



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Aproximaciones bioanalíticas basadas en fagos para la
detección de bacterias fitopatógenas

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Pérez Garreta, Javier

Tutor/a: Morais Ezquerro, Sergi Beñat

Cotutor/a: Sena Torralba, Amadeo

Cotutor/a externo: DOMINGO CALAP, PILAR

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

Aproximaciones bioanalíticas basadas en fagos para la detección de bacterias fitopatógenas.

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Trabajo de Fin de Grado en Biotecnología

Curso Académico 2022/2023

ALUMNO: Javier Pérez Garreta

TUTOR ACADÉMICO: Sergi Morais Ezquerro

TUTOR ACADÉMICO: Amadeo Sena Torralba

COTUTORA EXTERNA: Pilar Domingo Calap

València, 12 de junio de 2023

Título

Aproximaciones bioanalíticas basadas en fagos para la detección de bacterias fitopatógenas.

Resumen

Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan y se replican selectivamente en bacterias. Dada la capacidad natural para reconocer e infectar bacterias, los fagos han demostrado su utilidad en medicina, biotecnología y en agricultura como por ejemplo para controlar enfermedades bacterianas en plantas, lo que podría reducir el uso de plaguicidas. Sin embargo, el potencial de los fagos como elementos de biorreconocimiento de bacterias en biosensado aún necesita ser explorado, siendo escasas las aproximaciones descritas al respecto. Por este motivo, este trabajo plantea la puesta a punto de aproximaciones bioanalíticas basadas en fagos y metodologías analíticas de flujo lateral que permitan la detección y cuantificación de bacterias fitopatógenas. Con las aproximaciones desarrolladas se plantea abordar estudios que mejoren los protocolos de diagnóstico y detección de *Xanthomonas arboricola* en materia vegetal como prueba de concepto.

Este trabajo se alinea con un alto grado de relación con los siguientes ODS de la Agenda 2030: ODS 2 - Hambre cero; ODS 3 - Salud y bienestar; ODS 9 - Industria, innovación e infraestructura; y ODS 12 - Producción y consumo responsables.

Palabras clave: bacteriófagos, biorreceptores, bacterias fitopatógenas, micromatriz, ensayo de flujo lateral.

Summary

Bacteriophages or phages are viruses that selectively infect and replicate in bacteria. Given the natural ability to recognize and infect bacteria, phages have proven their usefulness in medicine, biotechnology, and agriculture, for example, to control bacterial diseases in plants, which could reduce the use of pesticides. However, the potential of phages as biorecognition elements of bacteria in biosensing still needs to be explored, and the approximations described in this regard are scarce. For this reason, this work proposes the development of phage-based bioanalytical approaches and lateral flow analytical methodologies that allow the detection and quantification of phytopathogenic bacteria. With the approaches developed, it is proposed to address studies that improve the diagnosis and detection protocols of *Xanthomonas arboricola* in plant matter as a proof of concept.

This work is highly relevant to the following SDGs of the 2030 Agenda: SDG 2 - Zero Hunger; SDG 3 - Health and well-being; SDG 9 - Industry, innovation and infrastructure; and SDG 12 - Responsible consumption and production.

Keywords: bacteriophages, bioreceptor, phytopathogen, microarray, lateral flow assay.

ALUMNO: Javier Pérez Garreta

TUTOR ACADÉMICO: Sergi Morais Ezquerro

TUTOR ACADÉMICO: Amadeo Sena Torralba

COTUTORA EXTERNA: Pilar Domingo Calap

València, 12 de junio de 2023

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. BACTERIÓFAGOS	1
1.2. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LOS BACTERIÓFAGOS	2
1.3. SISTEMAS DE BIOSENSADO BASADOS EN BACTERIÓFAGOS	3
1.4. EL IMPACTO DE LOS FITOPATÓGENOS A NIVEL MUNDIAL	6
1.5. SITUACIÓN ACTUAL	7
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1. MATERIALES Y REACTIVOS	10
3.2. EQUIPOS UTILIZADOS	10
3.3. PROCEDIMIENTOS	11
3.3.1. Preparación del cultivo y recuento bacteriano	11
3.3.2. Amplificación y recuento de bacteriófagos	11
3.3.3. Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro	12
3.3.4. Conjugación de las nanopartículas de oro y caracterización	12
3.3.5. Ensayos en disco compacto en formato de microarray	13
3.3.6. Fabricación de tiras reactivas y ensayos de flujo lateral	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
4.1. CULTIVO, CRECIMIENTO Y RECUENTO BACTERIANO	17
4.2. AMPLIFICACIÓN Y RECUENTO DE BACTERIÓFAGOS	19
4.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO	20
4.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS CONJUGADOS AU-FAGO	21
4.5. ENSAYO EN DISCO COMPACTO EN FORMATO DE MICROARRAY	26
4.6. ENSAYO DE FLUJO LATERAL (LFA)	31
5. CONCLUSIONES	35
6. BIBLIOGRAFÍA	36

Índice de figuras y tablas

Figura 1. Representación esquemática del ciclo lítico y lisogénico de los bacteriófagos.....	1
Figura 2. Elementos de un biosensor.....	4
Tabla 1. Características de las técnicas de detección de bacterias.....	5
Tabla 2. Sistemas de biosensado basados en bacteriófagos para la detección de bacterias.....	6
Figura 3. Síntesis de las nanopartículas de oro.....	12
Figura 4. Representación esquemática de los formatos de ensayo evaluados y la relación dosis-respuesta.....	13
Figura 5. Representación esquemática de las etapas de los ensayos con formato competitivo y sándwich.....	14
Figura 6. Preparación del disco compacto para ensayos en formato microarray.....	15
Figura 7. Fabricación de las tiras reactivas.....	16
Figura 8. Cultivo de <i>Xanthomonas arboricola</i> X7 en medio LB, medio LB sin inocular y cultivo de <i>Xanthomonas arboricola</i> X10.....	17
Figura 9. Curvas de crecimiento de <i>Xanthomonas arboricola</i> X7 y X10.....	18
Figura 10. Imagen a las 48 horas de cultivo de <i>Xanthomonas arboricola</i> en medio LB en placa Petri.....	19
Figura 11. Imágenes de los resultados del ensayo de calvas a las 24 horas	19
Figura 12. Amplificación del bacteriófago en medio LB con <i>Xanthomonas arboricola</i> X10 y medio LB con un inóculo bacteriano de <i>Xanthomonas arboricola</i> X10 transcurridas 24 horas desde el inóculo.....	20
Figura 13. Caracterización de las nanopartículas de oro.....	21
Figura 14. Análisis de la estabilidad del conjugado a diferentes concentraciones de bacteriófago.....	22
Figura 15. Comparativa del conjugado obtenido al partir del bacteriófago en medio de cultivo LB y en tampón fosfato (PB).....	23
Figura 16. Espectro de absorción de las nanopartículas de oro de 20 nm y del conjugado de las nanopartículas de oro con el bacteriófago.....	23
Figura 17. Imágenes obtenidas mediante el microscopio electrónico de transmisión de los conjugados de nanopartículas de oro y bacteriófagos	24
Figura 18. Evaluación del potencial eléctrico de las nanopartículas de oro, el bacteriófago y el conjugado mediante potencial <i>Zeta</i>	25
Figura 19. Imagen del resultado del ensayo de calvas.....	25

Figura 20. Comparativa de señales obtenidas en el ensayo al inmovilizar bacterias <i>Xanthomonas arboricola</i> cepa X10 a diferentes concentraciones con tampón PBS y carbonato.....	26
Figura 21. Comparación de las señales registradas con diferentes concentraciones de conjugado sobre diferentes concentraciones de bacterias <i>Xanthomonas arboricola</i> cepa X10 inmovilizadas en tampón carbonato.....	27
Figura 22. Señales analíticas obtenidas en el ensayo directo inmovilizando <i>Xanthomonas arboricola</i> X10 en disco compacto a 10^7 CFU/mL, con distintas diluciones de conjugado preparado a partir de bacteriófago en medio LB y en tampón PB.....	28
Figura 23. Comparativa de señales obtenidas con el conjugado 1/10 para diferentes concentraciones de bacterias <i>Xanthomonas arboricola</i> cepa X7 y X10 inmovilizadas en tampón carbonato.....	28
Figura 24. Señales analíticas registradas en disco compacto con bacterias inmovilizadas con tampón carbonato y con PBS empleando conjugado con y sin bacteriófago en ausencia de fitopatógeno en la muestra.....	29
Figura 25. Comparación del ensayo competitivo utilizando un conjugado del bacteriófago con nanopartículas de oro y un conjugado control en el análisis de diferentes concentraciones de <i>Xanthomonas arboricola</i> X10 en las muestras.....	29
Figura 26. Curvas de calibrado del ensayo competitivo en disco compacto para concentraciones $2 \cdot 10^7$ y $4 \cdot 10^7$ CFU/mL de X7 inmovilizada. Se muestran las regresiones logísticas de 4 parámetros (4PL)	30
Figura 27. Comparativa de las curvas de calibrado de los ensayos competitivos en disco compacto en formatos homólogos y heterólogos con las cepas bacterianas <i>Xanthomonas arboricola</i> X7 y X10. Se muestran las regresiones logísticas de 4 parámetros (4PL)	31
Figura 28. Señales analíticas obtenidas en un ensayo directo de LFA realizado con diluciones 1/20 (0,050), 1/8 (0,125) y 1/5 (0,200) de conjugado	32
Figura 29. Optimización de la concentración de conjugado en los ensayos competitivos de LFA.....	33
Figura 30. Ensayo competitivo de flujo lateral realizado con la cepa X7 inmovilizada a 108 CFU/mL y dilución de conjugado 1/8, donde se ha analizado la cepa X10 a 0, 1, 10^5 y 10^8 CFU/mL.....	34

1. Introducción

1.1. Bacteriófagos

Los bacteriófagos, también conocidos como fagos, conforman un grupo de virus con capacidad de reconocer e infectar bacterias. Son considerados como el grupo más abundante de organismos presentes en todos los ecosistemas. Se estima que, por cada bacteria, existen aproximadamente diez bacteriófagos, de modo que en la biosfera podrían existir 10^{31} partículas fágicas (Clokie *et al.*, 2011).

Estructuralmente, los bacteriófagos son muy heterogéneos, pero generalmente consisten en material genético en forma de ADN o ARN, lineal o circular, mono o bicatenario contenido en una cápside de forma poliédrica, con la excepción de los virus filamentosos cuya cápside, más compleja, adopta formas helicoidales más alargadas. La cápside es una estructura proteica que puede o no estar unida a una cola y presenta unas fibras especializadas para interactuar con el organismo huésped. Estas fibras reconocen un receptor de membrana en las bacterias y permiten la introducción del material genético en la bacteria. En función de su capacidad de contractibilidad, hay tres tipos de colas: contráctil y no contráctil de cola larga o corta (Aksyuk *et al.*, 2009).

Como todos los virus, los bacteriófagos son entidades infectivas. Durante el proceso de infección, el fago, o al menos su material genético, penetra en la célula bacteriana, reprogramándola para fabricar los diferentes componentes del virus. Este proceso implica el reconocimiento bacteriano, la liberación del material genético, la transcripción de los genes, la síntesis de las proteínas víricas y su ensamblaje formándose las partículas víricas o viriones que, finalmente, son liberados mediante lisis de la membrana celular (Campbell, 2003). En este ciclo pueden llegar a producirse más de 100 fagos en menos de una hora y se conoce como ciclo lítico (**Figura 1**).

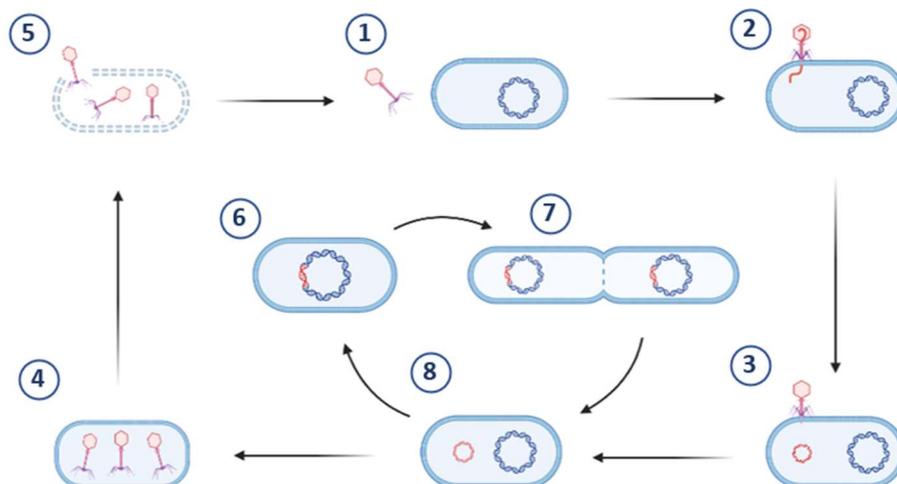


Figura 1. Representación esquemática del ciclo lítico y lisogénico de los bacteriófagos. Ciclo lítico de los bacteriófagos en el que: la partícula vírica se encuentra con una bacteria (1), el fago se adhiere a la superficie celular y reconoce la bacteria (2), el material genético se inserta en la célula huésped, quedando la estructura proteica del fago en el exterior celular (3). El genoma viral se replica, se transcribe y se traduce, ensamblándose las proteínas y formando los viriones (4). Como resultado se produce la lisis celular y la liberación de los fagos formados (5). En el ciclo lisogénico: el genoma viral se integra con el

cromosoma bacteriano (6) y las bacterias lisogénicas resultantes se replican indefinidamente (7) hasta que se produce la reentrada en el ciclo lítico (8).

Sin embargo, no todos los bacteriófagos se producen siguiendo este ciclo. Los fagos temperados son aquellos capaces de infectar una bacteria e integrar su genoma con el de la célula huésped en lo que se conoce como ciclo lisogénico. De este modo, la bacteria lisogénica alberga el fago en un estado quiescente conocido como profago durante un tiempo indefinido hasta que algún agente externo, como la radiación ultravioleta o la escasez de nutrientes, desencadene su reentrada en el ciclo lítico y la consiguiente producción de los viriones y su liberación por lisis celular. Algunos estudios sugieren que estos bacteriófagos temperados podrían regular la entrada en el ciclo lítico de algunas bacterias infectadas mediante la liberación de péptidos que impiden la integración del genoma viral en el bacteriano (Campbell, 2003).

1.2. Aplicaciones biotecnológicas de los bacteriófagos

El descubrimiento de los bacteriófagos se remonta a 1896, cuando el bacteriólogo Ernest Hankin describió la actividad antibacteriana de estos agentes contra *Vibrio cholerae*. Más tarde, en 1915, Frederick Twort planteó la posible asociación entre esta actividad y la existencia de virus. Sin embargo, fue el microbiólogo, Felix d'Herelle, quien describió por primera vez los bacteriófagos en 1917 (4). No obstante, d'Herelle es aún más conocido como pionero en el desarrollo y aplicación de la fagoterapia.

La fagoterapia fue el primer ejemplo conocido de aplicación de fagos en biomedicina, documentado en 1919 por d'Herelle en el Hôpital des Enfants-Malades de París. La principal ventaja de la fagoterapia radica en la alta selectividad que los fagos tienen hacia las bacterias diana, lo que les permite reconocer e infectar específicamente a diferentes bacterias presentes en la microbiota de los organismos. Los fagos son capaces de replicarse *in situ* al infectar las bacterias y entrar en ciclo lítico. En caso de que las bacterias desarrollen resistencias a la infección, los propios fagos son capaces de evolucionar de forma natural, desarrollando mecanismos para evadir las resistencias bacterianas, minimizando así las posibilidades de escape. Sin embargo, esta alta selectividad representa una limitación, ya que algunos fagos pueden reconocer de forma muy específica bacterias, lo que requiere la preparación de cócteles de fagos para ampliar el espectro de actuación. Además, ciertas condiciones fisiológicas pueden favorecer la entrada del bacteriófago en el ciclo lisogénico. Así, la terapia fágica parece ser una estrategia segura y efectiva para tratar infecciones resistentes a los antibióticos, especialmente en pacientes inmunocompetentes. Sin embargo, hay escasez de datos sobre los efectos de los bacteriófagos en pacientes inmunodeprimidos (Ul-Haq *et al.*, 2012).

Con el objetivo de superar estas limitaciones y mejorar las ventajas de su uso en comparación con los antibióticos convencionales, algunas investigaciones con fagos se centran en el empleo de ingeniería genética, principalmente mediante recombinación homóloga o el uso de CRISPR-Cas. Esto permite ampliar el rango de bacterias diana reconocidas por cada bacteriófago, incrementar la eficacia de la infección o la capacidad de degradación de biofilms, así como evitar la entrada en ciclo lisogénico (Gibb *et al.*, 2021).

En el campo terapéutico el uso de los fagos como vehículos de transporte de moléculas de ADN es una estrategia prometedora y en constante desarrollo. La estrategia consiste en introducir una molécula de ADN de interés en el interior de la partícula vírica, la cual la protege frente a la

degradación una vez se ha inyectado en el organismo (Pranjol & Hajitou, 2015). Debido a su elevada selectividad y el uso de la ingeniería genética para modificar las proteínas de su superficie, los bacteriófagos pueden producirse para reconocer específicamente a un receptor de la célula de interés, por ejemplo, exhibiéndose factores de crecimiento o integrinas. Esta estrategia permite su uso como vehículos para transportar vacunas, expresando directamente determinados antígenos en su superficie o, en el caso de vacunas derivadas de ADN, albergando una molécula de ADN en su interior que, posteriormente, se empleará para sintetizar el antígeno (Ul Haq *et al.*, 2012).

Otro sector especialmente sensible a la contaminación bacteriana es el agroalimentario. La producción de alimentos implica numerosos puntos críticos, que abarcan desde el crecimiento de los animales o la recolección de vegetales, hasta su procesamiento, fabricación, distribución y conservación. Estos puntos son susceptibles de contaminación por bacterias patógenas lo que supone enormes pérdidas económicas para el sector. Atendiendo a esta emergencia, el enfoque “Una sola salud” de la OMS (*One health*) ha marcado la prevención, detección y control de estos patógenos como uno de los retos ambientales más importantes a los que enfrentarse, especialmente como consecuencia de la aparición de bacterias multirresistentes. Así, el empleo de bacteriófagos se presenta como una alternativa muy interesante, ya que no representan ningún riesgo directo para la salud humana ni de otros animales, y no afectan la calidad de los alimentos. Hasta la fecha, se han llevado a cabo diversos estudios que han explorado la administración de bacteriófagos a animales, lo que ha demostrado reducir la incidencia de infecciones específicas. Por ejemplo, se ha observado una disminución de la carga bacteriana de *Campylobacter* spp. en gallinas y de *Vibrio anguillarum* en salmón. Además, se ha comprobado que el uso de fagos puede reducir la presencia de *Listeria monocytogenes* en jamón loncheado, así como de *Salmonella* spp. en carne de pavo o de pollo. En todos los casos, se ha demostrado una disminución de las infecciones y la contaminación de los productos alimentarios (Lavilla *et al.*, 2023).

El uso de bacteriófagos en el control de bacterias fitopatógenas resulta de gran interés en el caso de los organismos vegetales. Aunque existen pocas opciones comerciales de bioplaguicidas, se están realizando estudios sobre el empleo de bacteriófagos con el objetivo de proponer estrategias que prevengan la infección bacteriana en plantas y diseñar tratamientos para eliminar fitopatógenos. Algunos estudios han demostrado la efectividad del uso de bacteriófagos en la reducción de la carga bacteriana en diferentes cultivos. Por ejemplo, se ha observado que la aplicación semanal de bacteriófagos puede remitir la podredumbre blanda en lirio de agua causada por la bacteria *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, así como las manchas en hojas y fruto de melocotoneros causadas por *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* (Cotes *et al.*, 2018).

1.3. Sistemas de biosensado basados en bacteriófagos

Un sistema de biosensado es una herramienta que permite el análisis de muestras y determinación de analitos, generando en el proceso una señal que es proporcional a la concentración de dicho analito en la muestra. Estos sistemas son capaces de proporcionar una respuesta rápida y muy sensible, además requieren una cantidad de muestra mínima en comparación con métodos de análisis convencionales debido a que la señal es amplificada y son fácilmente miniaturizables, facilitando su portabilidad y su empleo *in situ* en el lugar que se necesite. Así pues, son una herramienta muy poderosa que permite su aplicación en diversas

áreas, especialmente en programas de vigilancia ambiental de contaminantes o en el campo de la salud en el descubrimiento de fármacos o la detección de biomarcadores relacionados con patologías (Naresh & Lee, 2021).

Todo biosensor cuenta con una serie de elementos comunes. En primer lugar, el biorreceptor, es decir, aquella molécula que va a encargarse de reconocer selectivamente al analito o molécula que se quiere detectar. Este, generalmente, es una célula, una enzima, una molécula de ADN o un anticuerpo. El transductor cumple la función de convertir ese reconocimiento en una señal que pueda medirse (óptica, eléctrica, electroquímica, acústica, impedancia, etc.). Por último, se incluye un elemento encargado de procesar y cuantificar la señal obtenida (Bhalla *et al.*, 2016).

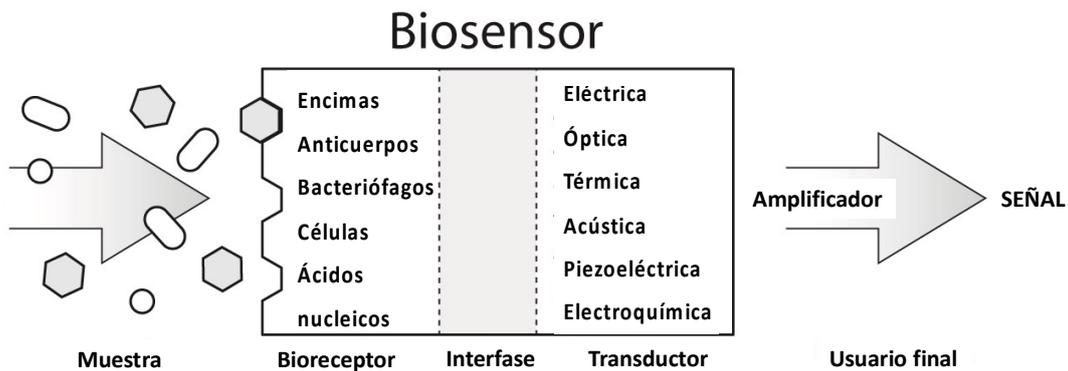


Figura 2. Elementos de un biosensor. Figura adaptada de (17).

En la última década ha habido un creciente interés en la aplicación de bacteriófagos como elementos de biorreconocimiento. Esto es debido, principalmente, a las características únicas que presentan estos virus. En primer lugar, los bacteriófagos muestran una elevada selectividad hacia las bacterias diana, lo que permite, por ejemplo, diferenciar entre células vivas y no viables en comparación con otros biorreceptores como los anticuerpos. Además, su producción es relativamente sencilla, lo que reduce los costos y aumenta las tasas de producción. Cabe destacar que no requieren el uso de animales de experimentación para su obtención. Asimismo, no se conocen efectos negativos directos sobre animales o plantas y los bacteriófagos tienen la capacidad de tolerar condiciones extremas de temperatura o pH sin comprometer su actividad (Farooq *et al.*, 2018).

Los ensayos que utilizan fagos como elemento de biorreconocimiento han demostrado simplicidad, sensibilidad y selectividad, llegando a detectar 5 CFU/mL de *Staphylococcus aureus* en muestras de leche en 30 min (Farooq *et al.*, 2020).

La **Tabla 1** muestra una comparación de las técnicas de análisis que se utilizan para llevar a cabo la detección de bacterias. Como se muestra en la **Tabla 1**, los métodos empleados para detectar bacterias, como el cultivo y conteo de colonias bacterianas en placa, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), son técnicas complejas. Requieren material especializado y personal capacitado, y suelen implicar tiempos largos. Por ejemplo, el cultivo bacteriano puede tardar entre 1 y 7 días antes de que se pueda realizar el conteo de colonias y su análisis. En el caso de la PCR o ELISA, el tiempo de ensayo se aproxima a las 4 horas. Por otra parte, las técnicas de biosensado basadas en el empleo de moléculas de ADN monocatenario (ADNmc), anticuerpos o bacteriófagos, presentan una mayor

simplicidad. Además, estos sistemas son más económicos, sensibles y estables (Farooq *et al.*, 2018).

Tabla 1. Características de las técnicas de detección de bacterias.

Técnica de detección	Dificultad	Tiempo requerido (h)	Discriminación viables/no viables	<i>In situ</i>	Ventajas	Limitaciones	Ref.
Conteo de colonias	Laborioso	24-168	Sí	No	Rentabilidad	Tiempos muy extensos	(Sieuwerts <i>et al.</i> , 2008)
PCR	Laborioso	1-4	Solo la PCR de viabilidad (vPCR)	No	Eficiencia	Personal especializado	(Garibyan & Avashia, 2013)
ELISA	Laborioso	1-4	No	No	Robustez	No distinción viables/no viables	(Aydin, 2015)
Biosensor ADNmc	Simple	0,5-2	No	Sí	Simplicidad y rapidez	Baja eficiencia	(Mehrotra, 2016)
Biosensor anticuerpo	Simple	0,5-2	No	Sí	Adaptabilidad y selectividad	Costes elevados	(Sharma <i>et al.</i> , 2016)
Biosensor fago	Simple	0,5-2	Sí	Sí	Estabilidad, identificación viables	Falta de desarrollo	(Singh <i>et al.</i> , 2020)

Actualmente, se está explorando el empleo de diferentes sistemas de detección de bacterias basadas en bacteriófagos. La **Tabla 2** recopila diferentes sistemas de biosensado empleados para la detección de bacterias utilizando fagos como elemento de biorreconocimiento.

Como puede observarse, en la mayoría de los ejemplos, los sistemas de biosensado se centran en la detección de bacterias patógenas presentes en animales con límites de detección altos ($> 1 \cdot 10^3$ CFU/mL). El caso del sistema de biosensado con detección amperométrica se basa en utilizar un plásmido con un gen codificante para fosfatasa alcalina. Este plásmido se introduce en el fago que reconoce a la bacteria diana y actúa como una enzima reportera al reaccionar con el sustrato p-aminofenil fosfato. La actividad enzimática se mide en una celda electroquímica y el ensayo dura tres horas. En el caso del ensayo de flujo lateral, se utiliza un dominio proteico del bacteriófago B4 que interacciona con la pared celular bacteriana. A pesar de que algunos sistemas de biosensado muestran una buena sensibilidad, la mayoría emplea los bacteriófagos como sistemas de detección indirecta. Así pues, es muy interesante realizar investigaciones sobre los bacteriófagos y su mecanismo de reconocimiento de bacterias, con el objetivo de mejorar la selectividad y sensibilidad de los ensayos y ampliar el espectro de patógenos diana. Esto permitiría optimizar los sistemas de detección y promover un mayor desarrollo en este campo.

Tabla 2. Sistemas de biosensado basados en bacteriófagos para la detección de bacterias.

Método de ensayo	Fago	Bacteria diana	Límite de detección	Referencia
Amperométrico	M13	<i>E. coli</i>	1 CFU/mL	(Neufeld <i>et al.</i> , 2005)
Fluorescencia	P- <i>S. aureus</i> -9	<i>S. aureus</i>	2,5·10 ³ CFU/mL	(Yan <i>et al.</i> , 2017)
Magnetoelástico	E2	<i>S. typhimurium</i>	5·10 ² CFU/mL	(Mack <i>et al.</i> , 2017)
Flujo lateral	B4	<i>B. cereus</i>	1·10 ⁴ CFU/mL	(Kong <i>et al.</i> , 2017)
Biosensor óptico	P22 (TSP)	<i>Salmonella</i>	4,4·10 ⁴ CFU/mL	(Taylor <i>et al.</i> , 2006)
Resonancia del plasmón de superficie	scFv	<i>L. monocytogenes</i>	2·10 ⁶ CFU/mL	(Nanduri <i>et al.</i> , 2007)

1.4. El impacto de los fitopatógenos a nivel mundial

El incremento de la población mundial proyectado por Naciones Unidas para 2050, se estima que se alcanzarán los diez mil millones de personas, plantea un desafío importante en cuanto a seguridad alimentaria. Para satisfacer las necesidades de esta creciente población, será necesario aumentar la producción de alimentos en un 60% en los próximos 30 años. Sin embargo, este objetivo se ve obstaculizado por el incremento alarmante de enfermedades vegetales asociadas a microorganismos patógenos, como *Penicillium spp.* o *Xanthomonas spp.*, entre otros microorganismos. Este incremento se traduce en importantes descensos en la capacidad productiva de los cultivos a nivel mundial que suponen pérdidas económicas de más de 220 mil millones de euros. Estas mermas en la producción oscilan según el tipo de cultivo y la localización entre un 10 y un 42% de media, alcanzándose en casos concretos pérdidas de hasta el 50% de los cultivos, como el de patatas en Sudamérica. Las pérdidas no son sólo económicas, suponen un importante impacto en los ecosistemas provocando un descenso y pérdida de la biodiversidad y un riesgo directo a la seguridad alimentaria al comprometerse el abastecimiento, pero sobre todo la calidad de los productos (Ristaino *et al.*, 2021).

Entre los principales agentes fitopatógenos se encuentran las bacterias, los hongos, virus y las plagas de insectos, habiéndose descrito más de 50.000 enfermedades en plantas. Dentro de estos fitopatógenos, el género *Xanthomonas spp.* es uno de los más estudiados. Se trata de un género de bacterias gram-negativa formado por 27 especies. Este género representa uno de los agentes patógenos más importantes, responsables de causar numerosas enfermedades afectando a alrededor de 400 plantas, lo que repercute directamente en la producción de alimentos. En la infección por *Xanthomonas spp.* se distinguen dos etapas características: una primera etapa epifítica, en la cual la bacteria reconoce la superficie de la planta y comienza la colonización, formándose un biofilm que actúa como barrera protectora frente a factores de estrés, y una fase endofítica, en la cual la bacteria penetra en la planta a través de lesiones en los tejidos y alcanza el sistema vascular (Nakayinga *et al.*, 2021). Por todo esto, resulta de especial

interés reconocer de forma temprana la infección para poder actuar de forma eficaz y controlar su diseminación.

1.5. Situación actual

Existe una creciente preocupación acerca del aumento de las enfermedades vegetales, como consecuencia del cambio climático. Este fenómeno tiene un impacto significativo en los ecosistemas, alterando diversos factores como la estructura del ecosistema, el suelo, la composición en las comunidades vegetales, y las poblaciones de vectores capaces de transmitir las enfermedades. Estos cambios podrían incrementar la capacidad de dispersión de los patógenos y afectar a la susceptibilidad de las plantas a las enfermedades, debido a alteraciones fisiológicas y de crecimiento causadas por el aumento de las temperaturas y la disminución de las precipitaciones (Yang *et al.*, 2023).

En este contexto, se vuelve de vital importancia el desarrollo de métodos de detección efectivos y estandarizados que permitan el control y la prevención de la propagación de los patógenos causantes de enfermedades vegetales. Fundamentalmente, se requiere un enfoque holístico para abordar el control de *Xanthomonas* spp. dada su relevancia en la afectación de los cultivos y su amplia distribución.

La mayoría de los protocolos diseñados específicamente para llevar a cabo un diagnóstico de *Xanthomonas* spp. incluyen la descripción de la sintomatología de la planta y, generalmente, más de un método de diagnóstico (como mínimo se realizan dos pruebas) para establecer con seguridad el origen de la patología, tomándose muestras de diversos tejidos del organismo. Los métodos que se emplean de forma rutinaria para su detección son métodos moleculares basados en el análisis de ácidos nucleicos (Catara *et al.*, 2021).

Los métodos basados en PCR se han convertido en el método estándar para la detección de *Xanthomonas* spp. Este método es sensible y relativamente rápido si se compara con las técnicas convencionales como el aislamiento y cultivo de bacterias. Dentro de esta técnica, la PCR cuantitativa en tiempo real o qPCR, así como la PCR digital o dPCR, se han desarrollado mucho, convirtiéndose en las variantes de PCR más utilizadas. Estas variantes ofrecen la capacidad de no solo detectar la presencia, sino de cuantificar los niveles del patógeno con una buena sensibilidad. Por otro lado, el desarrollo de la PCR de viabilidad o vPCR, ha permitido superar una de las limitaciones de estos métodos como es la discriminación entre bacterias viables y no viables. Este resultado se logra mediante la combinación de un PCR con un agente intercalador, interfiriendo en la amplificación en el caso de células viables (Lee *et al.*, 2022). Aunque todas estas variantes de la PCR han supuesto una gran mejora, el equipamiento y material requerido sigue limitando su aplicación en el lugar de toma de muestra, además de ser métodos tediosos y largos.

Por otra parte, existen métodos basados en hibridación. Estos métodos incluyen los microarrays, las hibridaciones en membrana y las técnicas de hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH), los cuales han permitido la detección y el cribado simultáneo de numerosos patógenos al analizar una gran cantidad de marcadores genómicos. Estos métodos se destacan por su alta sensibilidad y reproducibilidad. Sin embargo, presentan ciertas limitaciones, como la necesidad de utilizar marcadores genómicos adecuados para identificar la diversidad biológica presente en las muestras, la complejidad del proceso y las condiciones en las que se debe llevar a cabo, así como la dificultad de manejar la gran cantidad de datos obtenidos (Catara *et al.*, 2021).

Sin embargo, dada la complejidad en el manejo de estas patologías, resulta crucial contar con un diagnóstico rápido, efectivo y sensible que permita implementar medidas de control adecuadas, como el uso de bactericidas o inductores de resistencia en plantas (Kotsiri *et al.*, 2022). Para alcanzar este objetivo, es necesario desarrollar métodos de diagnóstico sencillos que puedan ser aplicados en el punto donde se recolectan las muestras. En este contexto, los sistemas de biosensado basados en bacteriófagos como elemento de biorreconocimiento pueden ser una alternativa con un gran potencial para lograr este objetivo.

2. Objetivos

Este Trabajo Fin de Grado tiene por objetivo general, estudiar y explorar el potencial de los bacteriófagos como elemento de biorreconocimiento para el desarrollo de nuevos sistemas de biosensado. Se pretende desarrollar un sistema de detección de bacterias fitopatógenas que suponga una mejora en: (1) sensibilidad y selectividad, (2) simplicidad, (3) tiempo de respuesta, y (4) capacidad de emplearse en el punto de interés, respecto a los sistemas empleados actualmente.

Las actividades planteadas para la realización del trabajo han sido las siguientes:

1. Cultivar y contar bacterias fitopatógenas.
2. Producir y cuantificar bacteriófagos.
3. Conjuguar nanopartículas de oro con bacteriófagos (AuNPs-fago).
4. Caracterizar conjugados AuNPs-fago por espectrofotometría y TEM.
5. Evaluar mediante ensayos de *microarray* en disco compacto la detección de fitopatógenos.
6. Desarrollar ensayos de flujo lateral para la detección rápida de *Xanthomonas arboricola* como prueba de concepto.

Los objetivos se alinean con un alto grado de relación con varios Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS):

ODS 2 - Hambre cero: La utilización de bacteriófagos para detectar enfermedades bacterianas en plantas puede contribuir a la mejora de la seguridad alimentaria y a la toma de medidas preparatorias para prevenir la propagación de enfermedades, aumentando la producción de alimentos.

ODS 3 - Salud y bienestar: Desarrollar aproximaciones bioanalíticas basadas en fagos para la detección y cuantificación de bacterias fitopatógenas contribuye a mejorar los protocolos de diagnóstico de enfermedades en plantas, lo que a su vez puede tener un impacto positivo en la salud humana al reducir la exposición a bacterias patógenas.

ODS 9 - Industria, innovación e infraestructura: Poner a punto metodologías analíticas de flujo lateral para la detección de bacterias fitopatógenas implica avances en bioanalítica y nanotecnología que pueden mejorar los protocolos existentes de detección de enfermedades en la industria agrícola.

ODS 12 - Producción y consumo responsables: La utilización de fagos para controlar enfermedades bacterianas en plantas puede reducir la dependencia de plaguicidas de síntesis, promoviendo prácticas agrícolas más sostenibles y responsables con el medio ambiente.

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales y reactivos

El bacteriófago (P4), el cultivo inicial de *Xanthomonas arboricola* (X7 y X10), los materiales y reactivos para el cultivo de las bacterias y amplificación del fago P4 fueron proporcionados por el grupo de investigación dirigido por Pilar Domingo-Calap en el I2SysBio (UV-CSIC) y el grupo de Ester Marco-Noales en el IVIA. Las nanopartículas de oro de 5 nm (752568), el ácido tetracloroaúrico (III) (520918), el citrato sódico (71497), la sacarosa (S0389), la albúmina sérica bovina (BSA) (A9418), las membranas de nitrocelulosa (Hi-Flow™ Plus 90), la fibra de celulosa (CFSP173000), los anticuerpos policlonales contra IgG de conejo (R5506), los reactivos para la amplificación con plata (Silver enhancer solution A (S5020) y B(S5145)) y los filtros de exclusión molecular de 100 KDa (UFC5100) han sido adquiridos en Merck. El detergente Tween-20 (TW00201000) ha sido adquirido en Scharlab. La columna de afinidad para la purificación de inmunoglobulinas de suero de conejo (HiTrap Protein G HP) se adquirió en Cytiva. Los soportes de bajo coste utilizados fueron discos DVD-R (MediaRange 16X). Las placas de 96 pocillos transparentes sin tratar (260895) se adquirieron en Fisher Scientific.

Los tampones mencionados a continuación se prepararon a partir de reactivos adquiridos en Merck usando una probeta, un matraz aforado, enrasando con agua ultrapura estéril (Milli-Q, Millipore Iberica) y ajustando el pH con ácido clorhídrico o hidróxido sódico 1 M usando un pHmetro. Antes de su uso, las disoluciones se filtraron con membranas de polietersulfona de 0.2 µm.

- PB (10 mM, pH 7.4): 10 mM Na₂HPO₄ y 10 mM NaH₂PO₄.H₂O.
- PBS (10 mM, pH 7.4): 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl.
- PBST (10 mM, pH 7.4): PBS con 0.05% v/v Tween-20.
- BB (0.1 M, pH 9.2): 100 mM Na₂B₄O₇·10H₂O y 100 mM H₃BO₃.
- Carbonato (0.1 M, pH 9.6): 12.5 mM NaHCO₃ y 87,5 mM Na₂CO₃.

3.2. Equipos utilizados

La manipulación de bacterias y fagos para su cultivo y amplificación, respectivamente, se realizó en una cabina de seguridad microbiológica de clase II (HeraSafe KS12, ThermoFisher Scientific). La funcionalización de los discos y de las tiras reactivas con las bacterias X7 y X10 se realizó mediante un dispositivo de impresión de líquidos automático de no contacto (AD 1500, Biodot. Inc.). La cuantificación de bacterias mediante OD₆₀₀ y la caracterización espectrofotométrica de los conjugados se realizó con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo-Fisher). La caracterización de los conjugados y de los fagos se realizó con el microscopio electrónico de transmisión TEM (FEI Tecnai G2 20), con el software de análisis de imagen Image J y variaciones en el potencial Zeta usando el ZetaSizer (Malvern). La lectura de las señales analíticas en DVDs se realizó con un lector de discos compactos de LG Electronics Inc., en modo de reflexión, utilizando una longitud de onda de 650 nm (Morais *et al.*, 2016).

3.3. Procedimientos

3.3.1. Preparación del cultivo y recuento bacteriano

En primer lugar, se preparó un cultivo glicerinado a partir de los cultivos bacterianos de las cepas X7 y X10 de *Xanthomonas arboricola*. Para ello, se mezclaron 400 μL de glicerol 50% v/v con 600 μL de cultivo bacteriano, y la mezcla se almacenó a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. El primer crecimiento de cultivo bacteriano se realizó raspando la superficie del glicerinado congelado con la punta de una micropipeta y sumergiendo la punta en 3,5 mL de medio LB líquido. Las bacterias se dejaron crecer en condiciones de agitación pasiva a temperatura ambiente, durante 24 horas. Pasado este tiempo, el cultivo se almacenaba a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante una semana como máximo.

El recuento bacteriano se realizó mediante conteo en placa Petri con agar. Para ello, se prepararon diluciones seriadas del cultivo bacteriano en medio LB. Se añadieron 100 μL de cada dilución en una placa Petri y se esparció la disolución por la superficie empleando un asa de siembra Drigalsky. Una vez incubadas las placas en estufa a $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas, se procedió a la determinación de las unidades formadoras de colonias por mililitro o CFU/mL (*colony-forming unit/mL*), mediante el recuento del número de colonias crecidas en la placa, teniendo en cuenta la dilución realizada y el volumen dispensado de cada cultivo. También se determinó la concentración de bacterias midiendo la densidad óptica a 600 nm de los cultivos en medio LB. Para ello, se estandarizó el valor de densidad óptica obtenido, estimando que 0,2 (u.a.) corresponde a una concentración de bacteria de 10^8 CFU/mL.

3.3.2. Amplificación y recuento de bacteriófagos

La amplificación del bacteriófago P4 se realizó preparando una disolución con 500 μL de medio LB líquido, 15 μL de cultivo de *Xanthomonas arboricola* X10 a una concentración de $5 \cdot 10^8$ CFU/mL y 15 μL de fago P4 a 10^8 PFU/mL (*plaque-forming unit/mL*). Además, se prepara un control positivo y negativo. En el primero no se incluye el fago P4 en la disolución y en el segundo no se incluye la bacteria X10. El control positivo indica que el inóculo bacteriano crece en el proceso y el control negativo indica que el fago no se replica en ausencia del inóculo bacteriano y que el medio LB no se encuentra contaminado. Las disoluciones se incubaron en agitación a 70 rpm y temperatura ambiente durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, se procedió a la purificación de los fagos siguiendo dos etapas de centrifugación a 13.000 rpm durante 5 minutos, recuperando el sobrenadante. La disolución del bacteriófago amplificado se almacenó a 4°C .

La titulación de los fagos amplificados se determinó calculando las unidades formadoras de placa (PFU/mL), obtenidas de un ensayo de calvas en donde se crece un cultivo bacteriano de X10 inoculado con el fago P4. Para ello, se calentó un vial con 3,5 mL de Top Agar y LB a baño maría. Seguidamente se añadió al vial 10 μL de bacteriófago y 400 μL del cultivo bacteriano X10. La disolución se vertió en una placa Petri con medio de cultivo LB y agar, se dejó enfriar y se cultivó a $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se realizó un recuento de placas teniendo en cuenta el factor de dilución.

3.3.3. Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro (AuNPs) de 20 nm de diámetro se sintetizaron siguiendo el método de Turkevich (33). En primer lugar, se preparó una disolución de 50 mL de HAuCl_4 a 0,25 mM en agua Milli-Q, se introdujo en un Erlenmeyer y se llevó a ebullición en condiciones de agitación (500 rpm) usando una placa magnética calefactable. Seguidamente, se añadió 1,25 mL de citrato sódico al 2% en agua Milli-Q, el cual actúa como agente reductor y estabilizante. La reacción de reducción de la sal de oro ocurrió durante los 10 minutos siguientes a la adición del citrato sódico, donde se observó un cambio de color de la disolución de incoloro a morado, violeta y rojo (**Figura 3**). Este último es el color característico de las nanopartículas de 20 nm de diámetro. Antes de almacenar las nanopartículas a 4 °C, se caracterizaron por espectrofotometría y microscopía electrónica de transmisión (TEM).

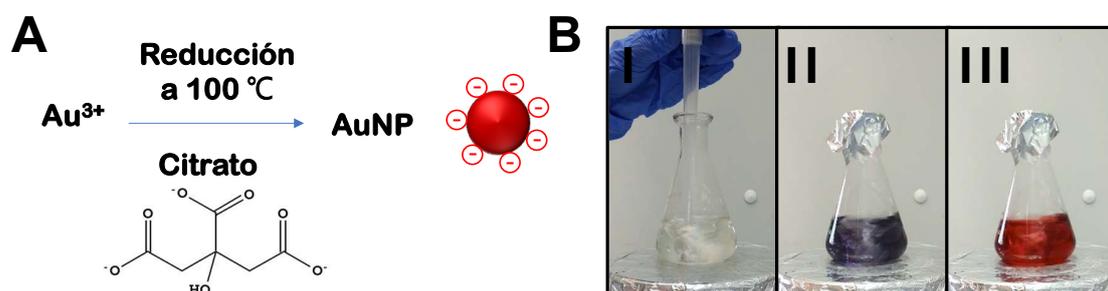


Figura 3. Síntesis de las nanopartículas de oro. **(A)** Reacción de reducción de la sal de oro para la síntesis de AuNPs de 20 nm, usando el citrato sódico como agente reductor y estabilizante. **(B)** Cambio de color de la solución coloidal durante la síntesis de las AuNPs.

3.3.4. Conjugación de las nanopartículas de oro y caracterización

Las AuNPs de 5 y 20 nm se conjugaron con el fago P4 mediante adsorción directa. Para ello, la disolución de fago ($1 \cdot 10^{10}$ PFU/mL) se reconstituyó en tampón PB (10 mM, pH 7.4), con el fin de eliminar el cloruro sódico del medio LB. Para ello, se emplearon filtros de exclusión molecular de 100 KDa y se realizaron 3 ciclos de centrifugación. Seguidamente, se añadió 100 μL del fago P4 a 1,5 mL de las AuNPs de 20 nm y 5 μL del fago P4 a 90 μL de las AuNPs de 5 nm. Ambas AuNPs estaban previamente ajustadas a pH 9.2 con el tampón borato (0.1 M, pH 9.2). Las disoluciones se dejaron incubar a 420 rpm y temperatura ambiente, durante 30 minutos y a continuación se añadieron 100 μL y 5 μL de tampón de bloqueo (PB 10 mM, pH 7.4, 10% m/v de BSA) a los conjugados de 20 y 5 nm, respectivamente. Se repitieron las mismas condiciones de incubación y finalmente se eliminó el exceso de fago y BSA mediante centrifugación a 13.000 rpm durante 30 minutos. Una vez descartado el sobrenadante, se recuperaron 100 μL y 30 μL de nanopartículas conjugadas de 20 y 5 nm, respectivamente. Las AuNPs de 20 nm también se conjugaron a anticuerpos contra IgG de conejo, los cuales se usaron como elemento de biorreconocimiento para la línea de control de la tira reactiva. El procedimiento de conjugación fue el mismo que con los fagos, salvo que se usaron 6,5 $\mu\text{g/mL}$ de anticuerpo.

Con el fin de caracterizar el conjugado de AuNPs con fago P4, se observó el conjugado con el microscopio electrónico de transmisión (TEM), usando una gradilla de cobre y una tinción negativa con 2% (m/v) de acetato de uranilo en agua Milli-Q. El conjugado también se caracterizó

mediante la determinación del potencial Zeta. Además, con el fin de evaluar la actividad infectiva y estabilidad del fago, después del proceso de conjugación y almacenamiento a 4°C durante una semana, se realizó un ensayo de calvas siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.3.2.

3.3.5. Ensayos en disco compacto en formato de microarray

Para la realización de los ensayos en formato microarray en disco compacto, se evaluaron los formatos de ensayo competitivo y sándwich. Tal y como muestra la **Figura 4A**, el formato competitivo consiste en la impresión de las bacterias en la superficie del DVD, mientras que el formato sándwich consiste en la impresión del fago. En el formato competitivo, la bacteria impresa actúa como biorreceptor de captura y compite con la bacteria presente en la muestra, para su reconocimiento por el fago conjugado con oro. Por lo tanto, la señal analítica en ausencia de bacteria en la muestra es máxima y disminuye conforme la concentración de bacteria en la muestra aumenta. Por el contrario, en el formato sándwich la bacteria es reconocida tanto por el fago de captura como por el fago conjugado, y la señal analítica es directamente proporcional a la concentración de bacteria en la muestra (**Figura 4B**).

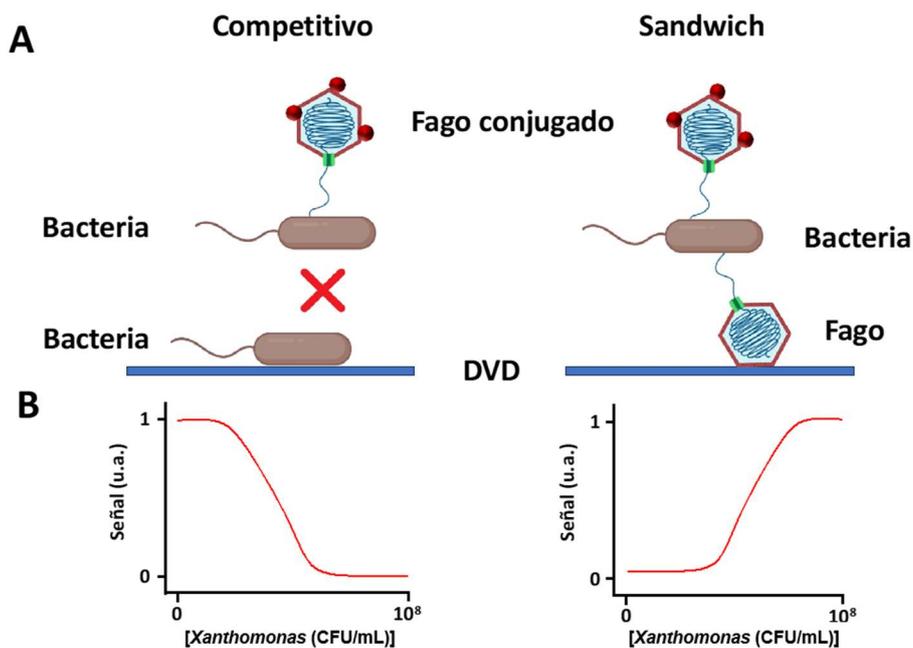


Figura 4. Representación esquemática de los formatos de ensayo evaluados y la relación dosis-respuesta. **(A)** Representación esquemática del ensayo en disco compacto con formato de competitivo (impresión de la bacteria en el DVD como biorreceptor de captura) y sándwich (impresión del fago en el DVD como biorreceptor de captura). **(B)** Representación de la relación dosis-respuesta característica de cada formato de ensayo, siendo la señal del formato competitivo inversamente proporcional a la concentración de bacteria y directamente proporcional para el formato sándwich.

Ambos formatos de ensayo comenzaron con la impresión de los biorreceptores de captura en la superficie del disco, mediante el dispensador de líquidos. Se imprimieron diferentes diluciones de los biorreceptores en PBS (10 mM, pH 7.4) y tampón carbonato (0.1 M, pH 9.6) (**Figura 5 A1 y B1**), utilizando el dispensador de líquidos (AD1500, Biotod. Inc., Irvine, CA, EEUU).

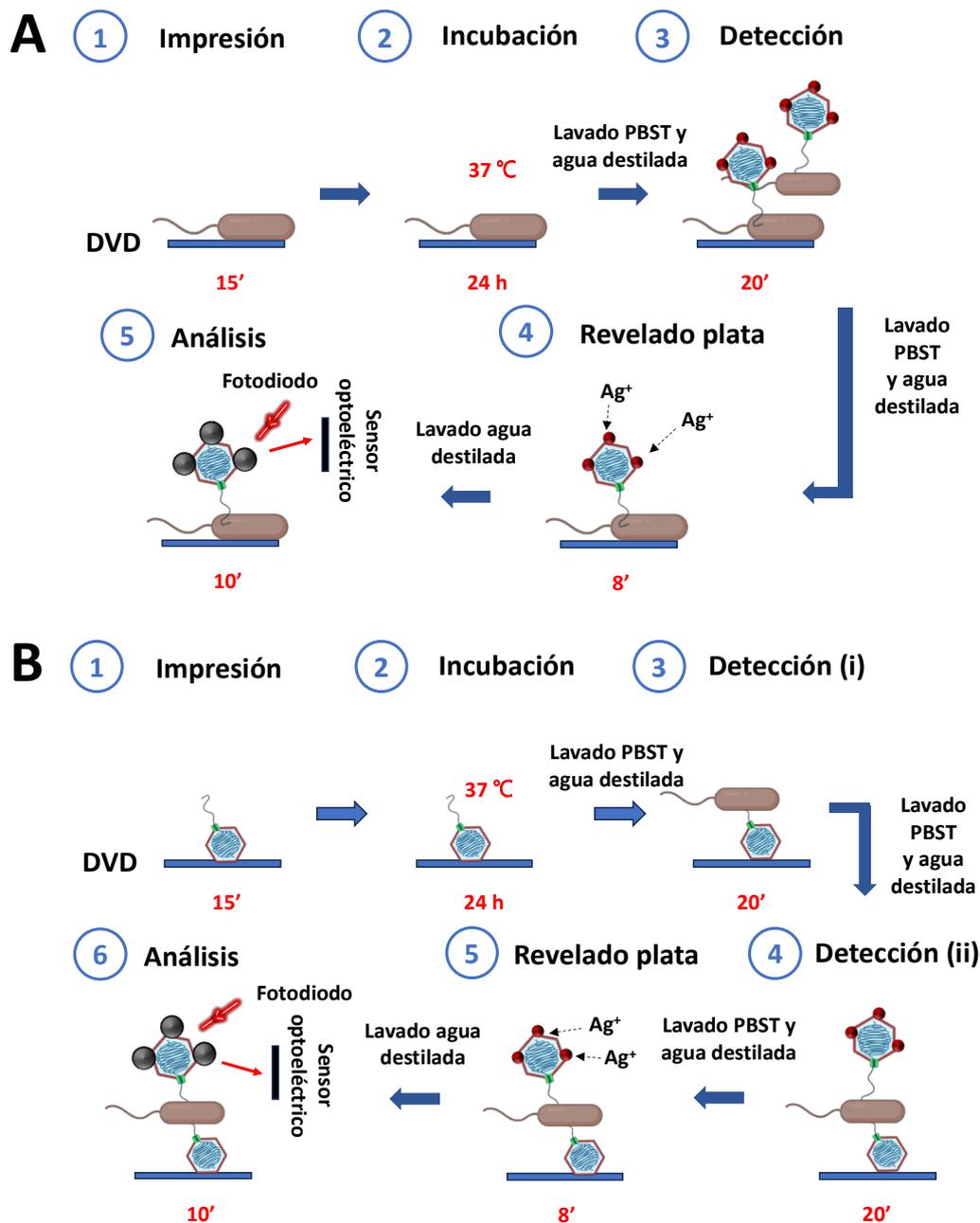


Figura 5. Representación esquemática de las etapas de los ensayos con formato **(A)** competitivo y **(B)** sándwich.

Se imprimieron 20 micromatrices de 4×4 puntos en cada disco (**Figura 6**). Los discos se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con el fin de inmovilizar las bacterias o fagos por adsorción en la superficie de policarbonato (**Figura 5A2 y B2**). Transcurridas 16 h, los discos se lavaron con PBST y agua destilada y se secaron por centrifugación.

El protocolo de trabajo de los ensayos competitivos consistió en preparar diluciones seriadas ($0\text{-}10^8$ UFC/mL) de X10 como analito competidor, y de igual forma para X7, y de fago marcado con oro de 5 nm en PBST. Las disoluciones se dejaron incubar 5 min antes de dispensar $50\text{ }\mu\text{L}$ de cada dilución sobre la matriz. Transcurridos 20 min, el disco se lavó como antes. A continuación se dispensaron $50\text{ }\mu\text{L}$ de la disolución de revelado (silver enhancer A y B, 1:1 (v/v)) y se dejó incubar durante 8 min. La reacción se paró lavando la superficie con agua. La disolución de amplificación

genera un precipitado de plata (Ag^0) cuya densidad óptica está inversamente relacionada con la concentración de bacteria. Los DVDs se leyeron con un prototipo lector de discos compactos como se describe en Morais *et. al*, 2016. El principio de detección con un lector de DVD se basa en registrar la intensidad de luz reflejada por la capa metálica del disco por medio del fotodiodo del cabezal del grabador. Cualquier alteración de las propiedades ópticas del disco modifica la intensidad de luz reflejada por éste, atenuando la señal detectada por el fotodiodo. Esta atenuación de la señal reflejada se relaciona directamente con la concentración de analito, causante de la alteración de las propiedades del disco.

Los ajustes de las curvas sigmoideas se realizaron usando el modelo de regresión no lineal de 4 parámetros logísticos (4PL) con el programa SigmaPlot 11.0, proporcionando los valores de sensibilidad (IC50), intervalo de trabajo (IT) y límite de detección (LD) del ensayo.

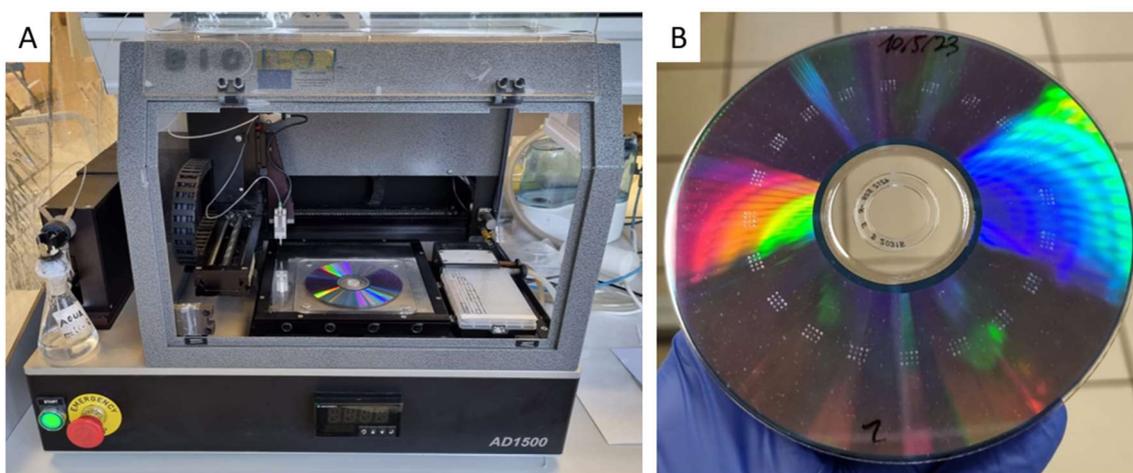


Figura 6. Preparación del disco compacto para ensayos en formato microarray. **(A)** Impresión de los biorreactivos con el BioDot. **(B)** Disco compacto con 20 micromatrices impresas con 16 puntos cada una.

El protocolo de ensayo en formato sándwich es similar al del ensayo competitivo en cuanto a tiempo de reacción y volúmenes de trabajo, salvo que se inmoviliza el fago en la superficie del disco y la detección se realiza en dos etapas **(Figura 5B)**.

3.3.6. Fabricación de tiras reactivas y ensayos de flujo lateral

La tira consta de cuatro partes principales: una almohadilla de celulosa a la que se le adiciona la muestra, una de fibra de vidrio impregnada con la disolución deshidratada del bacteriófago conjugado con las nanopartículas de oro, una almohadilla de nitrocelulosa en la que tendrá lugar el ensayo de reconocimiento y una última almohadilla de celulosa que absorbe la muestra, generando el flujo capilar por la tira (Parolo *et al.*, 2020). En este trabajo no se utilizó la membrana de fibra de vidrio.

En primer lugar, se realiza la impresión de los reactivos mediante el dispensador de biorreactivos de BioDot **(Figura 7A)**, en forma de líneas en la membrana de nitrocelulosa **(Figura 7B)**. Se probaron dos formatos de ensayo: sándwich y competitivo. Como línea de test se imprimió el bacteriófago P4 a 10^7 PFU/mL en tampón carbonato para el ensayo sándwich, y *Xanthomonas arboricola* X10 a 10^8 CFU/mL en tampón carbonato para el ensayo competitivo. En la línea control se dispensó inmunoglobulina G de conejo a una concentración de 1,0 mg/mL para ambos ensayos. Una vez impresa, la membrana de nitrocelulosa se incubó durante dos horas a 37 °C. El

conjugado de AuNPs-fago se resuspendió en tampón borato 20 mM pH 7,5; 5% de sacarosa y 0,5% Tween-20. Posteriormente, se ensambló la almohadilla celular y se cortó la lámina en tiras de 6 cm de largo por 3 mm de ancho.

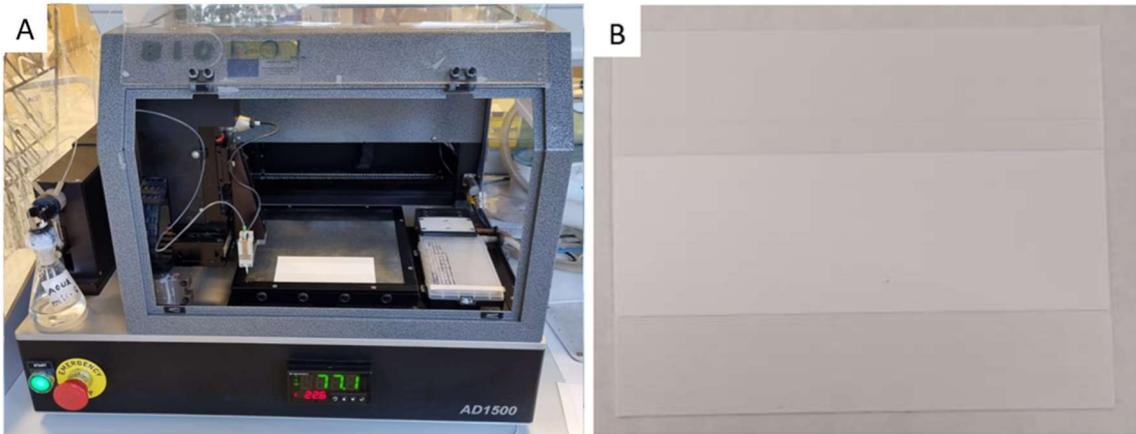


Figura 7. Fabricación de las tiras reactivas. **(A)** Inmovilización de los biorreactivos con el BioDot. **(B)** Membrana de nitrocelulosa sobre una lámina de cartón adhesiva.

4. Resultados y discusión

4.1. Cultivo, crecimiento y recuento bacteriano

Las bacterias del género *Xanthomonas arboricola* identificadas como X7 y X10 fueron cultivadas en medio LB líquido. Estas bacterias se cultivaron de forma rutinaria una vez por semana en condiciones de agitación a temperatura ambiente durante 24 h. Paralelamente, se utilizó una muestra de LB sin inóculo bacteriano a modo de control. La **Figura 8** muestra los cultivos de X7 y X10 (izquierda y derecha de la imagen, respectivamente) y el medio control (en el centro). Se observa claramente que los cultivos bacterianos presentan una mayor turbidez en comparación con el tubo control, el cual permanece transparente. Esta mayor turbidez revela un crecimiento correcto de las bacterias en condiciones específicas.

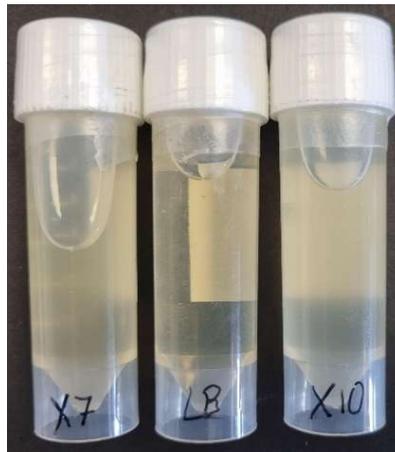


Figura 8. Cultivo de *Xanthomonas arboricola* X7 en medio LB; medio LB sin inocular y cultivo de *Xanthomonas arboricola* X10 (de izquierda a derecha, respectivamente).

Con el objetivo de estudiar el comportamiento y el patrón de crecimiento de *Xanthomonas arboricola* en condiciones específicas, las dos cepas bacterianas se cultivaron en medio líquido LB y se midió la OD_{600} de los cultivos cada dos horas. Los datos se muestran en la **Figura 9**. Se observa que se diferencian claramente las fases características de las curvas de crecimiento bacteriano. Ambos cultivos partieron de un cultivo bacteriano iniciador con una OD_{600} de 0,2. Transcurrida la primera hora y media del ensayo el crecimiento de las bacterias fue mínimo, correspondiendo este tiempo con la fase de latencia propia del inicio de crecimiento. En el caso de la cepa bacteriana X7, esta duración fue algo menor, lo cual indicaría una adaptación más rápida a las condiciones de cultivo. A partir de este momento y hasta las 14 horas del inicio de cultivo para X7 y las 12 para X10, se observa un marcado crecimiento de la población bacteriana, que se correspondería con la fase logarítmica de crecimiento. En este caso, la cepa X10 muestra un menor crecimiento, no solo es menor la duración de esta fase, sino que la pendiente obtenida es mucho menor, lo cual se traduce en un crecimiento más lento. En último lugar, se diferencia una etapa en la cual el crecimiento bacteriano se estabiliza, manteniéndose la densidad óptica estable en el tiempo. Esta fase estacionaria comienza en torno a las 15 horas del cultivo en ambos casos. Como se puede observar en la gráfica, la máxima densidad óptica alcanzada fue 0,2 u.a. para X7, es decir, una concentración aproximada de 10^8 CFU/mL, mientras que la densidad óptica máxima obtenida para X10 fue 0,15 u.a. que se corresponde con una concentración de $7,5 \cdot 10^7$ CFU/mL.

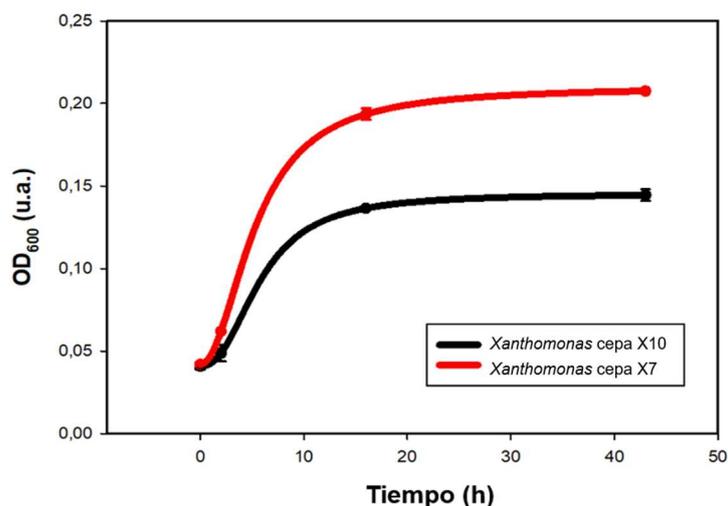


Figura 9. Curvas de crecimiento de *Xanthomonas arboricola* X7 y X10.

La monitorización del crecimiento del cultivo bacteriano permitió determinar el tiempo que requieren las bacterias para alcanzar el estado estacionario, lo cual tiene lugar en torno a las 14 horas de cultivo. Por ello, en los ensayos competitivos y sándwich se utilizaron los cultivos crecidos durante 24 horas. Se monitorizaron diversas curvas de crecimiento, lo cual permitió determinar que todos los cultivos presentaron la misma tendencia en cuanto al tiempo de cada etapa del crecimiento, obteniéndose valores máximos de OD₆₀₀ que oscilaron entre los 0,15 y 0,4 u.a.

A continuación, se llevaron a cabo ensayos de recuento de colonias en placa para determinar la concentración de bacterias presentes en las muestras, expresada en unidades formadoras de colonias por mililitro (CFU/mL). Estos ensayos permitieron corroborar los resultados obtenidos mediante la estimación de la concentración por espectrofotometría utilizando la medida de OD₆₀₀. Los resultados revelaron una relación proporcional y directa entre ambos métodos. La **Figura 10** muestra un ejemplo de los resultados obtenidos del cultivo en placa Petri de las bacterias utilizadas.

La **Figura 10A** muestra los resultados del cultivo de la bacteria X7, de la que se añadieron a la placa 100 µL de una dilución 1/10⁸. Se contaron 40 colonias, lo que indica una concentración de 4·10¹⁰ CFU/mL. En cuanto a la **Figura 10B**, se evaluó una dilución de X10 con una concentración inicial más baja, por lo que se analizó la placa correspondiente a la dilución 1/10⁶. En este caso, se contaron alrededor de 140 colonias a partir de 100 µL del cultivo añadido a la placa, lo que indica una concentración de 1,4·10⁹ CFU/mL. Por otro lado, las colonias presentaban una morfología circular con diámetros de entre 2 y 5 mm. Además, se observó que las colonias eran de color amarillento, viscosas y lisas, características típicas de las colonias obtenidas en el cultivo de bacterias pertenecientes al género *Xanthomonas* spp. (An *et al.*, 2020).

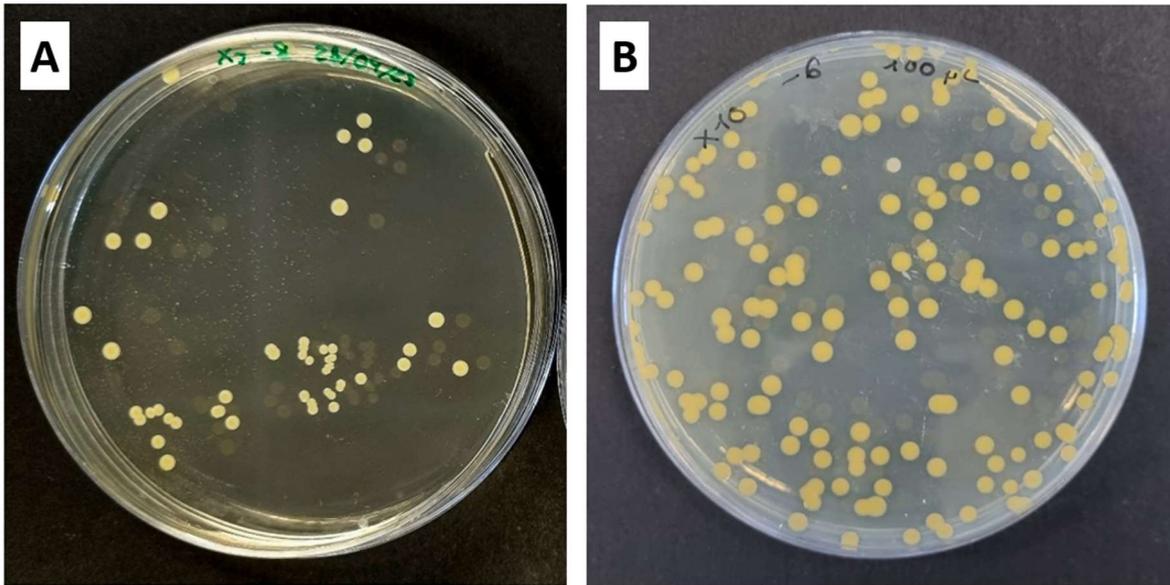


Figura 10. Imagen a las 48 horas de cultivo de *Xanthomonas arboricola* en medio LB en placa Petri. **(A)** cultivo de *Xanthomonas arboricola* X7 en medio LB con agar. **(B)** cultivo de *Xanthomonas arboricola* X10 en medio LB con agar.

4.2. Amplificación y recuento de bacteriófagos

Después de entender el patrón de crecimiento, los esfuerzos se centraron en producir suficiente cantidad de fago mediante un proceso de amplificación. Para ello, se utilizó el bacteriófago de *Xanthomonas arboricola* (P4) para infectar las cepas X7 y X10, como se describe en el apartado 3.2.2. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 11**.

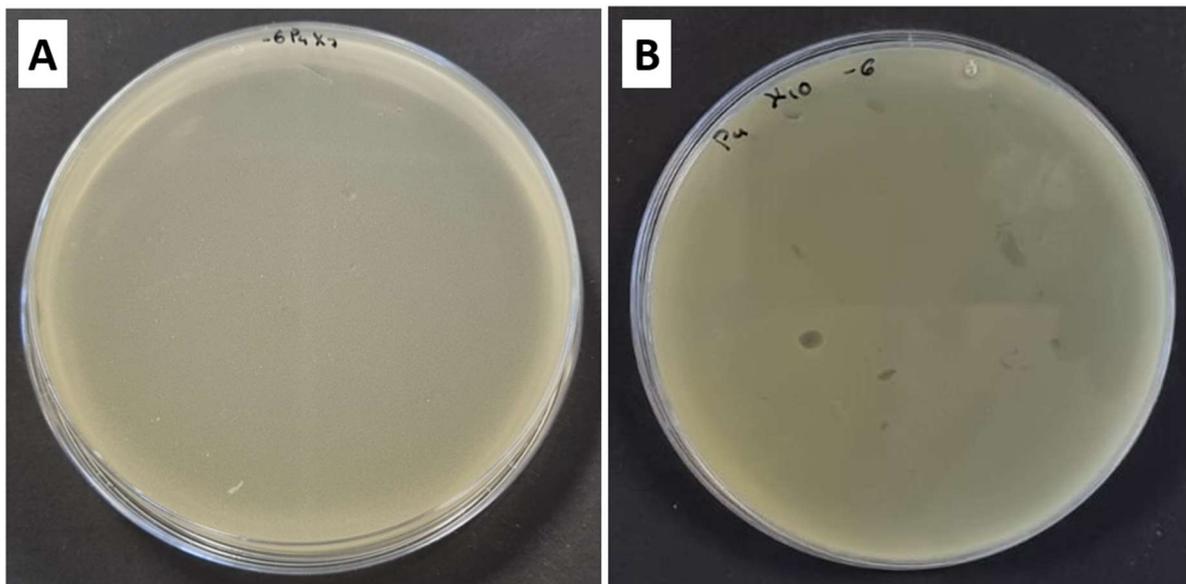


Figura 11. Imágenes de los resultados del ensayo de calvas a las 24 horas. **(A)** Césped bacteriano obtenido al cultivarse las *Xanthomonas arboricola* X7 junto con los bacteriófagos P4. **(B)** Césped bacteriano con aparición de calvas por infección y lisis de las *Xanthomonas arboricola* X10 por el bacteriófago P4.

Como se observa en la figura, en ambos casos se forma un césped bacteriano opaco como resultado del crecimiento de las bacterias. En la **Figura 11A**, se observa un crecimiento homogéneo de la bacteria X7 por toda la placa, mientras que en la **Figura 11B** se pueden identificar calvas debidas a la infección de la cepa X10 por parte del fago P4.

El ensayo de calvas permite determinar el título del fago a través del recuento de estas. Así, el título se obtiene como producto del número de calvas formadas (18 placas) por la inversa de la dilución empleada (10^6). Para este caso concreto, empleando 10 μL de disolución de fago, el título fue $1,8 \cdot 10^9$ PFU/mL.

La amplificación de los bacteriófagos es un proceso que dura 24 horas y que se puede evaluar cualitativamente mediante la observación de la turbidez del medio de cultivo. Para ello, se añadieron 15 μL del bacteriófago diluido a una concentración de $1 \cdot 10^8$ PFU/mL en medio LB con 15 μL de inóculo bacteriano a una concentración de $1 \cdot 10^8$ CFU/mL. Además, se empleó un control sin el inóculo bacteriano y con el fago (negativo de crecimiento) y uno sin el bacteriófago y con la cepa de *Xanthomonas arboricola* (positivo de crecimiento). Como se observa en la **Figura 12**, el medio del control positivo de crecimiento sin fago (derecha) se vuelve turbio durante la incubación, indicando que la bacteria ha crecido, mientras que el medio en el que se produce la amplificación, que cuenta con un inóculo bacteriano en presencia de bacteriófagos, se vuelve transparente con el tiempo, indicando que el fago infecta a las bacterias y las lisa. En este caso, el análisis visual de la turbidez del medio permitió evaluar posibles contaminaciones, el crecimiento bacteriano y la infección por el bacteriófago.

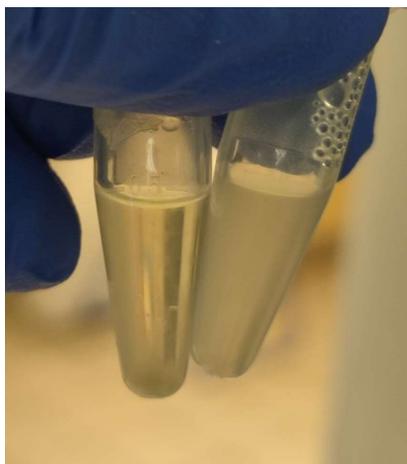


Figura 12. Amplificación del bacteriófago en medio LB con *Xanthomonas arboricola* X10 (izquierda) y medio LB con un inóculo bacteriano de *Xanthomonas arboricola* X10 (derecha) transcurridas 24 horas desde el inóculo.

4.3. Caracterización de las nanopartículas de oro

La caracterización de las nanopartículas de 20 nm de diámetro se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de transmisión o TEM y registrando su espectro de absorción. Las nanopartículas de 5 nm son comerciales por lo que estaban caracterizadas. La **Figura 13A** muestra una imagen TEM en la que puede observarse que las nanopartículas tienen forma esférica. La distribución de los diámetros de las nanopartículas de oro se muestra en la **Figura**

13B. El diámetro medio fue $18,5 \pm 3$ nm, con un coeficiente de variación del 16%. La nanopartícula más grande mostró un diámetro de 28,9 nm y la de menor tamaño de 11,3 nm; no obstante el 41,8% de las nanopartículas presentaron un diámetro comprendido entre 15,7 y 17,9 nm.

También se evaluó el espectro de absorción de las nanopartículas de oro sintetizadas midiendo la absorción en el intervalo de longitud de onda comprendido entre 350 nm y 800 nm (**Figura 13C**). Estas nanopartículas se caracterizan por presentar un pico de máxima absorbancia a 520 nm correspondiente al plasmón de superficie.

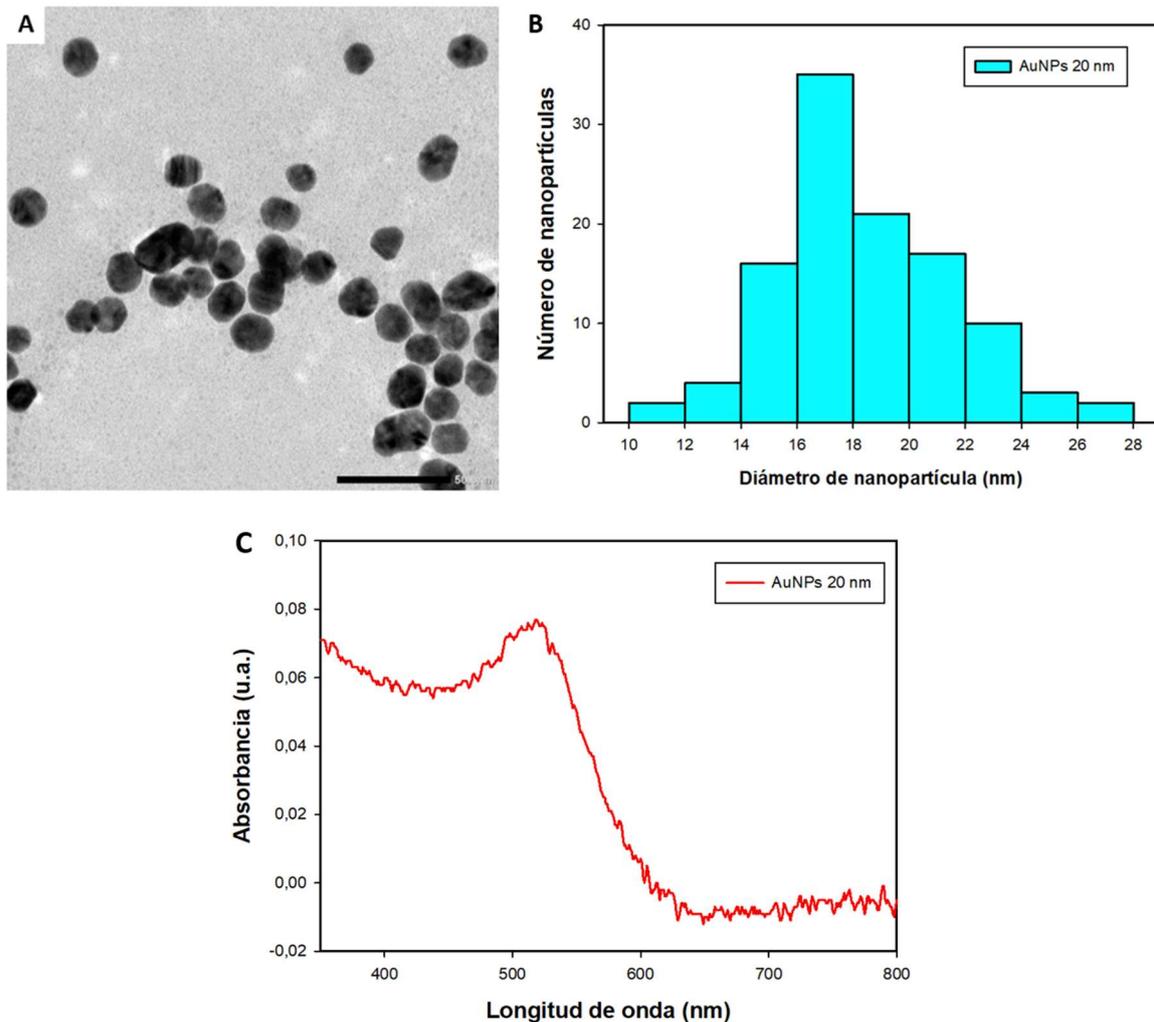


Figura 13. Caracterización de las nanopartículas de oro. **(A)** Imagen de las nanopartículas por el microscopio electrónico de transmisión (TEM). **(B)** Histograma de la distribución de los diámetros de las nanopartículas. **(C)** Espectro de absorción de las nanopartículas de oro, registrando un pico a una longitud de onda de 520 nm.

4.4. Caracterización de los conjugados Au-fago

En este estudio, se llevó a cabo la caracterización de los conjugados de nanopartículas de oro con bacteriófagos. Se analizó el efecto sobre la estabilidad del conjugado de la adición de diferentes concentraciones de bacteriófago: 10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 y 10^1 .

PFU/mL. El fago a concentración 10^{10} PFU/mL se encuentra en medio LB y las diluciones se realizaron en PBS. Como se observa en la **Figura 14A**, emplear fago a 10^{10} PFU/mL en medio LB directamente, provocaba que la disolución adquiriera una tonalidad morada más oscura que al diluirlo previamente en tampón PBS, mientras que los demás conjugados mantenían la tonalidad roja característica de las nanopartículas de oro. Esto es debido a que ambos medios son ricos en cloruro sódico y el ion sodio tiene mucha afinidad por el citrato presente en la capa estabilizante de las partículas de oro (**Figura 14A**). El ion sodio desplaza la capa de citrato haciendo que las nanopartículas empiecen a unirse entre sí, formando agregados de gran tamaño. Ello causa un desplazamiento en el pico de plasmón de 520 nm a 600 nm (**Figura 14B**). Este fenómeno ya ha sido descrito en la literatura, y de hecho se usa en el test de agregación de oro (GAT), método usado para optimizar el procedimiento de conjugación de AuNPs con anticuerpos (Parolo *et al.*, 2020). Es importante destacar que los demás conjugados se prepararon con diluciones del fago en PBS, tampón con un contenido elevado de cloruro sódico (8 g/L). Si bien es cierto que en comparación con el medio LB (10 g/L), el tampón PBS no causó una agregación instantánea de las AuNPs. Los conjugados preparados en estas condiciones se agregaron a las horas de ser almacenados a 4 °C.

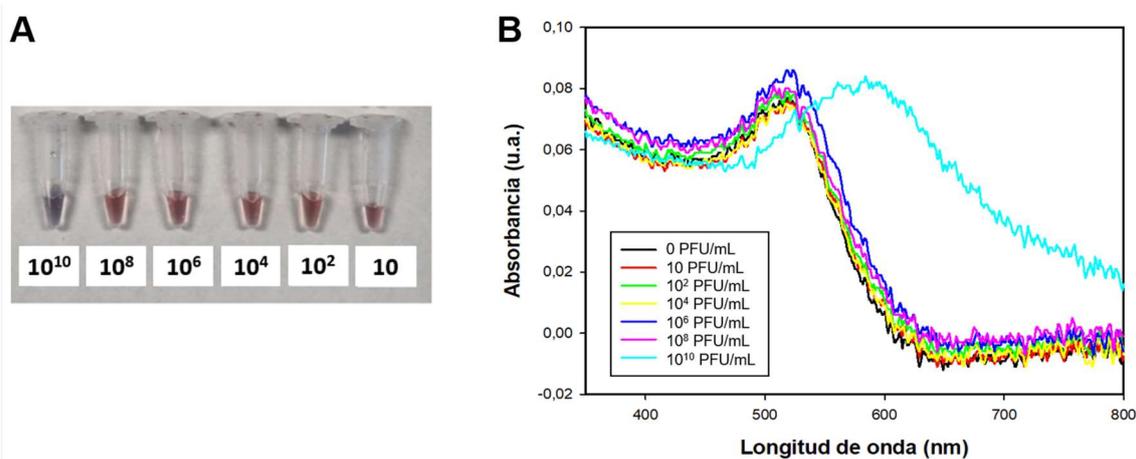


Figura 14. Análisis de la estabilidad del conjugado a diferentes concentraciones de bacteriófago. **(A)** Fotografía a la media hora de conjugar las nanopartículas de oro con diferentes concentraciones de bacteriófago en PFU/mL. **(B)** Espectros de absorbancia de los conjugados, con un desplazamiento del pico de plasmón de 520 a 600 nm al añadir 10^{10} PFU/mL.

Para evitar la agregación, se cambió el medio de disolución de los bacteriófagos al tampón fosfato (PB) sin la presencia de cloruro sódico. Además, la resuspensión final del conjugado se llevó a cabo en tampón borato. Como resultado de este cambio, el conjugado era estable, evitando agregaciones detectables durante un mínimo de tres semanas. Como se muestra en la **Figura 15**, al añadir 100 μ L de bacteriófago con un título viral de 10^9 PFU/mL en medio LB se produce un inmediato cambio de color del conjugado a morado, mientras que, si se añade el mismo volumen en PB, se mantiene en el color rojo característico de las nanopartículas de oro de 20 nm.

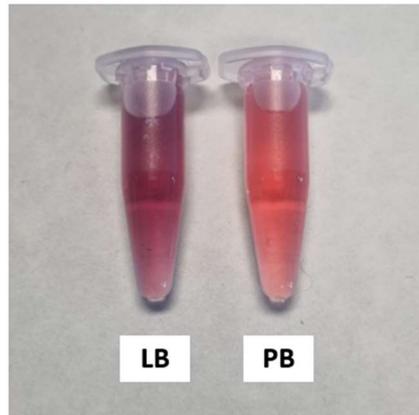


Figura 15. Comparativa del conjugado obtenido al partir del bacteriófago en medio de cultivo LB y en tampón fosfato (PB).

Una característica de las nanopartículas de oro es el espectro de absorción que se registra al medir el espectro ultravioleta visible. Cuando las nanopartículas se conjugan se produce un desplazamiento del pico de plasmón desde una longitud de onda de 520 nm a 530 nm. Por ello, se procedió a analizar el espectro de las nanopartículas de oro de 20 nm y se comparó con el espectro obtenido con el conjugado. Los resultados se muestran en la **Figura 16**.

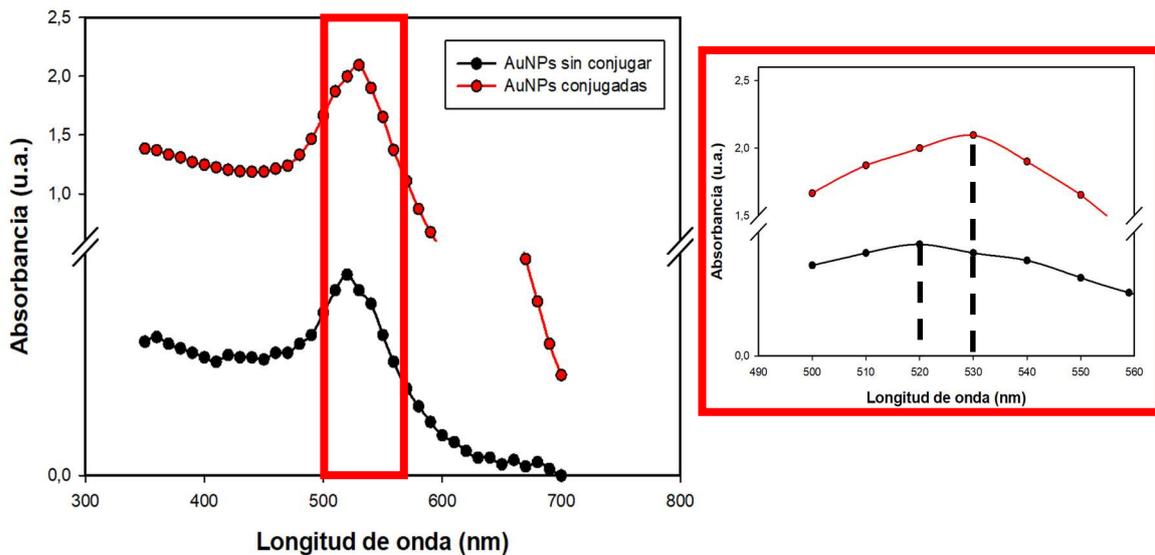


Figura 16. Espectro de absorción de las nanopartículas de oro de 20 nm y del conjugado de las nanopartículas de oro con el bacteriófago.

Para corroborar que la conjugación fue correcta se empleó el microscopio electrónico de transmisión (TEM) para observar los bacteriófagos marcados. La **Figura 17** muestra las imágenes obtenidas. Los bacteriófagos presentan una cápside en torno a 50 nm de anchura y una cola con una longitud aproximada de 150 nm.

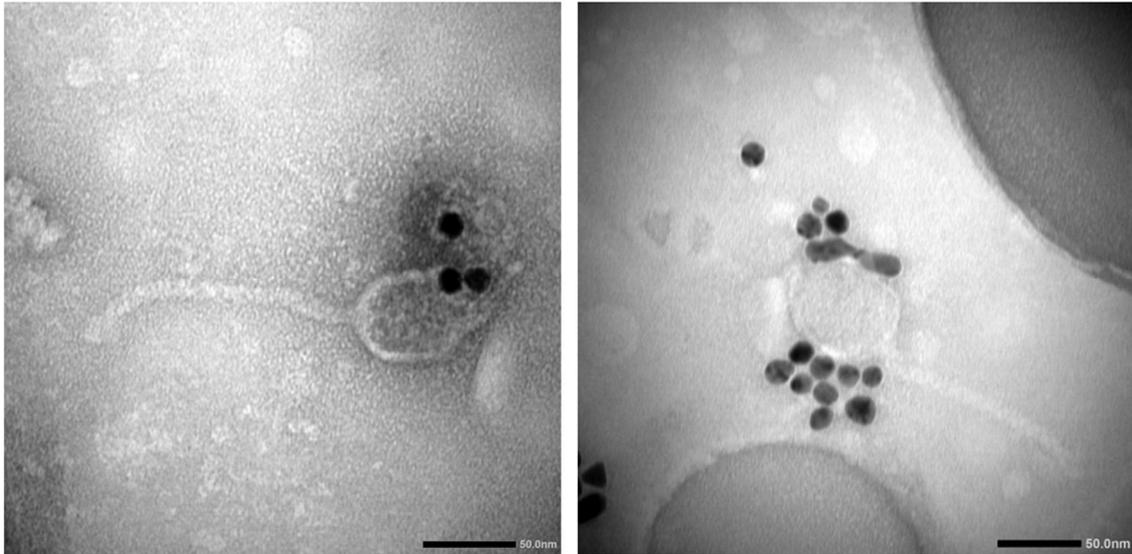


Figura 17. Imágenes obtenidas mediante el microscopio electrónico de transmisión de los conjugados de nanopartículas de oro y bacteriófagos .

En las muestras que se estudiaron se pudo observar que las nanopartículas de oro establecían interacciones principalmente con las proteínas de la cápside, dejando la cola libre de nanopartículas. Puesto que los bacteriófagos reconocen la bacteria a través de las fibras proteicas de la cola, la unión de las AuNPs parece que no impide su interacción con ésta.

La imagen de la derecha muestra un conjugado producido a partir de bacteriófagos en medio LB y diluidos en PBS, por lo que también puede apreciarse una pequeña agregación de nanopartículas de oro en torno a la superficie del virus.

El conjugado de oro se caracterizó mediante la determinación del potencial Zeta. Este potencial es una propiedad física, una magnitud de atracción o repulsión de carga entre las partículas, exhibida por cualquier partícula en suspensión. Se evaluó el potencial Zeta de las AuNPs de 20 nm solas, los bacteriófagos solos y el conjugado de AuNPs con la partícula viral. Los resultados mostrados en la **Figura 18** muestran diferencias en la intensidad del campo para cada partícula. Las nanopartículas de oro en solución presentaron un potencial Zeta de -57 mV. Esta carga negativa es consecuencia de los iones de citrato que se encuentran unidos a las nanopartículas estabilizando su superficie. La carga del bacteriófago se encuentra próxima a la neutralidad, con un potencial Zeta de -7 mV. Esto indica que el fago presenta en su superficie proteínas con carga positiva y negativa que dan como resultado una carga general ligeramente negativa de la partícula viral. Por lo que respecta al conjugado, el valor obtenido en este caso fue de -45 mV. Este valor es un poco más positivo que el de las AuNPs y más negativo que los bacteriófagos. La disminución en el potencial Zeta del conjugado indica que los bacteriófagos se han adsorbido a la superficie de las AuNPs, por lo que la conjugación ocurre satisfactoriamente.

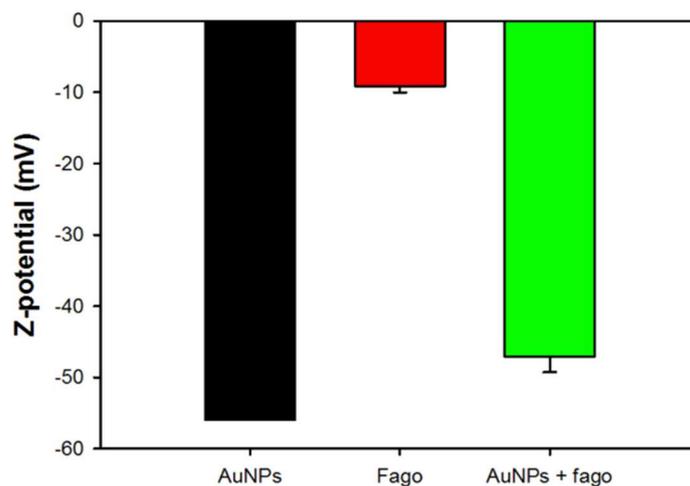


Figura 18. Evaluación del potencial eléctrico de las nanopartículas de oro, del bacteriófago y del conjugado mediante la medida del potencial Zeta/.

Finalmente, se llevó a cabo un ensayo de calvas para evaluar la estabilidad e infectividad del bacteriófago marcado con oro. Este conjugado se preparó utilizando el bacteriófago a una concentración de 10^{10} PFU/mL, siendo la concentración en el conjugado de $5 \cdot 10^8$ PFU/mL y, considerando que el factor de concentración fue 2, la concentración final de bacteriófago fue $1 \cdot 10^9$ PFU/mL. La **Figura 19** muestra la formación de un césped bacteriano y la aparición de calvas. En este ensayo se contabilizaron 14 calvas. Así pues, considerando la dilución realizada (10^6) y teniendo en cuenta que para la titulación de fagos se emplearon $10 \mu\text{L}$, el título obtenido fue $1,4 \cdot 10^9$ PFU/mL, muy próximo a la concentración estimada de $1 \cdot 10^9$ PFU/mL. lo cual indica la conservación de la capacidad infectiva del virus y sugiere que las nanopartículas de oro no impiden el reconocimiento de la bacteria.



Figura 19. Imagen del resultado del ensayo de calvas.

4.5. Ensayo en disco compacto en formato de microarray

En este estudio se probaron diferentes condiciones que afectaban tanto al tampón de impresión como a la cepa bacteriana utilizada. La **Figura 20** se muestra una gráfica que compara las señales obtenidas al inmovilizar 10^7 , 10^6 y 10^5 CFU/mL de la cepa X10, utilizando tampón PBS (10 mM, pH 7.4) y tampón carbonato (0.1 M, pH 9.6). En todos los casos se utilizó el conjugado para el reconocimiento de las bacterias: AuNPs-P4 a una dilución 1/10. Se observa que las señales analíticas registradas fueron significativamente más altas al inmovilizar las bacterias en tampón carbonato en comparación con el tampón PBS. Por ejemplo, para una concentración bacteriana de 10^7 CFU/mL, la señal obtenida en carbonato fue de 14000 u.a. mientras que en el caso de la inmovilización en PBS se registraron 8500 u.a. Debido a este motivo, se seleccionó inicialmente el tampón carbonato para llevar a cabo los ensayos.

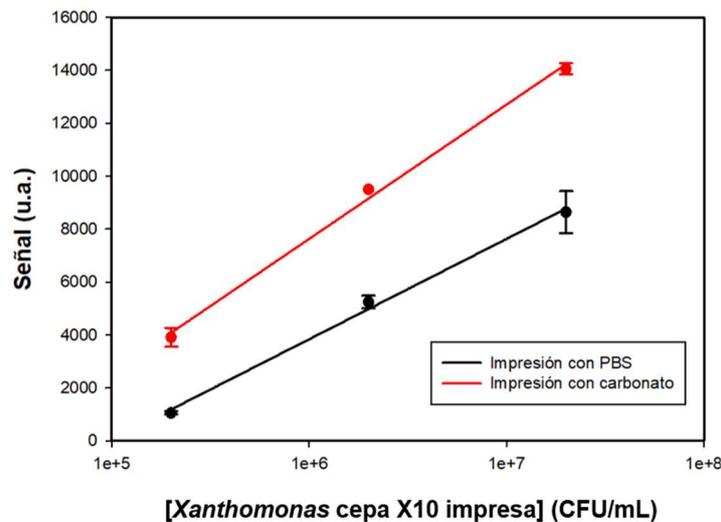


Figura 20. Comparativa de señales obtenidas en el ensayo al inmovilizar bacterias *Xanthomonas arboricola* cepa X10 a diferentes concentraciones con tampón PBS y carbonato.

Las mayores señales obtenidas al emplear el tampón carbonato probablemente son consecuencia de su mayor pH, favoreciendo las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas laterales de los aminoácidos y la superficie de policarbonato del disco.

A continuación, se evaluaron las diluciones del conjugado y su efecto sobre la capacidad de detección del fitopatógeno. Estos resultados se muestran en la **Figura 21**. Se probaron 3 diluciones diferentes del conjugado con bacteriófagos a 10^8 PFU/mL en el tampón de resuspensión: 1/10, 1/20 y 1/40. Además, se utilizaron tres concentraciones de bacteria X10 en tampón carbonato: 10^7 , 10^6 y 10^5 CFU/mL. En todos los casos, se observó una relación positiva entre la señal registrada y el aumento de la concentración de bacterias inmovilizadas. Del mismo modo, concentraciones de conjugado más altas también resultaron en señales más intensas, evidenciando una relación dosis-respuesta. La dilución 1/40 mostró las señales más bajas en todos los casos: 10000 u.a., 4000 u.a. y 2000 u.a. para las concentraciones de bacterias 10^7 , 10^6 y 10^5 CFU/mL, respectivamente. Por otro lado, la dilución 1/10 generó las señales más altas (14000 u.a., 9500 u.a. y 4000 u.a.). Aunque la señal analítica para la concentración más baja de X10 fue similar entre la dilución 1/10 y la 1/20 (4000 u.a.), en los demás casos fue considerablemente superior. Al analizar las rectas obtenidas para cada dilución (1/10: $y=2203,9\ln(x)-22335$; 1/20: $y=1908\ln(x)-19527$; y 1/40: $y=1708,7\ln(x)-18503$), se puede concluir

que la dilución 1/10 también mejora significativamente la sensibilidad del ensayo en comparación con las otras diluciones estudiadas, con un aumento de hasta un 22% en la sensibilidad en relación a la dilución 1/40. Esta mayor sensibilidad es consecuencia de una mayor concentración del bacteriófago en el conjugado. Esta clara relación de dosis-respuesta, confirma un reconocimiento específico entre el fago y la bacteria.

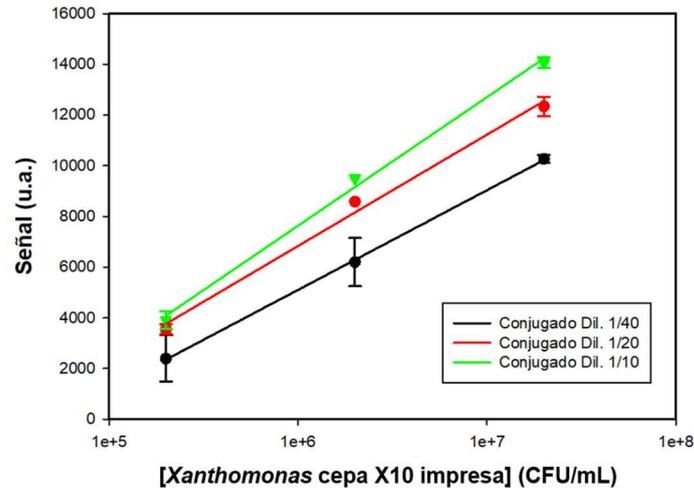


Figura 21. Comparación de las señales registradas con diferentes concentraciones de conjugado sobre diferentes concentraciones de bacterias *Xanthomonas arboricola* cepa X10 inmovilizadas en tampón carbonato.

Por otra parte, se realizó un ensayo para comprobar si los conjugados producidos mediante la adición de fago en tampón PB, generaban señales más elevadas que los conjugados con fago en LB. Como se ha observado en la optimización del conjugado, los conjugados obtenidos a partir de bacteriófagos en medio LB resultaron ser más inestables. Además, como se muestra en la **Figura 22**, con estos conjugados se obtuvieron señales mucho más bajas en cualquier dilución del conjugado (1/10, 1/20 y 1/40). Esto se debe a que, para evitar esa inestabilidad, el conjugado se preparó utilizando 5 µl del bacteriófago a una concentración de 10⁶ PFU/mL en medio LB. Sin embargo, si el fago se encontraba en tampón PB, se pudo añadir 5 µl de una concentración de 10¹⁰ PFU/mL. De esta manera, el uso del conjugado en PB permite aumentar las señales registradas. Sorprendentemente, incluso la dilución más baja en este medio (1/40) logró obtener señales analíticas de 10000 u.a., lo cual es comparable a las intensidades de señales del conjugado más concentrado en el medio LB (1/10).

También se llevó a cabo un estudio comparativo para evaluar las diferencias en las señales registradas al inmovilizar concentraciones de 10⁷, 10⁶ y 10⁵ CFU/mL de *Xanthomonas arboricola* cepas X7 y X10 en tampón carbonato. Los resultados obtenidos se presentan en la **Figura 23**. Se utilizó el conjugado con un título viral de 10⁸ PFU/mL a una dilución 1/10 en tampón de resuspensión, y se observaron señales más altas a medida que se incrementaba la concentración de bacterias impresas. Es importante destacar que las señales fueron más elevadas en todos los casos cuando se realizaron los ensayos inmovilizando la cepa de *Xanthomonas arboricola* X7, alcanzándose un máximo de 16000 u.a., en comparación con el máximo de 14000 u.a. registrado para la cepa X10. Estos resultados sugieren que el bacteriófago presenta una ligera mayor afinidad por la cepa X7.

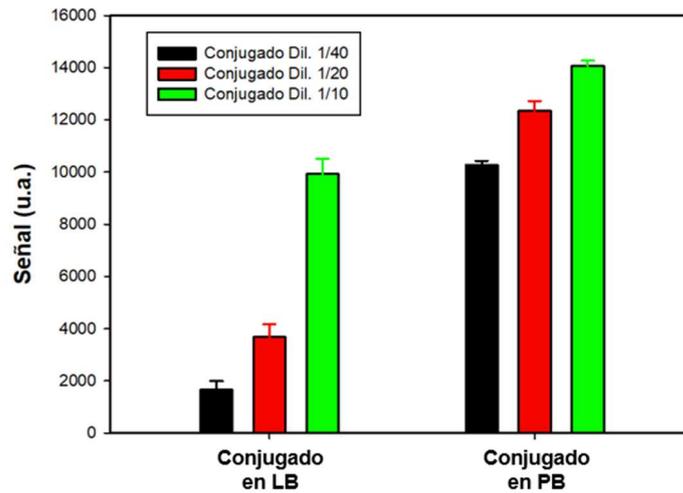


Figura 22. Señales analíticas obtenidas en el ensayo directo inmovilizando *Xanthomonas arboricola* X10 en disco compacto a 10^7 CFU/mL, con distintas diluciones de conjugado preparado a partir de bacteriófago en medio LB y en tampón PB.

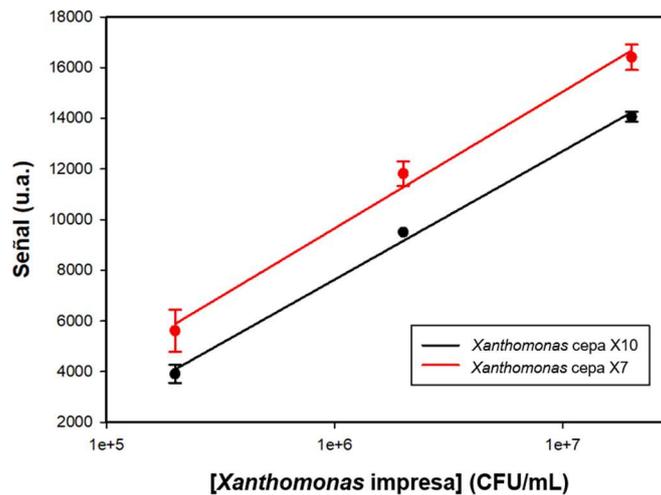


Figura 23. Comparativa de señales obtenidas con el conjugado 1/10 para diferentes concentraciones de bacterias *Xanthomonas arboricola* cepa X7 y X10 inmovilizadas en tampón carbonato.

Con el objetivo de determinar si la señal obtenida se debía a interacciones no específicas entre las AuNPs del conjugado con las bacterias presentes en la muestra, se realizó un ensayo comparativo en el que se evaluó la señal obtenida en presencia y ausencia de bacteriófago en el conjugado. En ambos casos el conjugado se bloqueó con una disolución de BSA al 10% en tampón PB. Se inmovilizaron $2 \cdot 10^7$ CFU/mL de bacteria X7 en tampón carbonato y PBS en el disco, utilizando conjugado con bacteriófago a un título de 10^8 PFU/mL y otro sin virus. Puesto que se trata de un ensayo competitivo, en ausencia de bacteria en la muestra se esperan señales más altas ya que el bacteriófago del conjugado interactuará con la bacteria inmovilizada. Los resultados obtenidos, como se muestran en la **Figura 24**, revelan que la señal al utilizar el conjugado sin bacteriófago (sólo con BSA) se mantiene muy alta, en valores cercanos a 5000 u.a., cuando se emplea el tampón carbonato. Esto indica una mayor cantidad de interacciones no específicas entre las nanopartículas de oro y las bacterias inmovilizadas. Por otro lado, al utilizar PBS, también se registraron señales, pero fueron más bajas, con un máximo de 3000 u.a.

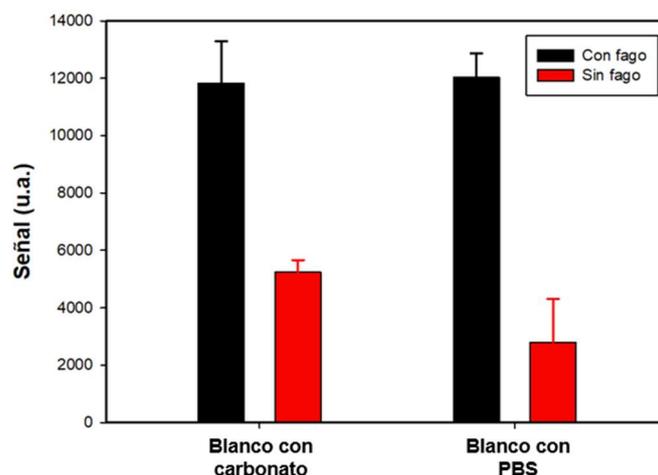


Figura 24. Señales analíticas registradas en disco compacto con bacterias inmovilizadas con tampón carbonato y con PBS empleando conjugado con y sin bacteriófago en ausencia de fitopatógeno en la muestra.

Estas señales son el resultado de un bloqueo incompleto de la superficie de las AuNPs con BSA, lo que provoca su interacción con otras sustancias biológicas, como proteínas que podrían estar presentes en la superficie de las membranas de las bacterias inmovilizadas. Sería necesario optimizar el proceso de bloqueo del conjugado, de tal manera que todas las AuNPs estén bloqueadas, con el fin de eliminar por completo las señales no específicas.

Dado que la impresión con tampón PBS generó menos señales inespecíficas, se procedió a trabajar en estas condiciones. Así, el ensayo comparativo entre conjugado con fago y sin fago se realizó esta vez analizando la cepa X10 a una concentración de 10^7 CFU/mL. Para ello, se utilizó el conjugado de nanopartículas de oro con bacteriófago (10^8 PFU/mL) y un conjugado control bloqueado únicamente con un 10% de BSA en tampón PB. Al analizar los resultados, se observó una disminución del 91% en la señal analítica al detectar la cepa X10 a 10^7 CFU/mL (**Figura 25, verde oscuro**). Sin embargo, las señales del conjugado control no fueron significativamente diferentes (**Figura 25, verde claro**). Esto indica que el fenómeno de competición solo ocurre en presencia de bacteriófagos, y por tanto los resultados de competición son válidos y específicos.

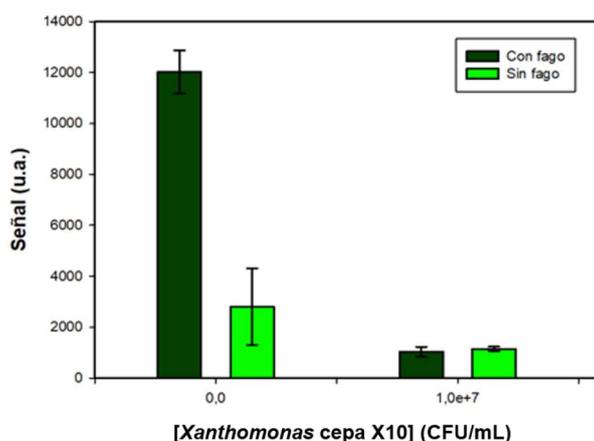


Figura 25. Comparación del ensayo competitivo utilizando un conjugado del bacteriófago con nanopartículas de oro y un conjugado control en el análisis de diferentes concentraciones de *Xanthomonas arboricola* X10 en las muestras.

Una vez establecido que el formato de ensayo competitivo funcionaba correctamente, se procedió a la realización de curvas de calibrado con diluciones seriadas de la cepa X7 (0 a 10^8 CFU/mL), usando discos con la cepa X7 impresa a $2 \cdot 10^7$ y $4 \cdot 10^7$ CFU/mL. Se observa para ambos casos una relación inversamente proporcional entre la señal analítica generada y la concentración de bacteria analizada (**Figura 26**). Las señales analíticas en ausencia de bacteria son similares (4700 y 3900 u.a.) y disminuyen a valores cercanos a 0 u.a. a una concentración de 10^8 CFU/mL.

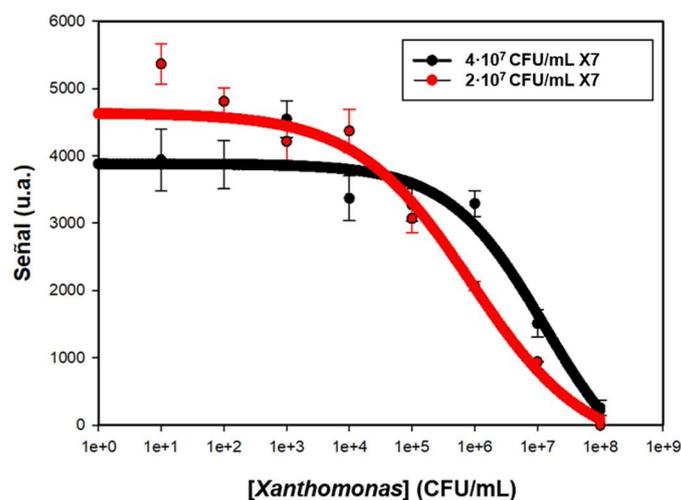


Figura 26. Curvas de calibrado del ensayo competitivo en disco compacto para concentraciones $2 \cdot 10^7$ y $4 \cdot 10^7$ CFU/mL de X7. Se muestran las regresiones logísticas de 4 parámetros (4PL).

De manera interesante, se aprecia como el rango dinámico de las curvas varía cuando se inmovilizan diferentes concentraciones de bacteria. En el caso de los discos funcionalizados con $2 \cdot 10^7$ CFU/mL, se obtiene un rango dinámico lineal de 10^4 hasta 10^8 CFU/mL, con un IC₅₀ (concentración que genera la mitad de la máxima señal) de $1,5 \cdot 10^6$ CFU/mL. En el caso de la inmovilización de $4 \cdot 10^7$ CFU/mL, el rango dinámico de la curva se estrecha, y va desde los 10^6 hasta las 10^8 CFU/mL y su IC₅₀ aumenta a $8 \cdot 10^6$ CFU/mL. Por lo tanto, al inmovilizar una menor concentración de bacteria la sensibilidad del ensayo mejora en dos ordenes de magnitud, consiguiendo un límite de detección de 10^4 CFU/mL.

Posteriormente, se compararon las curvas de calibrado para ensayos competitivos, evaluando el efecto de realizar ensayos homólogos y heterólogos. Los ensayos homólogos se basan en la inmovilización de una cepa bacteriana y la detección de la misma cepa inmovilizada, mientras que los ensayos heterólogos consisten en la detección de una cepa diferente a la inmovilizada. La **Figura 27** muestra las 4 curvas de calibrado resultantes de este análisis. Las curvas muestran dos tendencias dependiendo de si se inmoviliza X10 o X7. Estas diferencias se deben a las diferentes afinidades que el bacteriófago presenta por cada una de las bacterias, habiendo mostrado una mayor afinidad por la cepa X7.

En los ensayos donde se inmovilizó X7, se obtuvieron resultados de peor sensibilidad (regresión negra y roja). En el ensayo homólogo, el rango dinámico fue de 10^4 a 10^8 CFU/mL y en el ensayo heterólogo, fue de 10^4 a 10^7 CFU/mL. Las IC₅₀ obtenidas fueron de $1,5 \cdot 10^6$ CFU/mL y $3 \cdot 10^6$ CFU/mL, respectivamente. Sin embargo, en los ensayos en los que se inmovilizó la cepa X10, se obtuvo una mayor sensibilidad. En este caso, el ensayo heterólogo presentó un rango dinámico comprendido entre 10^2 y 10^5 CFU/mL, con una IC₅₀ de 10^4 CFU/mL, mientras que el ensayo

homólogo, mostró un rango dinámico de 10^3 a 10^5 CFU/mL, con una IC50 de $9 \cdot 10^3$ CFU/mL. Al comparar los resultados, se observa que la inmovilización de X10 permite reducir el límite de detección en varios órdenes de magnitud. En concreto, el ensayo más sensible fue el heterólogo con la cepa X10 inmovilizada, con un límite de detección (calculado como el 10% de la señal máxima) de 10^3 CFU/mL, en comparación con 10^4 CFU/mL obtenido con el ensayo homólogo.

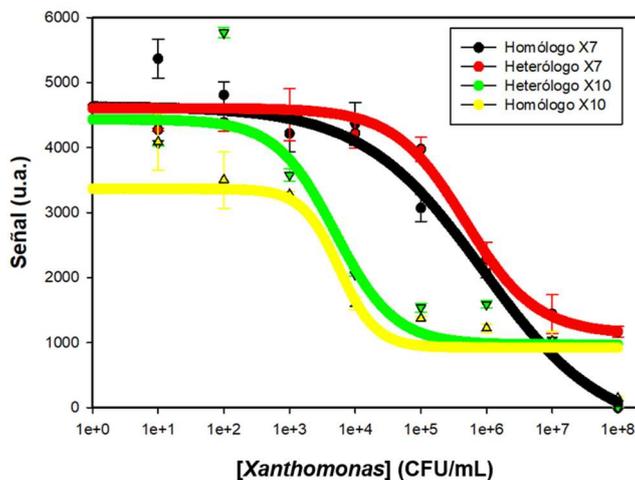


Figura 27. Comparativa de las curvas de calibrado de los ensayos competitivos en disco compacto en formatos homólogos y heterólogos con las cepas bacterianas *Xanthomonas arboricola* X7 y X10. Se muestran las regresiones logísticas de 4 parámetros (4PL).

Esta mejor competición al inmovilizar X10 para detectar X7 se debe a que el conjugado tiene una mayor afinidad por la bacteria diana en disolución que por la inmovilizada. Del mismo modo, las condiciones menos favorables son aquellas en las que se inmoviliza la cepa X7, ya que, al tener el fago una mayor afinidad por esta cepa, requeriría una concentración de bacterias en disolución mayor en la muestra. En este sentido, los mejores resultados son los que se obtienen del ensayo competitivo heterólogo inmovilizando X10 en el disco para detectar la cepa X7, mientras que para la detección de la cepa X10, el ensayo homólogo, inmovilizando X10 proporciona los mejores resultados de sensibilidad.

Una vez exploradas las prestaciones del ensayo competitivo, se procedió a evaluar el formato de ensayo sándwich. Para ello, se inmovilizó fago a dos concentraciones (10^9 PFU/mL y 10^{10} PFU/mL) y se realizaron los ensayos sándwich, utilizando diluciones seriadas de bacteria X10 y X7 (0 a 10^8 CFU/mL), y diluciones del conjugado de fago marcado con oro (1/2, 1/4, 1/10 y 1/20). En ninguna de las condiciones estudiadas se obtuvo señal analítica específica.

4.6. Ensayo de flujo lateral (LFA)

Después de estudiar la detección de bacterias fitopatógenas utilizando el ensayo de disco en formato competitivo, se procedió a desarrollar el ensayo de flujo lateral o LFA. En este sentido, lo primero que se realizó fueron ensayos directos en donde se inmovilizó en la línea de test la bacteria X7 a la máxima concentración posible (10^8 CFU/mL), y se evaluaron diluciones 1/5, 1/8 y 1/20 del conjugado AuNPs-fago (preparado con 10^8 PFU/mL de fago). Como se muestra en la **Figura 28**, al analizar las tiras reactivas de manera cuantitativa con el software Image J, se observó una relación dosis-respuesta, consiguiendo un incremento en la señal analítica de hasta un 60% al realizar el ensayo con el conjugado más concentrado (dilución 1/5 o 0,20). Por otra

parte, las señales colorimétricas obtenidas tenían una intensidad adecuada para ser observadas por inspección visual directa. Con todo ello, se concluye que los fagos tienen la capacidad para reconocer bacterias inmovilizadas en cuestión de segundos, por lo que son compatibles con este método analítico.

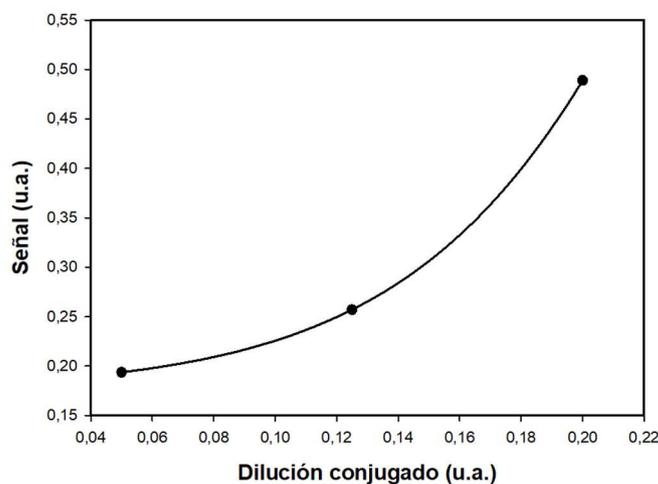


Figura 28. Señales analíticas obtenidas en un ensayo directo de LFA realizado con diluciones 1/20 (0,05), 1/8 (0,12) y 1/5 (0,20) de conjugado.

De este modo, se procedió a la realización del ensayo competitivo. Para ello, se prepararon tiras reactivas con la bacteria X7 impresa en la línea de test a 10^8 CFU/mL y el anticuerpo IgG de conejo impreso en la línea de control a 1,0 mg/mL. Se analizó la señal analítica obtenida en la línea de test y control al interrogar las tiras con muestras con 0, 10^5 y 10^8 CFU/mL de bacteria X10 en PBST, usando diluciones del conjugado (1/5, 1/8 y 1/20). Al tratarse de un ensayo competitivo, el objetivo era determinar qué dilución de conjugado era la óptima para alcanzar la mayor sensibilidad analítica. Tal y como se observa en la **Figura 29A**, la dilución de conjugado 1/5 (0,20) y 1/20 (0,05) no son apropiadas para el ensayo competitivo ya que no se aprecian diferencias de señal en la línea de test cuando se analizan muestras con ausencia o presencia de la cepa X10. Sin embargo, con la dilución 1/8 (0,12) se observa a simple vista una disminución en la intensidad de señal en la línea de test al analizar muestras con concentraciones crecientes de la cepa X10. Con el fin de obtener datos cuantitativos, se procedió al análisis de las intensidades de señal de dichas tiras reactivas mediante el software Image J. Para una mejor comparativa entre las diferentes condiciones de ensayo, y dado que las tiras reactivas no quedaron limpias del todo, se procedió a restar la señal de fondo a la intensidad de señal de la línea de test. Además se realizó una normalización de las señales analíticas, estandarizando la señal máxima a 1, y la mínima a 0. Con todo ello, se observó claramente que al usar las diluciones de conjugado 0,20 y 0,05, la intensidad de señal generada en la línea de test es ligeramente superior cuando se detecta la cepa X10 a 10^8 CFU/mL, lo cual es indicativo de que dichas diluciones no favorecen la competición. Por el contrario, la dilución 1/8 (0,125) permite un descenso en la intensidad de señal del 80% cuando se detecta la cepa X10 a 10^8 CFU/mL en comparación con el análisis de una muestra con 0 CFU/mL (**Figura 29B**). Por otra parte, es interesante destacar que la generación de señal en las líneas de control indica que el ensayo se ha realizado correctamente y que el conjugado ha fluido de manera satisfactoria a lo largo de la tira reactiva. Por lo tanto se puede concluir que las diferencias de intensidad de señal en la línea de test son específicas de la interacción de los fagos con las bacterias y no están relacionadas con una variabilidad en el

ejecución del ensayo. Cabe destacar que, a diferencia de lo esperado, la intensidad de señal en la línea de control no es constante y disminuye ligeramente si se analiza una mayor concentración de bacteria. Esto se debe a un efecto matriz causado por la complejidad del medio de cultivo de la bacteria analizada, siendo más evidente la disminución de señal en la línea de control cuando se añade dicho medio de cultivo a la tira sin diluir (cepa X10 a 10^8 CFU/mL). Este fenómeno podría invitar a pensar que la disminución de la intensidad de señal en la línea de test se debe también al efecto matriz de la muestra y no la especificidad propia del ensayo competitivo. Sin embargo, tal y como se observa en la **Figura 29B**, las intensidades de señal generadas en la línea de test al analizar el medio de cultivo sin diluir (10^8 CFU/mL) fueron ligeramente superiores que al analizar PBST (0 CFU/mL). Por lo tanto, se concluye que, por una parte, las señales generadas en la línea de test no son susceptibles de estar influenciadas por el efecto matriz de la muestra, y por otra parte, se debe incrementar la concentración de IgG de conejo en la línea de control con el fin de superar la limitación del efecto matriz.

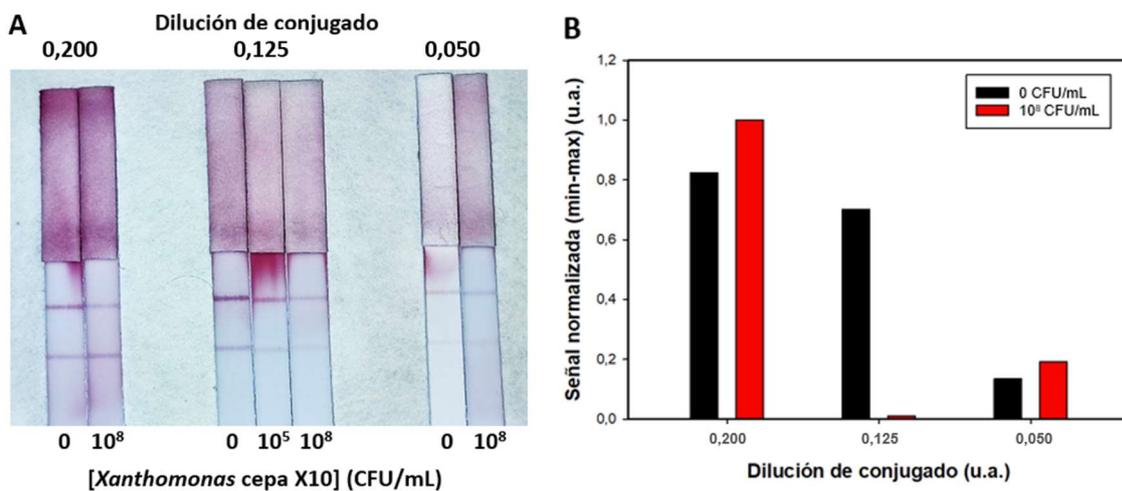


Figura 29. Optimización de la concentración de conjugado en los ensayos competitivos de LFA. **(A)** Foto de las tiras reactivas tomada 10 minutos después de realizar los ensayos competitivos para la detección de diferentes concentraciones de la cepa X10 usando diluciones de conjugado 1/20 (0,050), 1/8 (0,125) y 1/5 (0,200). **(B)** Análisis cuantitativo realizado mediante Image J, de la intensidad de señal normalizada generada en la línea de test para cada condición de ensayo competitivo..

La **Figura 30** muestra los valores de intensidad de señal sin normalizar de la línea de test, obtenidos después de analizar la cepa X10 a 0,01, 10^5 y 10^8 CFU/mL (interrogadas con la dilución de conjugado 1/8) con el software Image J. Se observa claramente una relación inversamente proporcional entre la señal analítica y la concentración de la cepa X10, característica del formato de ensayo competitivo. La señal analítica generada al analizar la cepa X10 a 10^5 CFU/mL disminuye un 36% y se diferencia claramente de la señal obtenida al analizar 0,01 CFU/mL. Por otra parte, la señal analítica obtenida al analizar 10^8 CFU/mL disminuye un 100%, una vez restada la señal de fondo.

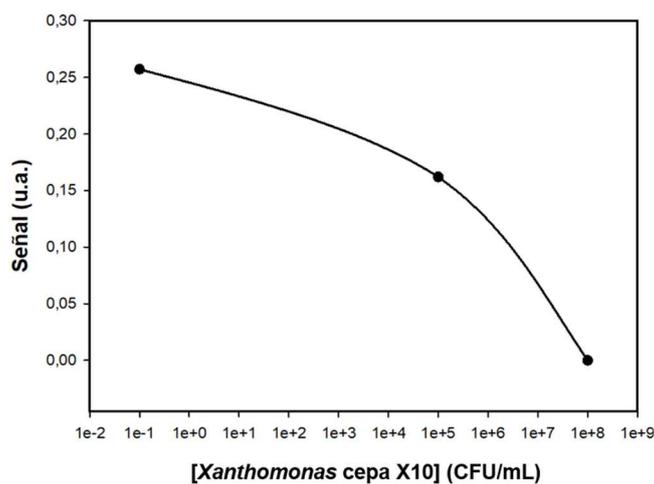


Figura 30. Ensayo competitivo de flujo lateral realizado con la cepa X7 inmovilizada a 10^8 CFU/mL y dilución de conjugado 1/8, donde se ha analizado la cepa X10 a 0,1, 10^5 y 10^8 CFU/mL.

Es importante destacar que, debido a limitaciones de tiempo, solo se pudieron analizar tres concentraciones, por lo que sería necesario obtener la curva de calibrado completa y realizar réplicas de cada una de las condiciones de estudio para determinar los parámetros analíticos del ensayo (límite de detección, límite de cuantificación, rango dinámico lineal, reproducibilidad). En este sentido, se va a continuar con el desarrollo y optimización de las tiras reactivas, en donde se va a evaluar las diferentes estrategias homólogas y heterólogas del formato competitivo y además se va a evaluar el formato de ensayo sándwich.

5. Conclusiones

En este trabajo, se han utilizado nanopartículas de oro de 5 nm y 20 nm y se ha explorado la capacidad de conjugación a bacteriófagos, caracterizando los conjugados mediante espectrofotometría, potencial Zeta y microscopía electrónica de transmisión. Los conjugados de oro son estables y mantienen la capacidad infectiva por lo que se muestran como una prometedora herramienta para aplicaciones en diagnóstico. Estos resultados respaldan la viabilidad y eficacia de los conjugados AuNPs-fago, lo que abre nuevas posibilidades en la detección de fitopatógenos.

Se ha demostrado, mediante la realización de ensayos en disco, que existe un reconocimiento específico entre el bacteriófago P4 y las bacterias *Xanthomonas arboricola*, siendo la afinidad mayor hacia la bacteria X7. Esto ha permitido desarrollar ensayos competitivos en formato heterólogo, inmovilizando la cepa X10. Esta estrategia ha permitido desarrollar un ensayo para detectar la cepa X7 a una concentración de 10^3 CFU/mL. Por otra parte, se ha comenzado a desarrollar el ensayo LFA, en donde se ha demostrado que el fago puede ser aplicado como elemento de bioreconocimiento. Si bien es cierto que debido a la falta de tiempo se han realizado pocos ensayos, donde únicamente se ha evaluado el formato de ensayo heterólogo (la cepa X7 impresa para la detección de la cepa X10) sin réplicas, cabe destacar la capacidad del ensayo para diferenciar una concentración de 0, 10^5 y 10^8 CFU/mL. Estos resultados son muy prometedores y animan a continuar con el desarrollo del método LFA en tira reactiva, el cual se podría realizar en el momento y lugar de toma de muestra, acortando los tiempos de diagnóstico de días a minutos y reduciendo las pérdidas económicas asociadas a la infección de las cosechas por *Xanthomonas arboricola*. Se espera que el formato heterólogo que ha demostrado ser el más sensible en los ensayos en disco (inmovilización de X10 y detección de X7) también lo sea para los ensayos en tira reactiva, con la que se espera conseguir un límite de detección menor de 10^5 CFU/mL.

A pesar de haber obtenido resultados prometedores con el uso de bacteriófagos como elementos de reconocimiento en la detección de organismos patógenos, aún hay mucho por hacer con el fin de maximizar el potencial de los bacteriófagos en biosensado. En este contexto, se sugiere explorar la aplicación de la ingeniería genética con el propósito de expresar proteínas de interés en la superficie del virus, tales como aquellas ricas en lisina o la expresión de biotina. Estas estrategias, aparte de incrementar la eficiencia de conjugación a los marcadores, facilitarían la conjugación orientada, la amplificación de las señales y la disminución de señales no específicas. Por otra parte, cabe destacar que aún quedan parámetros analíticos por evaluar, como por ejemplo la estabilidad de ensayo. En este sentido, dado que se ha evaluado el formato de ensayo competitivo en donde se han inmovilizado bacterias, y dado que algunos bacteriófagos únicamente son capaces de reconocer bacterias viables, es fundamental determinar la vida útil del disco y de las tiras reactivas. Con el fin de maximizar la estabilidad, se plantea la posibilidad de identificar el receptor bacteriano como el componente específico de reconocimiento, el cual es probable que sea más estable que la bacteria completa.

A raíz de los resultados obtenidos, se ha preparado una comunicación en formato de póster que ha sido aceptada para su exposición en el XVI *International Workshop on Sensors and Molecular Recognition*, que se celebrará en València los días 6 y 7 de julio de 2023.

6. Bibliografía

- Aksyuk, A. A., Leiman, P. G., Kurochkina, L. P., Shneider, M. M., Kostyuchenko, V. A., Mesyanzhinov, V. V., & Rossmann, M. G. (2009). The tail sheath structure of bacteriophage T4: A molecular machine for infecting bacteria. *EMBO Journal*, *28*(7), 821–829. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.36>
- An, S. Q., Potnis, N., Dow, M., Vorhölter, F. J., He, Y. Q., Becker, A., Teper, D., Li, Y., Wang, N., Bleris, L., & Tang, J. L. (2020). Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. *FEMS Microbiology Reviews*, *44*(1), 1–32. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz024>
- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, *72*, 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>
- Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., & Estrela, P. (2016). Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, *60*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>
- Campbell, A. (2003). The future of bacteriophage biology. *Nature reviews. Genetics*, *4*(6), 471–477. <https://doi.org/10.1038/nrg1089>
- Catara, V., Cubero, J., Pothier, J. F., Bosis, E., Bragard, C., Đermić, E. Đ., Holeva, M. C., Jacques, M.-A., Petter, F., Pruvost, O., Robène, I., Studholme, D. J., Tavares, F., Vicente, J. G., Koebnik, R., & Costa, J. (2021). Trends in Molecular Diagnosis and Diversity Studies for Phytosanitary Regulated *Xanthomonas*. *Microorganisms*, *9*(862). <https://doi.org/10.3390/microorganisms>
- Clokic, M. R. J., Millard, A. D., Letarov, A. V., & Heaphy, S. (2011). Phages in nature. *Bacteriophage*, *1*, 31-45. <https://doi.org/10.4161/bact.1.1.14942>
- Cotes, A. M., Mosher, S., Barrera, G. P., Kobayashi, S., & Elad, Y. (2018). Nuevas estrategias para el control biológico de fitopatógenos. *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros* (pp. 882-921). Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - AGROSAVIA.
- Farooq, U., Ullah, M. W., Yang, Q., Aziz, A., Xu, J., Zhou, L., & Wang, S. (2020). High-density phage particles immobilization in surface-modified bacterial cellulose for ultra-sensitive and selective electrochemical detection of *Staphylococcus aureus*. *Biosensors and Bioelectronics*, *157*. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112163>
- Farooq, U., Yang, Q., Ullah, M. W., & Wang, S. (2018). Bacterial biosensing: Recent advances in phage-based bioassays and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, *118*, 204-216. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.07.058>
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, *133*(3), 1–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- Gibb, B., Hyman, P., & Schneider, C. L. (2021). The many applications of engineered bacteriophages— an overview. *Pharmaceuticals*, *14*(7). <https://doi.org/10.3390/ph14070634>

- Kong, M., Shin, J. H., Heu, S., Park, J. K., & Ryu, S. (2017). Lateral flow assay-based bacterial detection using engineered cell wall binding domains of a phage endolysin. *Biosensors and Bioelectronics*, *96*, 173–177. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.05.010>
- Kotsiri, Z., Vidic, J., & Vantarakis, A. (2022). Applications of biosensors for bacteria and virus detection in food and water—A systematic review. *Journal of Environmental Sciences*, *111*, 367-379. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2021.04.009>
- Lavilla, M., Domingo-Calap, P., Sevilla-Navarro, S., & Lasagabaster, A. (2023). Natural Killers: Opportunities and Challenges for the Use of Bacteriophages in Microbial Food Safety from the One Health Perspective. *Foods*, *12*(3), 552. <https://doi.org/10.3390/foods12030552>
- Lee, A. S., Lamanna, O. K., Ishida, K., Hill, E., Nguyen, A., & Hsieh, M. H. (2022). A Novel Propidium Monoazide-Based PCR Assay Can Measure Viable Uropathogenic E. coli In Vitro and In Vivo. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.794323>
- Mack, J. D., Yehualaeshet, T., Park, M., Tameru, B., Samuel, T., & Chin, B. A. (2017). Phage-Based Biosensor and Optimization of Surface Blocking Agents to Detect Salmonella Typhimurium on Romaine Lettuce. *Journal of Food Safety*, *37*(2). <https://doi.org/10.1111/jfs.12299>
- Mehrotra, P. (2016). Biosensors and their applications – A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, *6*(2), 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>
- Morais, S., Puchades, R., Maquieira, A. (2016). Disc-based microarrays: principles and analytical applications. *Anal. Bioanal. Chem.* *408*, 4523-4534
- Nakayinga, R., Makumi, A., Tumuhaise, V., & Tinzaara, W. (2021). Xanthomonas bacteriophages: a review of their biology and biocontrol applications in agriculture. *BMC Microbiology*, *21*(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02351-7>
- Nanduri, V., Sorokulova, I. B., Samoylov, A. M., Simonian, A. L., Petrenko, V. A., & Vodyanoy, V. (2007). Phage as a molecular recognition element in biosensors immobilized by physical adsorption. *Biosensors and Bioelectronics*, *22*(6), 986–992. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.03.025>
- Naresh, V., & Lee, N. (2021). A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors. *Sensors*, *21*(4), 1-35. <https://doi.org/10.3390/s21041109>
- Neufeld, T., Mittelman, A. S., Buchner, V., & Rishpon, J. (2005). Electrochemical Phagemid Assay for the Specific Detection of Bacteria Using Escherichia coli TG-1 and the M13K07 Phagemid in a Model System. *Analytical Chemistry*, *77*(2), 652–657. <https://doi.org/10.1021/ac0488053>
- Parolo, C., Sena-Torrallba, A., Bergua, J. F., Calucho, E., Fuentes-Chust, C., Hu, L., Rivas, L., Álvarez-Diduk, R., Nguyen, E. P., Cinti, S., Quesada-González, D., & Merkoçi, A. (2020). Tutorial: design and fabrication of nanoparticle-based lateral-flow

- immunoassays. *Nature Protocols*, 15(12), 3788–3816. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0357-x>
- Pranjol, M. Z. I., & Hajitou, A. (2015). Bacteriophage-derived vectors for targeted cancer gene therapy. *Viruses*, 7(1), 268–284. <https://doi.org/10.3390/v7010268>
- Quesada-González, D., & Merkoçi, A. (2015). Nanoparticle-based lateral flow biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 73, 47–63. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.05.050>
- Ristaino, J. B., Anderson, P. K., Bebbler D, D. P., Brauman E, K. A., Cunniffe, N. J., Fedoroff, N. V, Finegold, C., Garrett, K. A., Gilligan, C. A., Jones K, C. M., Martin, M. D., Macdonald, G. K., Neenan, P., Records, A., Schmale, D. G., Tateosian, L., & Wei, Q. (2021). The persistent threat of emerging plant disease pandemics to global food security. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(23). <https://doi.org/10.1073/pnas.2022239118>
- Sena-Torralba, A., Ngo, D. B., Parolo, C., Hu, L., Álvarez-Diduk, R., Bergua, J. F., Rosati, G., Surareungchai, W., & Merkoçi, A. (2020). Lateral flow assay modified with time-delay wax barriers as a sensitivity and signal enhancement strategy. *Biosensors and Bioelectronics*, 168, 112559. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112559>
- Sharma, S., Byrne, H., & O’Kennedy, R. J. (2016). Antibodies and antibody-derived analytical biosensors. *Essays in Biochemistry*, 60(1), 9–18. <https://doi.org/10.1042/EBC20150002>
- Sieuwert, S., De Bok, F. A. M., Mols, E., De Vos, W. M., & Van Hylckama Vlieg, J. E. T. (2008). A simple and fast method for determining colony forming units. *Letters in Applied Microbiology*, 47(4), 275–278. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02417.x>
- Singh, S., Dhanjal, D. S., Sonali, Thotapalli, S., Kumar, V., Datta, S., Kumar, V., Kumar, M., & Singh, J. (2020). An insight in bacteriophage based biosensors with focus on their detection methods and recent advancements. *Environmental Technology and Innovation*, 20. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101081>
- Taylor, A. D., Ladd, J., Yu, Q., Chen, S., Homola, J., & Jiang, S. (2006). Quantitative and simultaneous detection of four foodborne bacterial pathogens with a multi-channel SPR sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(5), 752–758. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.03.012>
- Ul Haq, I., Chaudhry, W. N., Akhtar, M. N., Andleeb, S., & Qadri, I. (2012). Bacteriophages and their implications on future biotechnology: A review. *Virology Journal*, 9. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-9>
- Yan, C., Zhang, Y., Yang, H., Yu, J., & Wei, H. (2017). Combining phagomagnetic separation with immunoassay for specific, fast and sensitive detection of *Staphylococcus aureus*. *Talanta*, 170, 291–297. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.04.007>
- Yang, L. N., Ren, M., & Zhan, J. (2023). Modeling plant diseases under climate change: evolutionary perspectives. *Trends in Plant Science*, 28(5), 519–526. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.12.011>