

## RESUM

---

L'Espectroscòpia Electroquímica d'Impedàncies (EEI) i la Ressonància de Plasmó Superficial (RPS) han demostrat ser mètodes útils en el seguiment a temps real de l'adhesió bacteriana en superfícies metàl·liques, en mostrar gran concordança amb els mètodes tradicionals. Pel que fa a l'EEI, l'Element de Fase Constant de la interfase elèctrode-solució ( $EFC_i$ ), relacionat amb el recobriment de l'elèctrode per part de les bactèries, s'ha mostrat sensible al procés d'adhesió bacteriana fins a la formació de biofilms, especialment en l'etapa inicial, coneguda com adhesió inicial o *preadhesió*. La magnitud de l' $EFC_i$  ( $K_i$ ) s'ha mostrat influenciat pel temps d'adhesió i per la concentració bacteriana de la mostra. No obstant, un altre element del circuit equivalent, la capacitat del biofilm ( $C_{biofilm}$ ), ha demostrat ser fins i tot més sensible a la formació de biofilms que l' $EFC_i$ . La  $C_{biofilm}$  no només s'ha utilitzat pel control de la formació de biofilms, sinó que també s'ha emprat en la detecció de bacteriòfags, virus que infecten bactèries, mitjançant la degradació de biofilms específics formats en la superfície de l'elèctrode. En aquest cas, l'EEI també ha mostrat concordança amb els mètodes clàssics de microbiologia.

L'EEL també s'ha emprat en la quantificació bacteriana. Fixant el temps d'adhesió a un valor petit (per sota els 2 min), el valor de  $K_i$  s'ha pogut correlacionar amb la concentració de bactèries en suspensió entre  $10^1$  i  $10^7$  Unitats Formadores de Colònies per mL (UFC mL<sup>-1</sup>). La sensibilitat de la  $K_i$  ha augmentat aplicant potencials més positius a la superfície de l'elèctrode de treball, els quals afavorien l'adhesió bacteriana. Pel que fa a l'envelliment dels sensors, s'ha vist que, amb el temps, perdien la capacitat de discriminar entre concentracions, especialment a baixes concentracions. Aquesta estratègia, que ha demostrat ser insensible a la presència de metabolits, s'ha emprat en el seguiment de la concentració de mostres bacterianes *reals* extretes d'un reactor, mostrant concordança amb els mètodes clàssics (recompte en plaques d'agar o recompte utilitzant Microscòpia d'Epifluorescència). Per tal de facilitar el seguiment de la concentració bacteriana a temps real, s'ha desenvolupat nova Instrumentació Virtual (IV) que permetia dirigir el sistema de flux automàtic, concretament el transport de les mostres biològiques del reactor a la cel·la electroquímica i la posterior eliminació de residus, i sincronitzar-lo amb el sistema de mesura d'EEL.

La combinació d'aquesta estratègia impedimètrica amb Xarxes Neuronals Artificials (XNAs) s'ha emprat per resoldre de forma quantitativa mesclades binàries de microorganismes. En comparar els valors predits per la XNA amb els esperats (obtinguts mitjançant recompte amb plaques d'agar) s'han obtingut bones correlacions, amb rectes ajustades indistingibles de les ideals, és a dir, amb pendent 1 i amb l'ordenada a l'origen que passa per zero.

Finalment, la combinació de la informació d'adhesió obtinguda mitjançant RPS, la de formació de biofilms en la interfase aire-aigua, la de mobilitat bacteriana i la de virulència emprant *Galleria mellonella*, obtinguda de varis mutants de *Pseudomonas luminescens* TT01, s'ha utilitzat en la predicció de la funció de diverses proteïnes estructurals. Encara que el paper d'aquestes proteïnes només s'ha pogut determinar a un nivell molt bàsic, la combinació de tècniques emprada, i particularment la RPS, ha demostrat ser capaç de subministrar informació rellevant de forma ràpida i senzilla.

## SUMMARY

---

Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) and Surface Plasmon Resonance (SPR) have been demonstrated to be sensitive methods for the real-time monitoring of bacteria attachment to metallic surfaces and their measurements have shown good correlation with the traditional methods. In terms of EIS, the interface Constant Phase Element ( $CPE_i$ ), which related to the coverage of bacteria on the electrode surface, has been shown to be sensitive to the bacteria attachment until biofilm formation, especially at the initial stage of development called very early attachment or pre-attachment step. The  $CPE_i$  magnitude ( $K_i$ ) has shown dependence on both the attachment time and the concentration of bacteria. However, another element of the equivalent circuit, namely the biofilm capacitance ( $C_{biofilm}$ ), has probed to be even more perceptive to the biofilm growth and maturation than the  $CPE_i$ . The  $C_{biofilm}$  has not been only used to control the formation of biofilms, but it has been also applied to the detection of bacteriophages, virus that infect bacteria, by following the degradation of mature biofilms of specific bacteria grown on the electrode surface. In this case, the EIS have shown good correlation with classical microbiological methods.

EIS has been also applied to the bacteria quantification. When fixing the attachment time to a small value (below 2 min of attachment), the  $K_i$  has shown correlation with the suspended bacteria in a wide range of concentrations, from  $10^1$  to  $10^7$  Colony Forming Units per mL (CFU mL<sup>-1</sup>). The sensitivity of the  $K_i$  has been enhanced by applying more positive potentials on the working electrode which favoured bacterial attachment. In terms of aging, sensors have been shown to lose the capacity to discriminate between concentrations with time, especially at low concentrations. This impedimetric approach, which has been found insensitive to the presence of metabolites, has been applied to monitoring the concentration of *real* bacteria samples directly extracted from an incubator with good correlation with classical methods, namely plating on agar and Epifluorescence Microscopy counting. In order to facilitate the real-time monitoring of suspended bacteria, new Virtual Instrumentation (VI) has been developed for the management of the flow automatic system, particularly for the control of the transport of microbiological samples from the incubator to the electrochemical cell and the elimination of residues to a wasting recipient, and for the synchronization of both the flow and the EIS measurement systems.

The combination of this impedimetric approach and Artificial Neural Networks (ANNs) has been employed by resolving binary microbial mixtures quantitatively. Very good correlations have been obtained by comparing the predicted values (from the ANN) against the expected ones (from plating on agar), with comparison lines indistinguishable from the theoretical values (slope equal to one with zero intercept in the three cases under study).

Finally, attachment information from SPR data, together with biofilm formation (in the air-liquid interface) information, motility results (from the swimming process) and virulence assays (using *Galleria mellonella* larvae) of several *Pseudomonas luminescens* TT01 mutants has been combined for the prediction of the function of some structural proteins. Although characterization of the role of these proteins has been only achieved at a very basic level, the combination of used techniques, and particularly SPR, is capable of supplying relevant information rapidly and easily.