

Evaluation of Impedance Spectroscopy as a Transduction Method for Bacterial Biosensors

M. L. López Rodríguez, *Member*, IEEE, R. E. Madrid and C. E. Giacomelli

Abstract— Biosensors are simple, feasible and cost-effective devices where biological specificity and selectivity, and electronic miniaturization are combined. Degrading microorganisms, such as the M7 species of *Streptomyces* genus, can specifically be used as biorecognition element, for lindane detection and quantification. Furthermore, electrochemical impedance spectroscopy is a non-destructive technique that allows evaluating bacterial activity by measuring conductivity changes in a culture medium. In this work, instrumental conditions were optimized to apply this method as transduction principle in bacterial biosensors. By means of electrochemical impedance spectroscopy, concentrations of chloride ions close to the environmental lindane values were measured. This is a suitable, simple and economical technique for use as a transduction method in biorecognition devices for organochlorine pesticides detection, particularly lindane.

Keywords— Biosensor, Electrochemical Impedance Spectroscopy, Lindane, *Streptomyces* sp. M7.

I. INTRODUCCIÓN

ACTUALMENTE un objetivo prioritario en los países en desarrollo es la preservación del ambiente y la salud humana de la exposición de agentes contaminantes orgánicos persistentes. En este sentido, los plaguicidas constituyen un grupo muy importante de análisis teniendo en cuenta su alta toxicidad y su inevitable uso en prácticas agrícolas [1, 2]. En Argentina se han reportado importantes acuíferos contaminados con plaguicidas organoclorados (POs) en distintos puntos del país [3-5] a pesar de haber sido restringidos o prohibidos. Por lo tanto, es sumamente importante desarrollar herramientas adecuadas y económicas para el monitoreo y detección en forma rápida, sensible y económica de POs, particularmente de lindano (γ -Hexaclorociclohexano).

Los biosensores son sensores electro-bioquímicos que permiten identificar, transformar y cuantificar eventos biológicos y desde la obtención del primer biosensor por Clark y Lyons en los años sesenta han experimentado un enorme y continuo crecimiento [6]. Están compuestos fundamentalmente por dos elementos conectados en serie: una

capa de biorreconocimiento que es capaz de reconocer selectivamente un determinado analito; y un transductor, que transforma la señal resultante de la interacción en una señal eléctrica medible. Particularmente para la detección y cuantificación del lindano es posible utilizar microorganismos que lo degradan [7-9], tales como la especie M7 del género *Streptomyces* (*SM7*) [10, 11] que podría emplearse como elemento de biorreconocimiento para detectar y cuantificar este plaguicida.

La espectroscopía de impedancia electroquímica como principio de transducción ha sido ampliamente utilizada en el campo de la microbiología [12]. Esta técnica no destructiva permite detectar, cuantificar e identificar bacterias [13] midiendo los cambios de conductividad en el medio de cultivo. Teniendo en cuenta que los componentes del medio de cultivo afectan significativamente la actividad, el crecimiento y la producción de metabolitos de las bacterias [14], en trabajos previos [15, 16] se optimizó la composición del medio líquido para determinar la actividad de la *SM7* por impedancia. Se demostró también que la bacteria conserva su actividad en condiciones adversas de cultivo, similares a las de funcionamiento futuro del dispositivo de biorreconocimiento [17-19].

El objetivo de este trabajo es evaluar la espectroscopía de impedancia electroquímica como método de transducción para cuantificar lindano en medio de cultivo líquido para ser utilizado en un biosensor microbiano. En este trabajo se presentan resultados preliminares de la optimización del método de impedancia respecto a las celdas a emplear, la distancia inter-electrodo a utilizar y las mínimas concentraciones de iones cloruro medibles.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Reactivos

El lindano (Accustandard Inc., New Haven, USA), los solventes y otros químicos usados fueron de grado químico. Todas las soluciones fueron preparadas con agua ultrapura ($\rho = 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) obtenida con un equipo Millipore-MilliQ.

B. Microorganismos y medios de cultivo

Se utilizó una cepa bacteriana *Streptomyces* sp. M7 previamente aislada y caracterizada [20]. Esta cepa se cultivó primeramente en placas con medio almidón-caseína-agar conteniendo (en gramos por litro): almidón 10,0; caseína 1,0; K_2HPO_4 0,5; agar 15,0 [21] durante 7 días a 30°C. Luego a las esporas adheridas se les agregó un medio de cultivo mínimo salino (MM) [16] modificado con (en gramos por litro): $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 2,0; K_2HPO_4 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01. Ambos medios de cultivo fueron ajustados a pH 7,0

Este trabajo ha sido financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina (CONICET), Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT) y la Secretaría de Ciencia y Técnica (SECyT) de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

M. L. L. Rodríguez, INFIQC-CONICET, Universidad Nacional de Córdoba and Universidad Nacional de Tucumán, Argentina, m.l.lopez@ieee.org

E. M. Madrid, Universidad Nacional de Tucumán and Instituto Superior de Investigaciones Biológicas, INSIBIO-CONICET, Argentina, rmadrid@herrera.unt.edu.ar

C. E. Giacomelli, INFIQC-CONICET, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, giacomel@fcq.unc.edu.ar

previamente a su esterilización. El MM se suplementó con lindano $1,50 \text{ mg L}^{-1}$. Esta solución se esterilizó pasándola a través de un filtro de $0,22 \mu\text{m}$ de tamaño de poro y luego se adicionó asepticamente al medio autoclavado (MM+Lin) [22]. Se realizaron también controles no inoculados de referencia. Todas las medidas se llevaron a cabo en un baño termostatzado a 28°C , sin agitación rotatoria.

Para la evaluación de las celdas se emplearon soluciones de agua bidestilada ($\sigma = 0,3 \mu\text{S}$) y MM+Lin y se hicieron agregados de una solución concentrada de iones cloruro (concentración 10 mg L^{-1}).

C. Celdas

Se evaluaron distintos tipos de celdas (Fig. 1) como se describe a continuación: a) celda de vidrio (vol. 10 mL) con separación de electrodos de 2 mm; b) celda cilíndrica de acrílico con electrodos de diámetro de 5 mm y separación inter-electrodo de 30 mm; c) celda de vidrio con electrodos circulares (separación inter-electrodo: 10 mm); y d) celda plástica (diám. 90 mm, vol. 20 mL) con separación inter-electrodo de 2 mm. En todos los casos se utilizaron electrodos de acero inoxidable.

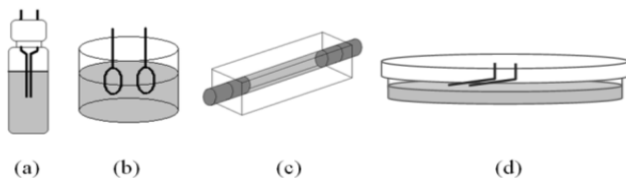


Figura 1. Celdas empleadas: a) celda de vidrio; b) celda de vidrio con electrodos circulares; c) celda de acrílico; d) celda plástica.

D. Equipos

Las medidas de impedancia electroquímica se realizaron con un equipo comercial Solartron 12508W compuesto de un Analizador electroquímico Solartron 1287 y un Analizador de respuesta en frecuencia Solartron 1250, controlado por software provisto por el fabricante (ZPlot®, Scribner Associates Incorporated). El análisis de los datos y el ajuste de las curvas se realizaron con OriginPro 8 SR0 (OriginLab Corporation). El análisis estadístico se realizó con InfoStat versión 2011e.

Las determinaciones de lindano se realizaron por cromatografía de gases con captura de electrones con un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard Modelo HP 6890 equipado con detector de captura de electrones y una columna HP1. Las condiciones cromatográficas usadas fueron: velocidad de flujo del gas portador (helio) $1,5 \text{ mL min}^{-1}$; temperatura del inyector 200°C ; temperatura del detector 300°C ; y volumen de inyección $1 \mu\text{L}$.

Para las medidas espectrofotométricas de iones cloruro se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV-1601 equipado con una interfaz a PC y software analítico.

E. Experimental

La evaluación de las celdas se realizó a través de espectroscopía de impedancia electroquímica. Para cada celda se realizaron barridos en frecuencia manteniendo la tensión constante en 20 mV. El barrido fue entre 10 Hz y 65 KHz, y se

registraron los espectros de impedancia. Se promediaron 5 ciclos para cada medición, y se midieron 6 puntos/década.

La actividad bacteriana se evaluó para cultivos de *SM7* adheridos a un medio sólido AAC en las celdas plásticas con el agregado de MM+Lin. Se tomaron muestras al principio y al final del experimento y se realizaron determinaciones de lindano residual e iones cloruro de los sobrenadantes. Las medidas de lindano residual se realizaron por cromatografía gaseosa con captura de electrones. Las determinaciones de iones cloruro se realizaron utilizando una modificación [23] del método de tiocianato de mercurio (II) propuesto por Bergmann y Sanik [24]. El análisis cuantitativo de las muestras se obtuvo usando curvas de calibración de estándares apropiadas. Todas las mediciones se realizaron a 25°C .

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Frente a otras técnicas de laboratorio, la espectroscopía de impedancia electroquímica presenta la ventaja de usar señales pequeñas (generalmente en el modo tensión) minimizando así las alteraciones de las propiedades del medio; es decir, la estimulación aplicada no altera las condiciones de equilibrio del sistema. En general, los cambios producidos en la conductancia del medio se deben a los productos metabólicos generados por la proliferación de los microorganismos [12].

En este trabajo se evaluaron distintas geometrías de celdas y electrodos a través de espectroscopía de impedancia electroquímica bipolar. La técnica bipolar consiste en realizar medidas de impedancia entre los electrodos y luego separar sus componentes (conductancia, capacidad, módulo de impedancia, fase angular y otros) para estudiar los cambios producidos en el medio y en la interfase [25]. En la Fig. 2 se observa el circuito equivalente utilizado para obtener los parámetros del sistema [26].

Para las celdas estudiadas se encontró que la celda de vidrio con electrodos de acero inoxidable con 5 mm de separación presentó la mejor respuesta a los cambios de impedancia. En la Fig. 3 se observa el diagrama de Argand obtenido para esta celda. La resistencia de transferencia de carga (R_{tc}) se obtuvo a través del ajuste de los parámetros del circuito equivalente de la Fig. 2. A medida que la concentración de ión cloruro aumenta se observa una disminución de la R_{tc} (Fig. 4). La concentración mínima de iones cloruro medida con esta configuración de celda y electrodos en agua ultrapura fue de $18 \mu\text{g L}^{-1}$. Este valor de concentración obtenido equivale a la degradación completa de $26 \mu\text{g L}^{-1}$ de lindano.

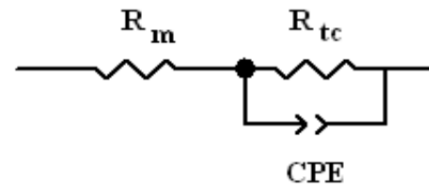


Figura 2. Circuito eléctrico equivalente.

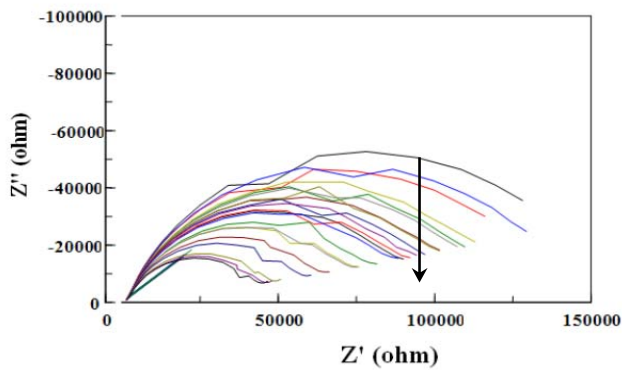


Figura 3. Diagrama de Argand para celda de vidrio con electrodos de acero inoxidable. Cada semicírculo corresponde al agregado de iones cloruro. La flecha indica el aumento de la concentración de iones cloruro.

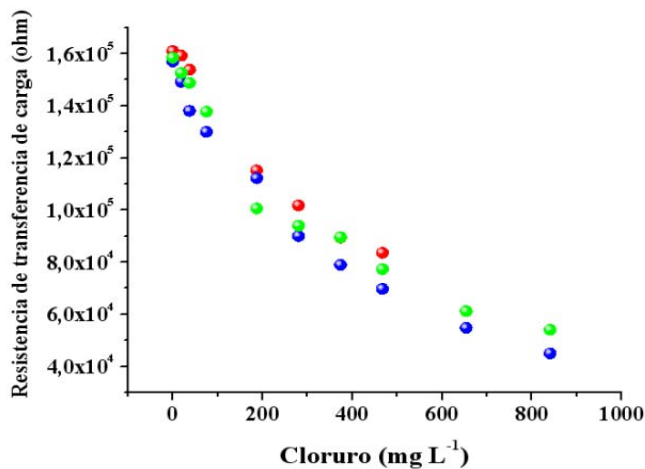


Figura 4. Variación de la resistencia de transferencia de carga en función de la concentración de iones cloruro para celdas de vidrio con electrodos de acero inoxidable.

Por otro lado, la mínima concentración detectada de iones cloruro para las celdas de acrílico utilizando MM fue de $186 \mu\text{g L}^{-1}$ que correspondería a la degradación total de $266 \mu\text{g L}^{-1}$ del plaguicida. Este valor es cercano a los valores ambientales ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) encontrados en aguas de río contaminadas [4]. En la Fig. 5 se observa el cambio en la resistencia de transferencia de carga en función de la concentración de iones cloruro para esta celda.

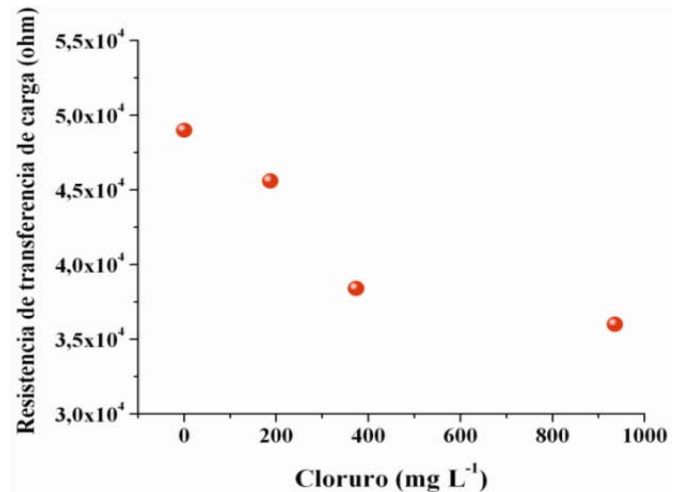


Figura 5. Variación de la resistencia de transferencia de carga en función de la concentración de iones cloruro para celdas acrílicas con electrodos de acero inoxidable.

La evaluación de las celdas de plástico con electrodos de acero inoxidable presentó una buena respuesta como se observa en el gráfico de admitancia (Fig. 6); sin embargo, no se logró obtener una buena curva de calibración a partir de los parámetros ajustados con el circuito equivalente utilizado. No obstante, para la evaluación de la actividad bacteriana se optó por trabajar con estas celdas ya que permiten el crecimiento de la *SM7* adherida a un medio sólido y por lo tanto, la integración del transductor físico y el receptor biológico en forma fácil y económica. Los cambios que se producen en la interfase electrodo-solución son muy sensibles a las variaciones de la actividad metabólica bacteriana [13] y permiten monitorear la *SM7* en forma simple y económica.

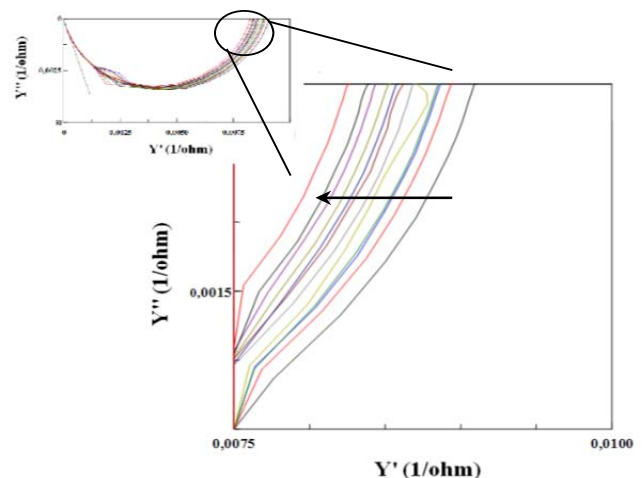


Figura 6. Gráfico de admitancia para celdas plásticas con electrodos de acero inoxidable. La flecha indica el aumento de la concentración de iones cloruro.

La degradación del lindano es más lenta comparada con el consumo de glucosa como única fuente de carbono. Resultados previos [16-18] muestran que la *SM7* consume 10 g L^{-1} de glucosa comparada con $1,50 \text{ mg L}^{-1}$ de lindano removido del medio de cultivo en el mismo periodo de tiempo.

Esto se debe a que necesita primero activar el mecanismo de degradación del plaguicida ante la falta de glucosa en el medio, para luego metabolizarlo. Sin embargo, la determinación de la concentración de iones cloruro liberados nos permitiría detectar y/o cuantificar en forma indirecta el lindano presente en el medio de cultivo en bajas concentraciones (mg L^{-1}), fácilmente y de forma económica.

La actividad metabólica de la *SM7* se determinó en cultivos de esporas adheridos a AAC sin agitación, es decir, condiciones adversas de crecimiento para la bacteria pero similares a las de funcionamiento futuro del prototipo. Se observó una disminución del 20% de la concentración de lindano residual al cabo de 96 h (Fig. 7). Esto corrobora que la restricción física de la *SM7* aunque disminuye su actividad no la elimina.

En condiciones óptimas de cultivo, la bacteria *SM7* libera 6 iones cloruro al medio líquido por cada molécula de lindano degradada, por lo tanto se realizaron también medidas de la concentración residual de iones cloruro en los sobrenadantes. Se observó un incremento de la concentración residual de iones cloruro en el medio salino (Fig. 7) al cabo de 96 h que se corresponde con la disminución del plaguicida en el medio y con determinaciones de iones cloruro por espectroscopía de impedancia electroquímica.

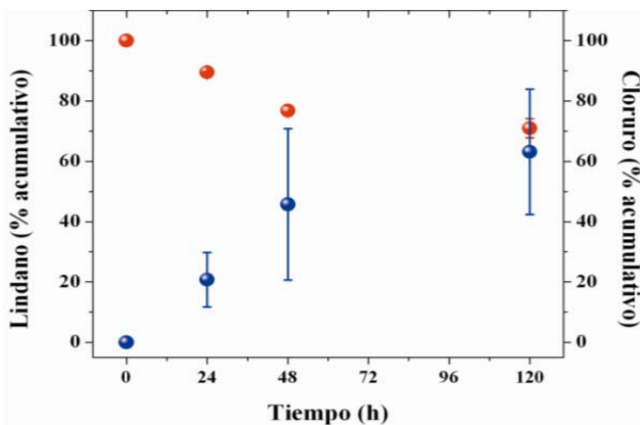


Figura 7. Concentración de (●) lindano e (●) iones cloruro residual expresado como % acumulativo en el tiempo.

IV. CONCLUSIONES

En este trabajo se optimizaron las condiciones de trabajo para utilizar la técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica como principio de transducción en biosensores bacterianos. A través del empleo de esta técnica se detectaron concentraciones de iones cloruro cercanas a los valores ambientales correspondientes a lindano. La técnica resulta adecuada, sencilla y económica para ser utilizada como principio de transducción en dispositivos de biorreconocimiento para la detección de plaguicidas organoclorados, en particular para lindano.

REFERENCIAS

[1] K. Walker, D. A. Vallero and R. G. Lewis. "Factors influencing the distribution of lindane and other hexachlorocyclohexanes in the environment". *Env. Sc. Tech.*, vol. 33 (1999), pp. 4373-4378.

[2] A. J. Hedley, L.L. Hui, K. Kypke, R. Malisch, F. X. R. van Leeuwen, G. Moyd, T.W. Wong and E. A. S. Nelson. "Residues of persistent organic pollutants (POPs) in human milk in Hong Kong". *Chemosphere*, vol. 79 (2010), pp. 259-265.

[3] C. S. Benimeli, R. G. Castro, A. P. Chaile and M. J. Amoroso. "Lindane removal induction by *Streptomyces* sp. M7". *J. Basic. Microbiol.* vol. 46 (2006), pp. 348-357.

[4] A. P. Chaile, N. Romero, M. J. Amoroso, M. Del V. Hidalgo and M. C. Apella. "Organochlorine pesticides in Sali River. Tucumán". *Rev. Bol. Ecol.* Vol., vol. 6 (1999), pp. 203-209 (in Spanish).

[5] S. F. Pesce and D. A. Wunderlin. "Use of water quality indices to verify the impact of Cordoba City (Argentina) on Suquia River". *Water Research*, vol. 34 (2000), pp. 2915-2926.

[6] L. Clark Jr. and C. Lyons. "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery". *Ann. NY Acad. Sci.* vol. 102 (1962), pp. 29-45.

[7] B. K. Singh and R. C. Kuhad. "Biodegradation of lindane (γ -hexachlorocyclohexane) by the white-rot fungus *Trametes hirsutus*". *Letters in App. Microbiol.*, vol. 28 (1999), pp. 238-241.

[8] B. K. Singh and R. C. Kuhad. "Degradation of the insecticide lindane (γ -HCH) by the white-rot fungi *Cyathus bulleri* and *Phanerochaete sordida*". *Pest Manag. Sc.*, vol. 56 (2000), pp. 142-146.

[9] A. De Schrijver and R. De Mot. "Degradation of pesticides by actinomycetes". *Critical Reviews in Microbiol.* vol. 25 (1999), pp. 85-119.

[10] C. S. Benimeli, R. G. Castro, A. P. Chaile and M. J. Amoroso. "Lindane removal induction by *Streptomyces* sp. M7". *J. Basic. Microbiol.* vol. 46 (2006), pp. 348-357.

[11] C. S. Benimeli, M. S. Fuentes, C. M. Abate and M. J. Amoroso. "Bioremediation of lindane-contaminated soil by *Streptomyces* sp. M7 and its effects on *Zea mays* growth". *Intern. Biodet. and Biodegrad.* vol. 59 (2007), pp. 148-155.

[12] N. Ramirez, A. Regueiro, O. Arias and R. Contreras. "Electrochemical impedance spectroscopy: an effective tool for a fast microbiological diagnosis". *Biotechn. Aplicada*, vol. 26 (2009), pp. 72-78.

[13] C. J. Felice, R. E. Madrid, J. M. Olivera, V. I. Rotger and M. E. Valentinuzzi. "Impedance microbiology: quantification of bacterial content in milk by means of capacitance growth curves". *J. Microbiol. Meth.* vol. 35 (1999), pp. 37-42.

[14] H. Gao, M. Liu, J. Liu, H. Dai, X. Zhou, X. Liu, Y. Zhuo, W. Zhang and L. Zhang. "Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology". *Bioresour. Technol.* vol. 100 (2009), pp. 4012-4016.

[15] M. L. López Rodríguez, R. E. Madrid and C. E. Giacomelli. "Evaluación de la actividad de *Streptomyces* M7 por espectroscopía de impedancia". XVII Congreso Argentino de Físicoquímica y Química Inorgánica, Córdoba, Argentina, 2011.

[16] M. L. López Rodríguez, G. L. Luque, C. J. Felice, N. F. Ferreyra, R. E. Madrid, G. A. Rivas and C. E. Giacomelli CE. "Asparagine quantification in cellular culture media using copper modified carbon nanotubes composite electrodes". *Sens. Actuators B.* vol. 158 (2011) pp. 423-426.

[17] M. L. López Rodríguez, C. E. Giacomelli; C. J. Felice and R. E. Madrid. "Evaluación de actividad de *Streptomyces* sp. M7 adheridas a un soporte sólido" in 6to Congreso Iberoamericano sobre Sensores, IBERSENSOR 2008, Sao Paulo, Brasil, 2008.

[18] M. L. López Rodríguez, C. E. Giacomelli; R. E. Madrid and C. J. Felice. "Optimización de la capacidad de bio-reconocimiento superficial de *Streptomyces* sp. M7" in XVI Congreso Argentino de Físicoquímica y Química Inorgánica, Salta, Argentina, 2009.

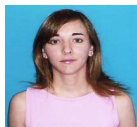
[19] M. L. López Rodríguez, R. E. Madrid and C. E. Giacomelli. "Evaluación de *Streptomyces* M7 como elemento de bio-reconocimiento para la detección y/o cuantificación de lindano por espectroscopía de impedancia". XVIII Congreso Argentino de Bioingeniería y VII Jornadas de Ingeniería Clínica, SABI 2011, Mar del Plata, Argentina, 2011.

[20] C. S. Benimeli, M. J. Amoroso, A. P. Chaile and R. G. Castro. "Isolation of four aquatic streptomycetes strains capable of growth on organochlorine pesticides". *Biores. Tech.* vol. 89 (2003), pp. 133-138.

[21] D. A. Hopwood. "Genetic analysis and genome structure in *Streptomyces coelicolor*". *Bacter. Reviews*, vol. 31 (1985), pp. 373-403.

[22] M. J. Amoroso, R. G. Castro, A. Duran, G. Oliver and R. T. Hill. "Chromium cation uptake by aquatic actinomycetes". *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* vol. 26 (2001), pp. 210-215.

- [23] S. F. Pesce and D. A. Wunderlin. "Biodegradation of lindane by a native bacterial consortium isolated from contaminated river sediment". Intern. Biodet. and Biodeg. vol. 54 (2004), pp. 255-260.
- [24] J. G. Bergmann and J. Sanik. "Determination of trace amounts of chlorine in naphtha". Analytical Chem. vol. 29 (1957), pp. 241-243.
- [25] R. E. Madrid, J. C. Felice, M. E. Valentinuzzi. "Automatic on-line analyzer of microbial growth using simultaneous measurements of impedance and turbidity". Med. Biol. Eng. Comp., vol. 37 (1999), pp.789-793.
- [26] R. E. Madrid, C. J. Felice, Assignee: UNT-CONICET, "Equipment for analyzing microbial contamination by impedance and turbidity", Argentine Patent AR014143B3 (Dic, 2006).



Maria Lorena López Rodríguez received her bachelor degree in bioengineering in 2005 from the National University of San Juan (Argentina) and her Ph.D in Chemical Sciences from the National University of Córdoba (Argentina) in 2012. She is an Associate Professor of Laboratory Instrumentation at the National University of Córdoba. Her research interests include the design and application of environmental (bio)sensors.



Rossana Madrid is EE and Ph.D. in Bioengineering. She is Assistance Professor at the University of Tucumán (Argentina). She has published 15 R&D papers in national and international journals, two chapters in book and has developed four patents. As a postdoctoral fellow, she spent a short time at the Institut für Technishe Chemie at the University of Hannover (Germany), in the area of (bio)sensors. She is a teacher of the Bioengineering Master and Doctoral degree. Her main research fields include sensors and biosensors for biomedical and environmental applications. She is now launching in the area of microsystems and microsensors.



Carla E. Giacomelli received her B.Sc. and Ph.D. degrees from the National University of Córdoba (Argentina) in 1991 and 1997, respectively. Then she stayed several years (1997-2001) as a postdoctoral fellow at Wageningen University (The Netherlands) under the supervision of Prof. Willem Norde. She is currently an Associate Professor of Chemistry at the National University of Córdoba and a researcher from the National Research Council (CONICET, Argentina). Her research interest is based on a biophysicochemical approach of surface processes and interfacial properties, including substrate biofunctionalization, drug delivery vehicles, biomaterials and biopolymers.