudi de Bai (Taula 3-1).

Aquest primer model de cel·la té una amplitud de  $3\ \mu\text{m}$  (1 dígit i espaiat de  $1.5\ \mu\text{m}$  respectivament) i una profunditat i alçada de  $18\ \mu\text{m}$ . L'alçada dels dígit és de  $0.5\ \mu\text{m}$  que és l'alçada real dels dígit dels IDEs fabricats.

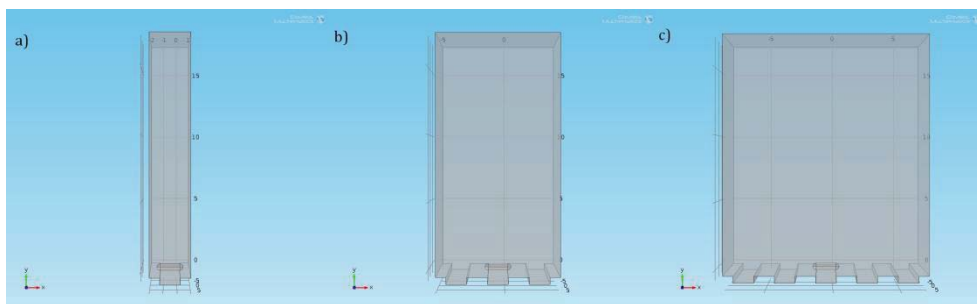


Figura 3-7: Models de cel·les per uns elèctrodes interdigitats de  $1.5\ \mu\text{m}$  d'ample x  $1.5\ \mu\text{m}$  d'espaiat. Per les tres imatges la profunditat (eix Z) i l'alçada (eix Y) és de  $18\ \mu\text{m}$ . El que varia és l'amplada que en el cas de la cel·la d'1 dígit és de  $3\ \mu\text{m}$  (a), per la de 3 dígit és de  $9\ \mu\text{m}$  (b) i per la de 5 dígit és de  $15\ \mu\text{m}$  (c).

Partint d'aquest model inicial es procedeix a optimitzar les mides de la cel·la. Aquesta optimització és important per minimitzar els errors durant les simulacions a causa d'una excessiva simplificació del model o per un model massa gran que no permet fer un mallat prou fi.

Quan es simula una cel·la s'està representant una petita part del sistema complet. En aquesta part només s'inclouen alguns dígit dels IDEs i un o uns pocs bacteris. Per tant, un IDE estaria compost per un nombre concret d'aquestes petites cel·les.

Per a poder extrapolar els resultats de les simulacions d'aquesta cel·la individual al conjunt de cel·les que formarien el total de l'IDE s'han de multiplicar (o dividir) els paràmetres resultants pel número de cel·les que el formen.

Les cel·les poden consistir en subdivisions tan petites com es desitgi sempre que es dissenyin mantenint una simetria. Totes les cel·les tindran un bacteri al mig, per tant, una cel·la d'àrea



molt disminuïda representarà una densitat de bacteris a la superfície de l'IDE superior a la d'una cel·la d'àrea més gran.

La pertorbació en la impedància entre elèctrodes causada pel bacteri seguirà una resposta lineal fins arribat un punt en que la cel·la representada sigui massa petita. Arribat aquest punt de densitat molt alta de bacteris per superfície, la presència d'un bacteri a una cel·la afecta la resposta de la cel·la contigua.

Pels assajos experimentals que es duen a terme en aquest treball, s'observa que les densitats de bacteris que s'aconsegueixen unir a la superfície dels elèctrodes mai són tan elevades.

Per aquest motiu, es realitza un estudi per trobar la cel·la mínima per la qual la resposta es manté lineal.

Primerament s'optimitza l'amplada de la cel·la que afecta al nombre de dígit que s'inclouen. Es proven cel·les que inclouen 1 dígit (2 meitats + espaiat, 3  $\mu\text{m}$ ), 3 dígit (2 sencers i 2 meitats + 3 espaiats, 9  $\mu\text{m}$ ) i 5 dígit (4 sencers i 2 meitats + 5 espaiats, 15  $\mu\text{m}$ ) (vegeu Figura 3-7).

Per aquestes tres cel·les es calcula l'increment del mòdul de la impedància que suposa la presència del bacteri (vegeu fórmula 1.1). Per fer el blanc, en lloc de treure el bacteri del model se li assigna als seus components els mateixos valors per cada paràmetre que al medi. Pel medi s'introdueix una  $\sigma$  de 30  $\mu\text{S}/\text{cm}$  i una  $\epsilon_r$  de 81. Procedint d'aquesta manera el programa segueix mantenint els nodes en la mateixa posició i s'evita l'augment de l'error a causa d'un canvi en el mallat.

$$1.1. \Delta|Z| = |Z|_{bacteri} - |Z|_{blanc}$$

L' $\Delta|Z|$  causat per un bacteri ha de ser igual per tot el rang de densitats de bacteri per àrea que donen resposta lineal. Es calcula el percentatge d'error respecte la cel·la de 5 dígit (vegeu fórmula 1.2) i es conclou que la cel·la de **3 dígit** és suficientment representativa (Figura 3-7 b). Entre la cel·la de 3 dígit i la de 5 no hi ha una variació significativa i el percentatge d'error és inferior a 1%.

$$1.2. \% \text{ error} = \frac{\Delta|Z|_{cel\cdot la \text{ petita}} - \Delta|Z|_{cel\cdot la \text{ 5 digits}}}{\Delta|Z|_{cel\cdot la \text{ 5 digits}}} \times 100$$

Es procedeix d'igual manera per optimitzar la profunditat de la cel·la i, amb la configuració dels 3 dígits es proven les profunditats de 6, 9 i 18  $\mu\text{m}$ . Finalment es conclou que una **profunditat de 6  $\mu\text{m}$**  és suficient per considerar la cel·la independent (error <1%).

Per tant, la **cel·la mínima** per realitzar les operacions és una cel·la que inclou 3 dígits (9  $\mu\text{m}$ ) i que té una profunditat de 6  $\mu\text{m}$ . És a dir, una cel·la que ocupa una **superfície de 54  $\mu\text{m}^2$** .

La superfície ocupada pels IDEs de 1.5  $\mu\text{m}$  que es volen utilitzar per les mesures experimentals és de 1500  $\mu\text{m}$  x 1500  $\mu\text{m}$  ( $2.25 \cdot 10^6 \mu\text{m}^2$ ). Així que un **IDE conté un total de  $4.17 \cdot 10^4$  cel·les** iguals que la simulada. Aquest és el factor que s'ha d'usar per extrapolar els resultats simulats als experimentals.

També es comparen les alçades de 18, 4 i 3  $\mu\text{m}$  i es conclou que per 4  $\mu\text{m}$  el percentatge d'error és per totes les freqüències menor que 1% així que es considera una cel·la representativa. Per tant, l'**alçada** de la cel·la es fixa en **4  $\mu\text{m}$** . A més, tal com s'explicava en el capítol 1, el 80% del corrent es troba confinat a una distància de la superfície de la meitat del *pitch* (vegeu la Introducció a l'apartat d'*Elèctrodes Interdigitats*). Des de la superfície dels dígits, tenint en compte que tenen una alçada de 0.5  $\mu\text{m}$ , fins el límit de la cel·la hi ha 3.5  $\mu\text{m}$ . El *pitch* dels IDEs de 1.5  $\mu\text{m}$  és de 3  $\mu\text{m}$ , per tant, 3.5  $\mu\text{m}$  és més del total del *pitch*.

Finalment, a la Figura 3-8 es mostra la cel·la amb les mides optimitzades tant per amplada, profunditat, com alçada.

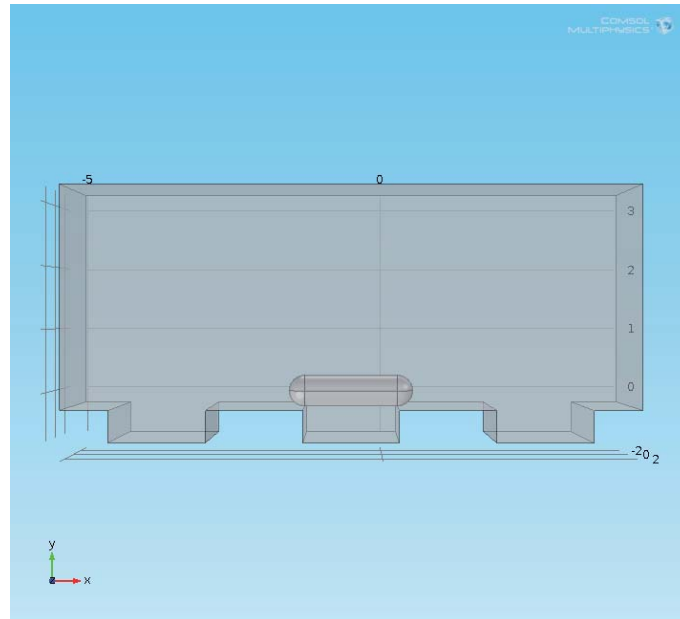


Figura 3-8: Cel·la mínima (mides optimitzades). Té una amplada de  $9 \mu\text{m}$ , profunditat de  $6 \mu\text{m}$  i alçada de  $4 \mu\text{m}$ .

### 3.2. Mallat

En l'apartat 1.1 d'aquest capítol s'introduïa la importància del mallat a l'hora de fer l'anàlisi pel mètode d'elements finits.

Pel nostre model hi ha regions crítiques on és necessari densificar el mallat com són tots els dominis que formen el bacteri, tots els vèrtex dels dígit, i les superfícies dels elèctrodes que estan en contacte amb el bacteri.

Per tant, es realitza un mallat controlat per l'usuari on per les regions no crítiques es defineix el mallat predefinit pel programa com a "normal". Pel domini del periplasma es defineix una mida màxima dels elements finits que allà s'hi formen de 5 nm. El gruix del periplasma és de 10 nm i, per tant, s'assegura que hi hagi almenys un node enmig d'aquest espai. Finalment, pels vèrtex dels elèctrodes es defineix una mida màxima dels elements de  $0.1 \mu\text{m}$  ja que són els punts on hi ha la màxima densitat de corrent (vegeu Figura 3-9).

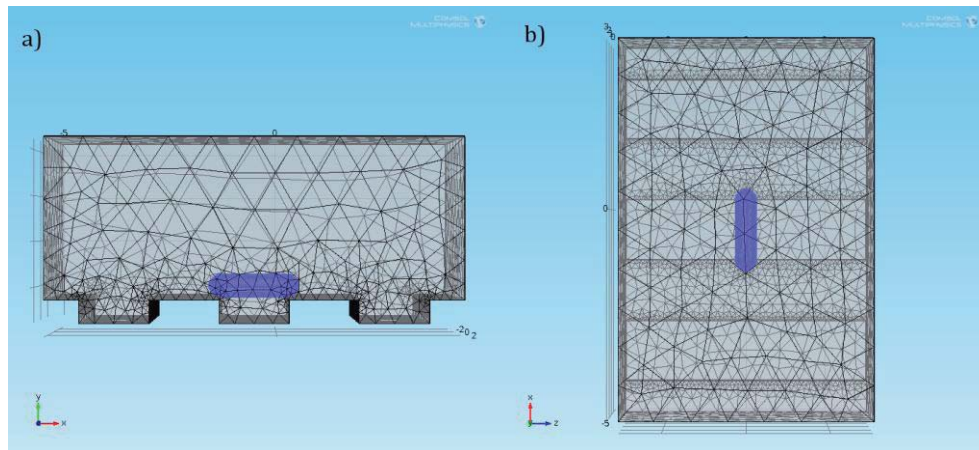


Figura 3-9: Vista en projecció YX (a) i XZ (b) del mallat definit per la cel·la de simulació.

### 3.3. Detecció bacteriana

Un cop optimitzats tots els paràmetres de la cel·la s'analitzen els resultats obtinguts. Els elèctrodes es defineixen amb l'opció de superfícies d'impedància distribuïda i en un s'hi aplica un voltatge d'1 V i en l'altre de 0. Així mateix, en ambdós es defineixen els mateixos valors pels paràmetres de resistència i capacítància de superfície que són de  $10^8 \Omega \cdot \text{m}^2$  i  $1.7 \cdot 10^{-2} \text{ F/m}^2$  respectivament.

El valor de la resistència s'escull arbitràriament perquè és un valor prou alt que ja es pot considerar com a infinit. Per altra banda, la capacítància de la superfície es fixa tenint en compte el comportament experimental dels nostres IDEs de  $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}$ .

El resultat que interessa de les simulacions és la normal de la densitat de corrent que arriba a un dels dos elèctrodes. Aquest corrent ( $I$ ) s'expressa en nombres complexos  $i$ , tenint en compte que el voltatge aplicat és d'1 V, fàcilment s'obté el resultat en impedància integrant el corrent en tota la superfície dels elèctrodes i aplicant la llei d'Ohm (vegeu-ho al capítol 1).

Per tant, de cada simulació s'obté un valor d'impedància complexa per cada freqüència i d'aquí es pot extreure el mòdul, la fase, la part real i la imaginària.

3.3.1. Càlcul de l'increment de la impedància

La manera més comuna d'analitzar els resultats d'impedància és mitjançant l'ús de circuits elèctrics equivalents (CEE), tal i com es comentava al capítol 1. En aquest tipus d'anàlisi s'usa la variació del valor d'algun dels components del circuit com a senyal analític.

Per fer ajustaments de CEE s'ha de partir d'una hipòtesi d'entrada que suposi un model de CEE que correspongui amb el sistema. No obstant, les cèl·lules són sistemes complexos, i no es poden simplificar a CEE senzills (vegeu Figura 3-10).

Quan els CEE contenen més de quatre components aquests deixen de ser fiables ja que passa a haver més d'una possibilitat per ajustar al mateix senyal.

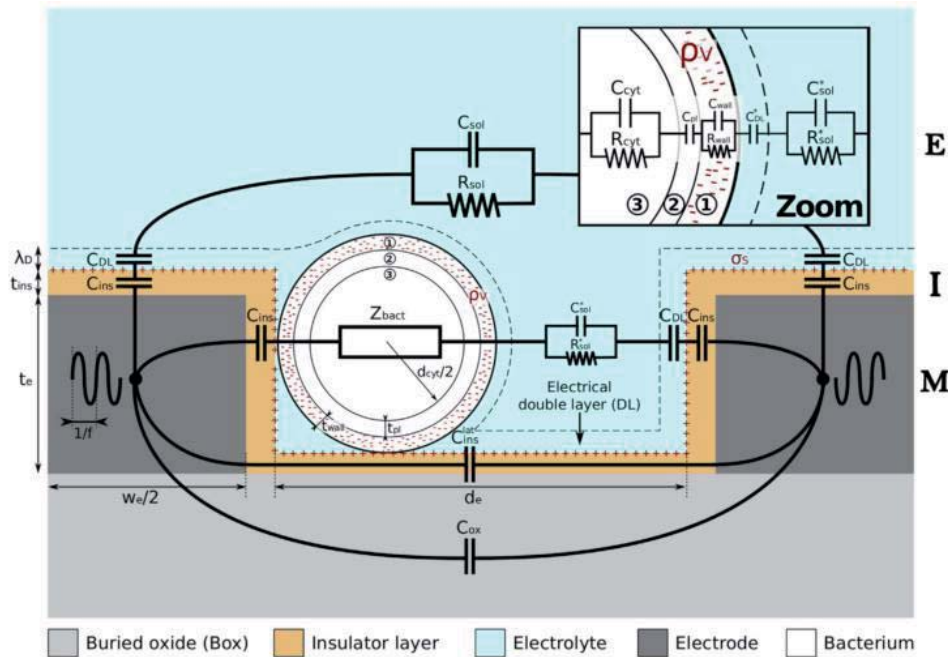


Figura 3-10: Esquema representant un circuit equivalent complex per un sistema d'elèctrodes interdigitats i *E. coli*. Extret de N. Couniot i col·laboradors (Couniot et al. 2015).

Pels avantatges que suposa com més endavant s'explicarà, es decideix buscar una alternativa a la representació en diagrama de Bode, que consisteix en representar **l'increment de la impedància ( $\Delta Z$ ) espectral**. Calculant els increments d'impedància respecte un blanc, s'obtenen les variacions d'impedància causades per la presència d'aquest bacteri o cos afegit al sistema. Sempre que experimentalment es mesurin mostres que es puguin considerar controls negatius o blancs es podran processar les dades de la mateixa manera i, així, es podran comparar amb les dades de les simulacions.

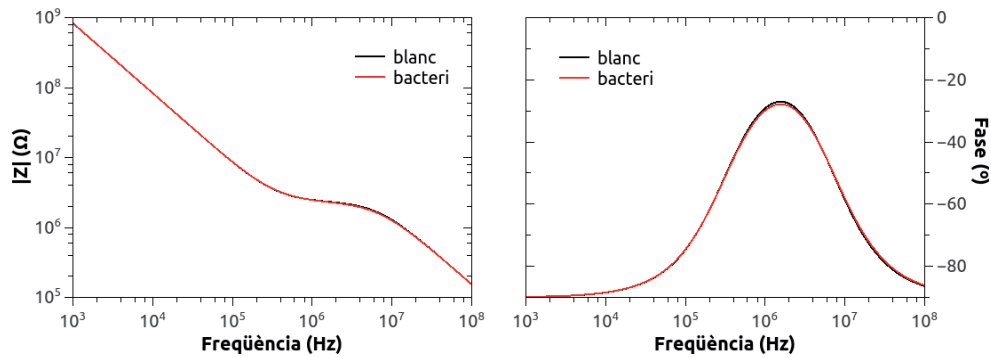


Figura 3-11: Diagrama de Bode on es representa la Z en mòdul i fase per la simulació amb COMSOL de la cel·la amb bacteri optimitzada.

Aquest càlcul es realitza amb el mòdul i amb la fase de la impedància ( $|Z|$  i  $\varphi$ ). Per tant, per cada freqüència analitzada s'obté un  $\Delta Z$ . A la Figura 3-11 es representen les dades d'impedància obtingudes de simular la nostra cel·la amb i sense bacteri. La diferència entre les corbes quasi no s'aprecia. Com es pot observar al diagrama de Bode,  $|Z|$  es representa amb ambdós eixos en escala logarítmica en base 10. Com que la magnitud dels valors de  $|Z|$  varia molt en funció de la freqüència, els  $\Delta|Z|$  es normalitzen respecte el valor del blanc per obtenir increments percentuals o relatius de  $|Z|$  i no increments absoluts. Això fa que es pugui apreciar molt millor la forma espectral que prenen les petites variacions d'impedància produïdes per la cèl·lula en tot el rang de freqüències mesurat.

Quan es representen els resultats d'aquests increments s'obté un espectre tant per  $\Delta|Z|$  com per  $\Delta\varphi$ . A la Figura 3-12 es mostra l'espectre resultant de les simulacions del bacteri.

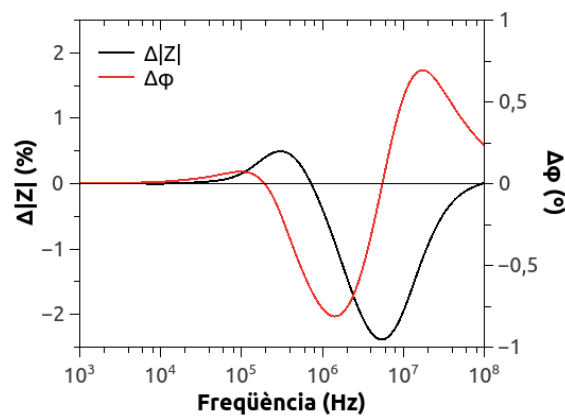


Figura 3-12: Representació de  $\Delta Z$  en mòdul i fase per la simulació amb COMSOL de la cel·la amb bacteri.

L'espectre de  $\Delta|Z|$  permet estudiar per quines freqüències el bacteri actua com a **partícula aïllant** ( $\Delta|Z|>0$ ) i per quines actua com a **partícula conductora** ( $\Delta|Z|<0$ ). Per altra banda, la representació espectral dels increments de  $\varphi$  dóna informació del desplaçament en fase provocat per la presència del bacteri en cada freqüència. És a dir, si el bacteri es comporta com un element més conductiu, resistiu o inductiu respecte la mesura del blanc.

En el cas concret de la simulació de la nostra cel·la amb bacteri (vegeu Figura 3-12) es pot observar com entre  $10^4$  i  $10^6$  Hz hi ha un augment de  $|Z|$ . És a dir que en aquest rang de freqüències el bacteri actua com a partícula aïllant. En canvi, de  $10^6$  a  $10^8$  Hz la presència del bacteri causa una disminució en  $|Z|$ . Per tant, en aquestes freqüències més altes el bacteri es comporta com una partícula conductora.

Com es pot apreciar en aquesta secció, tot i que la representació dels increments relatius de la impedància no s'ha utilitzat amb anterioritat, és ben útil per entendre els fenòmens elèctrics que ocorren per cada freqüència.

A més, a partir d'aquesta representació, deriva un nou sistema d'anàlisi de la impedància alternatiu als CEE que consisteix en utilitzar els valors dels màxims i/o mínims de l' $\Delta|Z|$  percentual, o fins i tot, la diferència entre els pics per comparar senyals.

#### *3.3.2. Posicionament del bacteri*

La primera cel·la que s'optimitza té representat un bacil en posició perpendicular als dígit contactant pels dos extrems amb dos dígit contigus. El fet que pels extrems el bacteri estigui contactant amb els elèctrodes afavoreix el decrement de  $Z$  a les freqüències en que el bacteri actua com una partícula conductora.

S'explora el canvi de posició del bacteri i es comparen els resultats (vegeu Figura 3-13 i Figura 3-14).

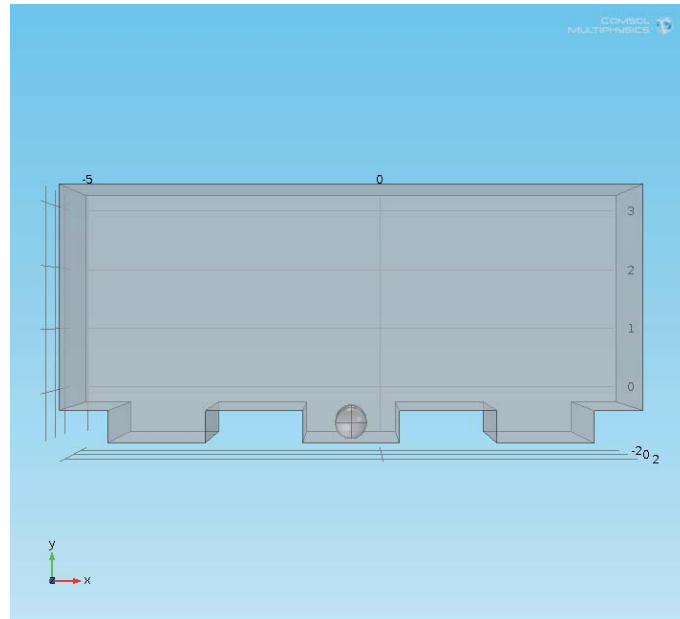


Figura 3-13: Cel·la de simulació amb el bacteri posicionat en paral·lel als dígit de l'IDE.

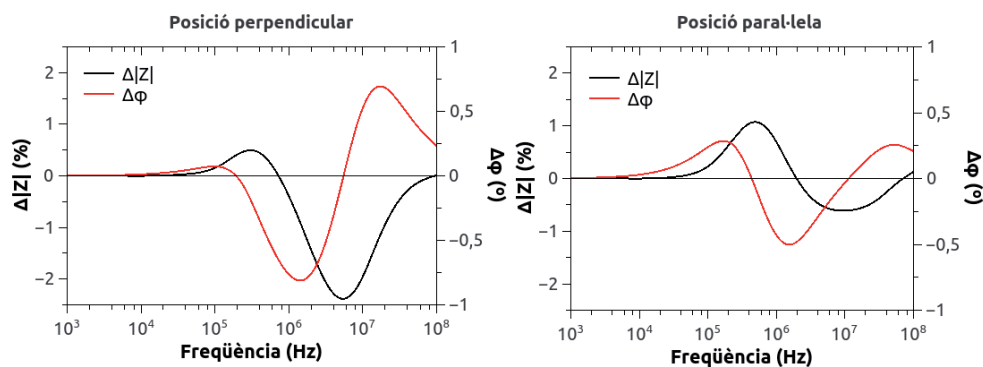


Figura 3-14: Representació dels espectres d' $\Delta Z$  pels dos posicionaments del bacteri: en perpendicular i en paral·lel als dígit dels IDEs.

S'observa com en funció de la seva posició, el bacteri afecta de diferent manera a la impedància entre elèctrodes. En el cas del bacil posicionat en **perpendicular** als dígit, clarament predomina el comportament **conductiu** sobre l'aïllant (en valor percentual). En canvi, quan el bacteri està posicionat en **paral·lel** predomina el comportament **aïllant** tot i que no deixa de ser conductiu per freqüències més altes (vegeu Figura 3-15).



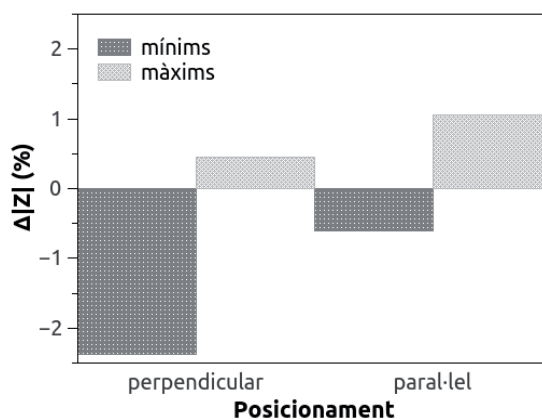


Figura 3-15: Representació en diagrama de barres dels valors màxims i mínims de l'espectre d' $\Delta|Z|$  percentual pels dos posicionaments del bacteri (perpendicular i paral·lel als dígit de l'IDE).

El bacteri en perpendicular, a les freqüències en que actua com a conductor, es podria dir que està curtcircuitant els elèctrodes. Per aquest motiu es dona un decrement tan acusat de  $|Z|$ .

### 3.3.3. Afectació dels diferents components cel·lulars a Z

*E. coli* té la capacitat de regular la biosíntesi d'oligosacàrids derivats de membrana en funció de l'osmolaritat del medi extern. Aquests oligosacàrids fixen els ions a l'espai periplasmàtic. En medis de baixa osmolaritat el bacteri incrementa la seva producció. D'aquesta manera es manté la pressió osmòtica alta al periplasma i s'evita la desestructuració cel·lular tot i la baixa osmolaritat del medi (Chancock 2002; Rumley et al. 1992).

Per tant, tot i canviar els bacteris a medis de baixa conductivitat, el periplasma d'una cèl·lula viva manté la seva alta càrrega iònica.

Segons el model de Bai, el periplasma té una conductivitat de 3 S/m mentre que la del citoplasma és de 0.22 S/m. Per tant, el **periplasma és més de 10 vegades més conductor que el citoplasma**. Per saber quin percentatge de corrent passa pel periplasma respecte el total que passa per la secció central del bacteri, es genera un pla que divideix el bacteri en dos. S'utilitza el model en que el bacteri està en perpendicular als dígit i s'integra el corrent que passa per tota la secció del bacteri i el corrent que només passa pel periplasma a la freqüència d'1 MHz. S'observa que el 72.29 % del corrent passa pel periplasma tot i que només representa un 8.5% de l'àrea total de la secció del bacteri (vegeu Figura 3-16).

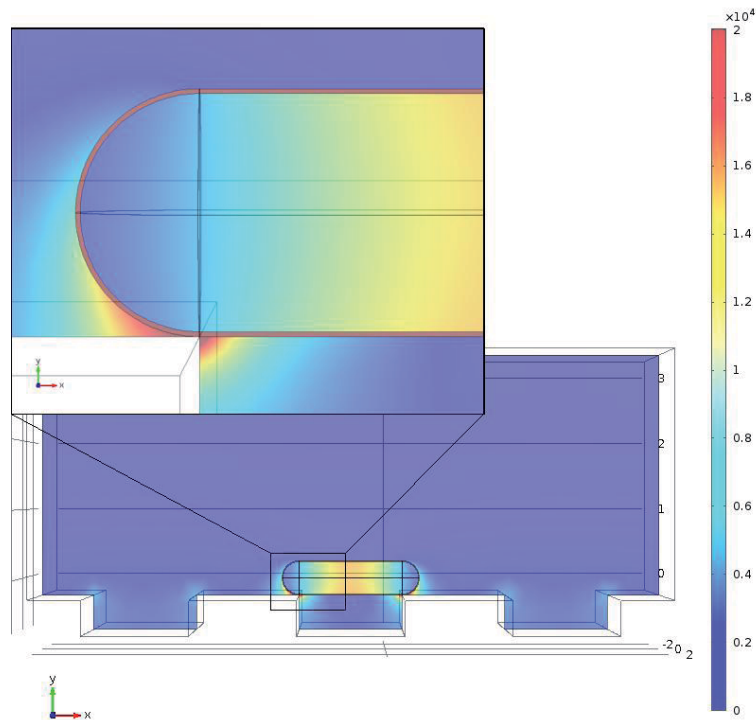


Figura 3-16: Representació de la densitat de corrent ( $A \cdot m^2$ ) del model simulat a 1 MHz.

### 3.4. Partícula aïllant, conductora i disminució de $C_{if}$

L'avantatge principal dels estudis mitjançant simulacions computacionals és que permeten explorar la resposta dels elèctrodes per tots els canvis de paràmetres que es desitgi provar prèviament a l'estudi experimental.

En aquest estudi s'analitza el canvi en  $Z$  per diferents casos extrems. Partint de la cel·la bàsica amb el bacteri en perpendicular, es modifiquen els paràmetres elèctrics dels seus components.

Es simula la resposta dels IDEs davant diferents situacions: una partícula amb la mateixa forma que el bacteri però que fos totalment conductora amb les característiques del citoplasma per tots els seus components ( $\sigma$  de 0.22 S/m i  $\epsilon_r$  de 81), una partícula amb forma de bacteri que fos totalment aïllant ( $\sigma$  de 0 S/m i  $\epsilon_r$  de 1), i un decrement en la capacitat de la interfície dels elèctrodes de  $1.7 \cdot 10^{-2}$  a  $1.69 \cdot 10^{-2}$  F/m<sup>2</sup> ( $-10^{-4}$  F/m<sup>2</sup>).

Aquest decrement de  $C_{if}$  en un experiment real equivaldria a un bloqueig de la superfície dels elèctrodes per una capa sòlida aïllant. Per exemple, un bloqueig amb BSA<sup>3</sup>. A la Figura 3-17 es mostren els  $\Delta Z$  per cada cas.

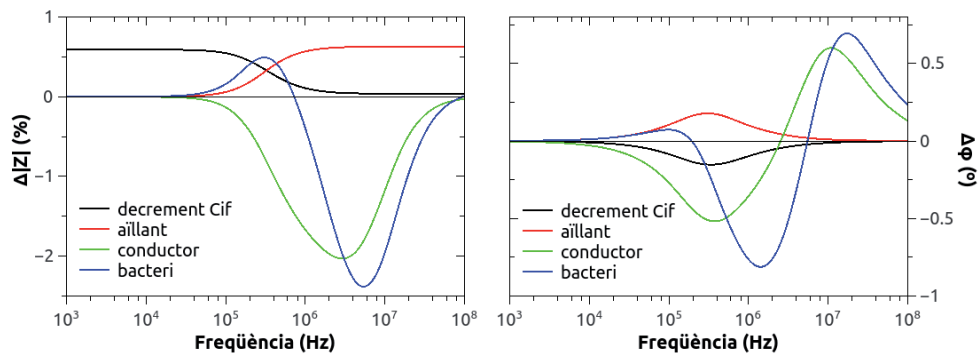


Figura 3-17: Representació gràfica dels  $\Delta Z$  provocats per la presència d'un bacil amb diferents característiques: bacteri (model de les tres capes), bacil totalment aïllant i bacil totalment conductor. També es simula la resposta per un decrement de la capacitat de la interfase.

Per la **partícula conductora**, l' $\Delta|Z|$  és **negatiu** per tot el rang de freqüències. El seu pic mínim coincideix amb la freqüència del mig entre pics de l'espectre d' $\Delta\phi$  tal com s'apunta en apartats anteriors.

Per altra banda, en el cas del **bacil aïllant**, l' $\Delta|Z|$  és **positiu** per tot el rang de freqüències i no s'observa un pic màxim si no que es manté en un valor constant a partir de la pujada.

Finalment, el **decrement de  $C_{if}$**  provoca un **augment de  $|Z|$**  a **les freqüències més baixes**, justament al contrari que la partícula aïllant. Aquesta resposta era la que es podia esperar ja que, precisament, els canvis en la interfase afecten les freqüències més baixes.

### 3.5. Canvi de la conductivitat del medi

Finalment, es realitza un estudi per analitzar la influència de la conductivitat del medi ( $\sigma_{medi}$ ) en les mesures (vegeu Figura 3-18).

<sup>3</sup> BSA: Sigles en anglès d'albumina de sèrum boví.

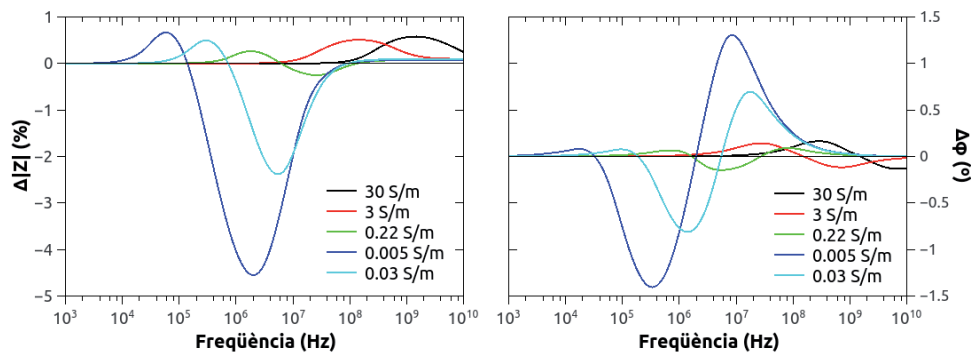


Figura 3-18: Representació gràfica dels  $\Delta Z$  provocats per la presència d'un bacteri en medis amb diferents  $\sigma$ .

Quan  $\sigma_{\text{medi}} < (\sigma_{\text{periplasma}} \text{ i/o } \sigma_{\text{citoplasma}})$ , es pot observar un decrement del  $|Z|$  a les freqüències corresponents ( $\sigma_{\text{medi}}$  de 0.005 a 0.22 S/m). A mida que augmenta  $\sigma_{\text{medi}}$ , el decrement del  $|Z|$  en aquestes freqüències és inferior ja que no hi ha tanta diferència entre conductivitats interna i externa del bacteri.

Quan  $\sigma_{\text{medi}} = \sigma_{\text{periplasma}}$  (3 S/m),  $\sigma_{\text{medi}}$  és superior a la de la resta d'elements interns de la cèl·lula. Per tant, a partir d'aquesta conductivitat el bacteri es comporta com una partícula aïllant. Tot i així, com que les freqüències per les quals el bacteri es pot detectar com a element aïllant són superiors a 1 MHz, en mesures reals no és possible observar aquest fenomen tal com s'explica a continuació.

A freqüències superiors a 1 MHz es comencen a observar les impedàncies causades pel sistema de mesura (elèctrodes, connexions, cables i potenciòstat). Per tant, aquestes impedàncies no donen informació del que succeeix a la cel·la de mesura. Un cop arribades aquestes freqüències on s'observen aquestes impedàncies, ja no té sentit parlar de canvis causats pels bacteris ja que només s'observa el comportament dels components del sistema.

En conseqüència, tot i que teòricament a conductivitats altes es podrien detectar els bacteris com a partícules totalment aïllants, a la pràctica, aquest comportament ja no es podria mesurar perquè abans d'arribar a aquestes freqüències s'observarien les esmentades impedàncies paràsites provinents del sistema de mesura que emascararien la impedància de la cel·la.

Finalment, es pot concloure que per obtenir un senyal superior del bacteri en  $\Delta|Z|$  percentual, els medis més òptims de mesura són els de més baixa conductivitat.

## 4. Optimització de les mides dels interdigitats en funció de les mides de l'anàlit

Com s'esmentava al capítol 1, la penetració del camp elèctric depèn de la geometria dels dígitos dels IDEs. Per aquest motiu s'estudia la relació entre la mida de l'anàlit i l'amplada i espaiat dels dígitos.

L'anàlit que s'utilitza de model consisteix en un bacteri gram negatiu en forma de coc (esfèrica) amb les característiques elèctriques del model de les tres capes pels seus components cel·lulars. S'escull la morfologia de coc perquè és la més senzilla i no dona possibilitat a diferents posicionaments que, com s'ha pogut observar anteriorment (secció 3.3.2 d'aquest capítol) es traduirien a diferents respostes impedimètriques.

Es proven tres diàmetres de coc ( $0.5 \mu\text{m}$ ,  $1 \mu\text{m}$  i  $1.5 \mu\text{m}$ ) i cinc geometries d'interdigitats ( $0.25 \mu\text{m} \times 0.25 \mu\text{m}$ ,  $0.5 \mu\text{m} \times 0.5 \mu\text{m}$ ,  $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ ,  $1.5 \mu\text{m} \times 1.5 \mu\text{m}$  i  $3 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$ ).

Per tots els casos es manté la superfície de la cel·la ( $54 \mu\text{m}^2$ ) i es posiciona el coc entremig de dos dígitos. D'aquesta manera els resultats són comparables perquè sempre es fa referència a la mateixa densitat cel·lular.

La Figura 3-19 mostra els espectres d' $|\Delta|Z|$  percentual per les diferents combinacions de mides de coc i IDEs.

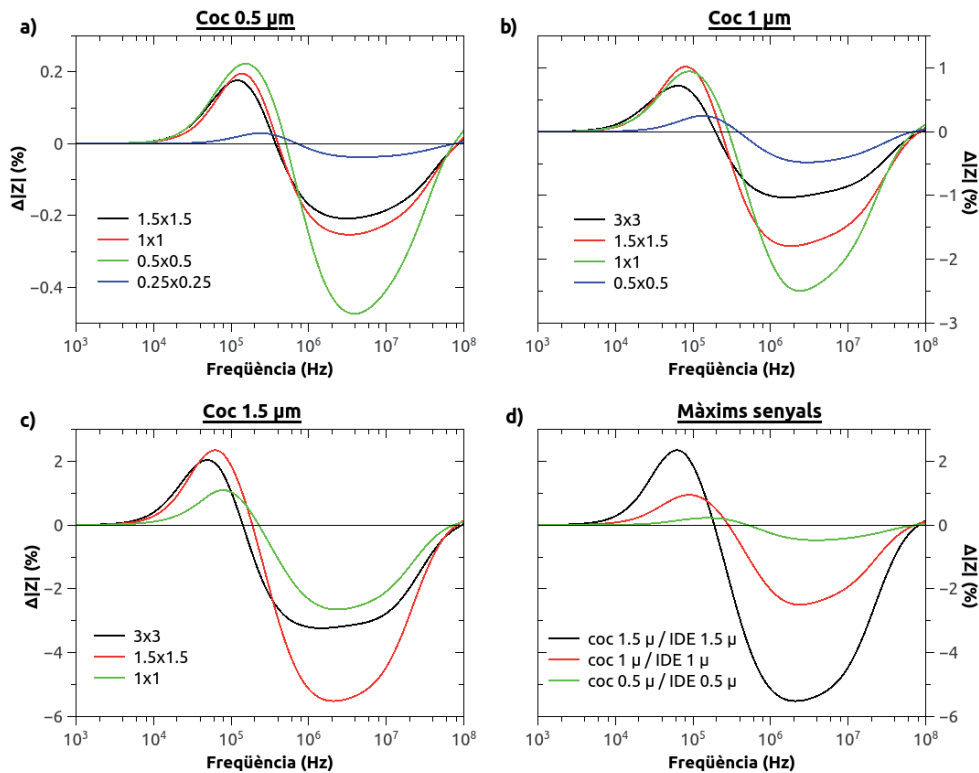


Figura 3-19: Estudi de la relació de senyal obtingut per la mesura de diferents diàmetres de cocs gram negatius [0.5  $\mu\text{m}$  a), 1  $\mu\text{m}$  b) i 1.5  $\mu\text{m}$  c)] amb diferents geometries de IDEs (0.25x0.25, 0.5x0.5, 1x1, 1.5x1.5, 3x3). L'espectre d) mostra les respostes màximes per cada mida de coc.

En tots els casos, la relació 1:1 (diàmetre coc : mida IDEs) és la que dona major senyal. Per altra banda, si s'observen els senyals màxims per cada diàmetre de coc (Figura 3-19 d) es pot apreciar que, el senyal minva amb la disminució de la mida del bacteri.

La Taula 3-2 conté els diferents paràmetres obtinguts per l'espectre de l' $\Delta|Z|$  percentual. La columna "Diferència" correspon al càlcul de la diferència entre pics. Per altra banda, per poder representar solapades les respostes pels diferents diàmetres de coc i comparar les seves tendències, es normalitza aquesta diferència entre pics respecte el valor màxim de diferència per cada cas (vegeu fórmula 1.3).

Diàmetre Coc ( $\mu\text{m}$ )	IDE	Quocient Bacteri/IDE	Màxim (%)	Mínim (%)	Diferència (%)	Normalitzat respecte màxim
0.5	0.25x0.25	2.00	0.03	-0.04	0.07	$9.71 \cdot 10^{-2}$
	0.5x0.5	1.00	0.22	0.47	0.69	1.00
	1x1	0.50	0.19	-0.25	0.45	$6.48 \cdot 10^{-1}$
	1.5x1.5	0.33	0.18	-0.21	0.45	$5.58 \cdot 10^{-1}$
1	0.5x0.5	2.00	0.25	-0.48	0.73	$2.14 \cdot 10^{-1}$
	1x1	1.00	0.90	-2.49	3.40	1.00
	1.5x1.5	0.67	1.00	-1.78	2.78	$8.18 \cdot 10^{-1}$
	3x3	0.33	0.72	-1.03	1.74	$5.13 \cdot 10^{-1}$
1.5	1x1	1.50	1.08	-2.64	3.72	$4.76 \cdot 10^{-1}$
	1.5x1.5	1.00	2.32	-5.49	7.82	1.00
	3x3	0.50	1.93	-3.23	5.16	$6.60 \cdot 10^{-1}$

Taula 3-2: Valors extrets de l'espectre d' $|\Delta|Z|$  percentual.

$$1.3. \text{ Normalització} = \frac{\text{Diferència entre pics}}{\text{Diferència màxima per aquell diàmetre de coc}}$$

La diferència màxima per cada diàmetre de coc coincideix amb el cas en que el quocient diàmetre coc / mida IDEs és 1.00. Per aquest motiu, per tots els casos en que el diàmetre del coc i el gruix i espaiat entre dígit són de la mateixa mida, el valor resultant de la normalització és 1.00.

A la Figura 3-20 es representen les diferències de pics en funció del quocient bacteri/IDE.

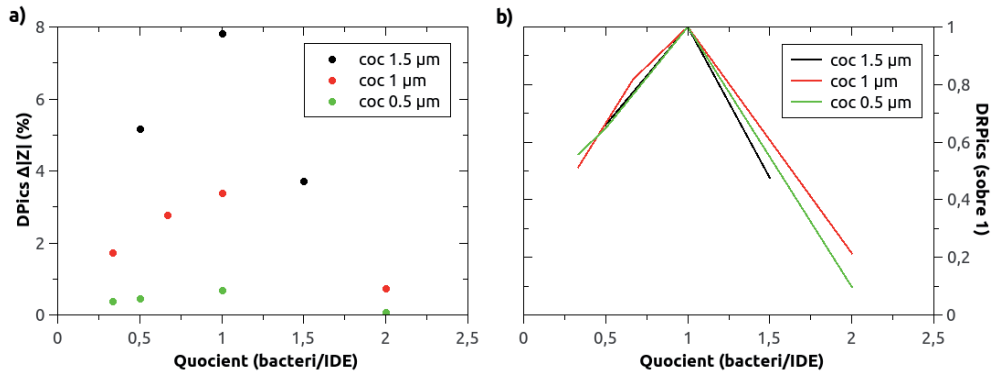


Figura 3-20: Representació de la diferència entre pics màxims de senyal dels espectres de la Figura 3-19 en valors absoluts a), i normalitzades b) on DRPics vol dir Diferència Relativa entre Pics.

A continuació es detalla l'explicació teòrica que respon a aquests resultats.

En disminuir les mides es donen dos fenòmens antagònics. Per una banda, disminueix la impedància perquè els dígit estan més junts, això té com a conseqüència una disminució de la sensibilitat perquè disminueix l' $\Delta Z$  causat pel bacteri (vegeu Figura 3-21). Però per altra banda, augmenta la proporció de corrents que només passen per dins del bacteri i, per tant, a les freqüències en que és conductor, com a conseqüència d'aquest fet, augmenta el senyal en el pic negatiu de l'espectre de l' $\Delta|Z|$  percentual, és a dir que augmenta la sensibilitat.

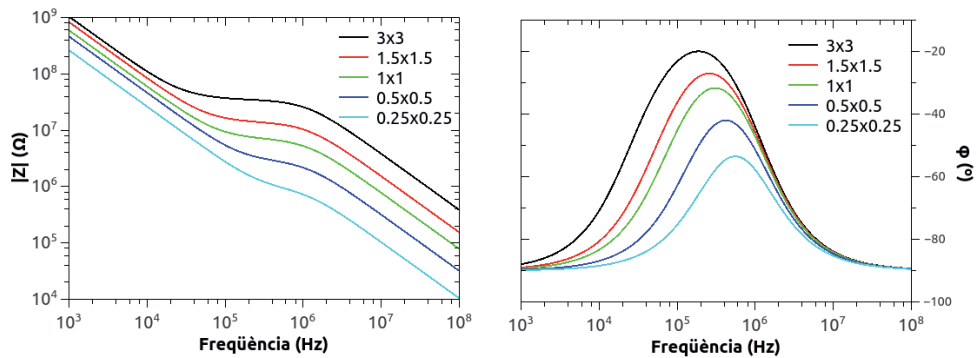


Figura 3-21: Representació del diagrama de Bode amb el  $|Z|$  i la  $\phi$ . Es mostra el decrement d'impedància com a conseqüència de la disminució de la geometria de l'IDE.

En els casos en que la distància entre dígit és superior al diàmetre del coc (quocients <1), predomina el segon efecte i no s'obté el màxim senyal perquè pocs corrents passen per dins el bacteri. A la relació 1:1 s'obté el màxim senyal ja que el coc contacta amb dos elèctrodes. Quan el diàmetre del coc és superior a la distància entre dits (quocients >1) el coc segueix contactant amb dos elèctrodes però la impedància ha baixat tant que s'ha perdut sensibilitat, és a dir, disminueix el senyal causat pel bacteri.



Per tant, la **relació òptima** de **1:1** és aquella en que s'arriba a un compromís entre ambdós efectes.

## 5. Conclusions

La metodologia de simulació utilitzada queda validada mitjançant l'obtenció de resultats anàlegs als analítics i experimentals de la literatura (Bai et al. 2006).

L'optimització de les mides de la cel·la mínima es resol amb una cel·la d'amplada de 9  $\mu\text{m}$ , profunditat de 6  $\mu\text{m}$  i alçada de 4  $\mu\text{m}$ .

La posició del bacteri respecte els dígits dels IDEs afecta a la resposta de Z. El posicionament perpendicular del bacteri respecte els dígits és el que permet obtenir un senyal superior. Amb aquesta posició, a les freqüències en que el bacteri actua com a conductor, es dona un curtcircuit dels elèctrodes.

Amb la integració del corrent a la freqüència d'1 MHz s'observa que el 72.29 % del corrent passa pel periplasma tot i que només representa un 8.5% de l'àrea total de la secció del bacteri.

Per l'estudi en que el bacil es modifica perquè sigui una partícula totalment conductora o totalment aïllant s'obté un  $\Delta|Z|$  negatiu per totes les freqüències pel primer cas, i  $\Delta|Z|$  positiu pel segon.

Per l'estudi de la resposta d'un decrement de  $C_{if}$ , l'augment de  $|Z|$  només es produeix a les freqüències més baixes.

La  $\sigma_{\text{medi}}$  afecta totalment la resposta en Z del bacteri. Per obtenir el màxim senyal el més òptim és realitzar les mesures en el medi de més baixa conductivitat possible.

Per l'estudi d'optimització de la relació entre les mides del bacteri i dels IDEs, es conclou que la relació òptima és la de 1:1 perquè s'arriba a un compromís entre els efectes antagònics produïts per la disminució de la geometria de l'IDE: la pèrdua de sensibilitat per una disminució de la impedància total i l'augment de sensibilitat perquè més proporció de corrents penetren la cèl·lula.

## 6. Referències

- Asami, K., T. Hanai, and N. Koizumi. 1980. "Dielectric Analysis of Escherichia Coli Suspensions in the Light of the Theory of Interfacial Polarization." *Biophysical journal* 31(2):215–28. Retrieved  
(<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1328779&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Bai, Wei, K. S. Zhao, and K. Asami. 2006. "Dielectric Properties of E. Coli Cell as Simulated by the Three-Shell Spheroidal Model." *Biophysical chemistry* 122(2):136–42. Retrieved January 14, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16603309>).
- Carstensen, E. L., H. a Cox, W. B. Mercer, and L. a Natale. 1965. "Passive Electrical Properties of Microorganisms: I. Conductivity of Escherichia Coli and Micrococcus Lysodeikticus." *Biophysical journal* 5(3):289–300. Retrieved  
(<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1367736&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Chancock, I. 2002. "Bacterial Cell Walls: An Overview." Pp. 33–46 in *Molecular Medical Microbiology*. Elsevier. Retrieved  
(<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780126775303502221>).
- Couniot, N., a. Afzalian, N. Van Overstraeten-Schlögel, L. a. Francis, and D. Flandre. 2015. "Capacitive Biosensing of Bacterial Cells: Analytical Model and Numerical Simulations." *Sensors and Actuators B: Chemical* 211:428–38. Retrieved  
(<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400515001355>).
- Littmarck, Svante and Farad Saeidi. 2016. "COMSOL." Retrieved March 6, 2016  
(<https://www.comsol.com/comsol-multiphysics>).
- Mateu Martínez, Rosa and Ignasi Corbella Sanahuja. 2007. "Diccionari de Telecomunicacions." 72–74.
- Rumley, M. K., H. Therisod, A. C. Weissborn, and E. P. Kennedy. 1992. "Mechanisms of Regulation of the Biosynthesis of Membrane-Derived Oligosaccharides in Escherichia

Coli." *Journal of Biological Chemistry* 267(17):11806–10.

# CAPÍTOL 4

## Detecció impedimètrica de microorganismes sobre elèctrodes interdigitats

En aquest capítol es detalla el procediment experimental realitzat per la detecció d'*E. coli* sobre IDEs de  $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}$  i de *S. cerevisiae* sobre IDEs de  $6 \times 6 \mu\text{m}$ .

Es tracta de dos microorganismes de mides i característiques molt diferents i per optimitzar la seva detecció és necessari l'ús de diferents geometries d'elèctrodes interdigitats.

En les mesures d'*E. coli* s'observa que aquestes responen seguint un patró espectral d'impedància que és únic i es diferencia de la resposta obtinguda per les mesures d'altres esdeveniments que també alteren la impedància.

En cas dels llevats, s'observa que actuen com a partícules purament conductores i s'obté una relació lineal entre la cobertura de l'IDE per llevats i el senyal negatiu de Z.

## 1. Detecció d'*Escherichia coli* per immunoassaig sobre IDEs de 1.5 x 1.5 µm

Tal com s'esmentava al capítol anterior, el grup disposa d'uns elèctrodes interdigitats d'1.5 µm d'amplada i de separació entre dígit. Com que les mides aproximades d'un bacteri *E. coli* és de 2 µm de llarg per 0.5 µm de diàmetre, és a dir, unes mides raonablement similars a les dels dígit d'aquesta geometria es decideix utilitzar aquests IDEs per estudiar la seva resposta impedimètrica en presència d'*E. coli*.

La major part del treball que es detalla a continuació està publicada a la revista *Sensing and BioSensing Research* (Mallén-Alberdi, Vigués, Mas, Fernández-Sánchez, & Baldi, 2016) (vegeu Annex).

### 1.1. Reactius i solucions

Anticòs primari IgG de cabra anti-*E. coli* O157:H7 policlonal i anticòs secundari anti-cabra IgG marcat amb Cy3 (KPL Inc., Gaithersburg, EUA). L'anticòs primari es va conjuguar amb estreptavidina utilitzant l'article comercial *Lightning-Link™ Streptavidin Conjugation Kit* (Innova Biosciences, Babraham, Regne Unit). Glicina, KCl, (3-aminopropil)trimetoxisilà (APTMS), BSA, dimetil sulfòxid, Tween 20, àcid fosfòric (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA). NHS-PEG<sub>12</sub>-Biotina (Thermo Scientific, Barcelona, Espanya), esferes d'òxid de silici d'1 µm de diàmetre (Bangs Laboratories Inc., Indianapolis, EUA).

Tampó glicina 250 mM pH6 (ajustat a  $\sigma = 30 \mu\text{S}/\text{cm}$  amb KCl). Tampó fosfat (PB) 100mM pH 7. Tampó fosfat amb Tween 20 al 0.05% (PB-T).

### 1.2. Materials i mètodes

#### 1.2.1. Cultiu i creixement bacterià

La *E. coli* DSMZ 17076 és una soca no patogènica però fenotípicament igual a la soca toxicogènica *E. coli* O157:H7.

Es fan créixer els bacteris aeròbiamment en el medi de cultiu Luria-Bertani durant 18 hores a 37°C en un bany amb agitació (160 rpm). Posteriorment, els cultius es centrifuguen 10 minuts a 10100 g a una centrífuga 5804R (Eppendorf, Madrid, Espanya). El medi sobrenedant s'elimina i es fa una resuspensió del precipitats cel·lular amb tampó glicina. Aquest procés de centrifugació i resuspensió es repeteix dues vegades més per eliminar els productes metabòlics, els fragments de membrana i les proteïnes citoplasmàtiques. Finalment, es fa una resuspensió amb 20 mL del mateix tampó glicina i es mesura la densitat òptica a 600 nm a un espectrofotòmetre Smartspec™Plus (Bio-rad, Hercules, EUA) per obtenir una aproximació de la concentració cel·lular del vial ( $10^8$  ufu/mL).

### *1.2.2. Funcionalització de la superfície dels IDEs*

Com s'esmentava anteriorment, els elèctrodes interdigitats que s'utilitzen per realitzar les mesures contenen 466 dígitos de silici policristal·lí. Els seus dígitos tenen la mateixa amplada i espaiat de 1.5  $\mu\text{m}$ , i la seva àrea d'exposició al medi és de 2.25 mm<sup>2</sup>. Aquests elèctrodes van ser produïts a la sala blanca de l'IMB-CNM seguint el procés de fabricació descrit per de la Rica i col·laboradors (de la Rica, Fernández-Sánchez, & Baldi, 2006).

La superfície dels IDEs es modifica amb els anticossos policlonals específics contra *E. coli*, com s'explica a continuació.

Inicialment es fa una neteja i activació de la seva superfície mitjançant un tractament de plasma d'oxigen en condicions de 200 W i 0.8 mbar durant 2 minuts utilitzant un equip TePla 300 (PVA MPS GmbH, Munich, Alemanya). Després s'hi uneix covalentment un silà (APTMS) mitjançant el mètode de deposició química de vapor (Hunt, Soteropulos, & Armani, 2010). Aquest mètode consisteix en introduir el silà en estat líquid dins d'uns petits vials oberts i col·locar-los juntament amb els xips a modificar en una càmera hermètica. L'ambient d'aquesta càmera es satura de nitrogen per desplaçar l'aigua de l'aire i es deixa reaccionar durant tota la nit. A continuació, s'uneix covalentment la biotina a la superfície silanitzada fent una incubació dels elèctrodes durant 30 minuts a temperatura ambient en una solució de 10 mM de NHS-PEG<sub>12</sub>-Biotina en dimetil sulfòxid.

Tot seguit, aquesta superfície s'aclareix a fons amb acetona pura i aigua desionitzada i s'incuba en una solució de 0.5  $\mu\text{g/mL}$  d'anticòs anti-*E. coli* conjugat amb estreptavidina en PB.

Finalment, els IDEs coberts d'anticossos es renten tres vegades amb PB-T i es reserven mullats en PB fins a ser usats.

### *1.2.3. Caracterització de la modificació de la superfície*

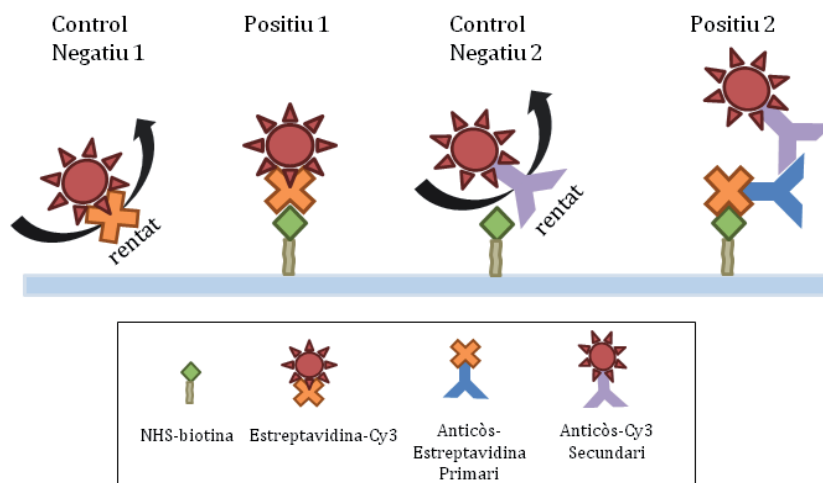
Per avaluar l'èxit de la funcionalització de la superfície dels IDEs amb anticossos, es realitza una caracterització minuciosa de cada etapa del procés mitjançant imatges de fluorescència.

La unió covalent de la biotina s'estudia amb un conjugat d'estreptavidina amb el fluorofor Cy3. S'incuben 30 minuts a temperatura ambient en una solució de 20 µg/mL Cy3-estreptavidina en PB quatre xips sense biotina (control negatiu 1) i quatre amb biotina (control positiu 1).

En paral·lel, també s'estudia la interacció entre l'anticòs primari conjugat amb estreptavidina i la superfície de l'IDE modificada amb biotina mitjançant l'ús d'un anticòs secundari marcat amb Cy3. De la mateixa manera que pel cas anterior, s'incuben quatre xips amb biotina a la superfície però sense anticòs primari (control negatiu 2) i quatre amb anticòs primari a la superfície (control positiu 2) durant 30 minuts a temperatura ambient en una solució de 10 µg/mL d'anticòs secundari-Cy3 en PB (vegeu Figura 4-1).

Finalment, tots els xips s'aclareixen successivament amb PB-T i aigua i s'assequen sota un flux de nitrogen.

Posteriorment es visualitzen al Servei de Microscòpia de la Universitat Autònoma de Barcelona utilitzant un microscopi òptic de fluorescència (Leica, Nanterre, França). L'objectiu que s'utilitza és el de 10x amb obertura numèrica de 0.40 i mode d'operació en sec. La longitud d'ona d'excitació del fluorofor Cy3 és de 550 nm i d'emissió 570 nm.



*Figura 4-1: Esquema del procés per dur a terme l'estudi de caracterització de la modificació de la superfície.*

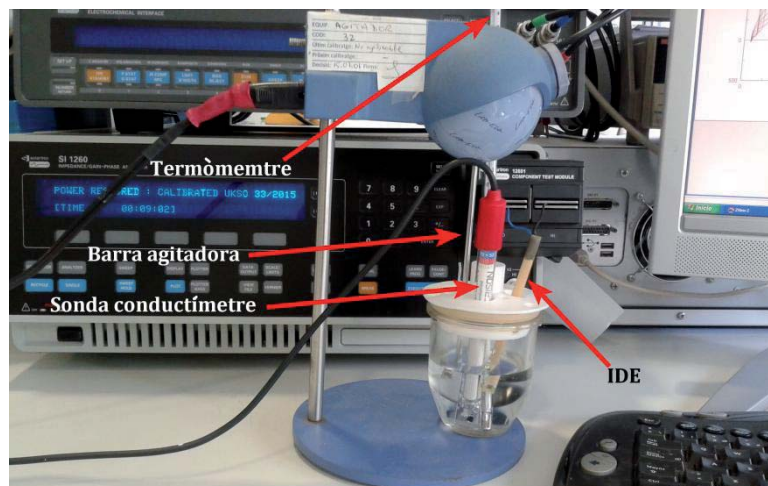
#### **1.2.4. Mesures d'impedància**

Un cop modificada la superfície dels IDEs, els elèctrodes s'aclareixen amb tampó glicina i es submergeixen a la solució de mesura. Aquesta solució consisteix en tampó glicina amb una concentració d'*E. coli* de  $10^8$  ufc/ml.

A continuació es realitzen les mesures amb l'anàlitzador d'impedàncies SI 1260 Solartron a 10 mV d'amplitud de voltatge, 0 V de potencial en corrent continu, en el rang de freqüències comprès entre 1 kHz i 10 MHz i a tres temps d'incubació: 0, 15 i 30 minuts.

Per poder dur a terme la correcció de l'augment de conductivitat causat per l'activitat metabòlica de la cèl·lula, paral·lelament a les mesures amb els IDEs, es controlen els canvis de conductivitat mitjançant un conductímetre comercial Micro CM 2202 (Crison Instruments S.A., Alella, Espanya). A més, durant les mesures també es controla la temperatura amb un termòmetre de mercuri i s'agita contínuament (vegeu Figura 4-2).





*Figura 4-2: Fotografia de la cel·la de mesura. Es pot observar com pels diferents orificis de la tapa de la cel·la es col·loquen la barra d'agitació, la sonda connectada al conductímetre, l'IDE connectat a l'analitzador d'impedàncies i, al fons, el termòmetre de mercuri.*

A part de mesurar els bacteris, també es prenen mesures d'altres esdeveniments relacionats per poder comparar les diferents respostes impedimètriques: Bloqueig de la superfície amb BSA, deposició de microesferes d'òxid de silici i augment de conductivitat de la solució.

L'adsorció de BSA a la superfície es realitza mitjançant una incubació d'una hora dels IDEs en una solució aquosa d'1 % BSA (m/v). L'espectre d'impedància es mesura abans i després de l'adsorció de la BSA sempre en el mateix tampó glicina que en el cas dels bacteris.

Per altra banda, es prepara una suspensió d'esferes d'òxid de silici en aigua desionitzada i es disposa aquesta suspensió a la superfície dels elèctrodes. Es deixen precipitar les partícules i s'assequen durant 5 minuts a 80°C utilitzant una placa calefactora. L'espectre d'impedància també es mesura abans i després de la deposició de les microesferes en el tampó glicina.

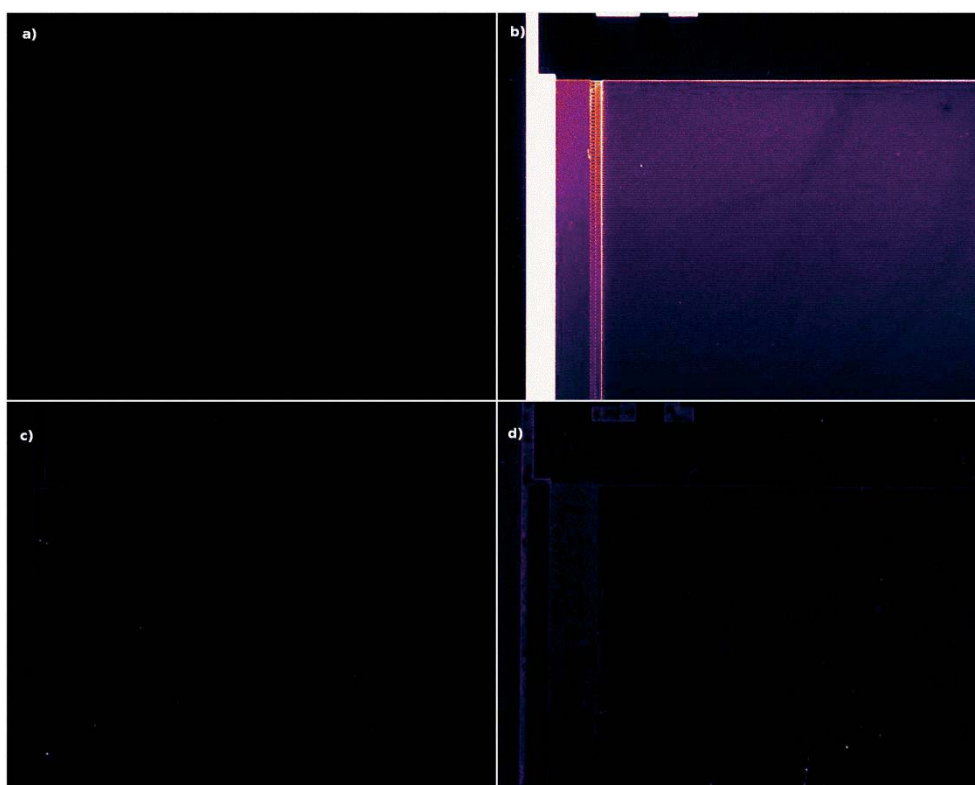
Les mesures de canvi de conductivitat es prenen a partir d'un tampó glicina de 5  $\mu\text{S}/\text{cm}$  que es va ajustant a conductivitats superiors amb l'addició de KCl.

### 1.3. Resultats i discussió

#### 1.3.1. Caracterització de la modificació de la superfície

La Figura 4-3 mostra una imatge de fluorescència de cada tipus de mostra que s'analitza per poder estudiar la funcionalització de la superfície dels IDEs.

Tal com es pot observar, tant la unió de la biotina a la superfície com la seva cobertura amb anticòs primari es dona correctament i uniforme. Tot i així, s'aprecia una gran diferència d'intensitats entre ambdós controls positius. Aquest fet pot ser causat per la diferència entre constants de dissociació (biotina/estreptavidina i anticòs/antigen) i per l'existència d'una segona capa en el cas del segon control positiu, que augmentaria els impediments estèrics. La constant de dissociació de la interacció biotina-estreptavidina ( $K_d = 10^{-15}$  M) (Zhang et al., 2013) és molt inferior a la constant de les interaccions d'anticòs més fortes ( $K_d = 10^{-9}$  M) (Landry, Fei, & Zhu, 2011). No obstant, com s'analitzarà a continuació, el segon positiu té un senyal significativament superior als dos controls negatius.



*Figura 4-3: Imatges de fluorescència de quatre xips amb diferents modificacions de la superfície: control negatiu 1 sense biotina (a), control positiu 1 amb biotina (b), control negatiu 2 sense anticòs primari (c), control positiu 2 amb anticòs primari (d).*

Els resultats de fluorescència es processen i analitzen utilitzant el programa lliure Image J (Schneider, Rasband, & Eliceiri, 2012) i el programa estadístic d'anàlisi de dades Deducer (R Development Core Team, 2014).

*Image J permet extreure les intensitats de cada píxel que configura la imatge. La*

Figura 4-4 mostra el diagrama de barres de la mitjana i l'histograma resultant per aquesta anàlisi de dades.

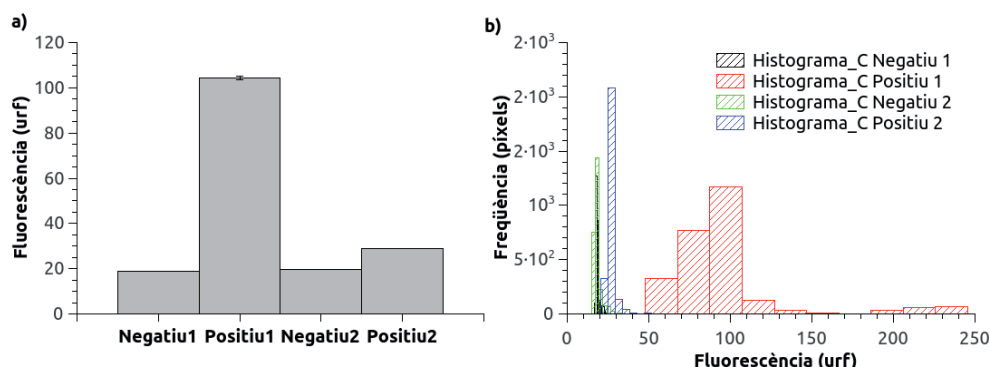


Figura 4-4: Diagrama de barres representant la mitjana amb el seu error estàndard (a) i l'histograma de distribució de dades per cada mostra (b).

Posteriorment, s'agrupen els valors dels controls negatius per una banda, i dels controls positius per altra, i s'aplica l'estadístic T-test de Welch per dues mostres. La Taula 4-1 mostra els resultats obtinguts del contrast estadístic.

Mostra	Controls positius	Controls negatius
Mitjana	66.72	19.26
Diferència entre mitjanes	47.46	
p-valor	0	

Taula 4-1: Resultats de comparar els controls positius i controls negatius mitjançant el T-test de dues mostres de Welch.

Tenint en compte que la hipòtesi nul·la d'aquest test consisteix en dir que no hi ha diferència entre les mitjanes mostrals ( $H_0$ : Diferència = 0) i que el p-valor d'aquesta hipòtesi és 0, es pot rebutjar la hipòtesi nul·la. Per tant, es pot concloure que la diferència entre grups sí que és estadísticament significativa.

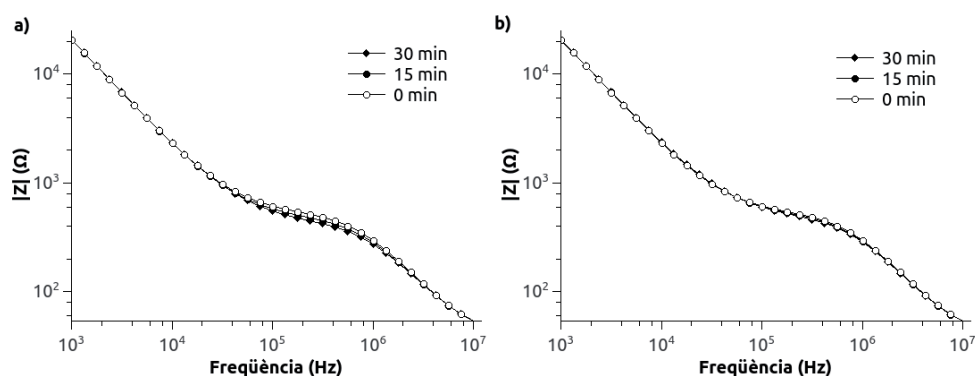
En conseqüència, d'aquest estudi es pot extreure que ambdues reaccions es donen correctament. És a dir, que tant la unió covalent de la biotina al substrat, com la interacció de l'anticòs anti-*E. coli* amb la superfície amb biotina, succeeixen de manera satisfactòria.

### 1.3.2. Mesures d'impedància

#### 1.3.2.1. Correcció de l'increment de conductivitat

L'activitat metabòlica cel·lular provoca un increment de la conductivitat del medi durant el període de mesura impedimètrica. Aquest canvi s'ha de tenir en compte per totes les mesures impedimètriques amb bacteris. Per aquest motiu es realitza una correcció per totes les dades obtingudes restant les variacions d'impedància registrades pel mateix IDE en resposta de variacions de conductivitat equivalents en solucions aquoses de KCl.

En paral·lel a les mesures es registra la conductivitat. La Figura 4-5 *a* representa l'espectre de  $|Z|$  del diagrama de Bode per les dades d'una mesura experimental on s'observa l'increment de conductivitat causat per l'excreció de metabòlits bacterians; les conductivitats registrades per aquest cas són de  $30.7 \mu\text{S}/\text{cm}$  a temps 0 min,  $34.6 \mu\text{S}/\text{cm}$  als 15 min i  $37.6 \mu\text{S}/\text{cm}$  als 30 min.



*Figura 4-5: Diagrama de Bode de  $|Z|$  per les dades experimentals (a), i de les dades refinades amb els canvis de conductivitat corregits (b).*

Primerament, es realitza un calibrat de conductivitat per cada parell d'elèctrodes i la seva regressió lineal a cada freqüència mesurada (vegeu Figura 4-6). Després es calcula la variació d'impedància causada per l'augment de conductivitat i aquesta es resta a les dades experimentals.

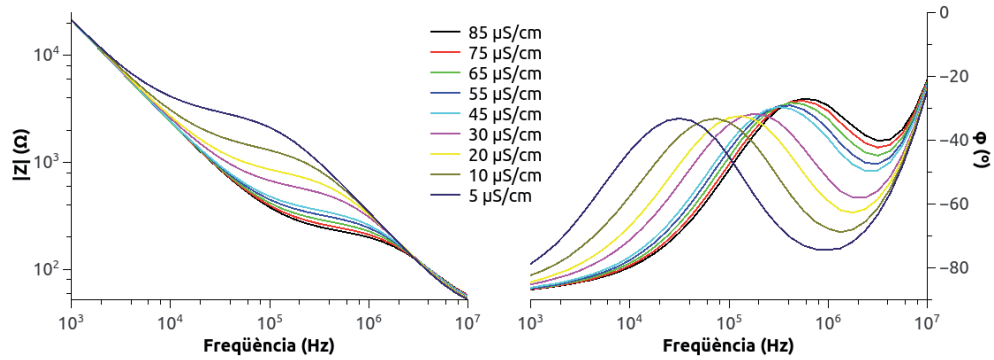


Figura 4-6: Representació del diagrama de Bode per un calibrat en conductivitat d'un IDE. La mitjana de constant de cel·la ( $k$ ) que s'extreu per tots els IDEs de  $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}$  utilitzats és de  $0.012 \text{ cm}^{-1}$ .

Aquestes dades refinades, per tant, només consideren la variació d'impedància causada per la simple presència del bacteri a la superfície dels IDEs sense el soroll produït per l'increment de conductivitat (vegeu Figura 4-5 b).

Per evitar que les variacions de conductivitat durant les mesures siguin majors, s'utilitza un medi de  $30 \mu\text{S/cm}$  i no el de  $5 \mu\text{S/cm}$  que seria el tampó glicina sense afegir KCl.

#### 1.3.2.2. Mesures bacterianes

A la Figura 4-7 a i b es mostra el diagrama de Bode per un parell d'IDEs amb la superfície modificada amb anticossos submergits en una solució amb *E. coli*. Les mesures es duen a terme a tres temps d'incubació: 0, 15 i 30 minuts.

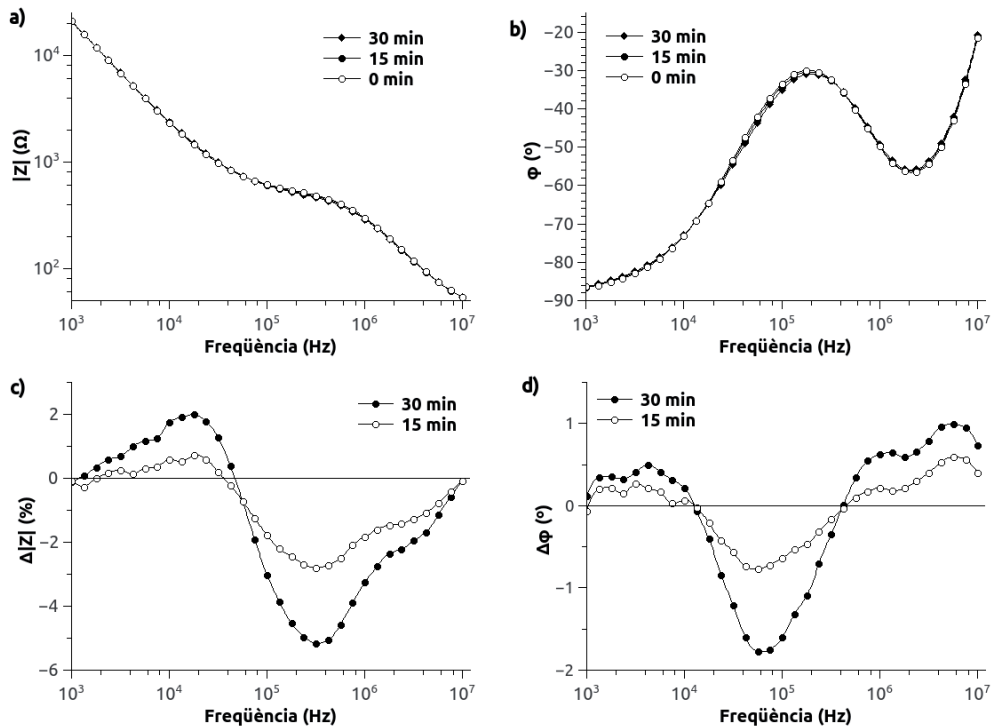


Figura 4-7: Diagrama de Bode on es representa la resposta en  $|Z|$  (a) i fase (b) dels tres temps de mesura. Representació dels  $\Delta Z$  respecte el temps 0 del  $|Z|$  (c) i de la fase (d).

Primerament, si s'observa el Bode de  $|Z|$  es poden apreciar tres pendents clarament diferenciats (Figura 4-7 a). A les freqüències baixes ( $<10^5$  Hz) domina la impedància de la interfície elèctrode-solució. En el cas concret dels elèctrodes interdigitats de silici policristal·lí submergits en una solució aquosa, aquesta impedància es refereix a la de la doble capa electroquímica i a la de la capa d'òxid de silici natiu. Aquesta  $Z$  és de naturalesa capacitiva i per aquest motiu té un pendent negatiu.

A freqüències intermèdies ( $10^5$  a  $10^6$  Hz), la resistència de la solució ( $R_s$ ) entre elèctrodes és la  $Z$  dominant. La resistència és independent de la freqüència i inversament proporcional a la conductivitat de la solució, per això té un pendent aproximat de 0.

A les freqüències altes ( $> 10^6$  Hz) el pendent de l'espectre torna a ser negatiu ja que passa a dominar la capacitat de la solució ( $C_s$ ), que és proporcional a la permitivitat de la solució.

Finalment, a la freqüència més alta que es mesura ( $10^7$  Hz), es pot començar a apreciar un decreixement del pendent. Aquest fenomen ve associat a la resistència dels elèctrodes, connexions i altres factors instrumentals més enllà de la cel·la d'estudi (de la Rica et al., 2006).

Un cop compensades les variacions de conductivitat, tal com s'explica a l'apartat anterior, els canvis en impedància produïts per les cèl·lules capturades a la superfície de l'IDE són massa petits per poder-se apreciar al diagrama de Bode. No obstant, la representació gràfica de la variació relativa de la impedància (utilitzada en el capítol anterior per analitzar els resultats de les simulacions) és una eina útil per poder distingir canvis clars en l'espectre de freqüències tant per  $|Z|$  com  $\varphi$  (vegeu Figura 4-7 c i d).

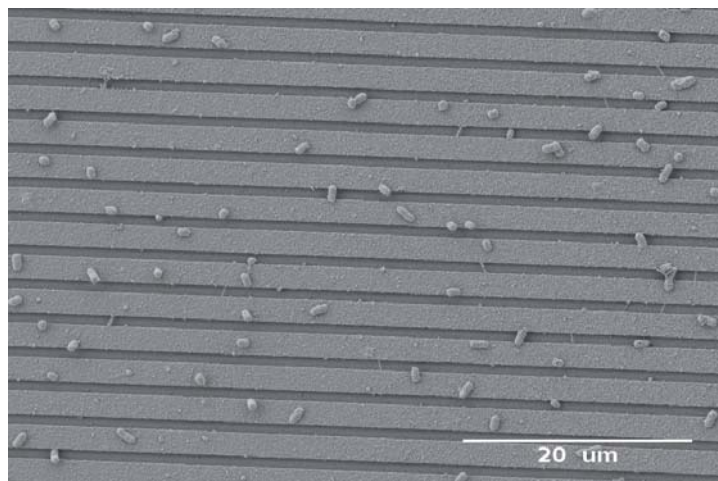
Al capítol anterior s'explicava detalladament el càlcul de  $\Delta|Z|$  percentual i  $\Delta\varphi$  així com l'explicació física per cada possible resultat.

Tornant a Figura 4-7 c, per tot el rang de freqüències mesurades ( $10^3$  to  $10^7$  Hz) es poden diferenciar dos pics, un de positiu i una altre de negatiu. Ambdós pics augmenten amb el temps, és a dir, amb l'increment de densitat bacteriana a la superfície dels elèctrodes.

L'augment de  $Z$  a les freqüències baixes (primer pic) és coherent amb els resultats obtinguts prèviament per detecció de bacteris per altres autors (Etayash, Jiang, Thundat, & Kaur, 2014; Kim, Moon, & Morgan, 2013).

En canvi, el segon pic negatiu indica una disminució de  $Z$  a les freqüències intermèdies, que suggereix que per aquestes freqüències els bacteris es comporten com a partícules més conductores que el medi. Aquest fet està en concordança amb els fenòmens de  $\beta$ -dispersió observats per suspensions cel·lulars (Cheung, Gawad, & Renaud, 2005). Més enllà de la freqüència crítica,  $f_c$ , els corrents poden penetrar a través de les membranes cel·lulars, i per tant, es pot mesurar l'interior de la cèl·lula. A les mesures dutes a terme en aquest treball, els bacteris es troben suspesos en una solució de  $30 \mu\text{S}/\text{cm}$  de conductivitat, és a dir, tres ordres de magnitud inferior que la conductivitat del periplasma d'*E. coli* reportada a la literatura ( $3 \cdot 10^4 \mu\text{S}/\text{cm}$ ) (Bai, Zhao, & Asami, 2006). Per aquest motiu, a freqüències superiors a  $f_c$ , es pot esperar un decrement significatiu de la  $Z$  mesurada amb els IDEs.

Un cop finalitzades les mesures, els xips s'observen a un SEM (Auriga, Zeiss, Oberkochen, Alemanya) (vegeu Figura 4-8).



*Figura 4-8: Imatge de SEM d'uns IDEs de 1.5x1.5 modificats amb anticòs i submergits durant 30 minuts en una suspensió d'E. coli de  $10^8$  ufc/mL en tampó glicina.*

A les imatges de SEM es pot observar com les cèl·lules es distribueixen aleatòriament a la superfície de l'IDE. A més, també cal destacar la baixa densitat de bacteris que es troben interaccionant amb la superfície tot i haver submergit el xip en una suspensió altament concentrada de bacteris ( $10^8$  ufc/mL).

Aquesta baixa eficiència en la captació de bacteris pels anticossos de la superfície dels elèctrodes es pensa que pot ser causada pel medi que s'utilitza. El tampó glicina és un medi de baixa conductivitat que és útil per fer les mesures d'impedància ja que, tal com s'estudiava al capítol anterior, una conductivitat del medi més baixa permet una millor detecció dels bacteris.

En tractar-se d'un medi amb concentracions salines baixes es possible que no es puguin blindar les càrregues de les diferents biomolècules que intervenen en la interacció. Per tant, tot i ser un medi òptim per mesurar, no és el millor medi per a que es doni la interacció bacteri-anticòs.

Aquest fet va provocar que fos altament difícil el calibrat amb diferents concentracions de bacteris ja que no es podia establir una relació directa de la concentració i el senyal de Z.

No obstant aquestes dificultats, sí que és cert que als gràfics amb els  $\Delta Z$  es pot observar com el valor dels pics en  $|Z|$  es dupliquen de 15 a 30 minuts. D'aquests resultats es pot deduir que amb aquest mètode s'ha de poder quantificar la concentració bacteriana.



Per altra banda, cal destacar aquesta peculiaritat de ser aïllant a freqüències baixes i conductor a freqüències més altes. Aquest patró que es detecta mitjançant la representació de l'espectre de  $\Delta|Z|$  percentual és únic del bacteri i ens ha de permetre distingir entre bacteris i altres objectes adherits a la superfície inespecíficament.

1.3.2.3. Mesures d'altres esdeveniments i comparació amb l'estudi per simulacions

Al capítol anterior es fa un estudi amb simulacions on es compara la resposta impedimètrica dels bacteris (utilitzant les característiques del model de les tres capes) amb la de partícules amb característiques aïllants, conductores i també amb una disminució de la capacitat de l'elèctrode.

En aquest estudi es conclou que aquest comportament freqüencial és únic dels microorganismes i no s'observa pels altres esdeveniments.

Per corroborar aquest estudi de simulacions FEA s'obtenen els mateixos espectres de  $Z$  per la mesura d'un augment de conductivitat, de l'addició d'una capa de BSA a la superfície, i l'adsorció de partícules d'òxid de silici d'1  $\mu\text{m}$  de diàmetre.

La Figura 4-9 *b* mostra les corbes obtingudes en cada cas . A la figura 4-9 *a* s'han representat els resultats obtinguts per simulació FEA d'alguns fenòmens relacionats o similars. Per un increment de conductivitat de  $2.8 \cdot 10^{-3} \text{ S/m}$  a  $3.1 \cdot 10^{-3} \text{ S/m}$ , la impedància disminueix al rang de freqüències intermèdies de la mateixa manera que succeeix per la simulació de la partícula conductora.

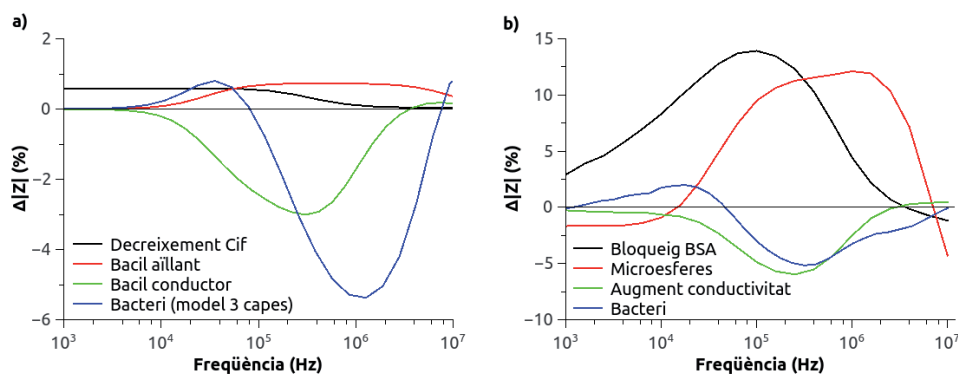


Figura 4-9: Espectres d' $\Delta|Z|$  percentual d'elements simulats amb COMSOL Multiphysics®(a) i obtinguts experimentalment (b).

En canvi, per l'adsorció de BSA a la superfície s'observa un augment de la impedància a les freqüències baixes, tal com s'esperava. Aquest resultat concorda amb els que prèviament s'havien obtingut amb biosensors capacitius (Labib, Hedström, Amin, & Mattiasson, 2009), en els que es monitoritzen decrements en capacitat causats per la interacció de l'anticòs i l'antigen que tenen lloc a la interfície.

Per altra banda, s'analitza la resposta causada per la deposició de microesferes d'òxid de silici, que és un material dielèctric. A la Figura 4-9 *b* es mostra una corba per la resposta d'un IDEs davant la deposició d'una densitat aproximada de  $10^6$  esferes/mm<sup>2</sup> (extreta del comptatge de microesferes mitjançant microscopi òptic). Es pot veure com la presència d'aquestes partícules d'òxid de silici no altera de manera significativa la *Z* a baixes freqüències. Això pot explicar-se pel fet que només bloquegen la interfase elèctrode-solució en un únic punt de contacte a causa de la seva forma esfèrica. A freqüències més altes, en canvi, la impedància sí que augmenta ja que, com es comentava, l'òxid de silici és un material aïllant i amb constant dielèctrica molt menor que l'aigua (3.9) (Gray, Hurst, Lewis, & Meyer, 2009).

El senyal obtingut per la simulació de les partícules aïllants en forma de bacteri és molt menor a l'obtingut experimentalment amb les esferes d'òxid de silici perquè la densitat de la simulació és de  $1.9 \cdot 10^4$  bacils/mm<sup>2</sup> respecte les  $10^6$  esferes/mm<sup>2</sup> de l'experimental.

### *1.3.3. Ajustament de les simulacions*

Per acabar d'ajustar les simulacions amb l'experimental s'ha de tenir en compte, la resistència que suposen els mateixos elèctrodes i connexions ( $R_C$ ) i el valor experimental de la capacitat de la interfase ( $C_{if}$ )

Com es deia al capítol anterior, un IDE de  $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}$  està compost per  $4.17 \cdot 10^4$  cel·les de  $54 \mu\text{m}^2$ . Per tant, per poder representar el diagrama de Bode del IDE complert s'ha de dividir la impedància obtinguda a les simulacions pel nombre de cel·les perquè la impedància és inversament proporcional a l'àrea interdigitada. A més, s'hi ha de sumar la  $R_C$  i fixar un valor per la  $C_{if}$ . Després d'haver ajustat les dades experimentals a un circuit equivalent (de la Rica, Baldi, Fernández-Sánchez, & Matsui, 2009) la  $R_C$  s'aproxima a  $40 \Omega$  i la  $C_{if}$  es fixa a  $1.7 \cdot 10^{-2}$  F/m<sup>2</sup>. A la Figura 4-10 es mostra el diagrama de Bode i l'espectre de l' $\Delta Z$  per una mesura experimental d'un IDE i la seva simulació ajustada.

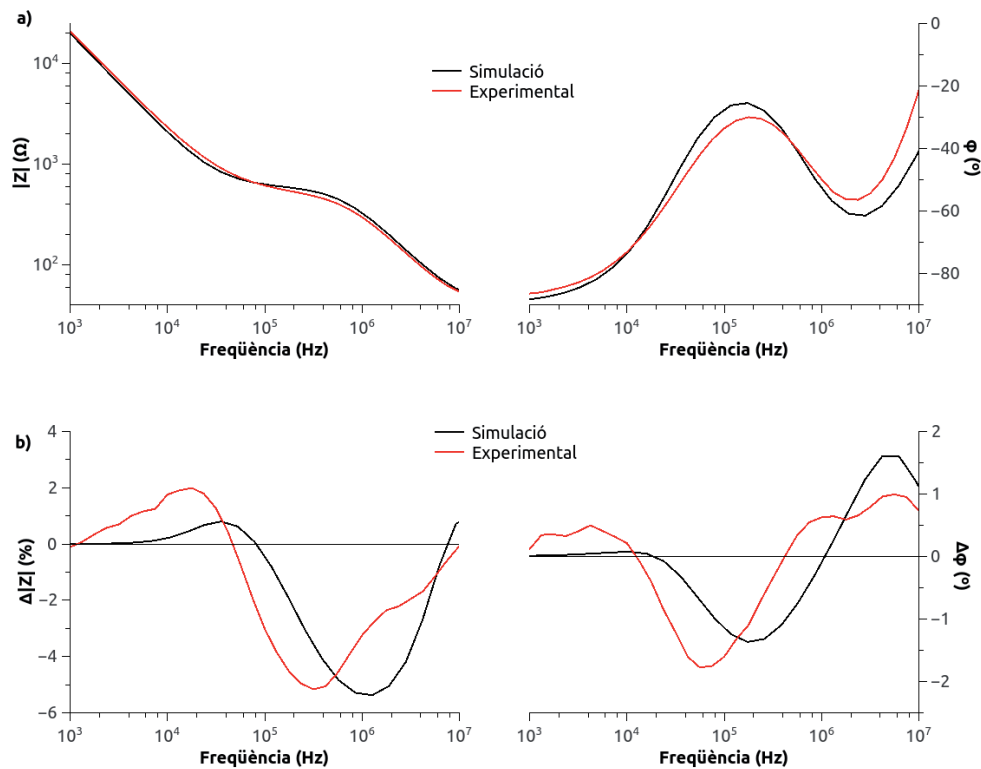


Figura 4-10: Diagrama de Bode (a) i espectre de l' $\Delta Z$  (b) per les mesures bacterianes experimentals i simulades.

El diagrama de Bode (Figura 4-10 a) mostra com s'aconsegueix un bon ajustament després d'haver tingut en compte els paràmetres que abans s'esmentaven.

Per altra banda, els espectres simulats de l' $\Delta Z$  obtingut per la presència de bacteris segueixen la mateixa tendència que els experimentals quan s'utilitzen els paràmetres del model de les tres capes (detallat al capítol anterior). En ambdós casos s'obté aquest doble comportament elèctric com a aïllant o conductor en funció de la freqüència. Tot i així, cal destacar que el pic positiu experimental és superior al simulat i comença a freqüències més baixes. Aquest comportament suggereix que les cèl·lules també produeixen un canvi a la impedància de la interfase. Una explicació per aquest fenomen podria ser que com que el tampó que s'usa per fer les mesures té molt baixa conductivitat i una baixa concentració de nutrients, podria provocar una situació d'estrès a *E. coli* fet que podria causar l'activació de la seva resposta general contra l'estrès. L'activació d'aquesta resposta permet als bacteris sobreviure en una alta varietat de medis hostils. Un dels efectes de la resposta a l'estrès pot ser la formació d'estructures d'adhesió, com fímbries, i la secreció d'exopolisacàrids (Chekabab, Paquin-Veillette, Dozois, & Harel, 2013; Muñoz-Berbel, Vigués, Jenkins, Mas, & Muñoz, 2008). Aquests

elements podrien causar un increment de la impedància de la interfase dels IDEs fet que no es considera a les simulacions.

A part, també cal recordar l'efecte del posicionament del bacteri respecte els dígit dels elèctrodes. La simulació que es representa a la Figura 4-10 consisteix en un bacil posicionat perpendicularment als dígit i contactant amb dos dígit d'elèctrodes contraris. Aquesta posició era la que obtenia un primer pic positiu menor i un pic negatiu major. Per tant, tenint en compte que, tal i com es veu a la imatge SEM de la Figura 4-8 (pàgina 89), els bacteris es posicionen de manera aleatòria, és raonable pensar que el senyal resultant sigui un promig entre els dos posicionaments estudiats al capítol anterior.

## 2. Detecció de *Saccharomyces cerevisiae* per adsorció sobre IDEs de 6 x 6 $\mu\text{m}$

*Saccharomyces cerevisiae* és un llevat mundialment conegut pel seu ús a la indústria alimentària. Des de temps immemorables la humanitat l'ha utilitzat per dur a terme diferents tipus de fermentació de sucres com la fermentació de masses a base de cereals (rebosteria), i la fermentació alcohòlica per una gran varietat de begudes.

Els llevats, a diferència dels bacteris, tot i ser organismes unicel·lulars són cèl·lules de tipus eucariota. Els organismes eucariotes ens caracteritzem per estar formats per cèl·lules amb nucli diferenciat. Aquest nucli consisteix en un compartiment cel·lular que conté el material genètic confinat dins la seva membrana. En el cas dels llevats, a més, la membrana plasmàtica és simple però està protegida per una paret cel·lular de  $\beta$ -glucans, quitina i mannoproteïnes (Sherman, 2002). La paret cel·lular té com a funció principal protegir la cèl·lula del medi exterior i, sobretot, dels canvis en la pressió osmòtica (vegeu Figura 4-11).

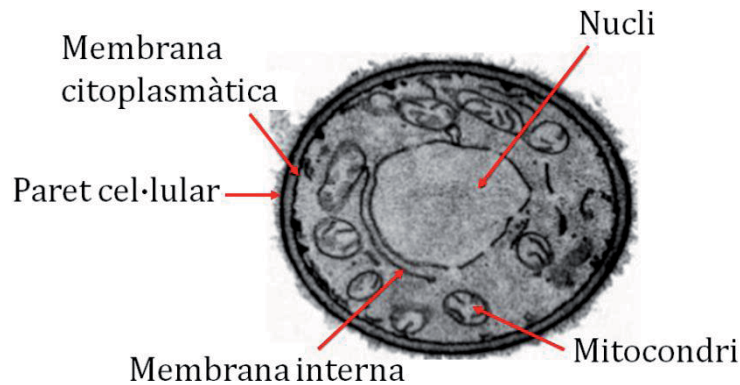


Figura 4-11: Imatge TEM d'una cèl·lula de *S. cerevisiae* on s'indiquen els seus components cel·lulars principals. Imatge obtinguda del curs de N. Iñón (Iñón, 2009).

Per tant, es tracta d'una cèl·lula estructuralment diferent a *E. coli* i, d'una mida superior (entre 4 a 10  $\mu\text{m}$ ). A més, la seva forma és pràcticament esfèrica.

Per realitzar les mesures d'aquests organismes s'utilitzen IDEs de silici policristal·lí amb una geometria de 6  $\mu\text{m}$  d'amplada i 6  $\mu\text{m}$  espaiat entre dígit. El nostre grup ja disposava d'elèctrodes d'aquestes mides així que es va poder aprofitar aquest disseny ja fabricat. A més, aquestes dimensions dels interdígitats són les més adequades, segons l'estudi de la relació

entre mides (IDEs: microorganisme) del capítol anterior, perquè són les més similars a les dimensions del llevat.

## 2.1. Reactius i solucions

Glicina (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) i pastilles de PBS (VWR International, Llinars del Vallès, Espanya).

Tampó glicina 250 mM pH6 ( $\sigma = 5.5 \mu\text{S}/\text{cm}$ ) i tampó fosfat salí (PBS) pH 7.4 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).

## 2.2. Materials i mètodes

### 2.2.1. Preparació de la mostra

Es fan créixer els llevats aeròbiamment en el medi de cultiu Saboraud durant 48 hores a 30°C en un bany amb agitació (160 rpm). Posteriorment, els cultius es centrifuguen 10 minuts a 10100 g a una centrífuga 5804R (Eppendorf, Madrid, Espanya). El medi sobrenedant s'elimina i es fa una resuspensió del precipitats cel·lular amb PBS. Aquest procés de centrifugació i resuspensió es repeteix dues vegades més per eliminar els productes metabòlics, els fragments de membrana i les proteïnes citoplasmàtiques. Finalment, es fa una resuspensió amb 50 mL del mateix tampó i es separen 20 mL per matar a l'autoclau durant 1 hora a 120°C.

### 2.2.2. Mesures d'impedància de llevats

Els xips escollits es netegen curosament amb aigua desionitzada i s'assequen sota flux de nitrogen.

Primerament s'observen al microscopi òptic Nikon Eclipse ME600 (Nikon, Tokyo, Japó) i es capten imatges de cada un.

A continuació es realitzen les mesures del blanc amb el mateix analitzador d'impedàncies SI 1260 Solartron a 10 mV d'amplitud de voltatge, 0 V de potencial en corrent continu, en el rang de freqüències comprès entre 100 Hz i 10 MHz.

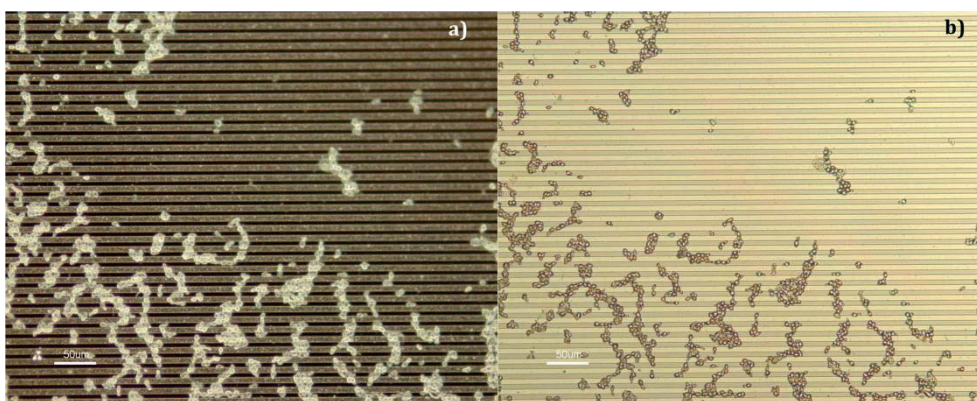
Paral·lelament a les mesures amb els IDEs es controlen els canvis de conductivitat mitjançant el conductímetre comercial Micro CM 2202 (Crison Instruments S.A., Alella, Espanya) i també es controla la temperatura mitjançant un termòmetre de mercuri. El muntatge per les mesures és el mateix que pels IDEs de geometria 1.5x1.5 (vegeu Figura 4-2 a la pàgina 82).

Posteriorment, s'afegeixen 5  $\mu\text{L}$  de suspensió de llevat viu o mort, en funció del xip, sobre la superfície de cada parell d'elèctrodes.

Tot seguit, es deixa assecar la suspensió sobre la superfície dels interdigitats dins la campana, amb el flux d'aire activat durant 30 minuts per accelerar la evaporació.

Després es submergeixen els xips en tampó glicina durant 2 hores perquè es dissolguin i desprenguin les sals del PBS.

Es tornen a observar tots els xips al microscopi òptic i es fan unes noves captacions per poder quantificar els llevats (vegeu Figura 4-12).



*Figura 4-12: Imatges de microscopi òptic realitzades mitjançant el mode de camp fosc (a) i camp clar (b). La barra d'escala indica una mida de 50  $\mu\text{m}$ .*

Finalment, es repeteixen les mesures d'impedància de la mateixa manera que pels blancs.

### 2.3. Resultats i discussió

Pel cas dels llevats cal destacar que no es registren augments de conductivitat i es manté constant a 5.5  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Per tant, no és necessari fer cap correcció.

Tal com s'observa a la Figura 4-13 a, tot i no registrar cap canvi de conductivitat en la solució amb les mesures del conductímetre comercial, en les mesures amb els IDEs es pot observar una gran davallada del  $|Z|$  per les freqüències intermèdies corresponents a la zona plana del diagrama de Bode en  $|Z|$ .

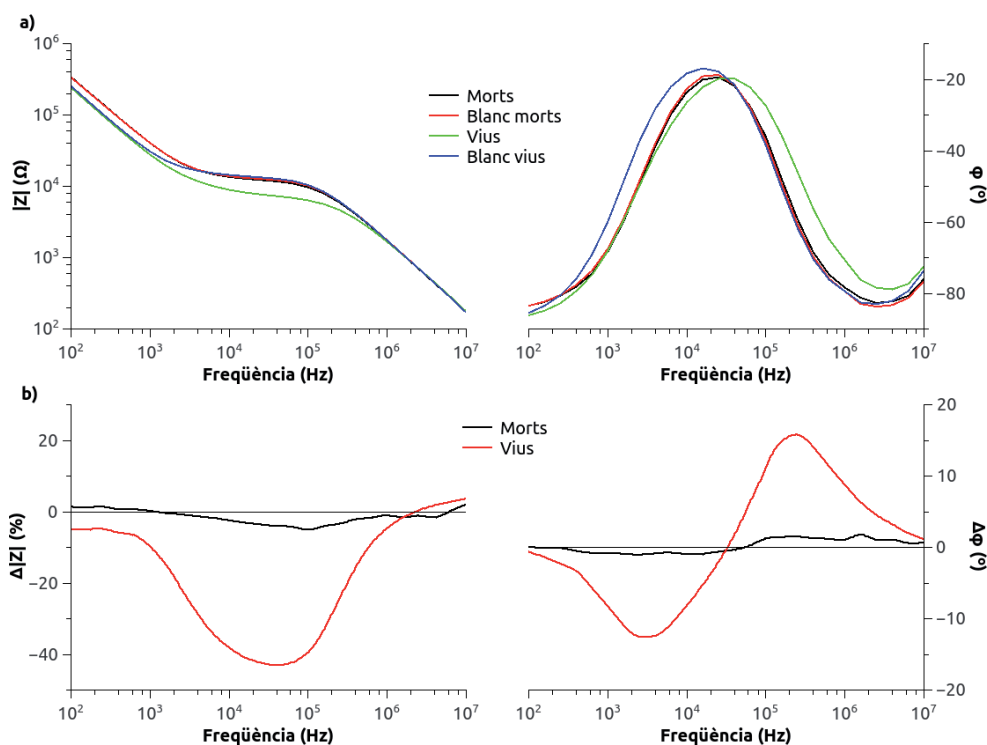


Figura 4-13: Diagrama de Bode per les mesures de llevats vius i els seus respectius blancs (a) i espectre de  $\Delta|Z|$  pels bacteris vius i morts (b).

Aquest decrement d'impedància, a la representació de l'espectre de  $\Delta|Z|$  (Figura 4-13 b), s'aprecia com una disminució molt acusada de la impedància, que en aquest cas concret del 40%. Cal tenir en compte que per fer les mesures dels llevats s'utilitza un medi de  $5 \mu\text{S}/\text{cm}$ , en canvi, per les mesures bacterianes el medi de mesura era de  $30 \mu\text{S}/\text{cm}$ . Tal i com s'estudiava al capítol anterior mitjançant simulacions, el fet de realitzar les mesures en medis de més baixa conductivitat permet obtenir una diferència de senyal superior. A més, amb el mètode emprat per l'adhesió dels llevats, tot i que és un mètode inespecífic, s'aconsegueix una densitat major de microorganismes immobilitzats sobre la superfície.

Pels llevats, el patró d' $\Delta Z$  que s'observa és el mateix que es podria observar per un augment de la conductivitat del medi. Tot i així, el fet de mesurar la conductivitat del medi, en paral·lel a realitzar les mesures, indica que aquest decrement de  $Z$  és causat per la presència de llevats i no per cap canvi de conductivitat. També es podria pensar que resten sals de PBS entre les



cèl·lules i que, en submergir els elèctrodes en el medi de mesura, aquestes sals es dissolen fent que localment es detecti un augment de la conductivitat. Tot i així, com que prèviament a les mesures es deixen els IDEs amb llevats submergits en un altre recipient amb el mateix medi de glicina de baixa conductivitat durant més d'una hora, es podria descartar aquesta possibilitat.

Per tant, aquests resultats indicarien que el llevat actuaria com un element purament conductor per les freqüències que es mesuren.

Per altra banda, es calcula el percentatge d'àrea dels IDEs cobert per *S. cerevisiae* mitjançant les imatges del microscopi prèvies i posteriors a la immobilització. Per dur a terme aquest càlcul s'utilitza el programa Image J (Schneider et al., 2012). Partint de la imatge inicial, aquesta es processa restant-li el soroll de fons (-100 d'intensitat), es selecciona la superfície on es troben els interdigitats i s'analitza mitjançant l'opció *measurement* que té el programa (afegint com a paràmetre a calcular la fracció d'àrea ocupada). El programa remet una graella amb els resultats de la mesura. Així s'obté la informació de l'àrea ocupada per píxels amb intensitat superior al fons (0). Per tant, l'àrea de cobertura es calcula restant aquesta àrea obtinguda pel blanc a l'obtinguda per la imatge presa posteriorment a l'adhesió dels llevats (vegeu Figura 4-14).

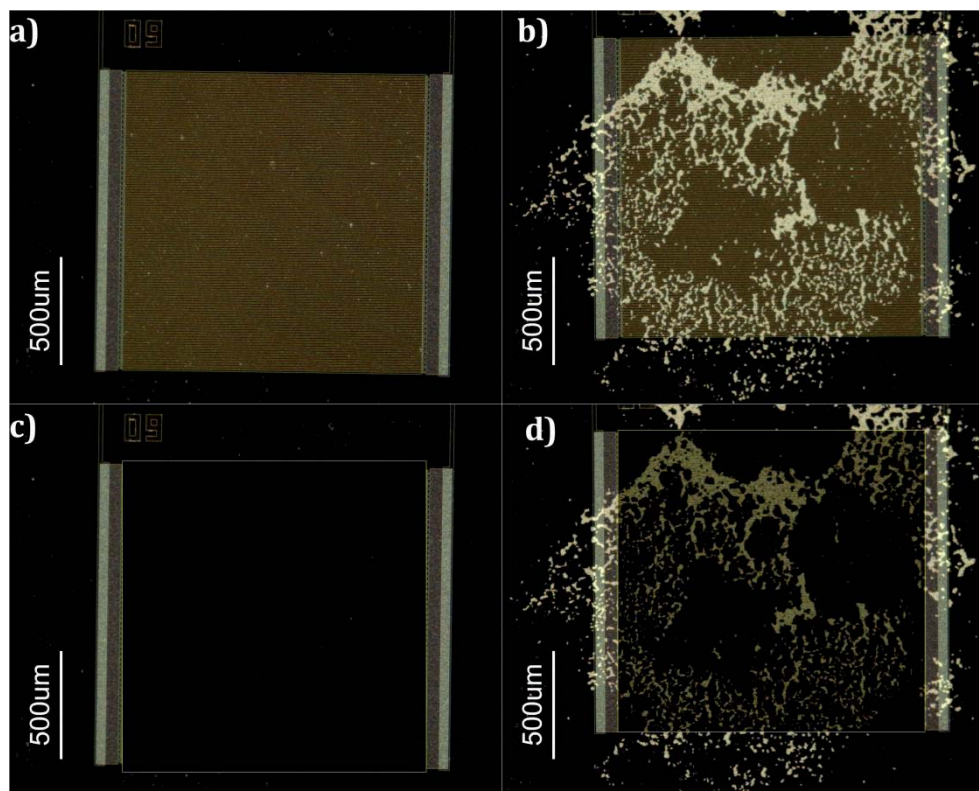


Figura 4-14: Imatges originals preses amb el microscopi òptic dels IDEs de  $6 \times 6 \mu\text{m}$  abans (a) i després (b) d'immobilitzar els llevats sobre la seva superfície. Imatges processades restant el fons (-100 d'intensitat) de la regió dels interdigitats on (c) correspon al processament de la imatge (a) i (d) al de la imatge (b). El requadre groc de les imatges (c) i (d) és el que s'analitza per calcular la seva àrea amb píxels d'intensitat superior a 0.

Per altra banda, de les dades obtingudes d'impedància per cada mesura es calculen les diferències entre pics (màxim - mínim) i el sumatori de senyals per cada freqüència mesurada (de  $10^2$  Hz fins a  $10^6$  Hz). Com es comentava anteriorment, el patró dels llevats per aquest tipus d'assaig, consisteix en un decrement en  $|Z|$  i no s'observa el doble comportament com per *E. coli*. Per aquest motiu, a part de calcular diferències entre pics es calcula el sumatori de tots els  $\Delta|Z|$ .

A la Figura 4-15 es representa la relació entre l'àrea coberta per llevats i el senyal calculat entre diferència de pics i el sumatori de senyals.

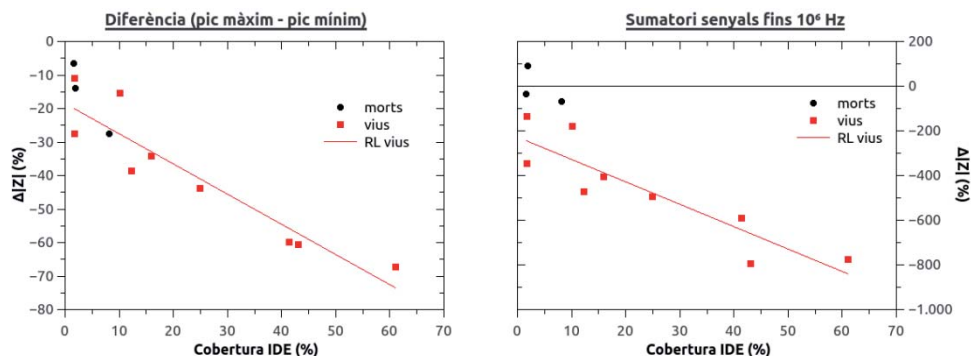


Figura 4-15: Sumatori (dreta) i diferència de senyals màxims i mínims d' $\Delta|Z|$  percentual (esquerra) respecte el percentatge de cobertura de la superfície dels IDEs pels llevats. En ambdues gràfiques està representada la recta de regressió lineal (RL) per les dades dels llevats vius.

A la Taula 4-2 es troben els valors pels diferents paràmetres de les rectes de regressió de les gràfiques de la Figura 4-15.

$y=A \cdot x+B$	Paràmetre	Valor	Error estàndard (+/-)
Diferència (màxim - mínim)	A	$-9.01 \cdot 10^{-1}$	$1.37 \cdot 10^{-1}$
	B	$-1.85 \cdot 10$	4.17
	R <sup>2</sup>	0.86	
Sumatori (fins 10 <sup>6</sup> Hz)	A	$-1.00 \cdot 10$	1.89
	B	$-2.28 \cdot 10^2$	$5.77 \cdot 10$
	R <sup>2</sup>	0.74	

Taula 4-2: Valors per les dues rectes de regressió lineal representades a la Figura 4-15.

Tot i que es representen tres mesures de llevats morts amb aquests calibrats no es pot acabar de concloure res respecte la diferència de senyals entre microorganismes vius i morts. El problema principal en la presa de mesures dels llevats morts és l'adhesió d'aquestes mostres. El percentatge de cobertura que s'aconsegueix amb les cèl·lules mortes en tots els casos és inferior al 10%.

No obstant, si el que s'observa és tot l'espectre d' $\Delta|Z|$  percentual, sí que s'aprecia que en el cas dels microorganismes morts el seu comportament impedimètric difereix clarament del dels vius (vegeu Figura 4-16).

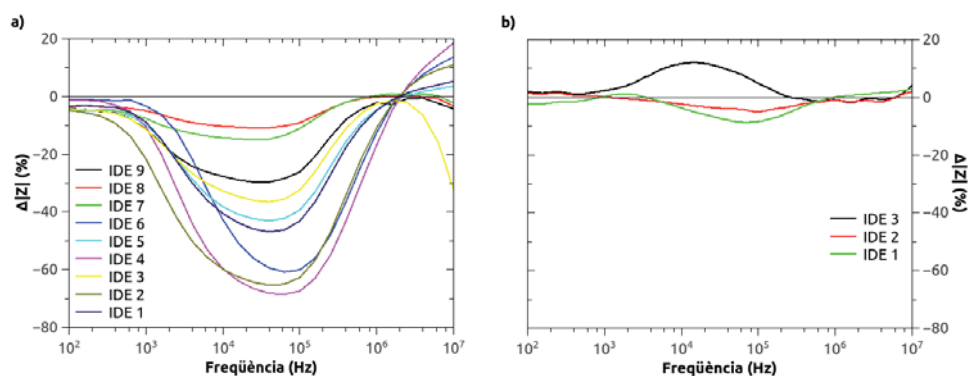


Figura 4-16: Representació dels espectres d' $\Delta|Z|$  percentual pels llevats vius (a) i morts (b). Pels llevats vius es realitzen nou mesures amb nou IDEs diferents. Pels llevats morts es realitzen tres mesures amb tres IDEs diferents.

Els senyals baixos dels microorganismes morts (Figura 4-16 b) es poden correspondre a la baixa densitat de cobertura. Tot i així, si es comparen els senyals de les cèl·lules vives que cobreixen un percentatge d'àrea similar a les tres mesures amb cèl·lules mortes (IDEs 7, 8 i 9 de la Figura 4-16 a), es pot veure com segueixen un patró diferent. És a dir que les cèl·lules vives provoquen un decrement més definit estrictament a la regió de la zona plana del Bode  $|Z|$  i, en canvi, les mortes no segueixen un patró tan regular.

De totes maneres no es pot arribar a cap conclusió clara, com ja es comentava anteriorment, pel fet de només haver aconseguit tres mesures de llevats morts i, per tant, poques dades per elaborar una bona estadística.

### 3. Conclusions

Per les mesures d'*E. coli* realitzades amb IDEs de 1.5 x 1.5, s'observa un patró d'impedància característic i diferent a les mesures d'altres esdeveniments mesurats.

El patró impedimètric característic d'*E. coli* consisteix en un primer augment de  $\Delta|Z|$  a freqüències baixes i un decrement a les freqüències més altes.

Aquests resultats indiquen que el bacteri té un doble comportament elèctric: aïllant a freqüències baixes i conductor a freqüències més altes.

Els resultats experimentals concorden amb les simulacions realitzades al capítol anterior.

En canvi, per les mesures de *S. cerevisiae* realitzades en IDEs de 6 x 6  $\mu\text{m}$ , s'observa que segueix el mateix patró que pel cas d'un augment de conductivitat del medi.

Es pot observar una relació directa entre la fracció de l'àrea de l'IDE coberta per llevat i el senyal obtingut.

No es pot concloure si s'aprecien diferències entre llevats vius i morts a causa de les poques dades obtingudes amb llevats morts.

## 4. Referències

- Bai, W., Zhao, K. S., & Asami, K. (2006). Dielectric properties of E. coli cell as simulated by the three-shell spheroidal model. *Biophysical Chemistry*, *122*(2), 136–42. <http://doi.org/10.1016/j.bpc.2006.03.004>
- Chekabab, S. M., Paquin-Veillette, J., Dozois, C. M., & Harel, J. (2013). The ecological habitat and transmission of Escherichia coli O157:H7. *FEMS Microbiology Letters*, *341*(1), 1–12. <http://doi.org/10.1111/1574-6968.12078>
- Cheung, K., Gawad, S., & Renaud, P. (2005). Impedance spectroscopy flow cytometry: on-chip label-free cell differentiation. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, *65*(2), 124–32. <http://doi.org/10.1002/cyto.a.20141>
- de la Rica, R., Baldi, A., Fernández-Sánchez, C., & Matsui, H. (2009). Selective detection of live pathogens via surface-confined electric field perturbation on interdigitated silicon transducers. *Analytical Chemistry*, *81*(10), 3830–5. <http://doi.org/10.1021/ac9001854>
- de la Rica, R., Fernández-Sánchez, C., & Baldi, A. (2006). Polysilicon interdigitated electrodes as impedimetric sensors. *Electrochemistry Communications*, *8*, 1239–1244. <http://doi.org/10.1016/j.elecom.2006.05.028>
- Etayash, H., Jiang, K., Thundat, T., & Kaur, K. (2014). Impedimetric detection of pathogenic gram-positive bacteria using an antimicrobial peptide from class IIa bacteriocins. *Analytical Chemistry*, *86*(3), 1693–1700. <http://doi.org/10.1021/ac4034938>
- Gray, P. R., Hurst, P. J., Lewis, S. H., & Meyer, R. G. (2009). *ANALYSIS AND DESIGN OF ANALOG INTEGRATED CIRCUITS*. Wiley. [http://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010316\)40:6<9823::AID-ANIE9823>3.3.CO;2-C](http://doi.org/10.1002/1521-3773(20010316)40:6<9823::AID-ANIE9823>3.3.CO;2-C)
- Hunt, H. K., Soteropoulos, C., & Armani, A. M. (2010). Bioconjugation strategies for microtoroidal optical resonators. *Sensors (Basel, Switzerland)*, *10*(10), 9317–36. <http://doi.org/10.3390/s101009317>
- Iñón, N. (2009). Microbiologia general. Retrieved April 20, 2016, from

<http://es.slideshare.net/ximenasaavedra89/bacterias-microbiologa>

- Kim, G., Moon, J.-H., & Morgan, M. (2013). Multivariate data analysis of impedimetric biosensor responses from *Salmonella typhimurium*. *Analytical Methods*, 5(16), 4074. <http://doi.org/10.1039/c3ay40256h>
- Labib, M., Hedström, M., Amin, M., & Mattiasson, B. (2009). A multipurpose capacitive biosensor for assay and quality control of human immunoglobulin G. *Biotechnology and Bioengineering*, 104(2), 312–320. <http://doi.org/10.1002/bit.22395>
- Landry, J. P., Fei, Y., & Zhu, X. D. (2011). High Throughput, Label-free Screening Small Molecule Compound Libraries for Protein-Ligands using Combination of Small Molecule Microarrays and a Special Ellipsometry-based Optical Scanner. *International Drug Discovery*, 8–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3271728/>
- Mallén-Alberdi, M., Vigués, N., Mas, J., Fernández-Sánchez, C., & Baldi, A. (2016). Impedance spectral fingerprint of *E. coli* cells on interdigitated electrodes: A new approach for label free and selective detection. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 1. <http://doi.org/10.1016/j.sbsr.2016.02.001>
- Muñoz-Berbel, X., Vigués, N., Jenkins, a. T. a, Mas, J., & Muñoz, F. J. (2008). Impedimetric approach for quantifying low bacteria concentrations based on the changes produced in the electrode-solution interface during the pre-attachment stage. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(10), 1540–1546. <http://doi.org/10.1016/j.bios.2008.01.007>
- R Development Core Team, R. (2014). R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R Foundation for Statistical Computing*. <http://doi.org/10.1007/978-3-540-74686-7>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. <http://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Sherman, F. (2002). Getting Started with Yeast. *Methods in Enzymology*, 350(2002), 3–41. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)50954-X](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(02)50954-X)

Zhang, M. Z., Yu, Y., Yu, R. N., Wan, M., Zhang, R. Y., & Zhao, Y. Di. (2013). Tracking the down-regulation of folate receptor- $\alpha$  in cancer cells through target specific delivery of quantum dots coupled with antisense oligonucleotide and targeted peptide. *Small*, 9(24), 4183-4193. <http://doi.org/10.1002/sml.201300994>





# CAPÍTOL 5

## Optimització de la geometria dels elèctrodes interdigitats i integració d'un sistema microfluídic

En aquest capítol es detalla el procediment de disseny i fabricació d'una nova geometria d'IDE per detectar microorganismes sub-micromètrics. A diferència dels IDEs anteriors, en aquest cas es dissenya un encapsulat amb un sistema microfluídic integrat i un imant amb diferents posicions per facilitar la captació immunomagnètica de la mostra.

S'optimitzen tots els paràmetres per realitzar les mesures mitjançant la utilització de tècniques complexes com la microscòpia confocal i finalment es realitzen mesures directes i indirectes del bacteri.

Posteriorment també s'analitza la raó dels diferents resultats obtinguts amb les mesures.

## 1. Disseny i fabricació del dispositiu

Per tal de seguir explorant les possibilitats de detecció de microorganismes amb IDEs es planteja la possibilitat de detectar un coc de dimensions sub-micromètriques com els cocs de la família *Veillonella*.

*Veillonella sp.* és una família de cocs gramnegatius anaeròbics que formen part de la flora normal de les vies respiratòries altes, el tracte intestinal baix i el tracte vaginal de diferents espècies de mamífer. Rarament constitueix un perill fatal per a humans (Liu et al. 1998) però sí que pot ser útil la seva detecció en aigües perquè es pot considerar un indicador fecal específic (Jeong et al. 2011). El seu diàmetre promig és de 0.5  $\mu\text{m}$  (Holland, Knapp, and Shoosmith 1987) i en ser gramnegatiu com *E. coli* té la mateixa estructura cel·lular de doble membrana i periplasma.

Al capítol 3 es conclou que la relació òptima entre mides de microorganisme i geometria d'IDE és el quocient 1:1. Per tant, per aconseguir el màxim senyal per la detecció de bacteris com *Veillonella sp.* s'haurà de reduir la geometria dels IDEs.

A l'Institut de Microelectrònica de Barcelona es disposa d'una Sala Blanca per a fabricació de xips. Es tracta d'una instal·lació qualificada pel Ministeri d'Economia i Competitivitat de l'Estat Espanyol com a Infraestructura Científico-Tècnica Singular (ICTS) (Ministerio de Economía y Competitividad 2016). Per aquest motiu, aprofitant les oportunitats que ens brinda el nostre centre, es resol fabricar un nou dispositiu.

Per una banda, s'han d'escalar els elèctrodes a unes mides més reduïdes i, per altra, es decideix implementar un sistema microfluídic que s'acobli al xip amb els elèctrodes.

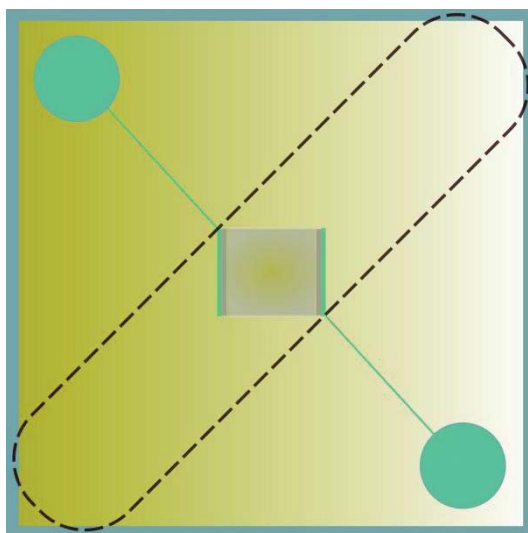
Per la **reducció de la geometria** s'acorden unes mides de 0.5  $\mu\text{m}$  tant per l'amplada com per l'espaiament entre dits. Aquestes són les mides que s'han explorat al capítol 3 mesurant un coc gram negatiu de 0.5  $\mu\text{m}$  de diàmetre com *Veillonella*.

Per altra banda, tenint en compte les dimensions d'*E. coli*, una distància entre elèctrodes de 0.5  $\mu\text{m}$  augmenta la probabilitat d'aquestes cèl·lules de contactar amb dos elèctrodes. Cal recordar que els resultats de les simulacions mostren que el fet que una cèl·lula contacti amb

dos elèctrodes produeix un augment molt superior del senyal a si només contacta amb un elèctrode. Per tant, tot i que aquesta geometria d'IDE no és la més idònia en quan a relació 1:1 de mides amb *E. coli*, el fet d'augmentar la probabilitat de contacte amb dos elèctrodes podria produir una millora a la seva detecció.

Cal aclarir que, tot i fer la optimització de la geometria pensant principalment en la detecció de la *Veillonella*, finalment no va haver-hi temps dins el marc d'aquest treball de tesi per caracteritzar experimentalment la detecció d'aquest microorganisme amb els nous IDEs fabricats. Com es veurà a la secció d'experimental, només es mostren resultats per la detecció d' *E. coli*.

En referència al **sistema microfluídic**, es pretén aconseguir que el dispositiu pugui treballar de manera automatitzada i controlada. Es conclou implementar un canal simple. Per facilitar la disposició de les connexions elèctriques i fluídiques al xip, es pensa en una configuració en diagonals perpendiculars. És a dir que a la confluència entre diagonals es troben els IDEs, en una diagonal el canal, i en l'altra les pistes dels elèctrodes fins als punts de connexió (vegeu Figura 5-1). D'aquesta manera, les connexions elèctriques i fluídiques queden el més separades possible.



*Figura 5-1: Esquema del xip dissenyat. Les línies discontinúes indiquen la disposició del canal microfluidic. Les pistes i punts de connexió d'alumini estan en color verd. Els interdigitats de silici policristal·lí es troben al mig del xip ocupant una superfície quadrada.*

Finalment, es decideix afegir un **imant** a l'encapsulat del xip, just a sota d'on es troben els IDEs, que pugui ser utilitzat en assajos que impliquin la tècnica de separació immunomagnètica.

En els casos anteriors, els anticossos per dur a terme la immunodetecció específica dels bacteris s'immobilitzaven directament a la superfície dels elèctrodes. Aquest fet dificultava l'ús continu i el reciclatge del xip.

Els assajos d'immunoseparació magnètica s'utilitzen com a mètode estàndard per la preconcentració bacteriana (Baldrich and Muñoz 2008). Actualment existeix una extensa gamma d'articles comercials que consten de partícules magnètiques de diferents mides amb elements de reconeixement específics contra diferents bacteris. Per tant, es disposen de protocols estandarditzats per a captar bacteris mitjançant aquesta tècnica.

Per aquest motiu, en aquest treball els bacteris s'uneixen a partícules magnètiques mitjançant anticossos. Aquest imant el que permet és la retenció d'aquests bacteris amb partícules magnètiques a la regió concreta dels IDEs. Per una banda, amb aquest sistema es fa una preconcentració de la mostra i, per altra, també es pot canviar el medi per a que sigui el més òptim per les mesures elèctriques. A més, com es comentava anteriorment, es simplifica la neteja ja que aquesta s'aconsegueix passant flux amb l'imant retirat per alliberar els bacteris retinguts. Aquesta estratègia permet que el xip sigui de múltiples usos i que es puguin fer mesures contínuament sense haver de desmuntar el sistema.

### 1.1. Elèctrodes de silici policristal·lí sobre oblies de silici

El disseny dels nous elèctrodes està basat en el procés de fabricació dels IDEs de geometries més grans esmentats en el capítol anterior (de la Rica, Fernández-Sánchez, and Baldi 2006).

Com s'explica més detalladament a l'apartat de la introducció que es refereix a microfabricació, en el procés d'elaboració del nostre xip es realitzen fotolitografies de projecció utilitzant un Stepper I12 (Nikon, Tokyo, Japó).

Per les geometries anteriors, en canvi, el procés de fabricació s'havia basat en fotolitografies de contacte. Per aquests casos, es va utilitzar un joc de màscares que constava de tres

màscares. En canvi, per les fotolitografies del nostre procés només es necessita un reticle que conté tots els nivells necessaris per la fabricació.

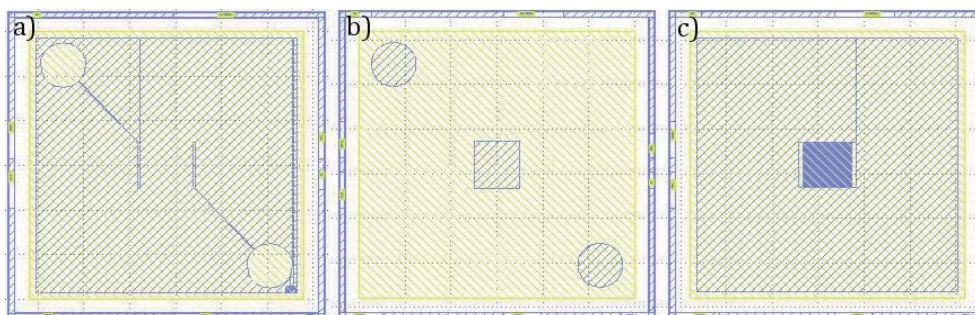
El procés de fabricació en concret consta de tres etapes de fotolitografia i, per tant, s'utilitzen tres nivells del reticle. El primer nivell defineix els elèctrodes de silici policristal·lí, el segon les connexions d'alumini i el tercer les obertures de la passivació.

A continuació es detalla com es va realitzar tot el procés, des del disseny dels nivells del reticle fins a la caracterització dels elèctrodes.

### 1.1.1. Materials i mètodes

#### 1.1.1.1. Disseny dels diferents nivells del reticle

A la Figura 5-2 es mostren els tres quadrants del reticle que defineixen els motius del nostre xip.



*Figura 5-2: Imatge dels tres quadrants de 6 mm per 6 mm del reticle CNM739 dissenyats per aquest treball. Definició dels motius d'alumini (a), de passivació (b) i de silici policristal·lí(c).*

El disseny dels diferents nivells es va realitzar utilitzant el programa Cadence (Cadence Design Systems Inc., San José CA, EUA).

El tercer quadrant (Figura 5-2 c) defineix els elèctrodes interdigitats compostos per un total de 1000 dígits (500 de cada elèctrode), essent 1030  $\mu\text{m}$  la llargada total de cada dígit (vegeu Figura 5-3).

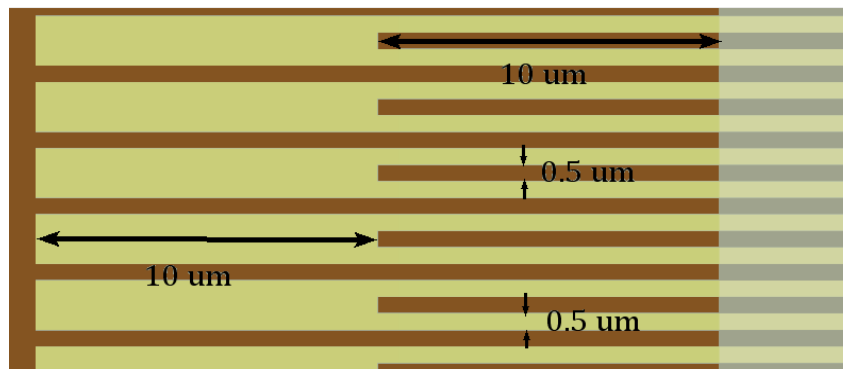


Figura 5-3: Representació gràfica on s'aprecia el detall d'un extrem dels elèctrodes interdigitats. En color més fosc estan representats els elèctrodes de silici policristal·lí. En color més clar (a la dreta) s'observa l'obertura de la passivació.

El primer quadrant defineix les pistes d'alumini i els punts de connexió d'1 mm de diàmetre (Figura 5-2 a). Les pistes es sobreposen a les barres col·lectores dels elèctrodes de silici policristal·lí en 40 µm dels 50 totals que fan (vegeu la Figura 5-4). Més endavant s'explicarà que, per fer les connexions, a l'encapsulat s'utilitzen uns connectors de molla en lloc de soldar directament les connexions. Per evitar que aquests connectors contactin fora de l'àrea del punt de connexió, es dissenyen aquests punts de connexió d'una mida considerablement superior als dels IDEs de 1.5 µm. Al següent apartat es justifica l'elecció de la mida dels punts de connexió.



Figura 5-4: Representació gràfica on es veu un detall d'un extrem dels elèctrodes interdigitats i s'observa la superposició de les pistes d'alumini amb la barra col·lectora de silici policristal·lí.

Finalment, el segon quadrant (Figura 5-2 b) defineix l'obertura de la passivació: un quadrat d'1 mm<sup>2</sup> al centre per exposar els IDEs i dues obertures rodones d'1 mm de diàmetre per exposar els punts de connexió.

Com s'explicava al primer capítol, a les fotolitografies per contacte o proximitat la màscara cobreix tota l'oblia i en una irradiació es marca tota la superfície. En canvi, en la de projecció s'han d'introduir les coordenades del reticle de la zona que es vol exposar, programar quantes vegades s'ha d'exposar, i en quina disposició dins la superfície de l'oblia.

En aquest procés, a cada etapa de fotolitografia s'exposa 61 vegades el nivell 1 per gravar aquest motiu en tota la superfície de l'oblia. A més, també es pot escollir la distància que ha d'haver entre motius i espaiar la següent exposició el que es desitgi. Pels nostres xips es decideix espaiar els motius deixant un marc de 2 mm al voltant de tot el quadrant (que en fa 6), així que finalment s'obtenen xips de 10 mm per 10 mm i no de 6 mm per 6 mm. Això no seria possible d'aconseguir amb la fotolitografia per contacte ja que la distància marcada per les màscares seria la que quedaria en exposició i no es podria canviar.

#### 1.1.1.2. Càlculs de les capacitats dels punts de connexió

Abans d'enviar a fabricar el reticle es comprova que la impedància produïda pels punts de connexió d'alumini no sigui major que la impedància que es vol mesurar entre els dits de l'IDE.

L'oblia que s'utilitza per la microfabricació, com s'explica més endavant, és de silici i té una capa d'òxid de silici de 2  $\mu\text{m}$ . Sobre d'aquesta capa d'òxid es troba l'alumini dels punts de connexió. Aquestes sandvitx de tres capes (dues conductores flanquejant una d'aïllant) actua com una capacitat.

En el cas dels IDEs d' $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}$  els punts de connexió tenien una àrea de  $1.44 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$  però en canvi, al nou disseny són de  $7.85 \cdot 10^5 \mu\text{m}^2$ . És a dir, 54.51 vegades més gran.

Per tant, coneixent la permitivitat relativa de l'òxid de silici, que és 3.9, i mitjançant l'equació 1.1 que permet calcular el valor de les capacitats en funció de la seva superfície, permitivitat i distància entre plaques, obtenim la capacitat corresponent a un punt de connexió.

$$1.1. \quad C = \frac{\epsilon \cdot S}{d} = \mathbf{13.55 \text{ pF/PAD}}$$



Cal tenir en compte però que es tenen dos punts de connexió així que les dues capacitats en sèrie donen la capacitat total deguda als punts de connexió que és de 6.78 pF (vegeu operació 1.2).

$$1.2. \quad \frac{1}{C_{total}} = \frac{2}{C_{PAD}} \rightarrow C_{total} = \frac{C_{PAD}}{2} = \frac{13.55pF}{2} = \mathbf{6.78 pF}$$

Per altra banda, es calcula mitjançant simulacions la capacitat de la solució d'un medi aquós per uns IDEs de 0.5x 0.5 µm i s'obté que és aproximadament de 2·10<sup>3</sup> pF.

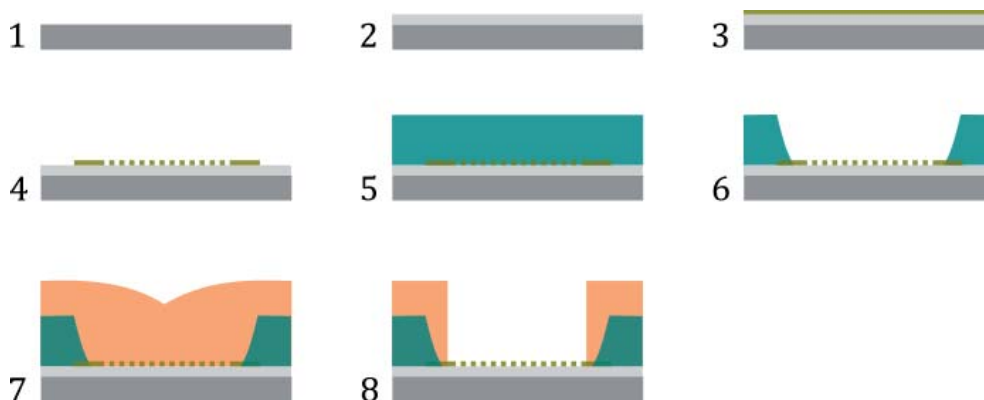
Per tant, tot i haver augmentat significativament l'àrea dels punts de connexió d'alumini, la seva capacitat segueix sent menyspreable respecte la capacitat de la solució (tres ordres de magnitud inferior).

Com a conclusió, es pot considerar que la definició de punts de connexió de 1 mm de diàmetre no afecta a les mesures d'impedància amb els IDEs d'aquesta geometria.

### 1.1.1.3. Microfabricació dels xips

Per la fabricació dels xips es parteix d'unes oblies de 4 polzades i 500 µm de gruix sobre les que es fa créixer una capa d'òxid de silici de 2 µm mitjançant oxidació tèrmica (vegeu Figura 5-5).

Primerament es disposa una capa de silici policristal·lí de 4800 Å per deposició química de vapor, es dopa amb oxicleur de fòsfor per fer-lo més conductor, es fa la fotolitografia amb els motius del nivell corresponent, i es grava mitjançant un gravat iònic reactiu profund (*DRIE*) selectiu a silici policristal·lí que és un tipus de gravat sec.



*Figura 5-5: Esquema de les principals etapes del procés de fabricació. 1 Oblija dopada de silici. 2 Creixement tèrmic de la capa d'òxid de 2  $\mu\text{m}$ . 3 Deposició química de la capa de 4800 Å de silici policristal·lí. 4 Gravats DRIE del silici policristal·lí. 5 Deposició física de la capa d'alumini d'1  $\mu\text{m}$ . 6 Gravats humits d'alumini. 7 Passivació del xip amb òxid i nitrur. 8 Gravats RIE i humits de la passivació.*

Un cop gravat el silici policristal·lí i decapada la resina es deposita una capa d'1  $\mu\text{m}$  d'alumini mitjançant polvorització catòdica<sup>1</sup> (un tipus de deposició física). Es realitza la fotolitografia corresponent que es grava en humit amb els motius del nivell del reticle corresponent.

Finalment, es passiva amb una capa d'òxid i nitrur (4000 Å d'òxid i 7000 Å de nitrur) mitjançant deposició química de vapor amb plasma (PECVD). Després de la fotolitografia es grava amb els motius del segon quadrant per deixar obertures als punts de connexió i als IDEs. Per gravar tota la passivació es fan tres atacs diferents: un atac en sec de tota la capa de 7000 Å de nitrur, un altre atac en sec dels primers 3000 Å d'òxid i, per acabar, en humit s'ataquen els últims 1000 Å d'òxid restants. El motiu d'acabar amb l'atac humit és que té una major selectivitat per l'òxid en front del silici policristal·lí.

Un cop decapada la resina es fa un recuit de l'alumini a 350°C per millorar l'adhesió d'aquest amb el silici policristal·lí. Finalitzat aquest punt ja es pot considerar com a acabat el procés dins la sala blanca. L'últim pas necessari per poder utilitzar els xips és enviar-los a tallar de l'oblija.

### *1.1.2. Resultats i discussió*

Durant tot el procés de fabricació van sorgir diferents dificultats. L'etapa més crítica del procés és l'**atac del silici policristal·lí**, que es realitza mitjançant un procés RIE direccional.

<sup>1</sup> *Sputtering* en anglès.

L'obertura que s'ha d'aconseguir entre dígits té la mateixa amplada que profunditat: 0.5  $\mu\text{m}$ . Per tant, s'ha d'atacar una regió molt estreta i els temps d'atac han de ser superiors als temps que normalment s'aplicarien per eliminar una capa d'aquest gruix però amb obertures més grans (l'anomenat efecte d'àrea dels atacs RIE).

La primera vegada que es va fer el procés la majoria dels elèctrodes van sortir curtcircuitats, és a dir que l'atac entre dígits va ser deficient. Es van triar els elèctrodes més curtcircuitats per caracteritzar-los mitjançant una observació al SEM (LEO model S-530, Hiatchi High Technologies America, Inc., Schaumburg, EUA). Per apreciar millor l'estat de l'obertura entre dits es van clivellar per la meitat de manera que es pot observar perfectament l'existència de silici policristal·lí entre dígits (vegeu Figura 5-6).

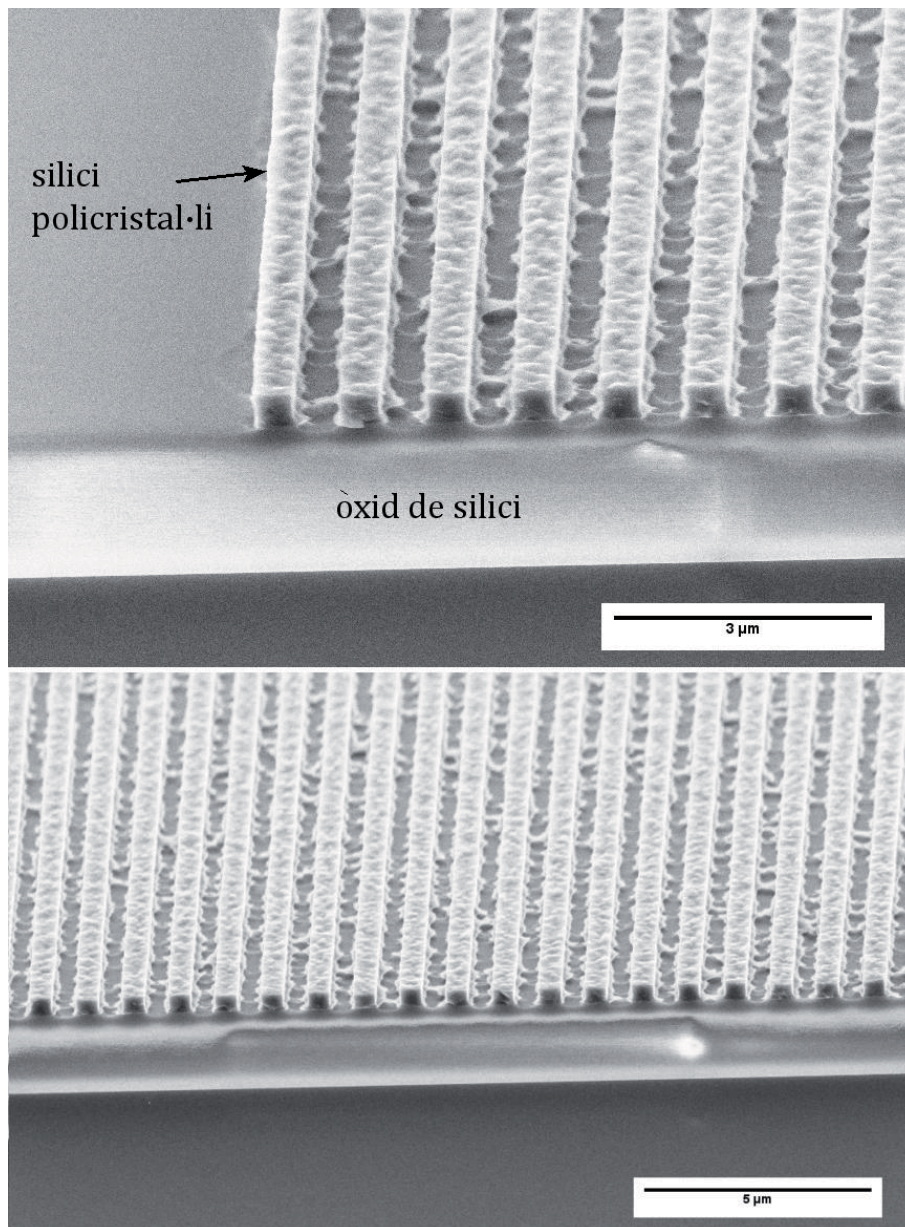


Figura 5-6: Fotos SEM de la regió dels dígitos de silici policristal·lí on s'observa que els elèctrodes estan curtcircuitats per tots els dígitos. Per aconseguir aquestes imatges s'ha clivellat prèviament el xip per la meitat. Amb color més clar es veu el silici policristal·lí. El material més llis i fosc de sota el silici policristal·lí és l'òxid de silici (capa de 2 µm).

En repetir el procés de fabricació, es va sobreatacar el silici policristal·lí i es va aconseguir una eficiència major de xips amb funcionament correcte (vegeu Figura 5-7).

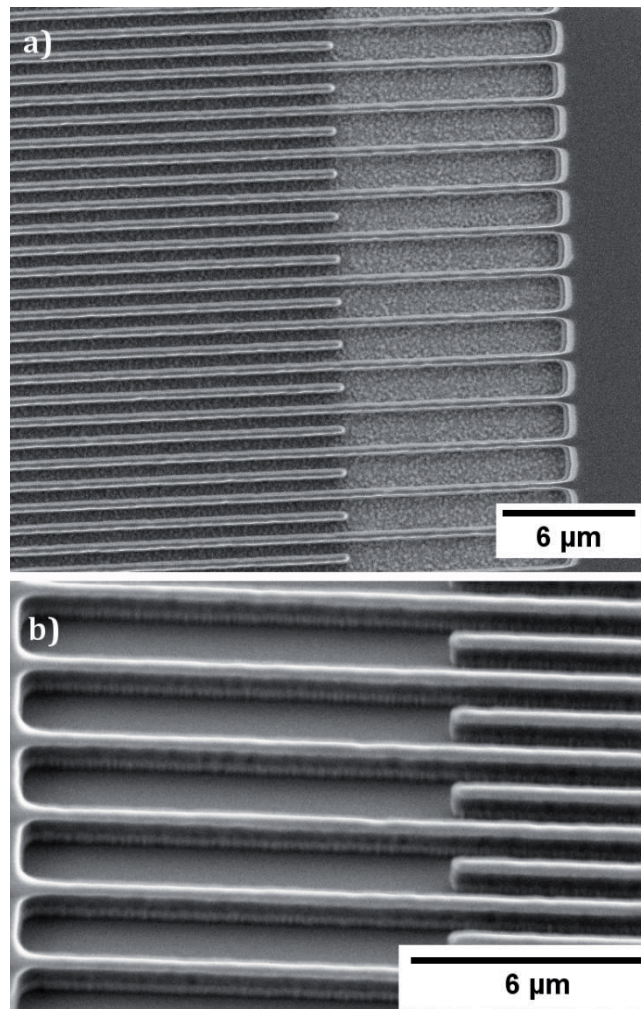


Figura 5-7: Imatges de SEM de l'etapa de fotolitografia i atac dels IDEs de silici policristal·lí. (a) Foto posterior al revelat de la resina i prèvia a l'atac del silici policristal·lí on s'observen els dígits de resina definits sobre la capa de silici policristal·lí (rugosa). (b) Foto posterior a l'atac de silici policristal·lí i prèvia al decapat de la resina on es veu el fons d'òxid de silici (llis) i els dígits formats per dues capes: 4800 Å de silici policristal·lí (més clar i rugós) i 6000 Å de resina.

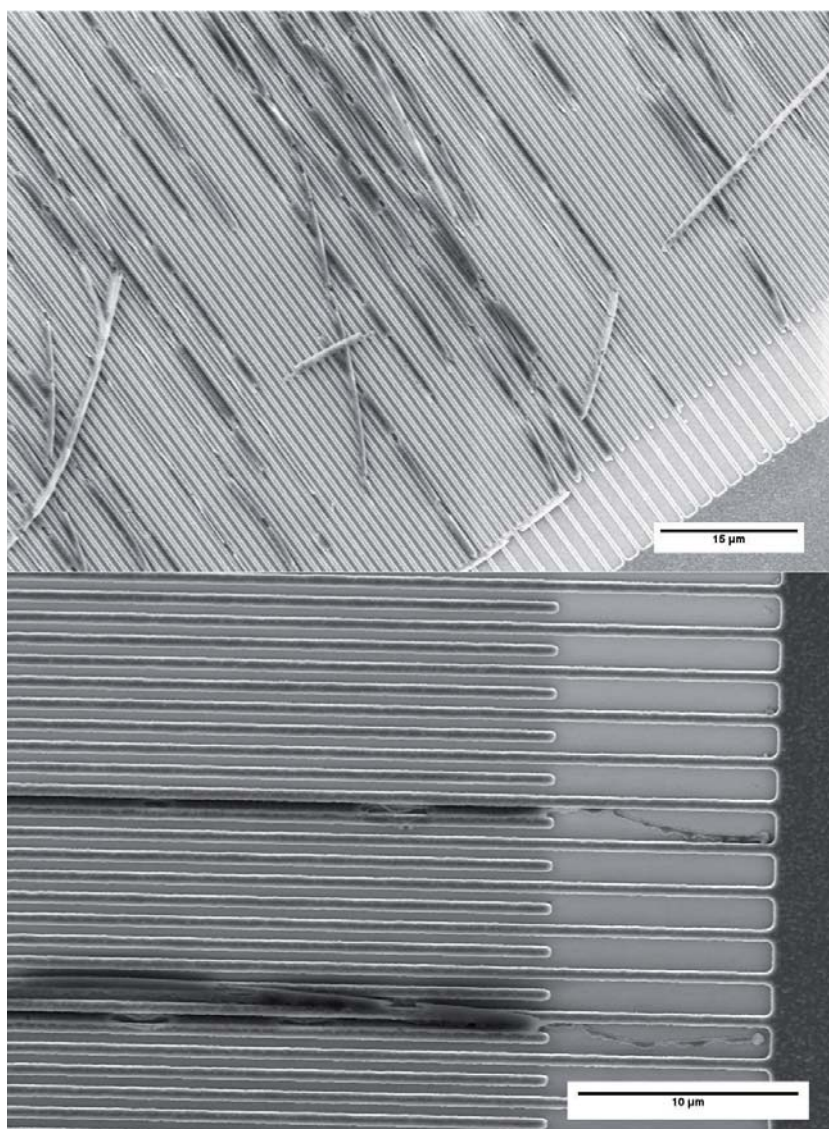
Per altra banda, durant la inspecció que es va fer després de l'**atac humit de l'alumini** es va observar l'aparició d'unes tires d'un material diferent al silici policristal·lí entre els dígits dels elèctrodes.

Després de l'observació amb SEM (vegeu Figura 5-8) es va descartar que les tires fossin d'alumini ja que algunes s'havien desplaçat per la fase aquosa (àcid de l'atac) fins dipositar-se en altres llocs del xip. Qualsevol traça de metall que passés a la solució atacant es dissoldria



ràpidament i, per tant, aquest material no podria ser alumini. No obstant, sí que podia ser resina de la fotolitografia que s'usa, precisament, per protegir el metall del bany d'atac.

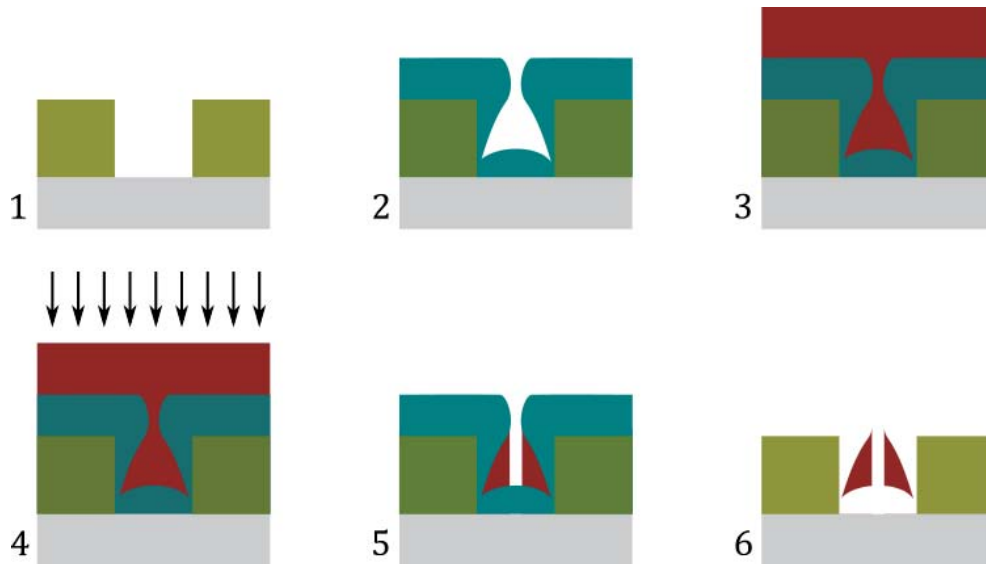
Després de decapar amb plasma, aquestes tires van desaparèixer, fet que va corroborar que es tractava de resina.



*Figura 5-8: Imatge SEM dels interdigitats de silici policristal·lí on s'observen les tires de resina de fotolitografia.*

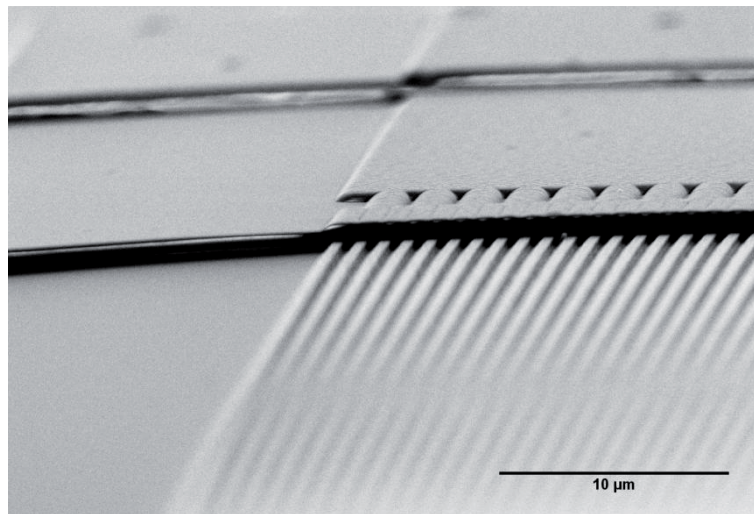
Una hipòtesi possible sobre l'aparició d'aquestes tires és que el dipòsit no conformal de l'alumini formaria una cavitat entre els dígitos de polisilici amb forma de canals paral·lels a aquests. Com a conseqüència, en dipositar la resina, aquesta s'hauria colat pels canals que hauria deixat l'alumini. Finalment, en irradiar la resina, aquesta part que es trobés protegida

pel relleu de l'alumini no es veuria afectada per la fotolitografia i, per tant, no es revelaria. És a dir que aquestes tires de resina només apareixerien després de l'atac de l'alumini que les alliberaria (vegeu Figura 5-9).



*Figura 5-9: Esquema de la hipòtesi sobre l'aparició de tires de resina durant l'atac de l'alumini. 1 Detall de dos dígitos de silici policristal·lí ja definits. 2 Deposició de la capa d'alumini. 3 Deposició de la resina fotosensible per fer la fotolitografia. 4 Etapa de fotolitografia: la regió dels IDEs ha de quedar totalment neta d'alumini. 5 Revelat de la fotoresina. 6 Gravats humits de l'alumini. Queden exposades les tires de fotoresina.*

La resta del procés es va resoldre sense més complicacions. A continuació, a la Figura 5-10, es mostra una imatge de SEM del xip després d'haver acabat tot el procés de fabricació.



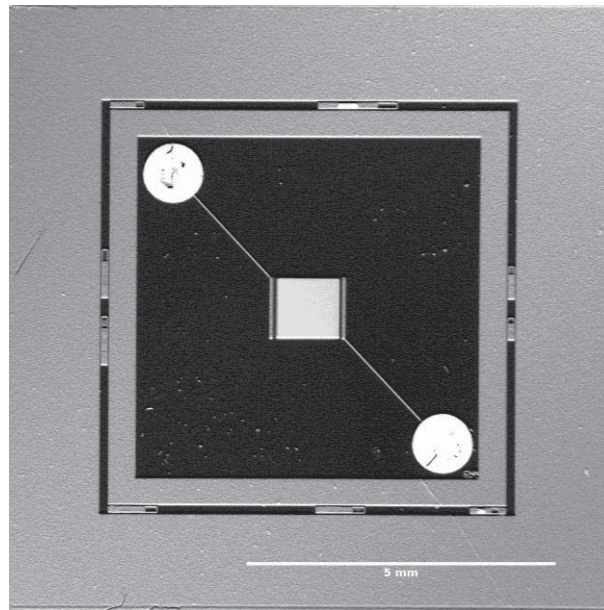
*Figura 5-10: Imatge SEM del xip després d'haver finalitzat el procés de microfabricació. A la part inferior de la fotografia s'aprecien els dígitos de silici policristal·lí. Més amunt s'observa com aquests dígitos queden coberts per una capa d'òxid de passivació. A la part més superior de la imatge es pot veure un darrer esglaó. Aquest darrer esglaó és conseqüència que sota la capa de passivació es troba dipositada la capa d'alumini de les barres col·lectores.*

Un cop finalitzada la fabricació, es mesura el pas de corrent entre ambdós elèctrodes de cada xip. S'identifiquen i marquen tots els xips de les diferents oblies processades amb funcionament correcte, és a dir, sense pas de corrent entre els seus elèctrodes. Pel primer procés de fabricació només s'obtenen 8 xips correctes d'un total de 244 (3.3%). La segona vegada augmenta el rendiment fins a 13.1%.

Els baixos rendiments són causats per l'atac insuficient del polisilici. Per procurar augmentar l'eficiència s'hauria d'augmentar el temps d'atac però s'ha de tenir present que durant l'atac la resina també es va consumint així que tampoc es pot abusar del sobreatac.

Tot i parlar de rendiments baixos cal dir que aquests xips són de múltiples usos així que finalment s'aconsegueixen prou xips per poder dur a terme tot l'experimental previst. La Figura 5-11 mostra un xip tallat.



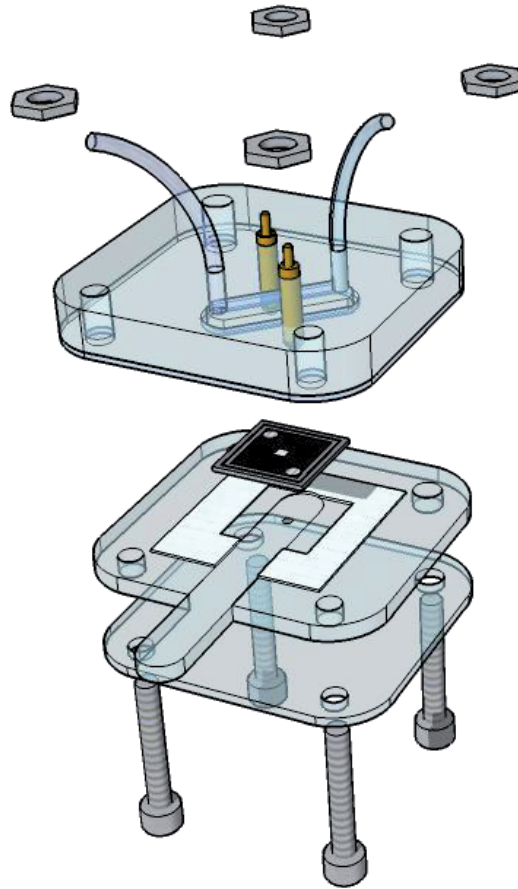


*Figura 5-11: Fotografia feta al microscopi òptic d'un xip. El marc que conté les pistes on estan els motius d'alineament té unes mides de 6 mm x 6 mm però pel tall es deixa un marge de 2 mm per tots els costats així que finalment les mides dels xips són de 10 mm x 10 mm.*

## 1.2. Encapsulat amb integració de microfluídica: disseny i fabricació

Com es mostrava a la Figura 5-1, el disseny del xip es fa pensant en acoblar un canal microfluídic a la diagonal contrària de les pistes d'alumini. La decisió de deixar un marc de 2 mm al voltant dels motius és per augmentar la distància entre l'entrada i la sortida del canal dels punts de connexió.

L'encapsulat que es dissenya és de tipus sandvitx on el xip es posiciona enmig de dues peces de metacrilat (vegeu Figura 5-12).

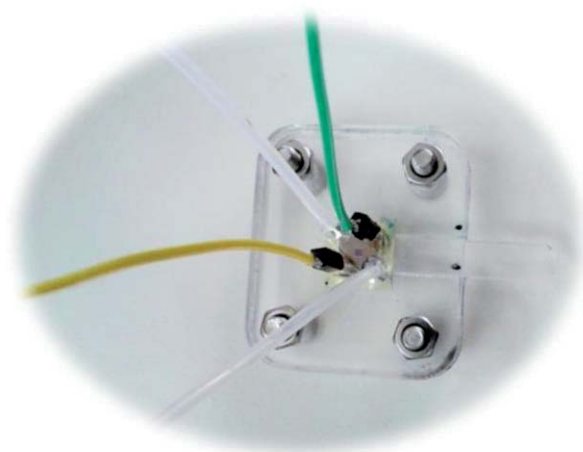


*Figura 5-12: Representació 3D de les diferents peces que componen l'encapsulat del xip.*

Com a particularitat es decideix integrar unes **peces de connexió de molla**<sup>2</sup> a la tapa que, per una banda contacten amb els punts de connexió del xip evitant així la soldadura i, per altra, exposen un pin mascle que es pot encaixar als cables mitjançant entrades de femella. Aquest sistema permet reutilitzar el mateix encapsulat pels diferents xips i, a la vegada, ens evita la incomoditat d'haver de manipular el dispositiu amb els cables ja que aquests només es connecten just en el moment de fer les mesures (vegeu Figura 5-13).

---

<sup>2</sup> *Spring-loaded* en anglès.

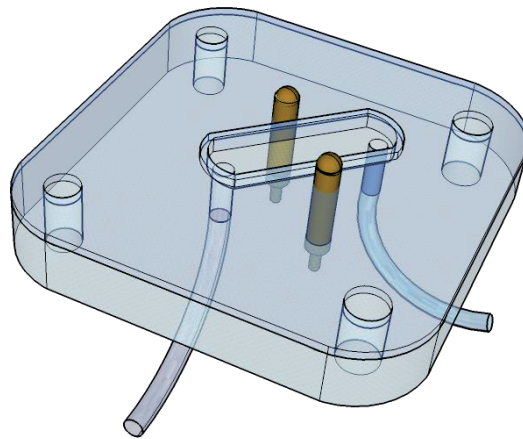


*Figura 5-13: Fotografia del dispositiu amb els cables connectats a les connexions de molla.*

A més, com s'esmentava a l'inici del capítol, es dissenya una pestanya a la peça que fa de suport del xip on s'hi encasta un **imant de neodimi** (*Supermagnete*, Webcraft GmbH, Gottmadingen, Alemanya). Aquesta pestanya pot retirar-se i tornar-se a posar lliurement per la ranura corresponent sense afectar al xip. D'aquesta manera es pot controlar el posicionament de l'imant a l'hora de passar partícules magnètiques pel canal. L'imant que s'utilitza té un diàmetre d'1 mm per a poder concentrar les partícules magnètiques just damunt la superfície dels IDEs que és d'1 mm per 1 mm. Finalment, el **canal microfluídic** es defineix a la tapa de l'encapsulat mitjançant l'adhesió de dues capes de vinil.

Totes les peces es dissenyen amb el programa CorelDRAW (Corel Corporation, Ottawa, Canadà). La base està composta per dues peces de metacrilat. La primera serveix per guiar la pestanya amb l'imant, només té els quatre forats pels cargols i té un gruix d'1 mm. La segona, a part dels quatre forats, també té definida la ranura per on s'encaixa la pestanya amb l'imant. Aquesta peça i la pestanya tenen un gruix de 3 mm. Sobre aquesta peça de la ranura s'hi enganxa un vinil de 70  $\mu\text{m}$  de gruix per facilitar el posicionament correcte del xip.

Finalment, la tapa consisteix en una peça de metacrilat de 5 mm de gruix amb els quatre forats pels cargols, dos forats per les connexions de molla i dos altres forats pels tubs de la microfluídica. A la cara de contacte amb el xip se li adhereix un vinil de 70  $\mu\text{m}$  que defineix el canal. Sobre d'aquesta s'hi afegeix una altra peça de vinil, del mateix gruix, que defineix la junta del canal (vegeu Figura 5-14).



*Figura 5-14: Representació del detall del dors de la tapa on es troben les peces de vinil adherides que defineixen el canal.*

Les peces de metacrilat es van tallar mitjançant un mecanitzat amb laser (Epilog Mini 24 CO2-laser, Epilog Laser, Golden, EUA). Les de 5 i 3 mm a 70% de potència, 10% de velocitat, essent necessàries dues passades per les de 5 mm. En canvi, per la peça d'1 mm s'utilitzen unes altres condicions de 20% de potència i 15% de velocitat. En tots els casos la freqüència emprada és de 5 kHz.

Les peces de vinil es van tallar amb un equip de tall tipus *Cutter plotter* (Roland GX-24 CAMM-1, Roland DGA Corporation, Irvine, EUA) utilitzant una fulla del mateix fabricant amb un òfset de 0.175 mm.

Les mides del canal són 11.2 mm de llargada, 3.37 mm d'amplada i 0.14 mm d'alçada (dos vinils de 70  $\mu\text{m}$ ) i la junta del canal té una amplada de 0.5 mm. Per tant, el volum màxim de líquid que s'hi pot allotjar és aproximadament de 5.3  $\mu\text{L}$ .

## 2. Estudis previs de caracterització i optimització dels diferents paràmetres necessaris per a realitzar les mesures d'impedància bacterianes

### 2.1. Reactius i solucions

Partícules magnètiques de 100 nm de diàmetre marcades amb estreptavidina *fluidMAG-Streptavidin* (Chemicell GmbH, Berlín, Alemanya), anticòs anti-*E. coli* O157:H7 marcat amb biotina (KPL Inc., Gaithersburg, EUA), pastilles de PBS (VWR International, Llinars del Vallès, Espanya), LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability Kit (Life Technologies S.A., Alcobendas, Espanya) i KCl (Sigma-Aldrich Química S.L., Madrid, Espanya).

Tampó fosfat salí (PBS) pH 7.4 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Solucions de diferents conductivitats de 5 µS/cm a 100 µS/cm (partint d'aigua desionitzada s'ajusta a cada conductivitat amb KCl.).

### 2.2. Materials i mètodes

#### 2.2.1. Caracterització impedimètrica dels IDEs

Abans de fer les mesures de bacteris amb els xips es realitzen calibrats en conductivitat per tots ells. Pels calibrats es mesuren diferents conductivitats del rang de 5 µS/cm a 100 µS/cm: 5, 10, 20, 40, 60, 80 i 100 µS/cm. A partir d'aquestes mesures s'estudien diferents paràmetres que defineixen els IDEs.

#### 2.2.2. Condicionament de les partícules magnètiques amb anticossos i optimització de la relació de partícules magnètiques per bacteri

Com es comentava anteriorment, el sistema té un imant integrat pensat per realitzar els assajos de detecció mitjançant l'ús de partícules magnètiques que capten l'analit.

L'avantatge d'aquest tipus d'assajos és la possibilitat d'acumular els bacteris just a la superfície dels IDEs. A més, un cop retinguts els bacteris, es pot canviar el medi en el que es troben per un de menys conductiu ja que, com s'estudiava al segon capítol, el senyal d'impedància degut a la presència de microorganismes serà superior amb medis de conductivitat baixa. Finalment, una altra virtut d'aquesta estratègia és la facilitat amb la que es pot aconseguir la neteja del xip (traient l'imant) sense haver de recórrer a reactius agressius i ni tan sols haver de treure el xip de l'encapsulat.

Per dur a terme l'assaig final de detecció de bacteris és necessari que les partícules magnètiques s'uneixin específicament al bacteri que es vol mesurar. Per altra banda, es vol evitar que les partícules produeixin més senyal impedimètric que els propis bacteris.

Per tant, s'opta per unes **partícules magnètiques de 100 nm de diàmetre** (cinc cops més petites que el diàmetre dels bacteris) modificades **amb estreptavidina** per unir-hi **anticossos específics** mitjançant la **interacció biotina-estreptavidina**.

Posteriorment al condicionament de les partícules magnètiques amb anticossos, cal trobar la **relació òptima** entre quantitat de **partícules magnètiques per bacteri**.

Aquesta optimització és important ja que un excés de partícules magnètiques podria perjudicar les mesures perquè cobriria la superfície de l'IDE i podria emmascarar els bacteris. Per altra banda, un dèficit de partícules magnètiques faria que els bacteris no es quedessin retinguts damunt els elèctrodes.

#### 2.2.2.1. Condicionament de les partícules magnètiques amb anticossos

Per aconseguir el condicionament es procedeix tal com indica el protocol del comerciant (Chemicell 2016). Les partícules magnètiques amb estreptavidina es renten tres vegades amb PBS utilitzant un separador magnètic *MagnetoPURE* (Chemicell GmbH, Berlín, Alemanya). Es prepara una solució final de 0.3 mg/mL d'anticòs marcat amb biotina i 10 mg/mL de partícules magnètiques marcades amb estreptavidina en PBS. Es deixa incubar en un agitador durant 15 minuts a temperatura ambient i es tornen a fer tres rentats amb PBS utilitzant el separador magnètic. Seguint aquest procediment s'obté una relació de 33.5 anticossos per partícula magnètica. Probablement hi hagi un excés d'anticossos que es neteja amb els tres

rentats finals. Finalment, aquestes partícules magnètiques conjugades es poden reservar al frigorífic per ser usades durant les setmanes posteriors.

### 2.2.2.2. Optimització de la relació de partícules magnètiques per bacteri

Un cop condicionades i rentades les partícules magnètiques amb anticòs, es preparen quatre vials amb diferents proporcions de bacteri i partícules magnètiques cada un (proporcions 1:10, 1:25, 1:50 i 1:100) i un vial amb el blanc amb partícules magnètiques sense bacteris (només PBS).

Els bacteris junt amb les partícules magnètiques condicionades s'incuben en agitació a temperatura ambient durant 30 minuts. Tot seguit es procedeix a la separació magnètica mitjançant el separador magnètic en agitació durant 1 hora. Després es recull el sobrenedant de cada vial en una cubeta de quars. Posteriorment, s'analitza la seva absorbància a 550 nm (longitud d'ona típicament utilitzada per a quantificació cel·lular) en un espectrofotòmetre DU730 (Beckman Coulter, Pasadena, EUA).

### 2.2.3. Optimització del flux: estudis amb microscopi confocal

Abans de realitzar les mesures impedimètriques de bacteris es fan estudis per optimitzar el flux a l'hora de fer l'assaig amb la microfluídica integrada.

A l'hora d'integrar la fluídica s'ha de ser conscient que un flux excessivament ràpid pot arrossegar l'anàlit amb partícules magnètiques sense que aquest pugui dipositar-se a la superfície dels IDEs. Per tant, és necessari optimitzar el flux per a que aquest sigui el més ràpid possible sense que es perdin un nombre significatiu de bacteris.

Per conèixer el flux òptim es realitza un estudi comparatiu de fluxos utilitzant solucions amb partícules magnètiques unides a bacteris. Per observar *in vivo* l'atracció i fixació dels bacteris a la superfície, s'utilitza la tècnica de microscòpia de fluorescència confocal.

#### 2.2.3.1. Preparació de la mostra

S'utilitzen el mateix tipus de bacteris que per les mesures amb els IDEs d'1.5  $\mu\text{m}$ , les *E. coli* DSMZ 17076. Després de centrifugar es fa una resuspensió del sediment amb PBS. Aquests

bacteris s'incuben amb les partícules magnètiques amb anticòs (proporció 1:100 tal com s'explicava a la secció anterior) en agitació durant 30 minuts a temperatura ambient.

Posteriorment s'afegeixen 2  $\mu\text{L}$  de cada colorant (A i B) de LIVE/DEAD Kit i es deixa actuar durant 5 minuts abans de passar-ho pel sistema microfluídic.

#### 2.2.3.2. Preparació del sistema microfluídic

Les observacions al confocal no es poden fer utilitzant el nostre dispositiu a causa de l'opacitat del xip i perquè els tubs de microfluídica impedeixen un bon enfocament de la imatge. Per aquest motiu, els estudis es fan amb uns portaobjectes comercials que contenen sis canals:  $\mu$ -Slide VI<sup>0.1</sup> (Ibidi GmbH, Martinsried, Alemanya). Hi ha diferents articles comercials amb canals que ens permeten fer l'estudi amb confocal (vegeu Taula 5-1) però s'escull el  $\mu$ -Slide VI<sup>0.1</sup> per ser el més similar al nostre canal. Per altra banda, existeix el Slide VI<sup>0.4</sup> amb canals de mida superior al del nostre dispositiu.

Un fluid passant a un flux  $X$  ( $\mu\text{L}/\text{s}$ ) anirà a una velocitat superior per un canal més petit que per un de més gran. El  $\mu$ -Slide VI<sup>0.1</sup> és preferible al  $\mu$ -Slide VI<sup>0.4</sup> perquè té unes mides lleugerament més reduïdes a les del nostre canal. Per tant, per un canal del  $\mu$ -Slide VI<sup>0.1</sup> qualsevol fluid anirà a velocitat superior que pel nostre canal en aplicar el mateix flux. En conseqüència, el flux que es consideri òptim per aquest canal comercial, amb tota certesa serà òptim també pel nostre canal, cosa que no es podria concloure si es fes l'estudi amb el canal més gran.

Canal	Llargada (mm)	Amplada (mm)	Alçada (mm)	Volum ( $\mu\text{L}$ )
Dispositiu amb IDE	11.2	3.37	0.14	5.3
$\mu$ -Slide VI <sup>0.1</sup> (comercial)	17	1	0.1	1.7
$\mu$ -Slide VI <sup>0.4</sup> (comercial)	17	3.8	0.4	30

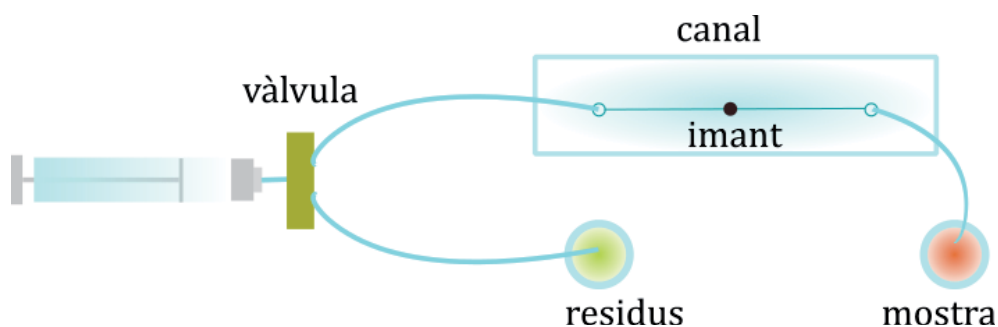
*Taula 5-1: Comparativa entre el canal del dispositiu i els canals comercials.*



Damunt de cada canal s'hi enganxa un imant del mateix tipus del que es posa a la pestanya de l'encapsulat (1 mm de diàmetre per 1 mm d'alçada). Aquest imant es pot observar amb el canal de llum transmesa i així es pot enfocar tenint-lo de referència.

L'estudi es va desenvolupar al Servei de Microscòpia de la Universitat Autònoma de Barcelona amb l'ajuda de la tècnic del Servei Mònica Roldán. L'equip que es va utilitzar va ser el Microscopi Làser Confocal Multifotó Espectral Leica TCS SP5 (Leica, Nanterre, França). Per controlar els fluxos s'utilitza una bomba de xeringues Nemesys (Cetoni GmbH, Korbußen, Alemanya) i xeringues de vidre de 2.5 mL (Hamilton Company, Bonaduz, Suïssa).

Es connecta la sortida del canal del portaobjectes comercial amb la xeringa de bombeig mitjançant un tub de tefló de secció interna de 0.5 mm i s'aplica pressió negativa per iniciar la succió de la mostra (vegeu Figura 5-15; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Per altra banda, per l'entrada del canal s'hi connecta un tub de les mateixes característiques que es deixa sense connectar. Aquest és el tub que es submergeix dins el líquid que s'hagi de fer passar pel sistema en cada cas. Abans de fer passar la mostra és necessari cebar tot el canal fins la xeringa. Per poder cebar el canal i després treure tot l'aire de la xeringa s'utilitza una vàlvula que es connecta a la sortida de la xeringa. Aquesta vàlvula té una connexió amb la xeringa i dues amb dos tubs: el tub que es connecta al canal i el tub dels residus.



*Figura 5-15: Representació esquemàtica de les connexions del sistema microfluídic.*

Quan es treballa amb pressió negativa, com és el cas d'aquest estudi i els posteriors, és necessari cebar el sistema amb líquid. Els gasos són compressibles però els líquids pràcticament no ho són. Quan es comença a aplicar la pressió negativa a un flux concret a velocitat constant, si tot el sistema està ple d'aire (gas), el líquid de la mostra que comença a entrar no anirà a la velocitat constant que s'està bombejant degut a la compressió i

descompressió del gas que hi ha al sistema. Per aquest motiu, per assolir una precisió superior en la velocitat del flux és necessari que tot el sistema contingui líquid.

Per cebar el sistema en aquest estudi utilitzem també PBS que és amb el que es troben les cèl·lules tenyides. A la Figura 5-16; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** es pot apreciar la complexitat de la integració del sistema microfluídic dins el microscopi confocal.



*Figura 5-16: Fotografies del muntatge complet per fer l'estudi. Integració del sistema microfluídic dins l'equip de microscòpia confocal. A l'esquerra es veu el microscopi confocal, l'aparell de bombeig amb la xeringa i l'ordinador portàtil que controla el bombeig. A la dreta s'observa més detalladament el posicionament del portaobjectes i les entrades i sortides del canal.*

#### 2.2.3.3. Pas de la mostra a diferents fluxos

Per fer els estudis es fan passar 50  $\mu\text{L}$  de mostra cada vegada. El volum del tub d'entrada és d'uns 300  $\mu\text{L}$  i per tant, després d'absorbir els 50  $\mu\text{L}$  de mostra a velocitat de 50  $\mu\text{L}/\text{s}$  es fan passar 250  $\mu\text{L}$  més de PBS a aquest mateix flux ràpid per posicionar la mostra just a l'entrada del canal.

Les gravacions es comencen en aquest punt en que la mostra s'ha situat al principi del canal. A partir d'aquí s'absorbeix el PBS a la velocitat de flux que s'estudia.

Es proven els següents fluxos: 0.5  $\mu\text{L}/\text{s}$ , 0.2  $\mu\text{L}/\text{s}$  i 0.1  $\mu\text{L}/\text{s}$ . Després de fer passar pel camp de visió els 50  $\mu\text{L}$  de mostra s'augmenta el flux a 100  $\mu\text{L}/\text{s}$  de manera que s'aconsegueix rentar el canal de bacteris i es pot procedir a repetir l'estudi amb un nou flux.

Amb el microscopi es fa una filmació a intervals<sup>3</sup> on el temps entre intervals és de 1 s amb 720 ms pel flux de 0.5  $\mu\text{L/s}$ , 3 s amb 440 ms pel flux de 0.2  $\mu\text{L/s}$  i de 875 ms pel de 0.1  $\mu\text{L/s}$ .

L'objectiu que s'utilitza és el de 10x amb obertura numèrica de 0.40 i mode d'operació en sec. El marcatge comercial que s'ha utilitzat marca per una banda amb verd totes les cèl·lules presents (vives i mortes) i, amb vermell, només aquelles que tenen dany cel·lular. Per excitar el verd s'utilitza un làser d'excitació a 488 nm que emet a 500-550 nm. En canvi, pel vermell s'excita a 561 nm i l'emissió és entre 600-800 nm. Les cèl·lules que s'utilitzen per l'estudi no han estat sotmeses a cap tractament per minvar la seva viabilitat, tot i així, sempre hi ha població de cèl·lules mortes que s'observen en el rang del vermell a causa de l'envelliment natural bacterià.

Pels primers dos estudis (0.5 i 0.2  $\mu\text{L/s}$ ) s'han captat les imatges excitant amb els dos làsers però, en canvi, per 0.1  $\mu\text{L/s}$  només s'excita amb el de verd. Aquest és el motiu pel qual pels dos fluxos més ràpids es necessita més temps entre una captació d'imatge i la següent.

### 2.3. Resultats i discussió

#### 2.3.1. Caracterització impedimètrica dels IDEs i comparació amb la geometria de 1.5 $\mu\text{m}$

##### 2.3.1.1. Calibrats en conductivitat

Abans de fer les mesures de bacteris amb els xips es realitzen calibrats en conductivitat per tots ells. Pels calibrats es mesuren diferents conductivitats del rang de 5  $\mu\text{S/cm}$  a 100  $\mu\text{S/cm}$ . La Figura 5-17 mostra el diagrama de Bode pel calibrat d'un xip.

Tal com s'esperava, es pot veure com la impedància de la interfície no varia amb la conductivitat i que la **màxima variació** es dona a la regió on predomina la **resistència de la solució**. La capacitat de la solució també és constant i es pot apreciar sobretot a les conductivitats baixes on la  $R_s$  és alta.

---

<sup>3</sup> *Time-lapse* en anglès

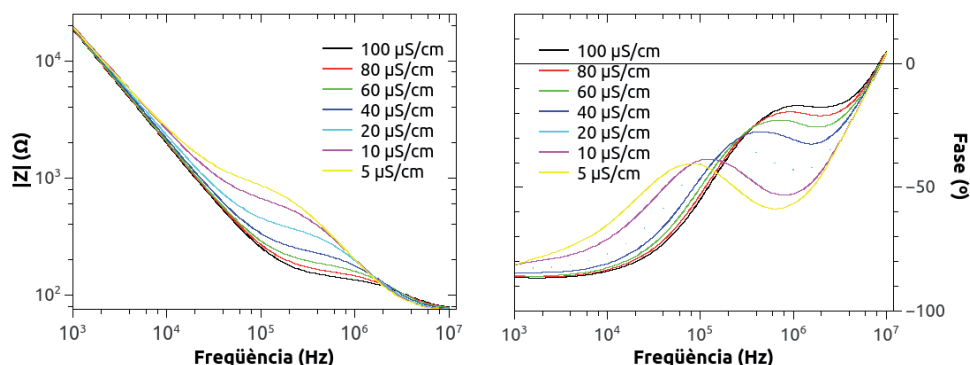


Figura 5-17: Diagrama de Bode del calibrat en conductivitat per un xip d'IDEs de  $0.5 \mu\text{m} \times 0.5 \mu\text{m}$ .

Observant la Figura 5-18, es pot veure que el que difereix més dels nous IDEs respecte dels de  $1.5 \mu\text{m}$ , és l'aparició a freqüències més baixes de l'efecte de la resistència de contactes ( $R_c$ ). Això es deu a la disminució de la impedància de la solució ( $R_s, -j/\omega C_s$ ) per la disminució de la separació entre dígit.

Filant més prim, si s'observa la fase de la impedància es pot veure com, pel cas dels IDEs de  $0.5 \mu\text{m}$ , aquesta assoleix valors positius a les freqüències més elevades. Això és conseqüència de l'aparició de l'efecte de la **inductància** dels cables de mesura que també influeixen la impedància d'aquestes freqüències altes a partir d'1 MHz (recordem que per una resistència pura la fase són  $0^\circ$ , i per una inductància  $+90^\circ$ ).

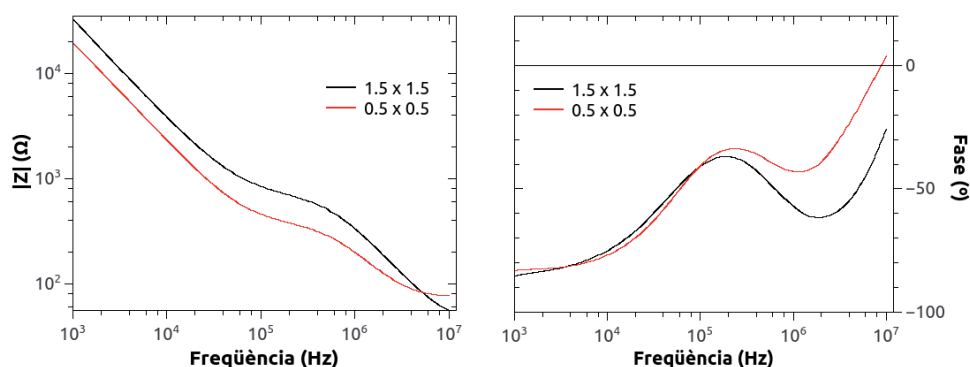


Figura 5-18: Espectre d'impedància representat mitjançant diagrama de Bode d'una solució de  $20 \mu\text{S/cm}$  mesurada amb d'IDEs de  $0.5 \times 0.5 \mu\text{m}$  i de  $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}$ .

Pel cas dels IDEs de  $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}$  no s'havia pogut concloure que realment intervinguessin fenòmens d'inductància a les freqüències més altes perquè la fase no arriba a valors positius. Però tot i així, el pendent que adquireix la fase a aquestes freqüències finals no té tendència a suavitzar-se cap als  $0^\circ$ .

2.3.1.2. Estudi de la influència de diferents paràmetres en funció de la freqüència:  
ajustament a circuits elèctrics equivalents

L'ajustament a circuits equivalents ens serveix per confirmar aquesta influència de la inductància a les últimes freqüències. En aquest cas sí que és una eina útil per veure quin tipus de fenomen impedimètric intervé a cada freqüència.

Es proven tres circuits similars (vegeu Figura 5-19) basats en la estructura física del dispositiu, combinant la  $R_c$  i  $L_c$  per veure quin s'ajusta més a les mesures experimentals.

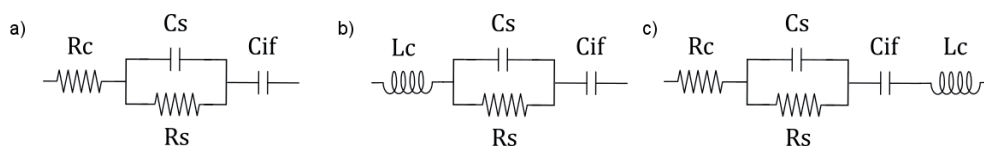


Figura 5-19: Circuits equivalents on  $R_c$  és la resistència de contactes,  $L_c$  la inductància deguda als cables,  $C_s$  la capacitat de la solució,  $R_s$  la resistència de la solució i  $C_{if}$  la capacitat de la interfície. a) Circuit 1 amb una  $R_c$ . b) Circuit 2 amb una  $L_c$ . c) Circuit 3 amb una combinació de  $R_c$  i  $L_c$  en sèrie.

A la Figura 5-20 es mostren els ajustaments dels tres circuits a les mesures experimentals realitzades amb els IDEs de 0.5x0.5 en una solució de 20  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

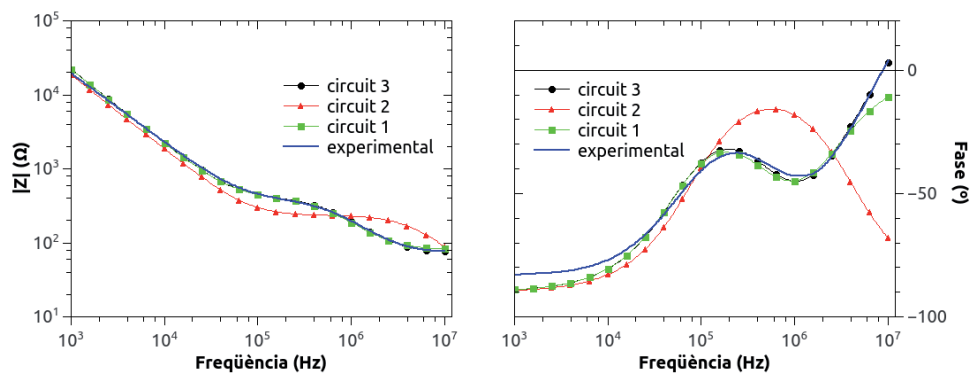


Figura 5-20 Espectre d'impedància representat mitjançant diagrama de Bode on es mostra la resposta experimental junt amb els ajustaments amb els tres tipus de circuits equivalents. On circuit 1 és el que té una  $R_c$ ; circuit 2 es substitueix la  $R_c$  per una  $L_c$ ; i circuit 3 es combina en paral·lel una  $R_c$  amb una  $L_c$ .

El circuit que millor s'ajusta és el 3 (circuit c de Figura 5-19). Per aquest ajustament s'obtenen els següents valors dels diferents paràmetres: 288.6  $\Omega$  de  $R_s$ ,  $1.053 \cdot 10^{-9}$  F de  $C_s$ ,  $7.245 \cdot 10^{-9}$  de  $C_{if}$ , 76.54  $\Omega$  de  $R_c$ ,  $3.430 \cdot 10^{-7}$  H de  $L_c$  i la  $\chi^2$  de l'ajustament és de 0.013831.

La resistència de quadre del silici policristal·lí és de  $15 \Omega/\square$  i la de l'alumini de  $0.03 \Omega/\square$ . Es calculen els quadres aproximats que contenen els nostres IDEs de  $0.5 \times 0.5$  i les pistes i connexions d'alumini i s'obté que la seva resistència és d'aproximadament  $40 \Omega$ . Aquesta resistència teòrica és del mateix ordre de magnitud que l'obtinguda per la  $R_c$  mitjançant l'ajustament al CEE 3.

Per tant, es pot concloure que realment en aquestes **freqüències altes** (properes a  $10^7$  Hz) comencen a ser importants tant la  $R_c$  com la  $L_c$ . Aquests són paràmetres constants que depenen dels elèctrodes ( $R_c$ ) i dels cables ( $L_c$ ) i no canvien amb la variació del medi. Tot i així la  $L_c$  es podria disminuir escurçant els cables.

A les freqüències entre  $10^6$  i  $10^7$  Hz, abans de l'aparició de  $R_c$  i  $L_c$  predomina la impedància de la  $C_s$ . En canvi, a les freqüències entre  $2 \cdot 10^4$  i  $10^6$  Hz és on la contribució més important a la impedància prové de la  $R_s$ . I finalment, a les freqüències **inferiors a  $2 \cdot 10^4$  Hz** predomina la impedància de la interfície que actua com una **capacitat**. Cal remarcar que aquesta capacitat no té un comportament totalment pur. Normalment s'ajustaria a una CPE ja que la seva fase no és exactament de  $90^\circ$ . Aquestes característiques híbrides entre capacitat i resistència poden ser causades per la rugositat de la superfície del silici policristal·lí (Dominguez-Benetton et al. 2012). Tot i així, es decideix no complicar l'ajustament ja que només es busca confirmar la influència tant d'inductàncies com de resistències a les freqüències properes a  $10^7$  Hz, i en aquestes freqüències la impedància de la interfície no contribueix significativament a la impedància total.

#### 2.3.1.3. Càlcul de la constant de cel·la dels elèctrodes

Finalment, a partir dels calibrats en conductivitat es pot calcular la constant de cel·la dels IDEs ( $k$ ) que és el paràmetre que es refereix a la configuració geomètrica dels elèctrodes. A l'equació 1.3 es defineix la constant de cel·la  $k$  com el paràmetre que relaciona la resistència de la solució ( $R_s$ ) amb la seva resistivitat ( $\rho$ ) que és la inversa de la conductivitat ( $\sigma$ ).

$$1.3. \quad k = \frac{R_s}{\rho}$$

Utilitzant el circuit 3 (vegeu Figura 5-19 c) s'obté la  $R_s$  per cada conductivitat.

A la Figura 5-21 es mostra la relació entre resistivitat del medi (calculada fent la inversa de la conductivitat mesurada) i resistència de la solució obtinguda de l'ajustament amb el circuit 3. Es pot veure com la relació entre ambdós paràmetres és lineal entre 100 i 500  $\Omega\cdot\text{m}$  (100 - 20  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) i que també en aquest rang es dona la menor dispersió de les dades.

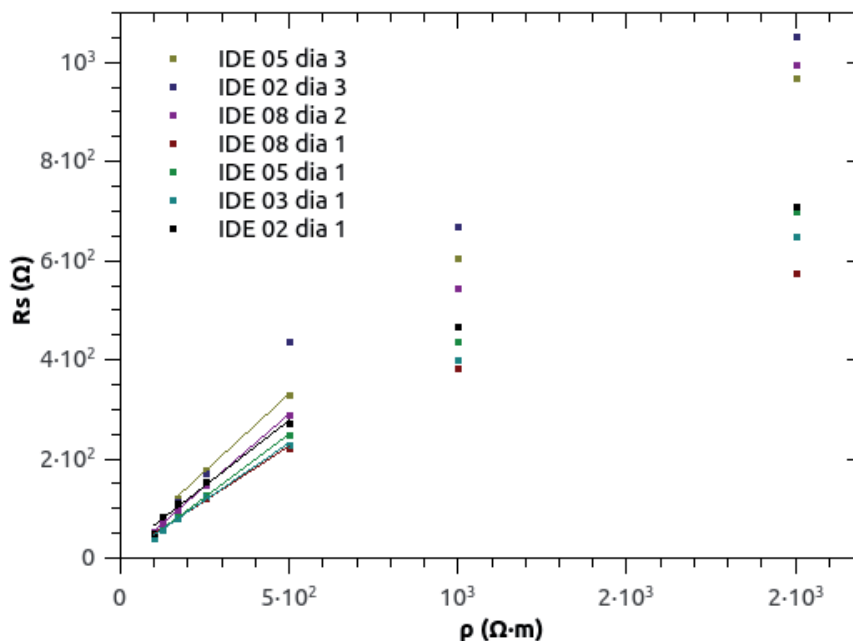


Figura 5-21: Representació gràfica de la relació entre resistivitat experimental ( $\rho$ ) i resistència de la solució derivada de l'ajustament al circuit 3 ( $R_s$ ) de diferents mesures realitzades amb quatre elèctrodes en tres dies diferents. També es mostren les regressions lineals del rang comprès entre 100 i 500  $\Omega\cdot\text{m}$  de totes les mesures menys la de l'IDE 02 feta el dia 3.

Per tant, per calcular la constant de cel·la s'utilitzen els valors dels calibrats en aquest rang esmentat. El pendent de la regressió lineal d'aquests punts és la constant de cel·la. La mitjana resultant de  $k$  és  $51.71 \pm 1.79 \text{ cm}^{-1}$  ( $n=6$ ).

### 2.3.2. Condicionament de les partícules magnètiques amb anticossos i optimització de la relació de partícules magnètiques per bacteri

Tal com es mostra a la Taula 5-2 la proporció millor en quant a captura és la **relació 1:100**. El sobrenedant d'aquesta proporció està pràcticament net de bacteris, és a dir, té gairebé l'absorbància del PBS.

En els altres casos hi ha una deficiència de partícules magnètiques i, per tant, al sobrenedant es detecta una absorbància superior al blanc com a conseqüència de la presència de bacteris.

Per aquest motiu es decideix utilitzar aquesta relació de partícules magnètiques per bacteri de cara a la preparació de la mostra per les mesures elèctriques.

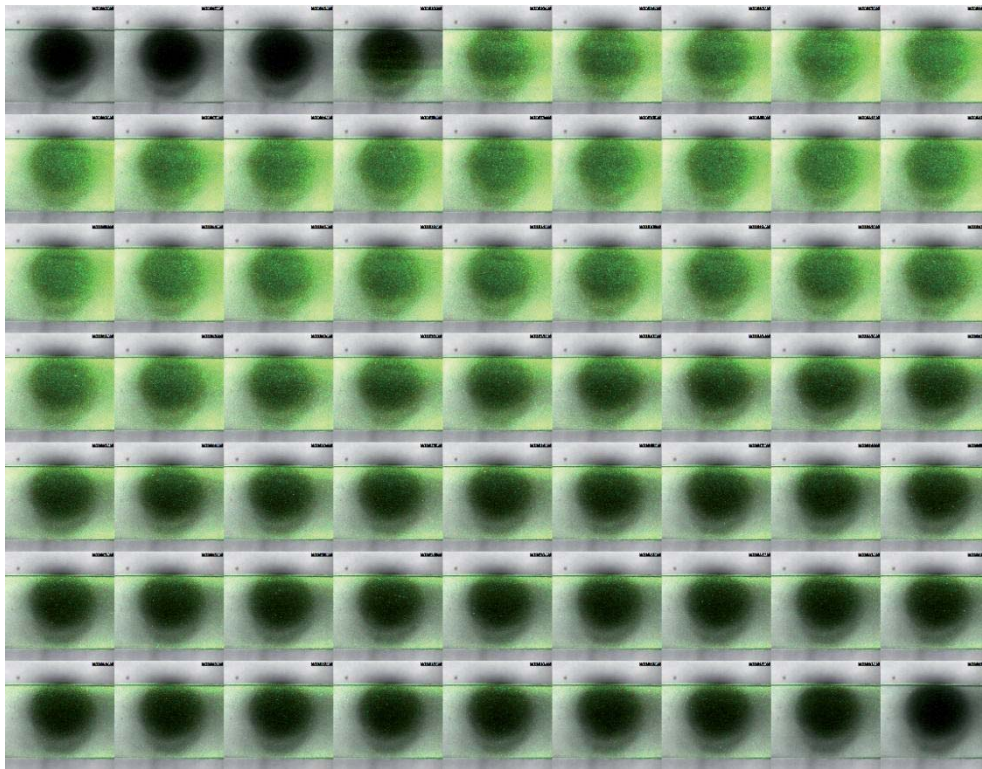
<b>Mostra ( bacteri : partícula)</b>	<b>Absorbància (550 nm)</b>
1 : 100	0.008
1 : 50	0.062
1 : 25	0.086
1 : 10	0.506

*Taula 5-2: Resultats de la mesura d'absorbància a 550 nm del sobrenedant de cada tipus de mostra.*

### *2.3.3. Optimització del flux: estudis amb microscopi confocal*

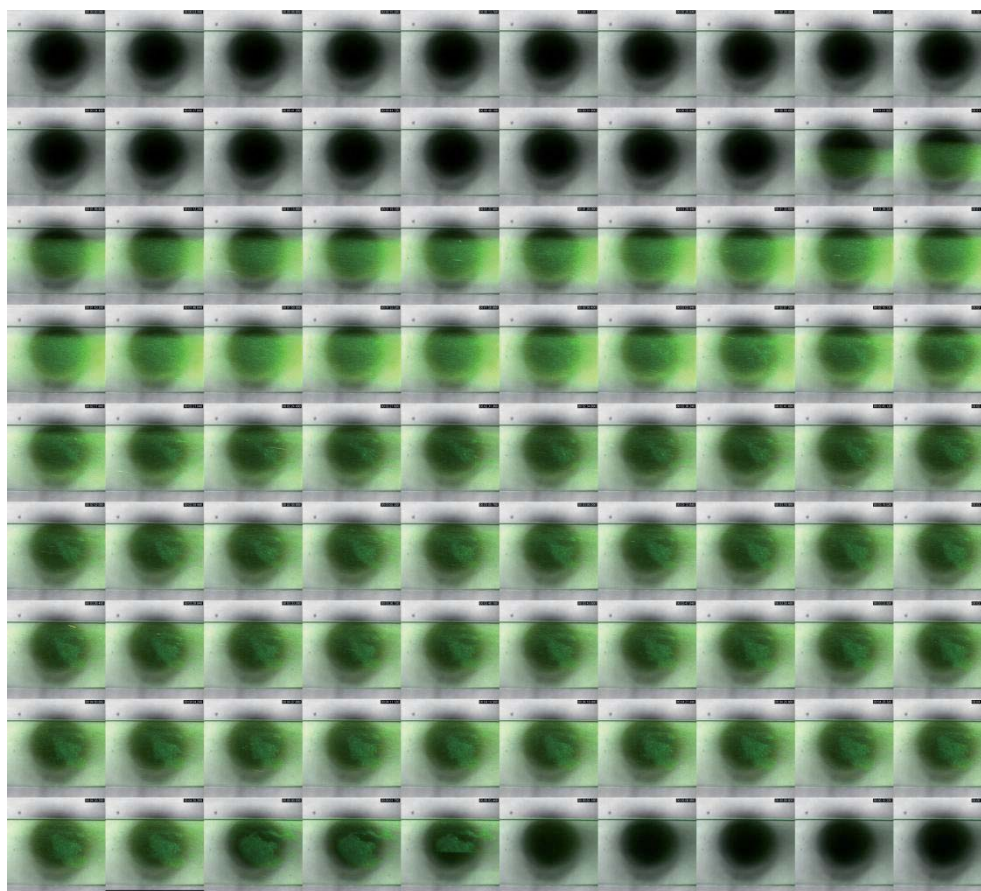
A continuació es mostren els resultats obtinguts de l'estudi amb cada flux. Per interpretar correctament les imatges cal tenir en compte que el sentit del flux era sempre d'esquerra a dreta. A més, després de deixar passar els 50  $\mu\text{L}$  de mostra (que en funció de la velocitat del flux triguen més o menys temps en passar) es fa una neteja augmentant el flux a 100  $\mu\text{L/s}$  i per aquest motiu les últimes diapositives sempre tornen a mostrar el canal net de bacteris.





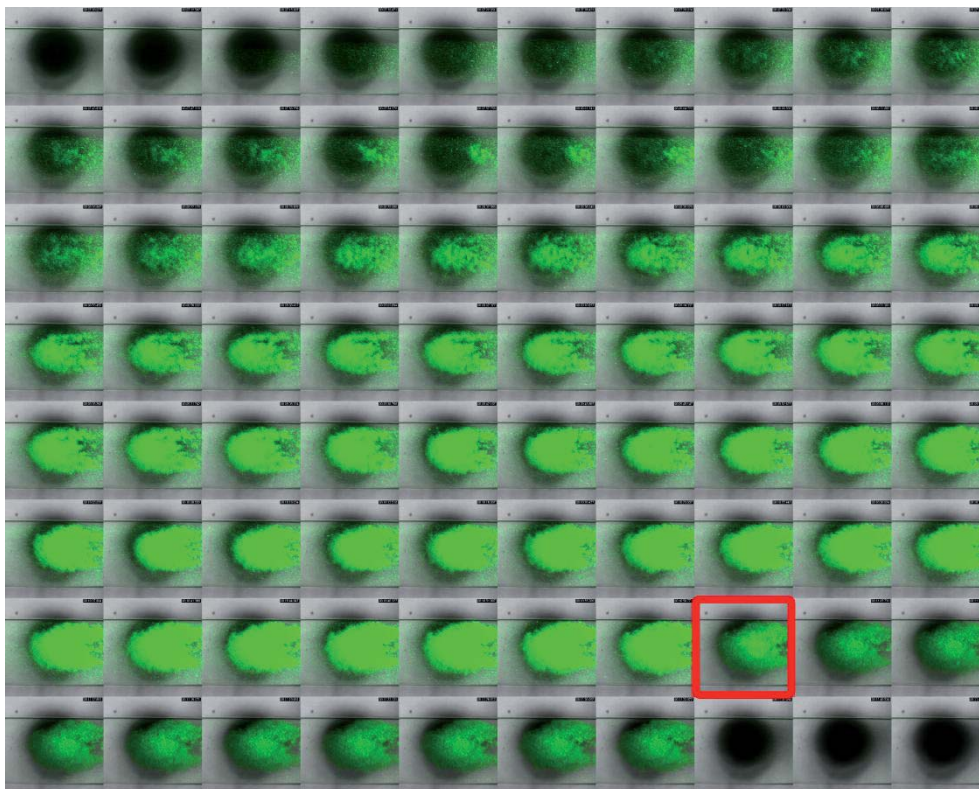
*Figura 5-22: Muntatge fotogràfic seqüencial de l'estudi pel flux de  $0.5 \mu\text{L/s}$  ordenat d'esquerra a dreta i d'amunt a baix. Es mostra l'ordenació temporal de la meitat de les imatges que componen aquesta gravació. Per tant, en aquesta seqüència el temps entre interval és de 3 s amb 440 ms i el temps total de gravació de 3 min 33 s amb 280 ms.*

La Figura 5-22 mostra el comportament dels bacteris de la mostra amb partícules magnètiques unides en passar pel canal aplicant un flux de  $0.5 \mu\text{L/s}$ . L'imant correspon a la foscor circular que s'aprecia al fons de la imatge. Es pot observar perfectament com els  $50 \mu\text{L}$  de mostra passen a una velocitat excessiva per a que els bacteris amb partícules magnètiques es puguin unir a la superfície. Per tant, la força del flux és superior a la força magnètica exercida per l'imant.



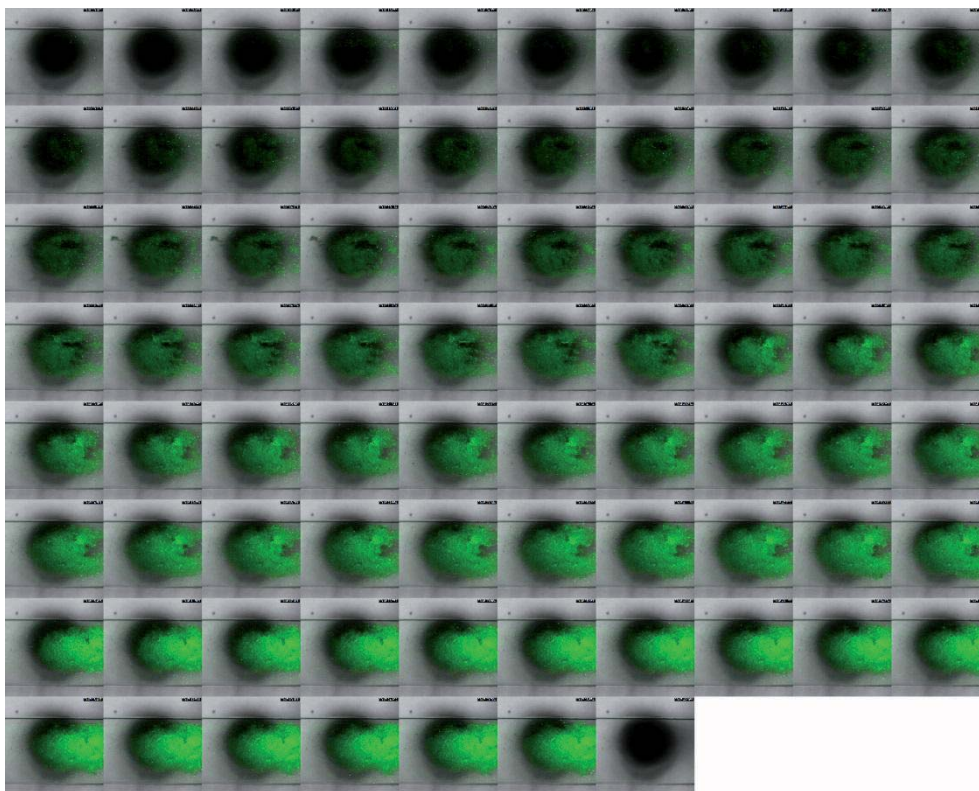
*Figura 5-23: Muntatge fotogràfic seqüencial de l'estudi pel flux de  $0.2 \mu\text{L/s}$  ordenat d'esquerra a dreta i d'amunt a baix. Es mostra l'ordenació temporal de totes les imatges que componen aquesta gravació. Per tant, en aquesta seqüència el temps entre interval correspon al de la gravació que és de 3 s amb 440 ms i el temps total de gravació de 4 min 13 s amb 760 ms.*

A continuació, a la Figura 5-23 es mostra l'estudi fet amb un flux de  $0.2 \mu\text{L/s}$ . Amb aquest flux s'aprecia la retenció de certa acumulació de bacteris però segueix tractant-se d'una retenció dèbil.



*Figura 5-24: Muntatge fotogràfic seqüencial d'un estudi pel flux de  $0.1 \mu\text{L}/\text{s}$  ordenat d'esquerra a dreta i d'amunt a baix. Es mostra l'ordenació temporal d'un quart de les imatges que componen aquesta gravació. Per tant, en aquesta seqüència el temps entre interval correspon al de la gravació que és de 3 s amb 480 ms i el temps total de gravació de 4 min 34 s amb 121 ms. A partir de la captació 67 (encasellada amb vermell) s'ajusta la intensitat de la imatge perquè aquesta està saturada.*





*Figura 5-25: Muntatge fotogràfic seqüencial d'un estudi pel flux de  $0.1 \mu\text{L/s}$ . Es mostra l'ordenació temporal d'una setena part de les imatges que componen aquesta gravació. Per tant, en aquesta seqüència el temps entre interval correspon al de la gravació que és de 6 s amb 125 ms i el temps total de gravació de 7 min 49 s.*

Finalment, a la Figura 5-24 i a la Figura 5-25 es mostren dos estudis realitzats amb el mateix flux de  $0.1 \mu\text{L/s}$ .

Es pot observar perfectament com aquest és un flux prou lent perquè els bacteris quedin acumulats a la zona del canal més propera a l'imant.

Les imatges mostrades són una combinació de les imatges generades per tres canals: els dos canals que capten l'emissió dels fluorocroms a dos rangs de longitud d'ona diferent (500-550 nm el verd i 600-800 nm el vermell), i el canal de llum transmesa (vegeu Figura 5-26).

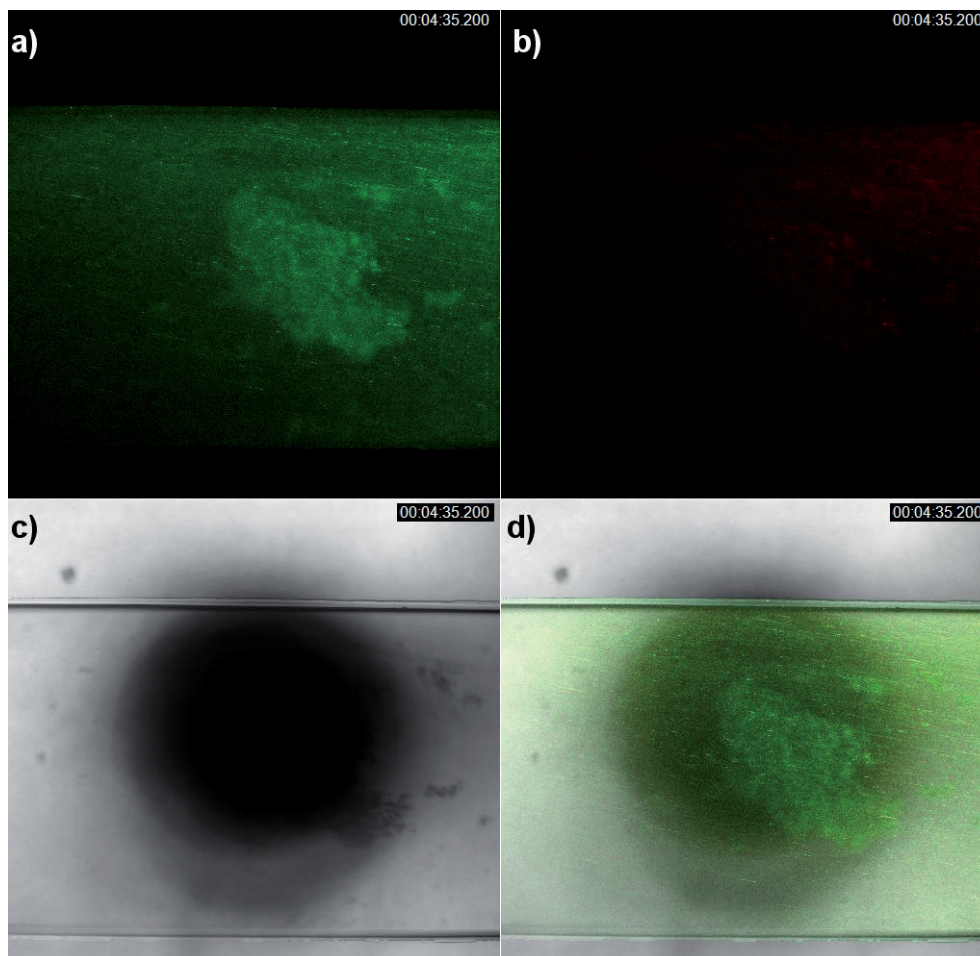


Figura 5-26: a) Imatge del canal 1 (verd). b) Imatge del canal 2 (vermell). c) Imatge del canal 0 (llum transmesa). d) Imatge composició de les tres anteriors que és la imatge final que s'estudia.

A part d'optimitzar el flux, aquest estudi també ens serveix per constatar que també els bacteris danyats s'uneixen a les partícules magnètiques amb anticossos. Això és conseqüència que els anticossos que s'utilitzen són policlonals i, per tant, poden interaccionar amb epítops presents a les membranes desestructurades.

Per tant, amb aquest estudi es conclou que el flux òptim per dur a terme els posteriors estudis amb el nostre sistema microfluídic és de **0.1  $\mu\text{L/s}$** , ja que per fluxos superiors la retenció de bacteris és molt ineficient. Per altra banda, es demostra que amb aquest sistema d'immunoseparació **no es seleccionen** exclusivament les cèl·lules **viables** si no que les partícules magnètiques **també** s'uneixen a les **mortes**.

### **3. Mesures impedimètriques dels bacteris**

Un cop optimitzat el flux i caracteritzats els elèctrodes es procedeix a les mesures de bacteris utilitzant el dispositiu complet.

La preparació prèvia dels bacteris és la mateixa que es realitza per l'estudi de confocal per l'optimització del flux. En aquest cas però, les cèl·lules no es tenyeixen perquè la lectura és elèctrica i no òptica i, per tant, la detecció és directa.

#### **3.1. Reactius i solucions**

*E. coli* DSMZ 17076 mortes i vives, partícules magnètiques de 100 nm de diàmetre marcades amb estreptavidina *fluidMAG-Streptavidin* (Chemicell GmbH, Berlín, Alemanya), anticòs anti-*E. coli* O157:H7 marcat amb biotina (KPL Inc., Gaithersburg, EUA), pastilles de PBS (VWR International, Llinars del Vallès, Espanya), separador magnètic *MagnetoPure* (Chemicell GmbH, Berlin, Alemanya), glicina, glutaraldehyd i 4',6-Diamidino-2-phenilindol diclorhidrat (DAPI) (Sigma-Aldrich Química S.L., Madrid, Espanya), filtres de carboni de 0.22 µm de diàmetre de porus (EMD Millipore, Billerica, EUA).

Tampó fosfat salí (PBS) pH 7.4 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) i tampó glicina 250 mM pH 6.5 ( $\sigma=5 \mu\text{S}/\text{cm}$  i  $\sigma=30 \mu\text{S}/\text{cm}$  ajustat amb KCl).

#### **3.2. Materials i mètodes**

Els bacteris morts s'obtenen d'autoclavar 100 mL de bacteris vius a 121 °C durant 1 hora.

A la secció 2.2.2 d'aquest capítol es detalla el procediment de condicionament de les partícules magnètiques amb anticossos específics i la immobilització d'aquestes a la superfície dels bacteris. Es fan tres de rentats amb tampó glicina dels vials amb bacteris i partícules magnètiques unides i dels vials amb partícules magnètiques sense bacteris que es troben en PBS. Posteriorment, es ceba tot el sistema amb tampó glicina. Després es fan passar les partícules magnètiques condicionades a 0.1 µL/s. Un cop passat el volum desitjat de partícules, es segueix passant a la mateixa velocitat tampó glicina i es prenen mesures

d'aquest control negatiu. A continuació es retira l'imant i es passa 1 mL de tampó glicina a un flux de 100  $\mu\text{L/s}$  per netejar el xip.

Finalment, es fan passar els bacteris amb partícules magnètiques de la mateixa manera que el control negatiu, es mesuren i es neteja el xip. Aquest procés es repeteix per totes les mesures i per les dues conductivitats de tampó glicina (5  $\mu\text{S/cm}$  i 30  $\mu\text{S/cm}$ ).

Com que hi ha sistemes comercials que tenen optimitzat el procés de captació i preconcentració de bacteris, en lloc de mesurar diferents dilucions bacterianes, en el nostre cas es passen diferents volums de mostra concentrada ( $10^8$  ufc/mL aproximadament) amb partícules magnètiques.

Les mesures es realitzen utilitzant l'equip d'anàlisi d'impedàncies Solartron SI 1260 a una amplitud del voltatge de 10 mV i a 0 V del potencial de CD. El rang de freqüències de mesura és el comprès entre 1 kHz i 10 MHz.

Un cop acabades les mesures es fixen les cèl·lules de la mostra restant que no s'ha mesurat amb 3% de glutaraldehid per poder fer el comptatge cel·lular exacte.

Posteriorment, es tenyeixen uns 200  $\mu\text{L}$  d'aquesta mostra fixada amb DAPI i es filtren 10 i 100  $\mu\text{L}$  amb dos filtres de carboni. A continuació s'observen al microscopi òptic de fluorescència del Departament de Microbiologia (Microscopi Zeiss AXIO Imager A1) i es fan 25 captacions de diferents camps del filtre que conté els 10  $\mu\text{L}$  de mostra, i unes altres 25 captacions pel de 100  $\mu\text{L}$ .

L'altra part de volum de mostra restant també es filtra en filtres de carboni amb l'objectiu d'observar-les al SEM. Per tal de poder veure les cèl·lules fixades sense que perdin la seva estructura a causa de les condicions de buit que s'han de fer dins l'equip, cal fer el procés de punt crític. En aquest procés la mostra es deshidrata en dilucions progressivament més concentrades d'etanol fins arribar al 100%.

La mostra deshidratada amb etanol es col·loca a un assecador de punt crític (Baltec CPD030 del Servei de Microscòpia de la UAB). Dins aquest assecador la mostra es posa en contacte

amb CO<sub>2</sub> líquid fins que aquest desplaça l'etanol. En aquest moment la mostra s'escalfa fins a 31°C perquè el CO<sub>2</sub> es sublimi i la mostra quedi seca.

Finalment, aquesta mostra seca es munta sobre els suports de SEM i es metal·litza amb or per convertir-la en conductora i permetre una visualització millor al microscopi. L'equip emprat per metal·litzar és l'*Sputter Coater E5000* (Emitech S.A., Versailles, França). Un cop metal·litzades les mostres s'observen al SEM AURIGA, estació de treball *Modular CrossBeam* (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanya).

### 3.3. Resultats i discussió

#### 3.3.1. Recompte cel·lular

Per conèixer exactament la quantitat de bacteris que el nostre sistema és capaç de detectar fem un recompte cel·lular de les imatges obtingudes del filtratge.

El DAPI és un colorant que tenyeix el material genètic de les cèl·lules. Per tant, es tenyeix l'interior dels bacteris (vegeu la Figura 5-27).

El comptatge cel·lular de cada imatge es realitza mitjançant l'ús del programari de tractament d'imatges ImageJ (Schneider, Rasband, and Eliceiri 2012) utilitzant l'opció de cerca de píxels de màxima intensitat amb una tolerància de 15.



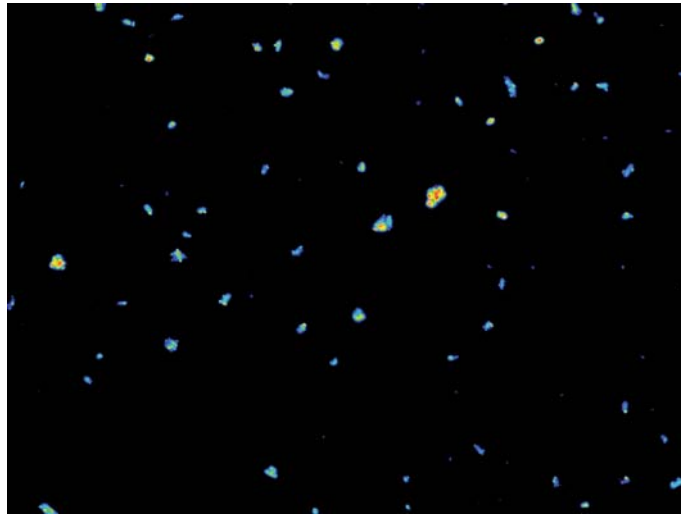


Figura 5-27: Imatge d'un camp del filtre de carboni amb bacteris dipositats. Resultat del filtratge de 100  $\mu\text{L}$  de mostra.

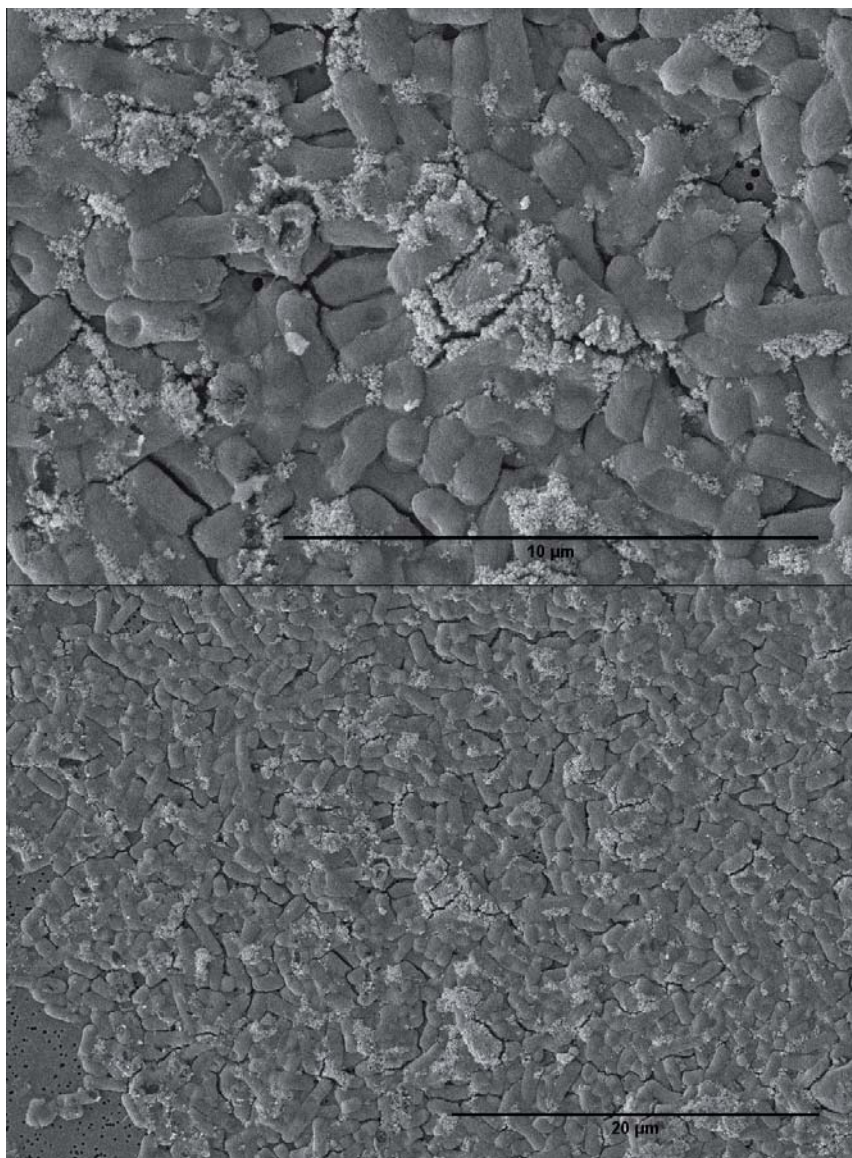
Realitzat el recompte de cada imatge es fa una mitjana i la concentració bacteriana de la mostra de partida s'obté de la equació 1.4. On a l'últim divisor s'ha de posar 0.1 en el cas de les imatges del filtre on s'havien filtrat 100  $\mu\text{L}$  o 0.01 per les que s'havia filtrat 10  $\mu\text{L}$ .

$$1.4. \quad C_{bact} = \frac{\text{Mitjana cèl·lules}}{\text{camp}} \times \frac{1 \text{ camp}}{6005.5 \mu\text{m}^2} \times \frac{1.5938 \cdot 10^8 \mu\text{m}^2}{\text{filtre}} \times \frac{1 \text{ filtre}}{0.1/0.01\text{mL filtrats}}$$

Finalment es conclou que la concentració aproximada de la mostra és de **2.41·10<sup>8</sup> ufc/mL**.

### 3.3.2. Observacions al SEM dels bacteris amb partícules magnètiques

Per veure de quina manera les partícules magnètiques quedaven unides a les cèl·lules es va filtrar una part de la mostra que ja havia estat fixada amb glutaraldehyd amb filtres de carboni. Després de metal·litzar-la es va observar al SEM (vegeu la Figura 5-28).



*Figura 5-28: Imatges SEM dels bacteris amb partícules magnètiques unides, filtrats amb un filtre de carboni i metal·litzats.*

En aquestes imatges es pot observar que les **partícules magnètiques s'uneixen** a diferents punts de la superfície dels bacteris **aleatòriament**. Això és conseqüència que les partícules es van condicionar amb anticossos policlonals que poden reconèixer diferents epítops de la membrana bacteriana externa.

Per altra banda, el que més crida l'atenció és l'amorfia de les partícules magnètiques. A les especificacions del producte es diu que la seva mida és de 100 a 200 nm però, en canvi, es pot veure com realment es tracta de grumolls de partícules més petites (de l'ordre de pocs nanòmetres) (vegeu Figura 5-29).

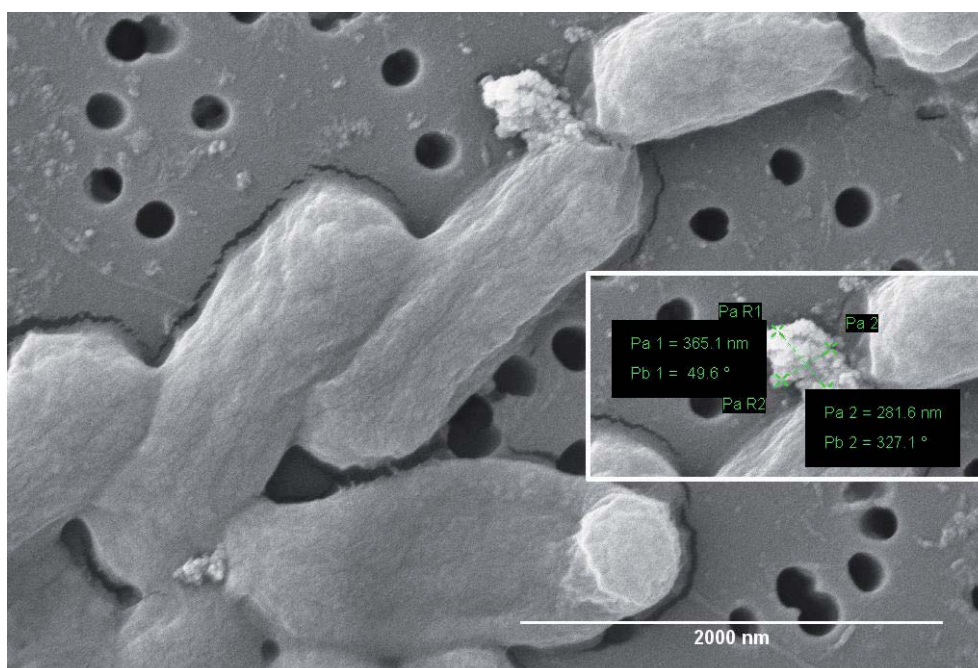


Figura 5-29: Imatge SEM d'un detall de bacteris amb partícules magnètiques. A la dreta de la imatge hi ha un detall d'una partícula magnètica amb les mides marcades: 365.1 x 281.6 nm.

Per comprovar que l'amorfia de les partícules magnètiques no era causada per tot el procés sofert de punt crític i metal·lització es van observar unes altres mostres que només contenien partícules magnètiques. Aquesta vegada només es va filtrar la mostra sense fer cap més tractament.

En aquest cas, l'aspecte de les partícules magnètiques seguia sent el mateix que en el cas de les mostres metal·litzades, per tant, es conclou que aquesta és l'aparença natural d'aquest tipus de partícules magnètiques.

### 3.3.3. Mesures directes de bacteris vius, morts i de control negatiu

Es fan passar pel sistema 40  $\mu$ L de bacteris vius, bacteris morts a l'autoclaui i partícules magnètiques sense bacteris (control negatiu). De la mateixa manera que s'analitzen les dades pels IDEs de 1.5 x 1.5  $\mu$ m, en aquest cas també s'obtenen els patrons impedimètrics per cada tipus de mostra (vegeu Figura 5-30).

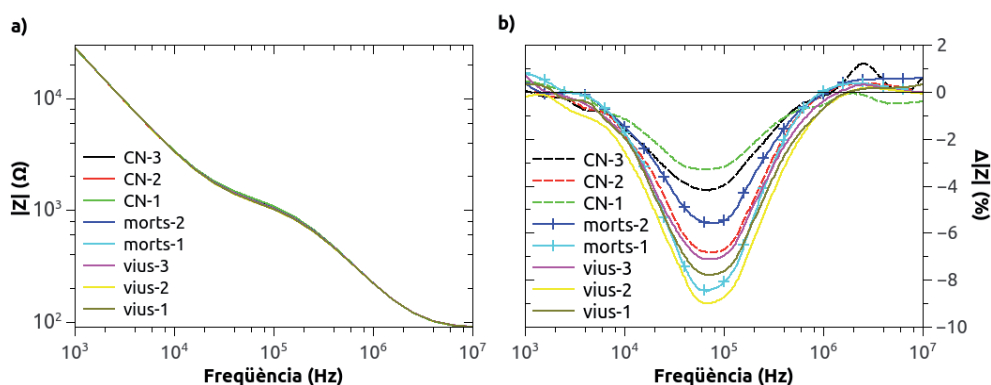


Figura 5-30: Diagrama de Bode de  $|Z|$  (a) i espectre de  $\Delta|Z|$  percentual (b) per les mesures de partícules magnètiques soles (CN), bacteris autoclavats (morts), i bacteris vius (vius).

A la vista dels resultats, **no s'aprecia** una **diferència** clara de comportament impedimètric entre bacteris morts i vius. El control negatiu també té un comportament molt similar.

Tots els canvis que s'observen es donen a les freqüències on predomina la  $R_s$ . Per tant, semblaria que les **partícules magnètiques** estiguessin contribuint a **disminuir la resistència del medi** que hi ha entre els dígits del IDE.

Estudiant amb deteniment les especificacions que dona el fabricant de les partícules magnètiques utilitzades (Chemicell), s'observa que la seva ànima<sup>4</sup> està formada de magnetita ( $Fe_3O_4$ ). Aquest material, a diferència de l'altre òxid de ferro conegut com a hematites ( $Fe_2O_3$ ), té una conductivitat apreciable a temperatura ambient (Bagheli et al. 2015; Supattarasakda et al. 2013).

Per tant, una hipòtesi per explicar els resultats obtinguts seria que aquesta conductivitat intrínseca de les partícules magnètiques podria donar un senyal que emmascarés la resposta impedimètrica dels bacteris.

Tot i així, cal remarcar que la neteja dels elèctrodes es dóna correctament ja que, com es mostra a la Figura 5-31, després de netejar els diferents tipus de mostra que s'han immobilitzat magnèticament, l'espectre d'impedància torna als seus valors originals.

<sup>4</sup> Core en anglès.

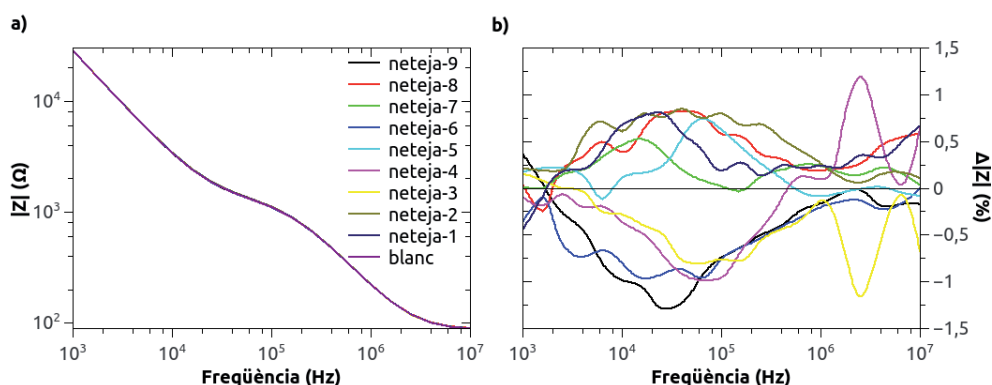


Figura 5-31: Diagrama de Bode de  $|Z|$  (a) i espectre de  $\Delta|Z|$  percentual (b) per les mesures preses després de realitzar la neteja per cada cas de les mesures de la Figura 5-30.

Així que, tot i que l'ús de partícules de magnetita per la captació de bacteris **no dona un bon resultat** per la seva **detecció impedimètrica directa**, sí es demostra que la **captació immunomagnètica** posada a punt en aquest treball és una **tècnica neta i reversible** que permet realitzar múltiples deteccions consecutives amb el mateix IDE. Una possibilitat a explorar per millorar els resultats seria l'ús de partícules magnètiques de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> en comptes de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

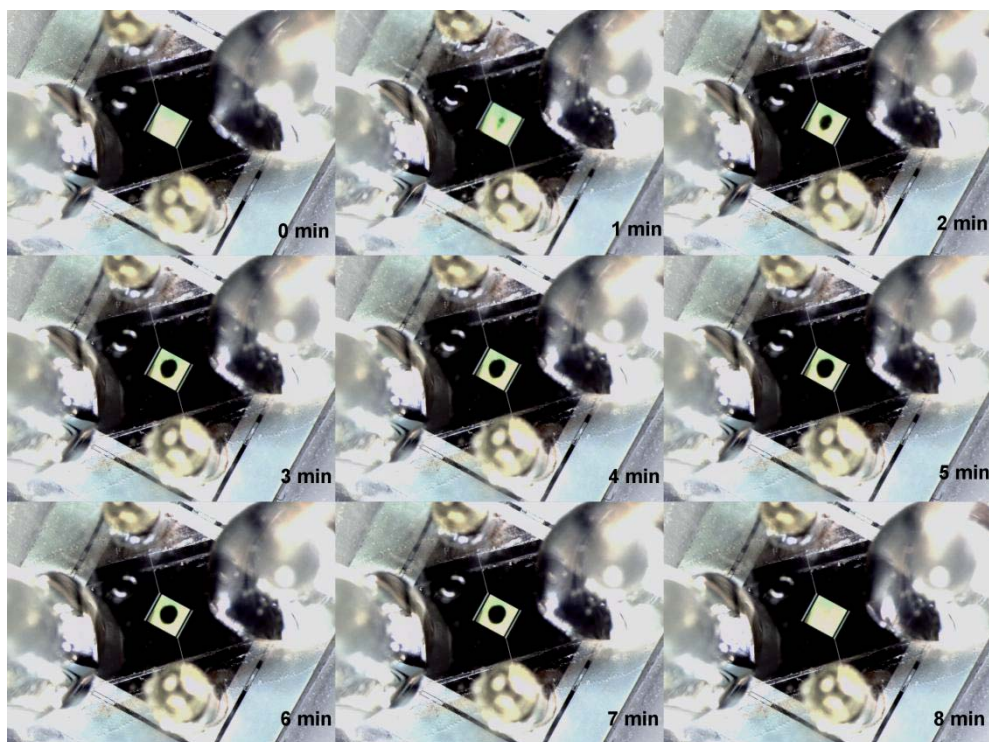
### 3.3.3.1. Observació temporal amb microscopi estereoscòpic del dispositiu durant les mesures

Durant les mesures s'observa a ull nu com es perfila certa foscor damunt l'IDE a mida que la mostra es va immobilitzant magnèticament a causa de l'imant que es troba a sota.

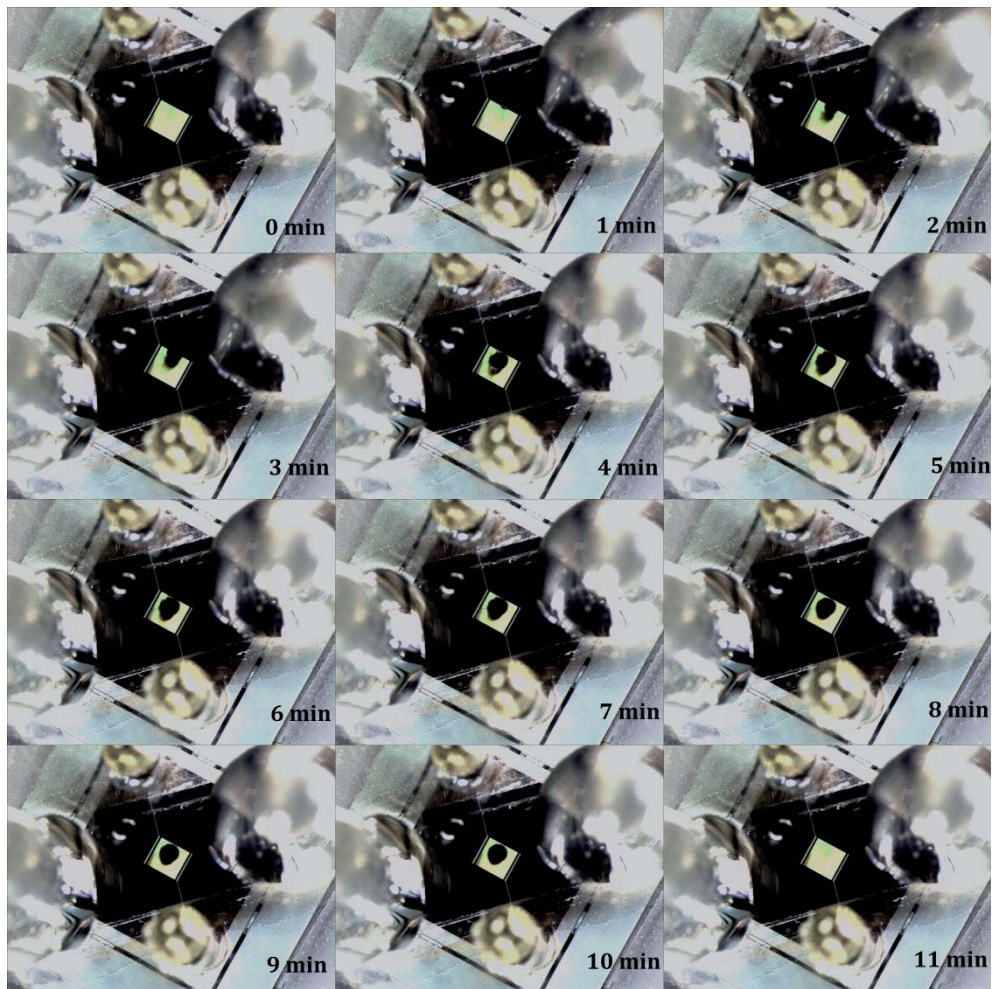
Aparentment la foscor o punt que s'observa damunt la regió dels elèctrodes sembla més densa i definida quan la mostra que es fa passar és de bacteris morts o control negatiu. En canvi, quan es passen els bacteris vius no s'aprecia un punt tan definit si no que és més difuminat.

Amb l'ajuda del microscopi estereoscòpic (Leica, Nanterre, França) es realitzen diferents captacions pel pas de 40  $\mu$ L de les mateixes mostres que s'han usat per les mesures d'impedància (vegeu Figura 5-32, Figura 5-33 i Figura 5-34).





*Figura 5-32: Seqüència d'imatges preses per la immobilització de 40  $\mu$ L de la mostra de control negatiu (partícules magnètiques sense bacteris). Entre els 7 i 8 minuts es realitza la neteja i la última captació torna a mostrar l'IDE net.*



*Figura 5-33: Seqüència d'imatges preses per la immobilització de 40 µL de la mostra de bacteris morts. Entre els 10 i 11 minuts es realitza la neteja i la última captació torna a mostrar l'IDE net.*

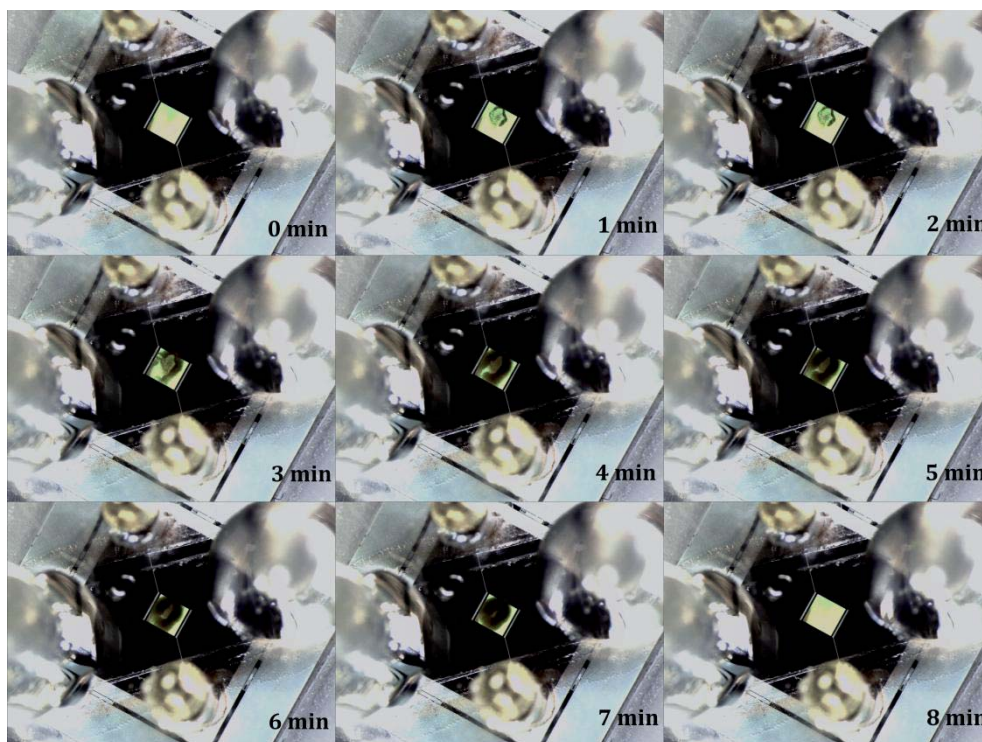


Figura 5-34: Seqüència d'imatges preses per la immobilització de 40  $\mu\text{L}$  de la mostra de bacteris vius. Entre els 7 i 8 minuts es realitza la neteja i la última captació torna a mostrar l'IDE net.

Tant a la Figura 5-32 com a la Figura 5-33, es mostra com la immobilització de les **partícules magnètiques soles i de les unides a cèl·lules mortes**, formen un **punt ben definit** dins l'àrea de l'IDE.

En canvi, a la Figura 5-34, on es mostra la **immobilització de les cèl·lules vives** amb partícules magnètiques unides, la immobilització es dona en una **àrea més extensa** i la imatge obtinguda té un **aspecte borrós**, com si no totes les cèl·lules estiguessin en el mateix pla focal. Aquestes imatges indueixen a pensar que els bacteris es disposen en un volum que ocupa bona part del gruix del canal fluídic i no en íntim contacte sobre la superfície dels elèctrodes.

Tenint en compte que els elèctrodes interdigitats mesuren la impedància del volum immediatament proper a la superfície, tots els bacteris que es trobin a una distància major a aquest límit en que detecta no podran mesurar-se amb aquest sistema.



Pel cas dels IDEs de  $0.5 \times 0.5 \mu\text{m}$ , la distància des de la superfície en que passen el 80% dels corrents és de  $0.5 \mu\text{m}$ . Per tant, tot bacteri que es situï a una distància superior, estarà fora del radi de detecció del dispositiu.

### 3.3.3.2. Anàlisi de la disposició dels bacteris mitjançant estudis amb microscopi confocal de fluorescència

Aquest anàlisi es realitza a partir d'una imatge de l'estudi d'optimització de fluxos realitzat amb el Microscopi Làser Confocal Multifotó Espectral Leica TCS SP5 (Leica, Nanterre, França). Les condicions de captura de la imatge estan detallades a l'apartat 2.2.3 d'aquest capítol.

La Figura 5-35 mostra una projecció de la captació en diferents plans d'una secció d'un canal de  $\mu\text{-Slide VI}^{0.1}$  per on hi circula una mostra de bacteris units a partícules magnètiques. Aquests bacteris han estat prèviament tenyits tal com s'explica a l'estudi anterior de microscòpia confocal.

Aquesta figura demostra que els bacteris amb partícules magnètiques, a mida que es van immobilitzant sobre l'àrea que ocupa l'imant a causa de l'atracció magnètica que exerceix aquest, van formant estructures tridimensionals.

Per tant, els bacteris no es disposen just a la superfície del canal si no que es dipositen un damunt de l'altre formant així un cúmulo de cèl·lules repartides per les regions de màxima atracció magnètica de l'imant (vegeu Figura 5-35 i Figura 5-36).

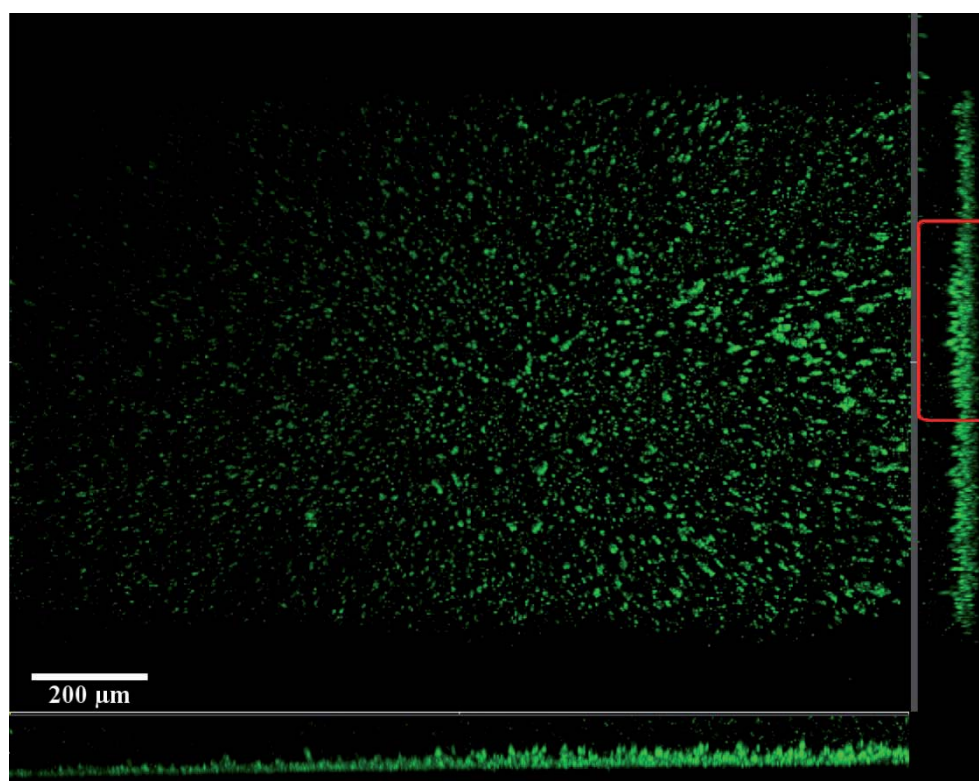


Figura 5-35: Imatge en projecció realitzada amb microscopi confocal de fluorescència d'un canal d'un  $\mu$ -Slide VI<sup>0.1</sup>. Pel canal està fluint una solució de bacteris amb partícules magnètiques unides. Sota al canal hi ha un imant d'1 mm de diàmetre que atreu els bacteris amb partícules magnètiques que queden immobilitzats a la superfície del canal. El quadrant més gran correspon a la vista des de dalt del canal, a la dreta s'observa una secció del canal en l'eix Y i a l'esquerra, una secció en l'eix X. A la secció de la dreta està assenyalat un requadre (vermell) que és el que s'analitza a la Figura 5-36.

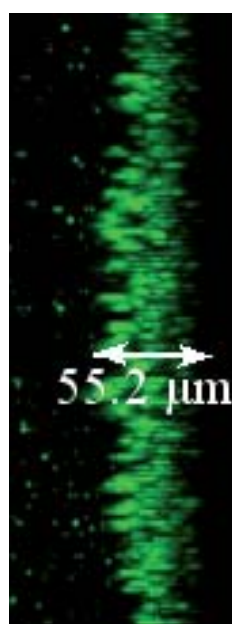


Figura 5-36: Detall de la secció en l'eix Y del canal (vegeu Figura 5-35). Els bacteris amb partícules magnètiques formen una capa d'un gruix aproximat de 55  $\mu$ m.

Ambdues figures mostren aquesta disposició en volum dels bacteris. A la Figura 5-36 es mesura el gruix aproximat d'aquesta capa bacteriana que és d'uns 55  $\mu\text{m}$ . A més, cal remarcar que es disposen formant columnes o cadenes verticals ja que aquest és un comportament típic del ferrofluid (Ivanov et al. 2006). Per tant, la densitat de bacteris en cada pla no és molt elevada si no que queda repartida en alçada.

Com es comentava anteriorment, els IDEs de  $0.5 \times 0.5 \mu\text{m}$  tenen una penetració de camp de  $0.5 \mu\text{m}$ . Per tant, amb aquests elèctrodes només es poden detectar els bacteris que es trobin en el primer pla tocant la superfície. Aquests **bacteris detectables només suposaran un 1% del total de bacteris** immobilitzats en volum sobre la superfície.

Això pot contribuir també a que les mesures directes de bacteris no ens permetin distingir entre bacteris vius o morts, i que el senyal obtingut per bacteris vius sigui igual de petit que el dels controls.

Per un treball futur s'hauria de plantejar una nova metodologia d'immobilització reversible de bacteris en què aquests es disposessin en íntim contacte amb la superfície dels IDEs.

### *3.3.4. Mesures indirectes de bacteris vius i morts: Monitorització del metabolisme bacterià*

Un efecte que s'observa en tots els casos quan s'introdueixen bacteris vius amb partícules magnètiques, és que la  $R_s$  comença a disminuir en el moment en què s'atura el flux, cosa que s'associa a un augment de la conductivitat del medi proper a la superfície del IDE.

Per aquest motiu es decideix realitzar mesures on es registri aquest canvi d'impedància causat per **l'augment de conductivitat** del medi proper a l'IDE, conseqüència del **metabolisme bacterià**.

En les mesures dels bacteris vius es fa passar un volum de  $10 \mu\text{L}$  de mostra (a  $2.41 \cdot 10^8$  ufc/mL, segons càlculs del recompte) i  $50 \mu\text{L}$  de la mostra amb bacteris morts.

Per altra banda, també s'estudia l'efecte que té la conductivitat del tampó glicina utilitzat per prendre les mesures.

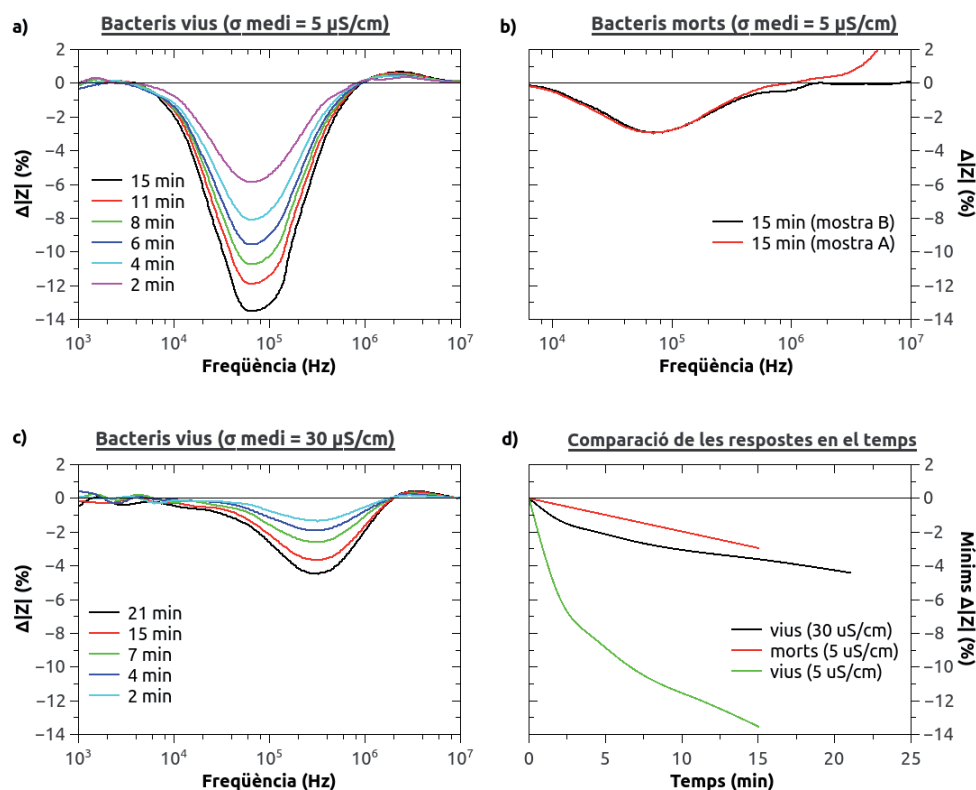


Figura 5-37: Les primeres tres gràfiques són representacions de l'espectre de l' $\Delta|Z|$  percentual per les mesures preses al llarg del temps de bacteris vius mesurats en un medi de  $\sigma = 5 \mu\text{S/cm}$  (a), bacteris morts mesurats en un medi de  $\sigma = 5 \mu\text{S/cm}$  (b) i bacteris vius mesurats en un medi de  $\sigma = 30 \mu\text{S/cm}$  (c). La darrera gràfica (d) correspon a la representació dels pics mínims de l' $\Delta|Z|$  percentual per cada tipus de mostra en funció del temps.

A la Figura 5-37; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** es mostren els decrements d'impedància que es donen al llarg d'un temps curt (15 minuts) quan s'immobilitzen magnèticament bacteris vius i morts.

Tot i que s'ha introduït un volum 5 vegades superior de mostra de bacteris morts respecte dels vius, el màxim decrement de  $|Z|$  no supera el 3% als 15 minuts.

En canvi, els bacteris vius captats damunt l'IDE varien la conductivitat del medi proper gairebé un 14 % només en 15 minuts.

Tenint en compte que la mostra que es mesura té una concentració de  $2.41 \cdot 10^8$  ufc/mL, i que s'hi han introduït 10  $\mu\text{L}$ , es pot dir que, com a màxim, el límit de detecció és de  $2.41 \cdot 10^6$  bacteris/IDE. Partint d'aquest valor, es pot calcular el volum necessari de mostra que s'hauria de fer passar pel sistema per detectar diferents concentracions bacterianes (vegeu **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

Concentració bacteriana (ufc/mL)	Volum necessari (mL)
$10^4$	$2.41 \cdot 10^2$
$10^5$	$2.41 \cdot 10$
$10^6$	2.41
$10^7$	0.24
$10^8$	0.02

*Taula 5-3: Relació de volums de mostra necessaris que s'haurien de fer passar pel nostre sistema per poder detectar la concentració bacteriana concreta en cada cas.*

Per tant, amb aquest sistema de mesures indirectes es poden arribar a detectar fins concentracions bacterianes bastant baixes si es fa passar suficient volum de mostra. Cal destacar que es tracta d'un mètode lliure de marcadors, i per tant, més simple que els existents actualment per detectar bacteris.

A més, l'ús d'anticossos fa que sigui una detecció específica, no com els sensors comercials existents actualment que també es basen en la detecció de microorganismes a partir dels canvis que provoca el seu metabolisme.

No obstant, les mesures de conductivitat no justifiquen el disseny d'aquesta geometria d'IDES més reduïda ja que es podrien realitzar igualment amb interdigitats de mides molt superiors.

## 4. Conclusions

Amb aquest nou dispositiu s'agilitza el procediment d'immobilització i rentat dels bacteris gràcies al sistema microfluídic.

Així mateix, s'aconsegueix que els elèctrodes siguin de múltiples usos consecutius.

No obstant, no es poden diferenciar els bacteris vius dels morts mitjançant mesures impedimètriques directes amb el protocol de separació immunomagnètica utilitzat. Això és conseqüència principalment que es disposen en capes de gruix superior a  $50 \mu\text{m}$  formant cadenes verticals i els IDEs només detecten els bacteris presents en el volum contingut entre la superfície i  $0.5 \mu\text{m}$  de distància. Per altra banda, també existeix una interferència en el

senyal a causa de la pròpia conductivitat de les partícules magnètiques que fa que el control negatiu (només partícules) produeixi una resposta similar a la obtinguda en presència dels bacteris i que, per tant, ni tan sols es pugui detectar la petita fracció de bacteris que queda en contacte amb la superfície dels IDEs.

Tot i així, aquest dispositiu és capaç de distingir entre bacteris vius i morts mitjançant les mesures impedimètriques indirectes. És a dir, monitoritzant l'increment de conductivitat del medi causat pel metabolisme cel·lular.

## 5. Referències

Bagheli, S., H. Khandan Fadafan, R. Lotfi Orimi, and M. Ghaemi. 2015. "Synthesis and Experimental Investigation of the Electrical Conductivity of Water Based Magnetite Nanofluids." *Powder Technology* 274:426–30. Retrieved (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032591015000777>).

Baldrich, Eva and Francesc Xavier Muñoz. 2008. "Enzyme Shadowing: Using Antibody-Enzyme Dually-Labeled Magnetic Particles for Fast Bacterial Detection." *The Analyst* 133(8):1009–12. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18645641>).

Chemicell. 2016. "fluidMAG - Affinity." Retrieved February 19, 2016 (<http://www.chemicell.com/products/nanoparticles/fluidmag-affinity/index.html>).

Dominguez-Benetton, Xochitl, Surajbhan Sevda, Karolien Vanbroekhoven, and Deepak Pant. 2012. "The Accurate Use of Impedance Analysis for the Study of Microbial Electrochemical Systems." *Chemical Society reviews* 41(21):7228–46. Retrieved January 14, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22885371>).

Holland, K. T., J. S. Knapp, and J. G. Shoesmith. 1987. *Anaerobic Bacteria*. Boston, MA: Springer US. Retrieved (<http://link.springer.com/10.1007/978-1-4613-1775-3>).

Ivanov, Alexey O., Sofia S. Kantorovich, Valentin S. Mendelev, and Elena S. Pyanzina. 2006. "Ferrofluid Aggregation in Chains under the Influence of a Magnetic Field." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 300(1).

- Jeong, Ju Yong, Hee Deung Park, Kyong Hee Lee, Hang Yeon Weon, and Jong Ok Ka. 2011. "Microbial Community Analysis and Identification of Alternative Host-Specific Fecal Indicators in Fecal and River Water Samples Using Pyrosequencing." *Journal of Microbiology* 49(4):585–94.
- de la Rica, Roberto, César Fernández-Sánchez, and Antonio Baldi. 2006. "Polysilicon Interdigitated Electrodes as Impedimetric Sensors." *Electrochemistry Communications* 8:1239–44.
- Liu, J. W., J. J. Wu, L. R. Wang, L. J. Teng, and T. C. Huang. 1998. "Two Fatal Cases of *Veillonella* Bacteremia." *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 17(1):62–64. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1007/BF01584370>).
- Ministerio de Economía y Competitividad. 2016. "Infraestructuras Científico Técnicas Singulares (ICTS)." Retrieved February 10, 2016 (<http://www.idi.mineco.gob.es/portal/site/MICINN/menuitem.29451c2ac1391f1febebed1001432ea0/?vgnnextoid=d27fce5451f44410VgnVCM1000001d04140aRCRD>).
- Schneider, Caroline A., Wayne S. Rasband, and Kevin W. Eliceiri. 2012. "NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis." *Nature Methods* 9(7):671–75.
- Supattarasakda, Kitibodee, Karat Petcharoen, Tharaporn Permpool, Anuvat Sirivat, and Wanchai Lerdwijitjarud. 2013. "Control of Hematite Nanoparticle Size and Shape by the Chemical Precipitation Method." *Powder Technology* 249:353–59. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2013.08.042>).

# CAPÍTOL 6

## CONCLUSIONS I TREBALL

### FUTUR

En aquest darrer capítol es resumeixen les conclusions extretes al llarg de tot el treball.

També es plantegen les dues noves vies de recerca per on s'hauria de seguir per assolir els objectius plantejats en un inici i per optimitzar l'aplicabilitat del dispositiu desenvolupat en aquest treball de tesi.



## 1. Conclusions

Les principals conclusions a les quals s'ha pogut arribar al final de aquest treball són les següents:

1. Mitjançant els estudis de simulacions per anàlisi d'elements finits es resol que la posició del bacteri respecte els dígit dels IDEs afecta a la resposta de  $Z$  i que el posicionament perpendicular del bacteri respecte els dígit és el que permet obtenir un senyal superior perquè amb aquesta posició, a les freqüències en que el bacteri actua com a conductor, es dona un curtcircuit dels elèctrodes. També es veu com la  $\sigma_{\text{medi}}$  afecta totalment la resposta en  $Z$  del bacteri i que per obtenir el màxim senyal, el més òptim és realitzar les mesures en el medi de més baixa conductivitat possible.
2. Per les mesures d'*E. coli* realitzades amb IDEs de  $1.5 \times 1.5$ , s'observa un patró d'impedància característic i diferent a les mesures d'altres esdeveniments mesurats. El patró impedimètric característic d'*E. coli* consisteix en un primer augment de  $\Delta|Z|$  a freqüències baixes i un decrement a les freqüències més altes. Aquests resultats indiquen que el bacteri té un doble comportament elèctric: aïllant a freqüències baixes i conductor a freqüències més altes. Aquests resultats experimentals concorden amb les simulacions realitzades al capítol anterior.
3. Per les mesures de *S. cerevisiae* realitzades en IDEs de  $6 \times 6 \mu\text{m}$ , s'observa que segueix el mateix patró que pel cas d'un augment de conductivitat del medi. També es pot observar una relació directa entre la fracció de l'àrea de l'IDE coberta per llevat i el senyal obtingut. Però no es pot concloure si s'aprecien diferències entre llevats vius i morts a causa de les poques dades obtingudes amb llevats morts.
4. S'ha dissenyat un nou dispositiu amb el què s'agilitza el procediment d'immobilització d'anticossos selectius a la superfície de els elèctrodes i el rentat dels bacteris gràcies al sistema microfluídic i la captació immunomagnètica. D'aquesta manera, s'aconsegueix que els elèctrodes siguin de múltiples usos.

5. Mitjançant l'ús d'aquest nou dispositiu no es poden diferenciar els bacteris vius dels morts realitzant mesures impedimètriques directes. Això és conseqüència que els bacteris amb partícules magnètiques es disposen en capes de gruix superior a 50  $\mu\text{m}$  formant cadenes verticals i els IDEs només detecten els bacteris presents al volum contingut entre la superfície i 0.5  $\mu\text{m}$  de distància.
6. Tot i així, aquest dispositiu és capaç de distingir entre bacteris vius i morts mitjançant la monitorització de l'increment de conductivitat del medi causat pel metabolisme cel·lular. Amb aquest mètode es podrien arribar a detectar concentracions de  $10^4$  ufc/mL fent passar pel sistema uns 241 mL.

## 2. Treball futur

De cara a seguir amb aquesta línia de recerca es podrien optar per dues vies de resolució diferents.

**A)** Es podria optar per **aconseguir la detecció directa** tal com s'havia plantejat a l'inici d'aquest treball

Per assolir aquest objectiu, primerament s'hauria de resoldre el problema causat pel ferrofluid. Com s'ha vist al capítol anterior, els bacteris units a aquest tipus de partícules magnètiques es disposen en volum formant cadenes que s'allunyen de la superfície dels elèctrodes. Per aconseguir una detecció directa mitjançant l'ús dels IDEs de 0.5 x 0.5  $\mu\text{m}$  s'hauria de canviar de partícules magnètiques i provar unes que no fossin de tipus ferrofluid i que, per tant, s'unissin en íntim contacte amb la superfície del xip.

El nostre grup disposa d'unes partícules magnètiques d'una altra casa comercial que també estan marcades amb estreptavidina, fet que facilitaria el seu condicionament amb anticossos marcats amb biotina sense haver de canviar pràcticament el protocol realitzat fins ara.

Aquestes partícules magnètiques, segons el fabricant, tenen un diàmetre de 200 nm (les que s'han utilitzat en aquest treball eren de 100 nm), i estan pitjor caracteritzades perquè el fabricant no va saber respondre amb exactitud de quin material paramagnètic estaven fetes. Tot i així, van respondre que *creien* que en la seva totalitat eren de hematites ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ). Si realment estiguessin formades d'aquest material, aquest fet ja significaria una avantatja respecte de les usades ja que aquest és un tipus d'òxid de ferro no conductor.

No obstant, s'hauria de tornar a caracteritzar tot el condicionament i les condicions de flux, i comprovar que per aquest cas, el comportament no és el de ferrofluid i no forma cadenetes seguint les línies de camp magnètic.

**B)** Es podria optar per **optimitzar** les **mesures de monitorització** del metabolisme bacterià.

Aquesta opció seria la més senzilla i, tot i que no s'ajusta al plantejament inicial d'aquest treball, ja d'un inici es poden preveure els bons resultats.

Per aconseguir aquesta optimització es podria redissenyar tant l'encapsulat com el xip. Per començar, seria més òptim col·locar l'imant sobre del canal i no sota el xip. D'aquesta manera, els bacteris i les partícules magnètiques no es trobarien en contacte amb els IDEs i aquests es mantindrien en tot moment nets i s'evitaria qualsevol possible dany. A més, les mides de les partícules magnètiques no haurien de ser necessàriament tan reduïdes i, per tant, es podrien utilitzar partícules magnètiques comercials que s'usen com a mètode estàndard per fer preconcentracions de mostres microbianes i ja es troben condicionades directament amb els anticossos específics. Fins i tot, es podria acoblar el nostre dispositiu a sistemes de preconcentració que utilitzen partícules magnètiques però que actualment, després d'aquesta procediment, els microbiòlegs realitzen cultius en plaques i, per tant, tot i que els serveix per augmentar l'eficiència, per obtenir resultats han d'esperar hores.

Finalment, es podria canviar la geometria dels elèctrodes interdigitats i augmentar la seva mida, una bona opció seria realitzar-los de  $6 \times 6 \mu\text{m}$ . Amb una geometria

major, la zona plana del  $|Z|$  del diagrama de Bode s'amplia, és a dir, que la  $R_s$  predomina en un rang de freqüències més ampli. Com que l'únic paràmetre important en aquest tipus de mesures és la conductivitat de la solució, o el que és equivalent, la  $R_s$ , el més òptim és allargar el rang de freqüències de detecció d'aquest paràmetre. A més, el fet de tenir un sistema microfluídic incorporat, ens permet controlar el medi que s'utilitza per fer la mesura i, en conseqüència, tenir ben controlada la conductivitat inicial d'aquest medi. D'aquesta manera, es pot conèixer per quina freqüència es donen els canvis majors en  $Z$  i limitar les mesures a una sola freqüència. Així es podria utilitzar un sistema de mesura senzill en lloc d'un analitzador d'impedàncies complex.