

## ELEKTROCHEMICZNE BIOSENSORY DO DETEKCJI PATOGENÓW ROŚLINNYCH

### ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS FOR PLANT PATHOGEN DETECTION

dr inż. Małgorzata Łabańska, dr hab. inż. Włodzimierz Przewodowski  
IHAR-PIB Oddział w Boninie, e-mail: m.labanska@ihar.edu.pl

#### **Streszczenie**

Jedną z głównych przyczyn strat plonów roślin uprawnych takich jak ziemniak są organizmy patogene. Niejednokrotnie kluczowym elementem, pozwalającym uniknąć lub zredukować te straty, jest ich szybka detekcja. W tym celu stosowane są molekularne, serologiczne, mikrobiologiczne oraz mieszane metody diagnostyczne. Ze względu na liczne zalety coraz bardziej interesującą alternatywę dla dotychczas stosowanych metod stanowią biosensory. W pracy przedstawiono budowę oraz klasyfikację biosensorów, ich szeroki zakres zastosowań, a także przykładowe wykorzystanie w detekcji patogenów roślinnych.

**Słowa kluczowe:** biosensory, biosensory DNA, detekcja patogenów roślinnych, immunosensory

#### **Abstract**

Pathogenic organisms are one of the main causes of significant crop losses. Often the key element to avoid or reduce these losses is their rapid detection. For this purpose, molecular, serological, microbiological and mixed diagnostic methods are used. Due to numerous advantages, biosensors are an increasingly interesting alternative to the methods used so far. In this work architecture and classification of biosensors, wide range of their applications as well as exemplary usage to the plant pathogen detection are presented.

**Keywords:** biosensors, DNA-biosensors, immunosensors, plant pathogen detection

Jednym z ważniejszych czynników zmniejszających wydajność upraw i generujących straty ekonomiczne są choroby roślin (Martinelli i in. 2015). Wywołują je organizmy patogenne takie jak wirusy, bakterie, grzyby czy nicienie. Szczególnie niebezpieczne są organizmy kwarantannowe, które nie tylko mają bezpośredni negatywny wpływ na plon, ale również generują straty ekonomiczne wynikające z nałożenia kwarantanny, m.in. koszty utylizacji porażonego materiału oraz zakaz eksportu i dystrybucji materiału pochodzącego z objętego nią gospodarstwa. Z tego powodu kluczową rolę odgrywa szybka detekcja patogenów roślinnych, która pozwala kontrolować odpowiednio wcześnie infekcję wywołaną patogenem w różnych jej stadiach i zmniejsza ryzyko jego rozprzestrzenienia się (Martinelli i in. 2015, Khater i in. 2017).

Do tej pory opracowano wiele technik służących detekcji oraz identyfikacji patogenów roślinnych. Spośród nich wyróżnia się metody serologiczne (zwane inaczej immunologicznymi), molekularne, mikrobiologiczne i mieszane. Powszechnie stosowane metody to immunoenzymatyczny test ELISA (ang. Enzyme-linked Immunosorbent Assay), analiza DNA patogenu wykorzystująca reakcję łańcuchowej polimerazy DNA – PCR (ang. Polymerase Chain Reaction) i jej modyfikacje (np. Real Time PCR, Multiplex PCR) oraz fluorescencyjna hybrydyzacja in situ – FISH (ang. Fluorescence In situ Hybridization). Są one rutynowo stosowane w analizie materiału roślinnego na całym świecie dzięki dobrze poznanemu mechanizmowi działania oraz niezawodności. W literaturze odnaleźć można wiele prac dokładnie prezentujących te techniki (Salamońska i in. 2016, Fang i in. 2015, Stochła i in. 2016, OEPP 2006).

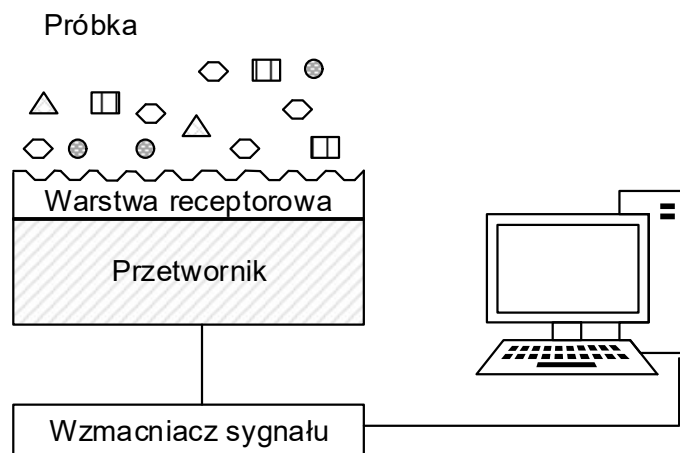
Metody immunologiczne oraz molekularne, bazujące na analizie DNA, istotnie skróciły czas oznaczania patogenów w porównaniu z konwencjonalnymi metodami mikrobiologicznymi, jednak wciąż brakuje możliwości wykrywania patogenów w warunkach polowych. Metody diagnostyczne projektowane

do wykrywania patogenów bezpośrednio na polu są z reguły oparte na wykorzystaniu przeciwciał, przez co charakteryzują się mniejszą czułością niż metody molekularne. Te z kolei w uwagi na konieczność izolowania RNA/DNA oraz stosowania drogiej aparatury możliwe są do przeprowadzenia tylko w laboratorium.

Ostatnio opracowano szereg izotermicznych metod molekularnych mających czułość podobną do PCR czasu rzeczywistego, a czas ich wykonania zajmuje od 5 do 30 minut, jednak testy te wciąż wymagają potwierdzenia ich specyficzności i poprawności pozytywnych wyników. Z powodu tych ograniczeń dotychczasowe metody są wciąż modyfikowane i dopracowywane, z drugiej strony opracowywane są alternatywne metody analityczne, które charakteryzowałyby się wysoką specyficznością i czułością, a także niską granicą oznaczalności (najmniejsze stężenie/ilość substancji możliwe do ilościowego oznaczenia daną metodą). Dodatkowo powinny one zapewniać szybką, wiarygodną oraz niedrogą detekcję patogenów roślinnych w warunkach laboratoryjnych i środowiskowych. Wśród wielu kierunków rozwijanych przez naukowców interesującym rozwiązaniem o dużym potencjale aplikacyjnym jest opracowanie biosensorów (Leonard i in. 2003).

### Budowa i klasyfikacja biosensorów

Biosensorami nazywane są czujniki, które zawierają w swojej budowie element biologiczny. Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC, ang. International Union of Pure Applied Chemistry) określa je jako samodzielne, zintegrowane urządzenia, które dostarczają specyficznych ilościowych lub półilościowych informacji analitycznych za pomocą biologicznych elementów receptorowych (bioreceptorów) znajdujących się w bezpośrednim kontakcie z przetwornikiem (Thevenot i in. 2001). Biosensory należą do grupy czujników chemicznych. Składają się one z dwóch głównych części: receptorowej oraz przetwornikowej (rys. 1).



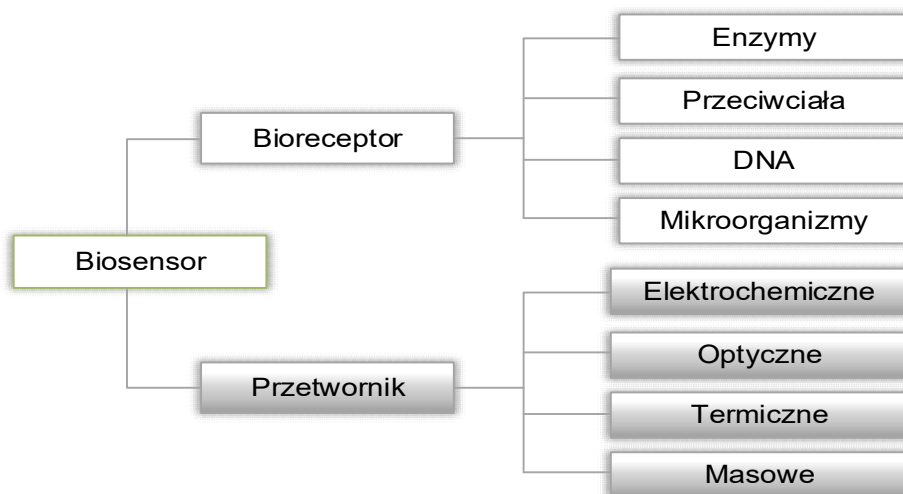
Rys. 1. Schemat budowy i działania biosensora

Najważniejszym elementem sensora jest warstwa receptorowa (chemoczuła), której zadaniem jest specyficzne rozpoznanie analitu (oznaczanej cząsteczki). Determinuje ona jego podstawowe parametry pracy, takie jak: czułość, selektywność, czas odpowiedzi czy czas życia. Cechą wyróżniającą biosensory spośród innych czujników jest warstwa receptorowa złożona z elementów biologicznych (warstwa bioreceptorowa). Przetwornik przekształca uzyskaną z części receptorowej informację na sygnał użyteczny analitycznie, np. elektryczny lub optyczny (Brzózka i in. 1999). Mechanizm rozpoznawania analitu przez biologiczny element receptorowy jest porównywany z działaniem zamka i klucza. Tylko odpowiedni klucz pasuje do zamka. Oddziaływanie właściwego bioreceptora z analitem inicjuje sygnał charakterystyczny dla danego zjawiska biologicznego, który następnie jest przetwarzany, a później rejestrowany (Kłos-Witkowska 2015).

Erę biosensorów zapoczątkowały pionierskie badania prowadzone w latach 50. XX wieku przez prof. Lelenda C. Clarka Jr. nad elektrochemiczną redukcją tlenu na elektrodzie platynowej. Wynikiem jego pracy był sensor czuły na tlen nazwany później elektrodą Clarka (Kłos-Witkowska 2014). W roku 1962 L. C. Clark Jr. razem z C. Lyons skonstruowali pierwszy amperometryczny biosensor do oznaczania stężenia glukozy we krwi. Opracowana technologia została przeniesiona do firmy Yellow Springs International Company (YSI), która w 1975 r. wprowadziła

na rynek pierwsze urządzenie do bezpośredniego pomiaru glukozy. Od tamtego czasu wciąż intensywnie rozwijana jest tematyka biosensorów, różnorodnie kierunki badań obejmują m in.: zastosowanie nanotechnologii (technologia krzemu, nanocząstki złota), poszukiwanie nowych materiałów (grafen, nanorurki węglowe) czy dopracowywanie istniejących urządzeń poprzez poprawę ich parametrów pracy (Kim i in. 2019, Magner 2013).

Podstawą klasyfikacji biosensorów jest element biologiczny tworzący warstwę receptorową, a także rodzaj zastosowanego przetwornika (rys. 2). Pierwsze tego typu czujniki zawierały w warstwie receptorowej enzymy (biokatalizatory), które selektywnie rozpoznają substraty i katalizują ich reakcję. Ta grupa bioczujników nazywana jest biosensorymi enzymatycznymi. Powszechnie używane są również przeciwciała specyficznie wiążące się z antygenami. Ponadto warstwę receptorową mogą tworzyć również antygeny, całe organizmy, takie jak bakterie czy wirusy, a także organelle komórkowe. Nową grupę o potencjalnie szerokim zastosowaniu stanowią aptasensory, w których elementem biologicznie aktywnym są aptamery, czyli jednoniciowe syntetyczne oligonukleotydy (krótkie fragmenty DNA bądź RNA) lub peptydy. Dzięki możliwości przyjmowania ściśle określonych form przestrzennych specyficznie wiążą one analit (Chambers i in. 2008).



Rys. 2. Schemat klasyfikacji biosensorów

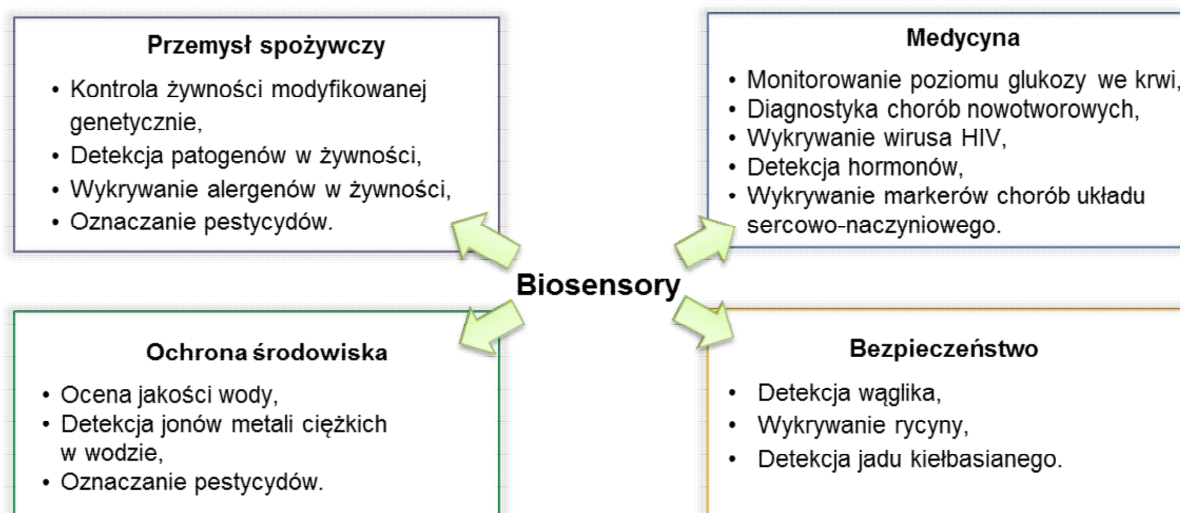
Biosensory klasyfikowane są również pod względem rodzaju sygnału generowanego przez przetwornik, jako wyniki oddziaływania receptora z analitem. Wyróżnia się cztery główne grupy: elektrochemiczne, optyczne, masowe (np. piezoelektryczne) oraz termiczne (Kłos-Witkowska 2015, Perumal i in. 2014). Coraz większą popularność zdobywają inne przetworniki, np. magnetyczne lub mikromechaniczne. Najstarszą i jedną z najczęściej wykorzystywanych grup stanowią biosensory elektrochemiczne (Grieshaber i in. 2008). Charakteryzują się wysoką czułością, łatwością obsługi, krótkim czasem odpowiedzi, niskim kosztem produkcji oraz możliwością miniaturyzacji.

W ostatnich latach dynamicznie rozwijane są również biosensory optyczne. Stanowią one ciekawą alternatywę dla metod konwencjonalnych, ponieważ oferują wysoką czułość, mały rozmiar, możliwość równoczesnego oznaczenia kilku analitów, a także bezpośrednią analizę bez użycia znaczników w czasie rzeczywistym. Optyczne przetworniki opierają się na zjawiskach m.in.: polaryzacji oraz załamania światła, luminescencji, fluorescencji, fosforescencji, absorpcji. Rosnącą popularnością cieszą się optyczne bio-

sensory wykorzystujące zjawisko powierzchniowego rezonansu plazmonów (SPR, ang. Surface Plasmon Resonance) (Sankiewicz 2014). Przetworniki masowe w zdecydowanej większości wykorzystują zjawisko piezoelektryczności odkryte przez braci Curie w 1880 r. (Kłos-Witkowska 2014).

Ostatnią grupę przetworników stanowią przetworniki termiczne. Największymi zaletami tych czujników są: stabilność, wysoka selektywność, łatwa miniaturyzacja, krótki czas odpowiedzi, a także możliwość analizy zanieczyszczonych próbek. Z drugiej strony do ich stosowania potrzebna jest często skomplikowana aparatura.

Pierwszym i głównym zastosowaniem biosensorów była diagnostyka medyczna, przede wszystkim oznaczanie stężenia glukozy we krwi (Wang 2008). Jednak zakres ich zastosowań wciąż się poszerza. Wysoka czułość i selektywność, możliwość pomiarów w czasie rzeczywistym, a także często niewielkie rozmiary czynią je niezwykle atrakcyjnymi narzędziami analitycznymi. Na rysunku 3 przedstawiono przykładowe zastosowania biosensorów w różnych dziedzinach.



Rys. 3. Schemat zastosowań biosensorów

### Wykorzystanie biosensorów elektrochemicznych w detekcji patogenów roślinnych

Straty plonów wynikające z obecności organizmów patogennych szacowane są na 20–40%, w przypadku ziemniaków stanowią ok. 24%. Są to wielomiliardowe straty każdego roku (Khater i in. 2017). W literaturze spotykane są najczęściej dwa typy biosensorów do detekcji patogenów roślinnych – immunosensory zawierające w warstwie receptorowej przeciwciała oraz biosensory DNA, w których część rozpoznającą analit stanowią fragmenty kwasów nukleinowych. Do uzyskania mierzalnego sygnału (zadanie przetwornika) wykorzystywane są metody elektrochemiczne, optyczne lub piezoelektryczne.

Opisywane w literaturze elektrochemiczne immunosensory wykorzystują jeden z dwóch mechanizmów detekcji. Metody bezznacknikowe opierają się na bezpośredniej zależności pomiędzy wielkością rejestrowanej odpowiedzi czujnika a ilością oznaczanego patogenu w analizowanym materiale roślinnym. Natomiast w metodach pośrednich stosowana jest odpowiednia substancja – znacznik, którego ilość zależy od ilości patogenu i determinuje wielkość mierzonego sygnału. W ten sposób zarejestrowana odpowiedź czujnika pośrednio określa ilość patogenu w próbce (Felix, Angnes 2018; Kokkinos i in. 2016). Jako metodę bezznacknikową zwykle stosuje się elektrochemiczną spektroskopię impedancyjną (EIS, ang. Electrochemical Impedance Spectro-

scopy), jednak znaczną trudność sprawia interpretacja uzyskanych wyników. W dużym uproszczeniu: w biosensorach impedancyjnych na powierzchni elektrody unieruchomione są bioreceptory (np. przeciwciała), których oddziaływanie z analitem (np. antygenem) generuje zmianę pojemności podwójnej warstwy elektrycznej znajdującej się na granicy faz elektroda/roztwór. W konsekwencji prowadzi to do zmiany rejestrowanego natężenia prądu. W literaturze odnależć można pionierskie prace prezentujące zastosowanie immunosensorów bezznacknikowych do detekcji wirusa mozaiki figowej (Haji-Hashemi i in. 2019) czy wirusa ospowatości śliwy (Jarocka i in. 2011).

Drugie rozwiązanie stanowi połączenie serologicznej metody ELISA z technikami voltamperometrycznymi (amperometrycznymi) (Khater i in. 2017). Rejestrowany sygnał pochodzi od redukcji lub utleniania na powierzchni elektrody produktu reakcji enzymatycznej, która jest możliwa, kiedy powstanie odpowiedni kompleks immunologiczny pomiędzy przeciwciałem a antygenem znajdującym się w badanym materiale. Jako znaczniki najczęściej stosowane są peroksydaza chrzanowa (HRP) oraz alkaiczna fosfataza (AP). Za pomocą elektrochemicznych immunosensorów, w których zastosowano znakowanie enzymatyczne, przeprowadzono detekcję m.in. bakterii *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (PSS), przyczyny bakteryjnego więdnienia kukurydzy (Zhao i in. 2014), i grzyba *Botrytis cinerea* –

sprawcy szarej pleśni (Fernández-Baldo i in. 2009).

W biosensorach elektrochemicznych przeznaczonych do detekcji patogenów roślinnych jako bioreceptory stosowane są również pojedyncze fragmenty nici DNA (tzw. sondy DNA). Rozpoznanie molekularne generujące sygnał analityczny polega na reakcji hybrydyzacji unieruchomionej na powierzchni przetwornika pojedynczej nici DNA (sondy) i komplementarnej do niej nici DNA znajdującej się w badanej próbce. Proces ten obserwowany jest za pomocą technik woltamperometrycznych, takich jak woltamperometria różnicowa pulsowa (DPV) czy woltamperometria cykliczna (CV), lub spektroskopii impedancyjnej. Detekcja hybrydyzacji DNA może być przeprowadzana bez znacznika, jak również z jego użyciem; jako marker często stosowany jest błękit metylenowy (Khater i in. 2017). Elektrochemiczne biosensory DNA posłużyły do wykrycia np. grzyba *Trichoderma harzianum* (Shafiquzzaman i in. 2012) czy wirusa CTV (Citrus tristeza virus) atakującego cytrusy (Khater i in. 2019).

### Podsumowanie

Ze względu na mnogość możliwych zastosowań badania nad biosensorami od wielu lat dynamicznie są rozwijane. Urządzenia te składają się z warstwy receptorowej zawierającej element biologiczny oraz przetwornika. Ich historia wiąże się z intensywną potrzebą opracowania urządzenia pozwalającego samodzielnie kontrolować poziom cukru we krwi. Z czasem jednak urządzenia te znalazły zastosowanie również w innych dziedzinach, takich jak: przemysł spożywczy, diagnostyka medyczna, ochrona środowiska czy wykrywanie materiałów niebezpiecznych. Ze względu na liczne zalety: wysoką czułość i specyficzność, łatwość obsługi, możliwość miniaturyzacji oraz niski koszt produkcji stanowią interesującą alternatywę dla dotychczasowych metod molekularnych i serologicznych.

Patogenne organizmy stanowią główną przyczynę infekcji roślinnych, które generują znaczne straty plonów, a ich wczesna detekcja jest często kluczowym elementem monitorowania zdrowotności roślin. W literaturze pojawiły się doniesienia opisujące zastoso-

wanie biosensorów do wykrywania wirusów, bakterii czy grzybów. Pomimo dużej liczby prac wykonanych w obszarze biosensorów ich zastosowanie do detekcji patogenów roślinnych stanowi stosunkowo nowy, interesujący kierunek badań. Opracowanie tego typu czujników pozwoliłoby znacznie zredukować czas i koszt analizy, a także umożliwiłoby jej przeprowadzenie również w warunkach polowych.

### Literatura

1. **Brzózka Z., Wróblewski W. 1999.** Wstęp i klasyfikacja sensorów chemicznych oraz sensory elektrochemiczne. [W:] Sensory chemiczne. Oficyna Wyd. Politechniki Warsz. Warszawa;
2. **Chambers J. P., Arulanandam B. P., Matta L. L., Weis A., Valdes J. J. 2008.** Biosensor Recognition Elements. – Curr. Iss. Mol. Biol. 10: 1-12;
3. **Fang Y., Ramasamy R. P. 2015.** Current and prospective methods for plant disease detection. – Biosensors 4: 537-561;
4. **Felix F. B., Angnes L. 2018.** Electrochemical immunosensors. – A powerful tool for analytical applications. – Biosens. Bioelectron. 102: 470-478;
5. **Fernández-Baldo M. A., Messina G. A., Sanz M. I., Raba J. 2009.** Screen-printed immunosensor modified with carbon nanotubes in a continuous-flow system for the *Botrytis cinerea* determination in apple tissues. – Talanta 79: 681-686;
6. **Grieshaber D., MacKenzie R., Voros J., Reimhult E. 2008.** Electrochemical Biosensors – sensor principles and architectures. – Sensors 8: 1400-1458;
7. **Haji-Hashemi H., Reza Safarnejad M. R., Norouzi P., Ebrahimi M., Shahmirzaie M., Reza Ganjali M. 2019.** Simple and effective label free electrochemical immunosensor for Fig mosaic virus detection. – Anal. Biochem. 566: 102-106;
8. **Jarocka U., Wąsowicz M., Radecka H., Malinowski T., Michalczyk L., Radecki J. 2011.** Impedimetric Immunosensor for Detection of Plum Pox Virus in Plant Extracts. – Electroanal. 23: 2197-2204;
9. **Khater M., de la Escosura-Muniz A., Merkoci A. 2017.** Biosensors for plant pathogen detection. – Biosens. Bioelectron. 93: 72-86;
10. **Khater M., de la Escosura-Muniz A., Quesada-Gonzalez D., Merkoçi A. 2019.** Electrochemical detection of plant virus using gold nanoparticle-modified electrodes. – Anal. Chim. Acta 1046: 123-131;
11. **Kim J., Campbell A. S., Esteban-Fernández de Ávila B., Wang J. 2019.** Wearable biosensors for healthcare monitoring. – Nat. Biotechnol. 37: 389-406;
12. **Kłós-Witkowska A. 2014.** Ewolucja i rozwój biosensorów – problemy i perspektywy. – PAK 60 (12): 1178-1180;
13. **Kłós-Witkowska A. 2015.** Biosensory. – PAK 19(3): 37-40;
14. **Kokkinos C., Economou A., Prodromidis M. I.**

2016. Electrochemical immunosensors: Critical survey of different architectures and transduction strategies. – Trends Anal. Chem. 79: 88-105; 15. Leonard P., Hearty S., Brennan J., Dunne L., Quinn J., Chakraborty T., O’Kennedy R. 2003. Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water. – Enzyme Microb. Tech. 32: 3-13; 16. Magner E. 2013. Biosensory elektrochemiczne – możliwości i ograniczenia komercjalizacji. – Chemik 67(2): 11-13; 17. Martinelli F., Scalenghe R., Davino S., Panno S., Scuderi G., Ruisi P., Villa P., Stroppiana D., Boschetti M., Goulart L. R., Davis C. E., Dandekar A. M. 2015. Advanced methods of plant disease detection. A review. – Agron. Sustain. Dev. 35: 1-25; 18. OEPP 2006. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. – OEPP Bull. 36: 99-109; 19. Perumal V., Hashim U. 2014. Advances in biosensors: principle, architecture and applications. – J. Appl. Biomed. 12: 1-15; 20. Salamońska K., Stochła W., Przewodowski W. 2016. Nowoczesne metody diagnostyczne w identyfikacji molekularnej bakterii kwarantannowych ziemniaka. – Ziemn. Pol. 4: 41-45; 21. Sankiewicz A., Puzan B., Gorodkiewicz E. 2014. Bioczujniki SPRI – narzędzie diagnostyczne przyszłości. – Chemik 68(6): 528-535; 22. Shafiquzzaman S., Yusof N. A., Salleh A. B. Tan S. G., Bakar F. A. 2012. Development of electrochemical DNA biosensor for *Trichoderma harzianum* based on ionic liquid/ZnO nanoparticles/chitosan/gold electrode. – J Solid State Electrochem. 16: 273-282; 23. Stochła W., Przewodowski W., Przewodowska A., Salamońska K. 2017. Immunodiagnostyczne metody wykrywania i identyfikacji bakteryjnych patogenów ziemniaka. – Ziemn. Pol. 1: 14-21; 24. Thevenot D. R., Toth K., Durst R. A., Wilson G. S. 2001. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. – Biosens. Bioelectron. 16: 121-131; 25. Wang J. 2008. Electrochemical glucose biosensors. – Chem. Rev. 108(2): 814-825; 26. Zhao Y., Liu L., Kong D., Kuang H., Wang L., Xu C. 2014. Dual Amplified Electrochemical Immunosensor for Highly Sensitive Detection of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. – ACS Appl. Mater. Interfaces 6: 21178-21183

