



¹ Katedra Mikrobiologii Środowiskowej, Wydział Agrobioinżynierii,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin, Polska

² Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywności Człowieka, Wydział Nauk o Żywności
i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Skromna 8, 20-704 Lublin, Polska

³ Szkoła Doktorska UP Lublin, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywności Człowieka,
Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Skromna 8,
20-704 Lublin, Polska

⁴ Kolegium Nauk Medycznych, Uniwersytet Rzeszowski, al. Kopisto 2a, 35-959 Rzeszów, Polska
*e-mail: anna.krzepilko@up.lublin.pl

AGATA ŚWIĘCIŁO ¹, ANNA KRZEPIŁKO ^{2*},
KATARZYNA MATYSZCZUK ³, MARTA SOWIŃSKA ⁴

Biosensory i nanobiosensory – nowoczesne narzędzia w detekcji fitopatogenów

Biosensors and nanobiosensors – a modern tools in phytopathogen detection

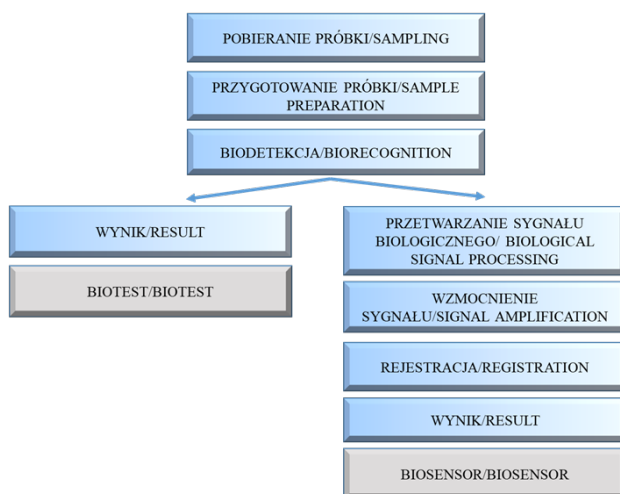
Streszczenie. Celem pracy była analiza danych literaturowych z zakresu rozwiązań konstrukcyjnych biosensorów wykorzystywanych w detekcji fitopatogenów. Omówiono ogólne zasady działania biosensorów i mechanizmy generowania sygnału analitycznego. Szczególną uwagę zwrócono na biosensory zawierające w swojej budowie nanomateriały, zw. nanobiosensory. Nanomateriały mogą wchodzić w skład warstwy receptorowej biosensora, przetwornika oraz obu tych elementów. Stabilizują one i przytwierdzają do powierzchni przetwornika cząsteczki receptorów biologicznych lub pełnią rolę znaczników wzmacniających sygnał analityczny. Dzięki temu w porównaniu do biosensorów bazujących na standardowych rozwiązaniach charakteryzują się lepszymi parametrami pracy. Nanobiosensory wykorzystywane w fitopatologii to przeważnie genosensory (zawierające w warstwie receptorowej aptamery, czyli jednoniciowe oligonukleotydy DNA, ssDNA) lub immunosensory (zawierające przeciwciała zdolne do rozpoznawania specyficznych struktur bakterii fitopatogennych lub białek płaszcza wirusów roślinnych). W obu typach urządzeń stosuje się zwykle elektrochemiczną lub optyczną transdukcję sygnału biologicznego. Zacznie rzadziej są spotykane genosensory z transdukcją mikrograwimetryczną, opierającą się na technice mikrowagi kwarcowej. Zaprezentowane biosensory i nanobiosensory charakteryzowały się w warunkach laboratoryjnych dobrymi parametrami analitycznymi, co wskazuje na ich duży potencjał aplikacyjny.

Słowa kluczowe: biosensory, nanobiosensory, detekcja, fitopatogeny

BIOSENSORY – DEFINICJA

Dynamiczny rozwój nowych technologii, przede wszystkim biotechnologii oraz inżynierii materiałowej, pozwolił na konstrukcję niewielkich, ale selektywnych i czułych urządzeń analitycznych zwanych biosensarami. Biosensor (czujnik biologiczny) zawiera w swojej budowie cząsteczkę biologiczną, zw. bioreceptorem, która, reagując z oznaczanym związkem (analitem), generuje sygnał biologiczny przekształcany następnie w mierzalny sygnał analityczny. Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC) definiuje biosensor jako zintegrowane, niezależne narzędzie pomiarowe, w którym zastosowano biologiczne składniki umieszczone w bezpośrednim kontakcie z elementem przetwarzającym, dostarczające specyficznych (ilościowych i jakościowych) informacji o analizie [Renneberg i in. 2008]. Biosensor składa się z warstwy receptorowej zawierającej cząsteczki biologiczne, powierzchni międzyfazowej, przetwornika oraz rejestratora. Zgodnie z tą definicją testy biologiczne wykorzystujące komponenty biologiczne ale nieposiadające przetwornika jako integralnego elementu systemu analitycznego nie są biosensarami [Leonard i in. 2003, Rodriguez-Mozaz i in. 2004]. Pomimo tego, w literaturze naukowej termin biosensor jest używany często w odniesieniu do tego typu testów. Ich zasada działania opiera się na reakcji receptora biologicznego z oznaczanym analitem, którą można zarejestrować wizualnie na podstawie zmian barwy roztworu reagentów lub pola testowego w przypadku testów paskowych [Zhao i in. 2011, Khaledian i in. 2017, Razmi i in. 2019]. Rycina 1 przedstawia etapy procesu analitycznego charakterystyczne dla biosensora i biotestu. Niekonsekwencje w stosowanej terminologii są typowe dla stosunkowo nowych i dynamicznie rozwijających się obszarów badawczych.

Techniki analityczne oparte na biosensarach funkcjonują od lat 50. XX wieku. Natomiast nonomateriały w ich konstrukcji są stosowane od około 20 lat. Zainteresowanie tematyką wykorzystania biosensarów w analityce jest duże, o czym świadczy m.in. duża liczba publikacji dostępnych w akademickich bazach danych. W bazie Web of Science



Ryc. 1. Biosensor i biotest w układach biodetekcji
Fig. 1. Biosensor and biotest in biodetection systems

Core Collection dla hasła „biosensor/y” znaleziono w całym dostępnym przedziale czasowym około 132 677 rekordów (pozycji literatury), natomiast zawężając obszar wyszukiwania do „nanobiosensorów” – 1660. Tak obszerna literatura przedmiotu umożliwia wgląd w historię rozwoju, dotychczasowe osiągnięcia i trendy badawczo-aplikacyjne dla tego typu urządzeń.

Celem pracy była analiza danych literaturowych dotyczących detekcji fitopatogenów za pomocą biosensorów, zastosowanych rozwiązań konstrukcyjnych w ich budowie oraz zalet i wad wykorzystywanych komponentów. Szczególną uwagę zwrócono na biosensory zawierające w swojej budowie nanomateriały, takie jak np. nanocząstki metali czy kropki kwantowe, QDs (ang. quantum dots). Rozwój nanotechnologii umożliwił syntezę materiałów w skali nanometrycznej, które w porównaniu ze swoimi makroskopowymi odpowiednikami posiadają unikatowe właściwości optyczne, mechaniczne, magnetyczne czy elektryczne. Dzięki tym właściwościom charakteryzują się one z reguły większą czułością, selektywnością, specyficznością i szybkością odpowiedzi na analit [Kaur i in. 2019].

BUDOWA BIOSENSORÓW

Cząsteczki biologiczne stosowane w warstwie receptorowej biosensora decydują o selektywności i precyzji rozpoznania analitu. Zadanie to mogą pełnić enzymy, antygeny, przeciwciała, cząsteczki kwasów nukleinowych, oligonukleotydy, bakteriofagi, mikroorganizmy, pojedyncze komórki czy fragmenty tkanek. Biorąc pod uwagę ich pochodzenie, można je podzielić na naturalne (np. enzymy, przeciwciała, wirusy), półsyntetyczne (sondy DNA lub RNA, czyli np. jednoniciowe oligonukleotydy RNA lub DNA zwane aptamerami) i syntetyczne np. polimery z odciskiem molekularnym (ang. molecularly imprinted polymers, MIPs) [Lee i in. 2018]. Rodzaj warstwy biologicznej znalazł odzwierciedlenie w nazewnictwie tych urządzeń np. biosensory immunologiczne (ang. immunosensors), zawierają przeciwciała w warstwie receptorowej, biosensory enzymatyczne (ang. enzymatic biosensors) zawierają enzymy, aptasensory lub genosensory (ang. aptasensors, genosensors) zawierają oligonukleotydy DNA lub RNA, natomiast biosensory mikrobiologiczne (ang. microbial biosensors) – całe komórki odpowiednich mikroorganizmów [Korotkaya 2014]. Innym kryterium podziału biosensorów jest mechanizm generowania sygnału analitycznego. Mając to na uwadze, wyróżnia się biosensory katalityczne (enzymatyczne, mikrobiologiczne itp.) i biosensory powinowactwa (bazujące na reakcji przeciwciało – antygen, hybrydyzacji kwasów nukleinowych, oddziaływaniu białko receptorowe – analit) [Subrahmanyam i in. 2002].

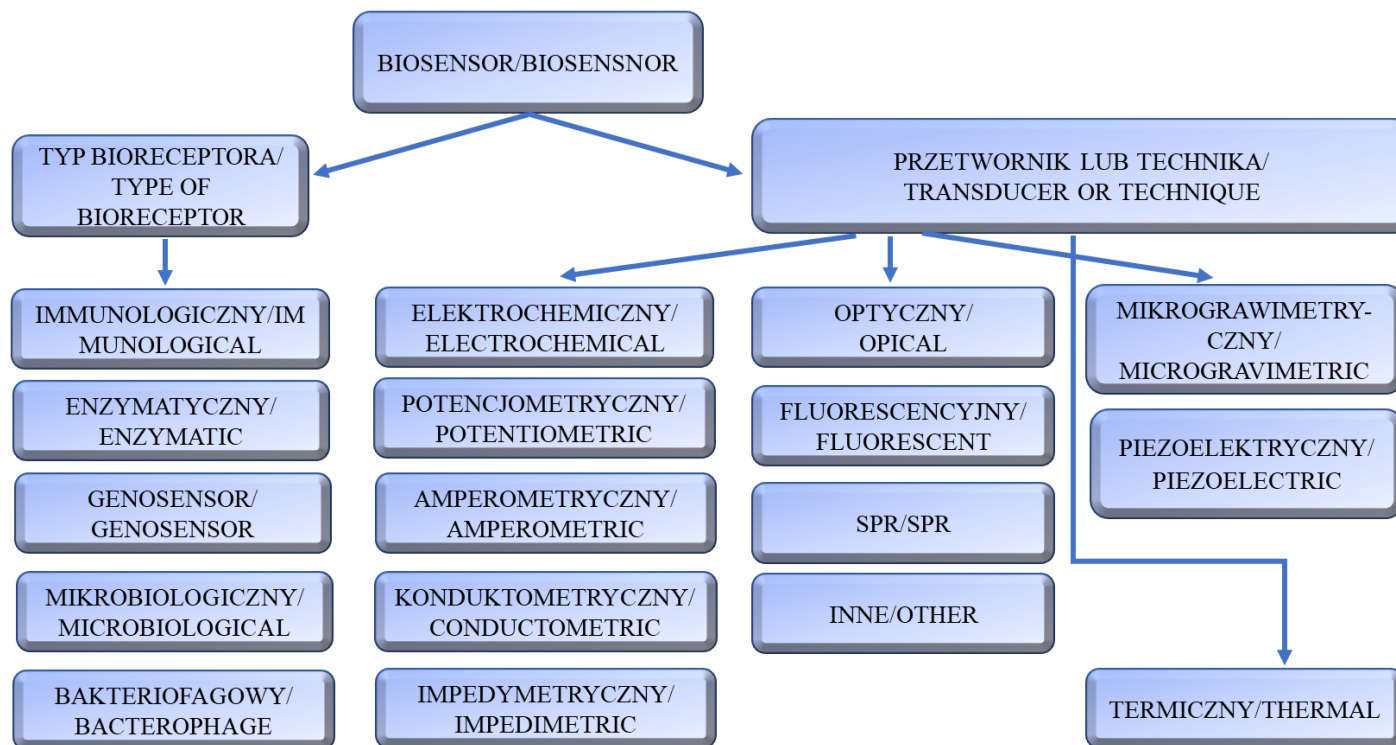
W wyniku oddziaływania analitu z warstwą receptorową biosensora zmieniają się właściwości fizyko-chemiczne zawartych w niej elementów biologicznych. W wyniku czego może np. ulec zmianie masa układu, wydzielać się ciepło, powstawać fala elektromagnetyczna, następować zjawisko dyfuzji cząsteczek, reakcje oksydo-redukcyjne i in. Część aparaturowa urządzenia przetwarza efekty oddziaływania receptor-analit; dzięki przetwornikowi powstaje sygnał analityczny najczęściej elektryczny, który trafia na rejestrator, gdzie jest wzmacniany i przetwarzany, w efekcie czego uzyskujemy wynik w formie cyfrowej. Przetworniki mają zdolność do translacji reakcji biologicznej wykrytej przez bioreceptor w mierzalny sygnał, proporcjonalny do docelowego stężenia analitu.

Rodzaj zastosowanego przetwornika stanowi kolejne kryterium podziału biosensorów (ryc. 2). Najczęściej stosowane są przetworniki termiczne, elektrochemiczne, optyczne i mikrograwimetryczne [Rogers 2006, Renneberg i in. 2008]. Przetworniki termiczne często stosowane w biosensorach enzymatycznych przetwarzają towarzyszące reakcjom enzymatycznym zmiany entalpii, co zazwyczaj wiąże się z wydzielaniem ciepła. Przetworniki elektrochemiczne (potencjometryczne, amperometryczne, impedymetryczne, konduktometryczne) przetwarzają zmiany natężenia prądu, potencjału, nagromadzonego ładunku lub przewodności roztworu. Przetworniki optyczne bazują na technikach detekcji zmian promieniowania elektromagnetycznego (absorbancji, fluorescencji, luminescencji, odbicia) lub zmianach właściwości optycznych przetwornika. Wiele biosensorów optycznych opiera się na zjawisku powierzchniowego rezonansu plazmonów (ang. surface plasmon resonance; SPR) polegającym na analizie zmian współczynnika załamania światła spowodowanych związaniem się cząsteczek analitu na powierzchni nanowarstwy. Wiele modyfikacji tego zjawiska, takich jak: powierzchniowy rezonans plazmonów w wersji imaging (SPRI), wieloparametrowy powierzchniowy rezonans plazmonów (MP-SPR), zlokalizowany powierzchniowy rezonans plazmonów (L-SPR), znalazło zastosowanie w konstrukcji biosensorów służących do wykrywania patogenów drzew owocowych (jabłoni, brzoskwiń), winorośli, warzyw (melonów, pomidorów) i ziemniaków [Lautner i in. 2010, Puttharugsa i in. 2011, Khaledian i in. 2017, Razmi i in. 2019, Sarcina i in. 2021].

Przetworniki mikrograwimetryczne oparte są na detekcji zmiany masy zachodzącej pod wpływem przyłączenia analitu do warstwy receptorowej. Zastosowane w nich kryształy piezoelektryczne reagują zmianą częstotliwości drgań lub prędkości rozchodzenia się fal akustycznych na ich powierzchni pod wpływem zmian masy (tzw. mikro-waga kwarcowa, ang. Quartz Microbalance; QMB). Rozwiązanie z użyciem mikrowagi kwarcowej zastosował Eun i in. [2002] w biosensorze przeznaczonym do detekcji wirusów CymMV i ORSV porażających rośliny storczyków. Z kolei zespół Papadakis i in. [2015] użył ten sam typ przetwornika w biosensorze przeznaczonym do detekcji patogennych dla pomidorów i papryki bakterii *R. solanacearum*, *P. syringae* pv. *tomato*, *X. campestris* pv. *vesicatoria* (tab. 1).

Transdukcja optyczna i elektrochemiczna sygnału biologicznego wydaje się być najbardziej obiecująca pod względem autonomii, możliwości zastosowania i wydajności, zarówno w detekcji, jak i analizie ilościowej fitopatogenów (tab. 2, 3). Immunosensory z transdukcją elektrochemiczną charakteryzują się wysoką czułością oznaczeń, pozwalają wykryć nawet 10^3 jtk \cdot ml $^{-1}$ i/lub ng \cdot ml $^{-1}$ białek fitopatogenu (tab. 2). Ponadto urządzenia oparte na optycznym lub elektrochemicznym mechanizmie przetwarzania sygnału nadają się do miniaturyzacji, co umożliwi zmniejszenie objętości próbki, wyeliminowanie zakłóceń sygnału, zwiększenie specyficzności oraz wydajności oznaczeń [Martinelli i in. 2015].

Przetworniki optyczne i elektrochemiczne umożliwiają zarówno bezpośrednią detekcję analitu, tzw. detekcję bezznacznikową (ang. label-free assays), jak i za pośrednictwem znaczników (ang. labels), które wydajnie przekształcają i wzmacniają sygnały biologiczne. Takie rozwiązania zastosowali w swoich badaniach m.in. Haji-Hashemi i in. [2019] oraz Sarcina i in. [2021]. Skonstruowali oni tzw. bezznacznikowe biosensory do detekcji wirusa mozaiki drzew figowych oraz patogennej dla winorośli i brzoskwiń bakterii *Xylella fastidiosa*. Zastosowanie znaczników (ang. labels) może znacząco podnieść efektywność detekcji poprzez modyfikację i/lub wzmocnienie generowanego



Ryc. 2. Klasyfikacja biosensorów na podstawie rodzaju bioreceptora i przetwornika
 Fig. 2. Classification of biosensors based on the type of bioreceptor and transducer

Tabela 1. Detekcja wybranych fitopatogenów za pomocą genosensorów z transdukcją mikrogravimetryczną
 Table 1. Detection of selected phytopathogens using quartz crystal microbalance-based genosensors

Warstwa bioczuła/ nanokomponent Biorecognition element/ nanocomponent	Technika Technique	Patogen Pathogen	Choroba/gospodarz Plant disease/host	Czułość (LOD)/ Zakres oznaczeń Sensitivity (LOD)/ Range of detection	Źródło Source
ssDNA przyłączone do złotej elektrody ssDNA attached to gold electrode	mikrowaga kwarcowa QCM	wirus mozaiki cymbidium, wirus pierścieniowej plamistości <i>Cymbidium mosaic virus</i> , CymMV <i>Odontoglossum ringspot virus</i> , ORSV	choroby storczykowa- tych orchids diseases	1 ng·μl ⁻¹ RNA w roztworze wzorcowym RNA 10 ng·μl ⁻¹ w ekstrakcie roślinnym 1 ng·μl ⁻¹ RNA in RNA standard solution 10 ng·μl ⁻¹ in plant extract	Eun i in. 2002
Niotynylowane dsDNA (produkt reakcji PCR) związane do neutrawidy- ny i pokrytych złotem kryształów kwarcu Biotinylated dsDNA (PCR products) on a neutravidin coated QCM gold crystal	mikrowaga kwarcowa, AFP QCM, SAW	<i>Ralstonia solana- cearum</i> <i>Pseudomonas sy- ringae</i> pv <i>tomato</i> <i>Xanthomonas cam- pestris</i> pv. <i>vesicato- ria</i> (Xcv)	więdnienie bakteryjne bacterial wilt bakteryjna centkowa- tość pomidora bacterial speck of tomato bakteryjna plamistość papryki i pomidora bacterial spot of pepper and tomato plants	 10 ³ –10 ⁴ jtk·ml ⁻¹ 10 ³ –10 ⁴ cfu·ml ⁻¹	Papadakis i in. 2015

Objaśnienia: dsDNA – dwuniciowe fragmenty DNA; APF – AFP – akustyczna fala powierzchniowa; PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy.

Explanation: dsDNA – double-stranded DNA; SAW – surface acoustic wave; QCM – QCM – quartz crystal microbalance, PCR – polymerase chain reaction.

sygnału. Eun i Wong [2000] zastosowali znakowane fluorescencyjnie ssDNA do wykrywania wirusa mozaiki cymbidium porażającego storczyki. Natomiast zespół Zhao i in. [2014] wykorzystali przeciwciała znakowane enzymatycznie – peroksydazą chrzanową (HRP) do detekcji patogenu kukurydzy – *Pantoea stewartii* ssp. *stewartii*.

NANOBIOSENSORY

Nanobiosensory stanowią obecnie ważną podgrupę czujników wykorzystywanych w różnych sferach życia człowieka. Nanomateriały stanowią integralną część warstwy receptorowej, powierzchni przetwornika lub obu tych elementów (ryc. 3). W konstrukcji biosensorów wykorzystuje się głównie cztery typy nanomateriałów: nanocząstki metaliczne (ang. metal nanoparticles, MeNPs), nanomateriały oparte na węglu (ang. carbon based), polimerowe (ang. polymeric nanomaterials) i nanokompozyty. Nanocząstki srebra oraz złota często wzbogacają warstwę receptorową biosensorów (tab. 1–5). Dzięki wysokiej biokompatybilności nadają się one do immobilizacji biomolekuł, takich jak np. przeciwciała [Yao i in. 2009, Zhao i in. 2014] czy aptamery [Zhao i in. 2011, Khaledian i in. 2017, Khater i in. 2019]. Zabieg ten stabilizuje cząsteczki biologiczne, co przekłada się na lepszą wydajność analityczną testu. Nanocząstki mogą pełnić także rolę znaczników wzmacniających sygnał analityczny. Skutkuje to ultraczułą detekcją analitu oraz dużą dokładnością oznaczeń za pomocą takich układów [Cai i n. 2002, Liu i in. 2008]. Roztwory nanocząstek mogą też pełnić rolę reagenta [Luo i in. 2004].

Częstym rozwiązaniem w konstrukcji biosensorów jest powlekanie powierzchni przetworników elektrochemicznych (elektrod) lub optycznych nanocząstkami złota AuNPs (Au nanoparticles) [Zhao i in. 2011, Vaseghi i in. 2013, Khaledian i in. 2017, Lau i in. 2017]. Ich właściwości plazmoniczne, elektrochemiczne oraz katalityczne umożliwiają detekcje sygnału za pomocą różnych technik: spektroskopowych, optycznych (np. z wykorzystaniem zjawiska SPR), kolorymetrycznych, amperometrycznych, woltamperometrycznych (np. techniką woltamperometrii pulsowo różnicowej (ang. differential pulse voltammetry, DPV) czy impedymetrycznych.

Kropki kwantowe, QDs to nanocząstki o wielkości od 1 do 20 nm, które tworzą sole metali takich jak: PbX, CdX, ZnX (X: S, Se, Te). Wykazują one wyjątkowe właściwości optyczne. W biologii molekularnej są wykorzystywane jako znaczniki fluorescencyjne nowej generacji dla sond DNA, przeciwciał monoklonalnych oraz białek. Charakteryzują się szerokim, przestrajalnym spektrum absorpcji oraz wąskim zakresem emisji, co pozwala na jednoczesne wzbudzenie kilku rodzajów kropek kwantowych przez jedną długość fali.

Układy biosensorowe bazujące na kropkach kwantowych wykorzystują w detekcji sygnału biologicznego zjawisko rezonansowego przeniesienia energii wzbudzenia (ang. fluorescence resonance energy transfer, FRET) [Eun i Wong 2000, Rad i in. 2012]. Zjawisko to polega na przeniesieniu energii pomiędzy naświetlanym donorem a akceptorem, który najczęściej w wyniku tego procesu emituje promieniowanie elektromagnetyczne o dłuższej fali niż fala wzbudzenia donora.

Pochodne grafenu i nanorurki węglowe sprawdziły się jako nośniki enzymów oraz przeciwciał warstwy receptorowej biosensorów. Skutkowało to zwiększeniem ich stabilności, aktywności, czasu przechowywania, liniowego zakresu odpowiedzi, limitów detekcji, a także gęstości prądowej biosensorów [Jin i in. 2012, Haji-Hashemi i in. 2018]. Podobnie, zastosowanie polimerów z odciskiem molekularnym (MIPs) jako analogów

Tabela 2. Detekcja wybranych fitopatogenów za pomocą immunosensorów z transdukcją elektrochemiczną
 Table 2. Detection of selected phytopathogens using electrochemical based immunosensors

Warstwa bioczuła/ nanokomponent Biorecognition element/ nanocomponent	Technika Technique	Patogen Pathogen	Choroba/gospodarz Plant disease/host	Czułość (LOD)/ zakres oznaczeń Sensitivity (LOD)/ range of detection	Źródło Source
Abs przeciw <i>P. stewartii</i> , pierwszorzędowe związane ze szklaną elektrodą węglową; drugorzędowe – znakowane peroksydazą chrzanową (HRP) immobilizowane do AuNPs Abs against <i>P. stewartii</i> , primary attached to glassy carbon electrode; secondary Abs against <i>P. stewartii</i> , HRP-labeled attached to the surface of AuNPs	spektroskopia impedancyjna EIS	<i>Pantoea stewartii</i> ssp. <i>stewartii</i>	bakteryjne więdnienie kukurydzy Stewart's vascular wilt in maize	$7,8 \times 10^3$ jtk·ml ⁻¹ $2,0 \times 10^7$ – $4,0 \times 10^4$ jtk·ml ⁻¹ $7,8 \times 10^3$ cfu·ml ⁻¹ $2,0 \times 10^7$ – $4,0 \times 10^4$ cfu·ml ⁻¹	Zhao i in. 2014
Abs przeciw białkom wirulencji PthA związane z AuNPs Abs anti PthA attached to the surface of AuNPs	spektroskopia impedancyjna EIS	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> .(Xcc)	bakteryjny rak cytrusowych the citrus bacterial canker disease	0,028 nM	Haji-Hashemi i in. 2018
Abs przeciw ORSV związane z AuNPs the ORSV Abs (anti-ORSV) attached to AuNPs	spektroskopia impedancyjna EIS	wirus pierścieniowej plamistości storczyków <i>Odontoglossum ringspot virus</i> ; ORSV	choroby roślin storczykowatych orchids diseases	0,35 ng·ml ⁻¹ / 50,000–0,5 ng·ml ⁻¹	Jian i in. 2018
Abs przeciw <i>P.sl</i> związane ze złotą elektrodą Abs against <i>P.sl</i> attached to gold electrode	spektroskopia impedancyjna EIS	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	bakteryjna kanciasta plamistość ogórka angular leaf spot	337 jtk·ml ⁻¹ 337 cfu·ml ⁻¹ 1×10^3 – 1.2×10^5 jtk·ml ⁻¹ 1×10^3 – 1.2×10^5 cfu·ml ⁻¹	Cebula i in. 2019

<p>Abs przeciw białku kapsydu wirusa (GBNV-N), związane z tlenkiem grafenu</p> <p>Abs against the virus capsid protein (GBNV-N) attached to graphene oxide</p>	<p>woltamperometria pulsowo-różnicowa DPV</p>	<p>orthospowirus nekrozy pąków orzeszków ziemnych groundnut bud necrosis orthospovirus, GBNV</p>	<p>szerokie spektrum gospodarzy: pomidor, wspania wężowata (<i>Vigna unguiculata</i>), <i>Nicotiana benthamiana</i> wide range of hosts: tomato, cowpea, <i>N. benthamiana</i></p>	<p>5,7 ±0,7 ng·ml⁻¹ antygen w roztworze wzorcowym</p> <p>antigen in the standard solution, 0,5–150 ng·ml⁻¹</p>	<p>Chaudhary i in. 2021</p>
<p>PAbs przeciw białku kapsydu wirusa FMV przyłączone do złotej elektrody</p> <p>PABs against the FMV virus capsid protein attached to the gold electrode</p>	<p>woltamperometria pulsowo-różnicowa DPV</p>	<p>wirus mozaiki drzew figowych <i>Fig mosaic virus</i>, FMV</p>	<p>choroba drzew figowych fig tree diseases</p>	<p>1 nM FMV</p>	<p>Haji-Hashemi i in. 2019</p>

Objaśnienia: LOD – granica wykrywalności; jtk – jednostki tworzące kolonie; DPV – woltamperometria pulsowo różnicowa; Abs – przeciwciała (immunoglobuliny).
 Explanations: LOD – limit of detection; cfu – cell forming unit, DPV – differential pulse voltammetry, Abs – antibodies.

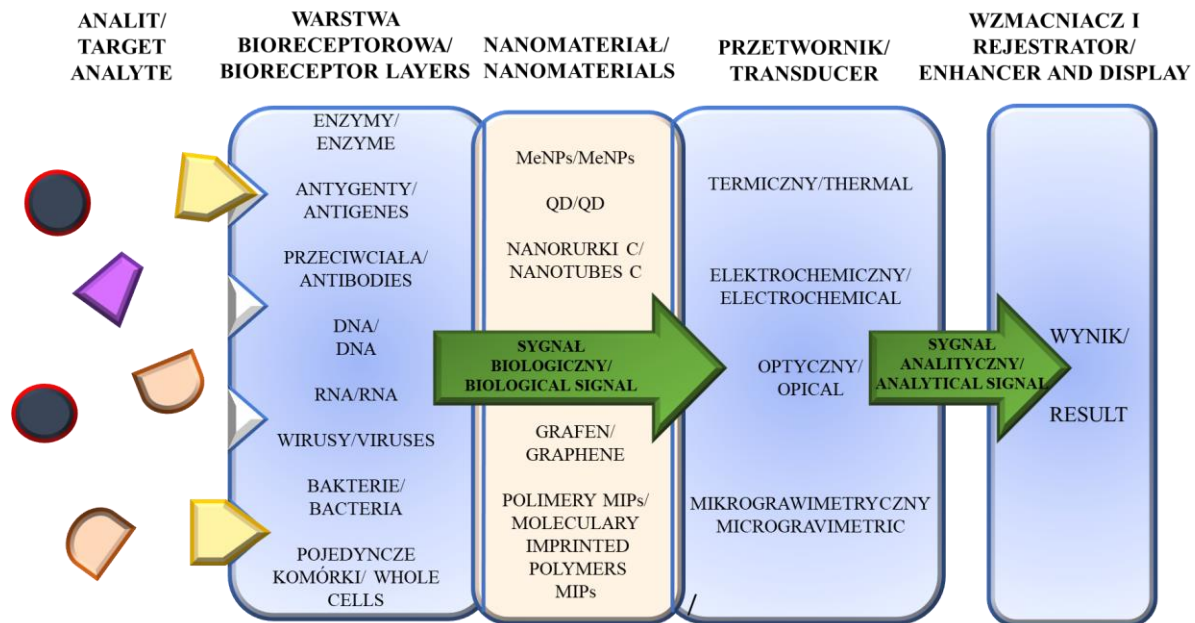
Tabela 3. Detekcja wybranych fitopatogenów za pomocą immunosensorów z transdukcją optyczną
 Table 3. Detection of selected phytopathogens using optical based immunosensors

Warstwa bioczuła/ nanokomponent Biorecognition element/ nanocomponent	Przetwornik/technika Transducer/technique	Patogen Pathogen	Choroba/gospodarz Plant disease/host	Czułość (LOD)/ zakres oznaczeń Sensitivity (LOD)/ range of detection/	Source Źródło
pierwszorzędowe Abs związane z fluorescencyjnymi NPs krzemionkowymi, drugorzędowe - Abs kozię/primary Abs attached to fluorescent silica NPs, secondary goat Abs	Fluorescencja fluorescence	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	bakteryjna plamistość roślin psiankowatych bacterial spot disease in <i>Solanaceae</i> plant	10^3 jtk·ml ⁻¹ 10^3 cfu·ml ⁻¹	Yao i in. 2009
Abs przeciw białku błony IMP przyłączone do CdTe QDs Abs against the immunodominant membrane protein (IMP) attached to CdTeQDs	bezpromienisty rezonans transferu energii FRET	Candidatus <i>Phytoplasma aurantifolia</i>	czarciomiotlastość drzew cytrusowych witches' broom disease of lime trees, WBDL	$5 \cdot \mu\text{l}^{-1}$ Ca. <i>P. aurantifolia</i>	Rad i in. 2012
MABs przyłączone do funkcjonalizowanej powierzchni złotej elektrody/MABs attached to surface functionalized gold electrode	rezonans plazmonów powierzchniowych w wersji imaging SPRI	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> (obecnie <i>Acidovorax citrulli</i>)	bakteryjną plamistość owoców fruit blotch	10^6 jtk·ml ⁻¹ 10^6 cfu·ml ⁻¹	Puttharugsa i in. 2011
PAb przeciw <i>X. fastidiosa</i> przyłączone do funkcjonalizowanej powierzchni złotej elektrody PAb against the <i>X. fastidiosa</i> attached to surface functionalized gold electrode	wieloparametrowy powierzchniowy rezonans plazmonów multiparameter surface plasmon resonance MPSPR	<i>Xylella fastidiosa</i>	choroby winorośli, brzoskwini i in. Pierce's disease of grapevine, phony peach disease a.o.	10^5 jtk·ml ⁻¹ 10^5 cfu·ml ⁻¹	Sarcina i in. 2021
MAB przeciw białku kapsydu wirusa PVY przyłączone do funkcjonalizowanej złotej elektrody MAB against the PVY virus capsid protein attached to surface functionalized gold electrode	rezonans plazmonów powierzchniowych surface plasmon resonance	wirus Y ziemniaka <i>Potato virus Y</i> PVY	brunatna nekroza nerwów liści tytoniu; choroby ziemniaka, pomidora, papryki oraz niektórych dzikich gatunków z rodziny <i>Solanaceae</i> brown necrosis of tobacco leaf veins; diseases of potato, tomato, pepper and some wild species of the <i>Solanaceae</i> family	0,31 mg·ml ⁻¹	Gutiérrez-Aguirre i in. 2014

MABs przeciw białkom kapsydów wirusów TMV i CPMV/MABs against TMV and CPMV virus capsid proteins	rezonans plazmonów powierzchniowych surface plasmon resonance	wirus mozaiki tytoniu, wirus mozaiki wspanięgi <i>Tobacco mosaic virus</i> , TMV, <i>Cowpea mosaic virus</i> , CPMV	mozaika tytoniu, mozaika wspanięgi disease tobacco mosaic, virus diseases of cowpea	–	Dubs i in. 1992
Abs pierwszorzędowe związane z magnetycznymi NPs; Abs drugorzędowe związane z SiO ₂ NPs primary Abs attached to magnetic NPs, secondary Abs attached to SiO ₂ NPs	Fluorescencja fluorescence	wirus pierścieniowej plamistości pomidora, wirus pstrzości strąków fasoli, wirus mozaiki gęsiówki <i>Tomato ringspot virus</i> , ToRSV, <i>Bean pod mottle virus</i> , BPMV, <i>Arabis mosaic virus</i> ; ArMV	choroby pomidorów, choroby roślin strączkowych, choroby roślin z rodzaju <i>Rubus</i> diseases of tomatoes, diseases of legumes, diseases of plants of the genus <i>Rubus</i>	10 ⁻⁴ mg·ml ⁻¹ 10 ⁻⁴ – 10 ⁰ mg·ml ⁻¹	Zhang i in. 2013
Abs przeciw MCMV związane z AuNPs Abs anti MCMV attached to AuNPs	rezonans plazmonów powierzchniowych surface plasmon resonance	wirus chlorotycznej pstrzości kukurydzy <i>Maize chlorotic mottle virus</i> , MCMV	letalna nekroza kukurydzy corn lethal necrosis, CLN	1 ppb; 1 ppb – 1000 ppb	Zeng i in. 2013
Abs przeciw wirusom CymMV i ORSV związane z nanoprętami złota Abs anti CymMV i ORSV attached to Au nanorods (AuNRs)	rezonans plazmonów powierzchniowych surface plasmon resonance	wirus mozaiki cymbidium, wirus pierścieniowej plamistości <i>Cymbidium mosaic virus</i> ; CymMV, <i>Odontoglossum ring-spot virus</i> , ORSV	choroby storczykowatych orchids diseases	48 pg·ml ⁻¹ (CymMV), 42 pg·ml ⁻¹ (ORSV)	Wang i in. 2012

Objaśnienia: Abs – przeciwciała (immunoglobuliny), MABs – monoklonalne przeciwciała, PABs – poliklonalne przeciwciała, NPs – nanocząstki, SPR- rezonans plazmonów powierzchniowych;

Explanation: Abs – antibodies, MABs – monoclonal antibodies; PABs – polyclonal antibodies, NPs – nanoparticles, SPR – surface plasmon resonance



Ryc. 3. Schemat budowy nanobiosensora [Renneberg in. 2008, Sharma i in. 2021]
 Fig. 3. Diagram of the construction of the nanobiosensor [Renneberg in. 2008, Sharma i in. 2021]

Tabela 4. Detekcja wybranych fitopatogenów za pomocą genosensorów z transdukcją elektrochemiczną
 Table 4. Detection of selected phytopathogens using electrochemical based genosensors

Warstwa bioczuła/ nano-komponent Biorecognition element/ nanocomponent	Technika Technique	Patogen Pathogen	Choroba/gospodarz Plant disease/host	Czułość (LOD)/ zakres oznaczeń Sensitivity (LOD)/ range of detection/	Źródło Source
ssDNA związane z AuNPs, kulki magnetyczne opłaszcz- zone streptawidyną ssDNA attached to AuNPs, streptavidin magnetic bead	pulsowo- -różnicowa woltamperometria DPV	<i>Pseudomonas syringae</i> pv tomato	bakteryjna cętkowość pomidora bacterial speck disease of tomato	214pM	Lau i in. 2017
tiolowany ssDNA przyłą- czony do AuNPs Thiolated ssDNA attached to AuNPs	elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna EIS	wirus tristeza cytrusów <i>Citrus tristeza virus</i> ; CTV	tristeza atakująca drze- wa cytrusowe tristeza, diseases of citrus	0.1–10 µM.	Khater i in. 2019

Objaśnienia: ssDNA — jednonicowy fragment DNA, DPV – woltamperometria pulsowo różnicowa, SPR – rezonans plazmonów powierzchniowych, LSPR – zlokalizowany powierzchniowy rezonans plazmonów, mikrowaga kwarcowa, MP – monoklonalne przeciwciała.

Explanations: LOD – limit of detection, cfu – cell forming unit, RupBy organic fluorescent dye, CdTe QDs – CdTe quantum dots, ssDNA – single stranded DNA, DPV – differential pulse voltammetry, SPR – surface plasmon resonance, LSPR – localized surface plasmon resonance, EIS – electrochemical impedance spectroscopy, QCM – quartz crystal microbalance, MAb – monoclonal antibody, PAb – polyclonal antibody.

Tabela 5. Detekcja wybranych fitopatogenów za pomocą genosensorów transdukcją optyczną
 Table 5. Detection of selected phytopathogens using optical based genosensors

Warstwa bioczuła/ nanokomponent/ Biorecognition element/ nanocomponent	Technika/ Technique	Patogen Pathogen	Choroba/gospodarz Plant disease/ host	Czułość (LOD)/ zakres oznaczeń Sensitivity (LOD)/ range of detection/	Źródło Source
ssDNA związane z AuNPs ssDNA attached to AuNPs	kolorymetria, LSPR colorimetric, LSPR	<i>Ralstonia solana- cearum</i>	śluzak ziemniaków/ bacterial wilt of potato	15 ng DNA <i>R. sola- nacearum</i>	Khaledian i in. 2017
ssDNA związane z AuNPs ssDNA attached to AuNPs	kolorymetria colorimetric	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citulli</i>	bakteryjna plamistość owoców/ bacterial fruit blotch	0,48 nM	Zhao i in. 2011
Tiolowane ssDNA związane z AuNPs Thiolated ssDNA attached to AuNPs a	kolorymetria colorimetric	<i>Pseudomonas syrin- gae</i> różne patowary/ <i>Pseudomonas syrin- gae various pathovars</i>	patogen wielu gatunków roślin uprawnych/ pathogen of many species of crops	15 ng · ml ⁻¹	Vaseghi i in. 2013
ssDNA typu latarni molekularnych, znakowane fluorescencyjnie ssDNA in the form of molecular bea- con, fluorescently labeled	kolorymetria, FRET colorimetric, FRET	wirus mozaiki cym- bidium, wirus pierścieniowej plamistości/ <i>Cymbidium mosaic virus</i> ; CymMV, <i>Odontoglossum ringspot virus</i> , ORSV	choroby storczykowatych orchids diseases	0.5 ng · μl ⁻¹ 0.5 ng RNA/100 mg liści 0.5 ng RNA/100 mg of leaves	Eun i Wong 2000
ssDNA rozpoznające białka płaszczka wirusa ASPV przyłączone do chipa napylonego złotem/ ssDNA recognizing ASPV cortex pro- teins attached to a gold-coated chip	rezonans plazmo- nów powierzch- niowych w wersji imaging SPRI	wirus jamkowatości pnia jabłoni <i>Apple stem pitting virus</i> , ASPV	zaburzenia wzrostu drzew pestkowych i owocowych growth disorders of pomes and fruits	500 mg · ml ⁻¹ białka w ekstrakcie 500 mg · ml ⁻¹ protein in extract	Lautner i in. 2010

enzymów, przeciwciał czy receptorów zwiększyło specyficzność, czułość oraz odporność układu na skrajne warunki fizyko-chemiczne, takie jak niskie/wysokie pH, temperatura lub wysokie stężenia rozpuszczalników organicznych. Materiały te w porównaniu do naturalnych makromolekuł są zdolne do oddziaływania tylko z badanym analitem, co eliminuje interferencje warstwy bioczułej z innymi substancjami obecnymi w próbce [Dickert i in. 2004].

Nanocząstki (kulki) magnetyczne na bazie różnych form tlenku żelaza wykorzystuje się często do rozpoznania analitu i jego separacji pod wpływem przyłożonego pola magnetycznego. Takie podejście umożliwia zagęszczenie próbki, zmniejszenie jej objętości oraz wzmacnia selektywność i czułość układu [Zhang i in. 2013, Lau i in. 2017, Freitas i in. 2019].

Połączenie nanotechnologii z nowoczesnymi technikami elektrochemicznymi i optycznymi umożliwia konstruowanie czujników i bioczujników nowej generacji, opartych na nowych rozwiązaniach detekcji sygnału i katalizy.

ZASADY DETEKЦИИ FITOPATOGENÓW ZA POMOCĄ NANO/BIOSENSORÓW

Choroby zakaźne roślin wywoływane są przez patogenne mikroorganizmy (grzyby, bakterie, wirusy, wiroidy, fitoplazmy) i nicienie. Są one jednymi z głównych czynników ograniczających wydajność upraw i zwiększających straty ekonomiczne w sektorze rolnym [Fang i Ramasamy 2015]. Wykrywanie patogenów roślin jest więc ważnym krokiem w walce z chorobami zarówno w uprawach polowych, jak i szklarniowych.

Tradycyjne metody detekcji fitopatogenów polegają na obserwacji upraw. Chorobę stwierdza się na podstawie zmian morfologicznych roślin (więdnięcie, zmiany zabarwienia, obumieranie tkanek, pojawienie się wydzielin, zniekształceń, narośli, ran) czy też obecności charakterystycznych struktur patogenu. Oznaki te zwykle wskazują na zaawansowane stadium choroby. Uzupełnieniem tych metod są obserwacje mikroskopowe oraz posiewy mikrobiologiczne. Umożliwiają one wykrycie zmian anatomicznych w roślinach pod wpływem patogenu oraz jego identyfikację. Szybsze wykrycie czynnika infekcyjnego umożliwiają metody immunoenzymatyczne (test ELISA) oraz testy molekularne. Te ostatnie są technologiami opartymi na detekcji specyficznych sekwencji kwasów nukleinowych. Najczęściej stosowane techniki diagnostyki molekularnej w fitopatologii obejmują różne warianty analiz opartych na reakcji łańcuchowej polimerazy DNA (ang. polymerase chain reaction, PCR) czy sekwencjonowaniu DNA. Testy te są uznawane za bardzo czułe, dokładne oraz wiarygodne i chociaż wymagają szczegółowych procedur pobierania próbek, kosztownej aparatury badawczej oraz specjalistycznych odczynników to umożliwiają detekcję patogenów we wczesnej, bezobjawowej fazie choroby [Martinelli i in. 2015].

Alternatywą dla metod laboratoryjnych mogą być proste urządzenia, takie jak biosensory. Oferują one możliwość szybkiej detekcji patogennych mikroorganizmów *in situ* – czyli w miejscu występowania roślin to jest w polu, w sadzie czy szklarni [Cassedy i in. 2020]. Z tego względu, układy te mogą być stosowane do analiz prowadzonych w czasie rzeczywistym. Zaletą tych urządzeń jest krótki czas oznaczeń, prosta obsługa, wysoka specyficzność i czułość często przewyższająca efekty analiz uzyskanych metodami immunologicznymi czy molekularnymi.

Przykładem takich rozwiązań jest, elektrochemiczny immunosensor skonstruowany przez Regiart i in. [2017], który wykrywał obecność *Xanthomonas arboricola* w próbkach orzecha włoskiego w trzykrotnie krótszym czasie niż rutynowy test ELISA i zapewniał znacznie wyższą swoistość i czułość oznaczeń. Podobnie elektrochemiczny aptasensor do wykrywania wirusa PPV (ang. *Plum pox virus*, PPV) powodującego ospowość śliwy skonstruowany przez Malecką i in. [2014] charakteryzował się bardzo niską granicą wykrywalności (ang. limit of detection, LOD) wynoszącą 12,8 pg ssDNA PPV/mL. Wysoką czułością charakteryzował się także elektrochemiczny biosensor posiadający w warstwie receptorowej przeciwciała poliklonalne anty-PPV przyłączone do złotej elektrody [Jarocka i in. 2011]. 10 000 razy bardziej czuły niż konwencjonalny test PCR okazał się przenośny elektrochemiczny biosensor DNA skonstruowany do wykrywania *Pseudomonas syringae* [Lau i in. 2017]. Wysoka czułość, precyzja, krótki czas oznaczenia, a także niewielkie koszty analizy jednostkowej sprawiają, że zainteresowanie takimi rozwiązaniami stale rośnie.

Biosensory sprawdziły się także do wykrywania patogenów we wczesnym stadium choroby (na etapie infekcji) dzięki detekcji specyficznych metabolitów roślinnych, tzw. markerów infekcji. Przykładem tego typu podejścia eksperymentalnego są badania Fang i in. [2014]. Zastosowali oni nanocząstki SnO₂ i TiO₂ na sitodrukowanych elektrodach węglowych (ang. screen printed carbon electrodes, SPCs) do wykrywania p-etylogwajakolu za pomocą różnicowej woltamperometrii impulsowej (DPV). Analit jest substancją lotną wytwarzaną przez owoce i rośliny zakażone grzybem *Phytophthora cactorum*. Oba czujniki charakteryzowały się niską granicą wykrywalności, LOD (35 i 62 nmol·L⁻¹, odpowiednio dla elektrod modyfikowanych TiO₂ i SnO₂) oraz wysoką selektywnością. Inną strategię w pośredniej detekcji chorób roślin reprezentuje biosensor służący do wykrywania białka efektorowego PthA produkowanego przez *Xanthomonas citri* subsp. *citri* w ekstraktach z tkanek roślinnych. Białko to wprowadzone do komórek gospodarza ma za zadanie tłumić jego reakcję obronną przez co umożliwia rozwój patogena i kolonizację tkanek roślinnych [Haji-Hashemi i in. 2018].

Tabele 1–5 prezentują przykłady biosensorów/nanobiosensorów skonstruowanych do detekcji patogenów roślinnych z uwzględnieniem rodzaju warstwy bioczułej, sposobu transdukcji sygnału analitycznego oraz rodzaju i funkcji zastosowanego nanomateriału.

Biosensory służące do wykrywania bakterii bazują na wykrywaniu ich składników lub całych komórek. Pierwszy rodzaj biosensorów wymaga zniszczenia ściany/błony cytoplazmatycznej w celu dotarcia do wykrywanych składników komórkowych, takich jak DNA, RNA, enzymów, endotoksyn [Rodriguez-Mozaz i in. 2004]. Główną wadą tych urządzeń jest konieczność przygotowania próbki biologicznej, co skutkuje wykorzystaniem dodatkowych odczynników. Na przykład wykrywanie DNA patogenu często musi być poprzedzone powieleniem (amplifikacją) specyficznych fragmentów DNA za pomocą techniki PCR oraz modyfikacją ich końców [Vaseghi i in. 2013, Lau i in. 2017]. Zabieg ten zwiększa czułość oznaczeń ale jednocześnie wydłuża czas i podnosi koszt jednostkowy testu.

Bardziej efektywnym sposobem detekcji patogenów jest wykrywanie całych komórek mikroorganizmów. Tego typu rozwiązanie reprezentują biosensory opracowane przez zespoły Yao i in. [2009], Puttharugsa i in. [2011], Rad i in. [2012], Zhao i in. [2014] czy Cebula i in. [2019]. Sprawdziły się one w detekcji *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, Candidatus *Phytoplasma aurantifolia*, *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* oraz *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*.

Bioreceptory dla całych komórek bakterii mogą wykrywać wiele antygenów powierzchniowych o charakterze białek, glikoprotein, lipopolisacharydów i peptydoglikanów. Ciekawym rozwiązaniem jest wykorzystanie bakteriofagów jako receptorów w biosensorach do wykrywania wrażliwych bakterii [Tolba i in. 2012]. Wysoką specyficznosc wiązania bakteriofagów PBSPCA1 do bakterii *Pseudomonas cannabina* pv. *alisalensis*, porażających wiele gatunków roślin z rodziny krzyżowych wykorzystano do opracowania testu diagnostycznego służącego do identyfikacji i oznaczania ilościowego tego patogenu [Schofield i in. 2013].

Przeciwciała są podstawowym elementem warstwy biologicznej w biosensorach immunologicznych (tab. 2, 3). Urządzenia te, wykorzystując interakcje antygen–przeciwciało ułatwiają koncentrację i separację specyficznych mikroorganizmów spośród innych drobnoustrojów w badanym środowisku. Do wykrywania komórek różnych szczepów bakterii w obrębie tego samego gatunku najczęściej stosuje się przeciwciała poliklonalne rozpoznające różne epitopy antygeny. Jako warstwy receptorowe biosensorów mogą także zostać wykorzystane przeciwciała monoklonalne, które służą do identyfikacji bakterii w obrębie szczepu. Ich zastosowanie zwiększa więc swoistość i wrażliwość czujnika. Podejście takie zastosowali Puttharugsa i in. [2011] w biosensorze przeznaczonym do wykrywania *Acidovorax avenae* subsp. *citruilli* (obecnie *Acidovorax citruilli*), uzyskując granicę detekcji na poziomie 10^6 jtk·ml⁻¹.

Biosensory immunologiczne znalazły także zastosowanie do wykrywania wirusów roślinnych, takich jak np.: wirus Y ziemniaka (PVY), wirus tristeza cytrusów (CTV), wirus mozaiki drzew figowych (FMV) czy orthospowirus nekrozy pąków orzeszków ziemnych (GBNV) [Gutiérrez-Aguirre i in. 2014, Freitas i in. 2019, Haji-Hashemi i in. 2019, Chaudhary i in. 2021]. W warstwie receptorowej tych biosensorów umieszczono przeciwciała swoiste dla białek płaszcza wirusów. Szczególnym przykładem biosensorów immunologicznych są tzw. biosensory kanapkowe (ang. sandwich immunosensor), gdzie detekcja analitu odbywa się za pomocą dwóch przeciwciał, pierwszorzędowego przyłączonego do przetwornika najczęściej elektrochemicznego i drugorzędowego znakowanego najczęściej enzymem lub nanocząstką, których rola polega na wzmacnianiu sygnału elektrochemicznego. Na tej zasadzie działa czujnik skonstruowany przez Zhao i in. [2014] do oznaczania patogena kukurydzy – *Pantoea stewartii* ssp. *stewartii*.

Przeciwciała drugorzędowe można także sprzęgać z kulkami magnetycznymi, co umożliwia odseparowanie koniugatów przeciwciała (drugorzędowe) – antygen za pomocą pola magnetycznego od innych składników próbki [Freitas i in. 2019]. Utworzenie kompleksu immunologicznego składającego się z dwóch przeciwciał rozpoznających ten sam analit uruchamia sygnał, który jest rejestrowany przez przetwornik. W niektórych przypadkach właściwości magnetyczne nośników przeciwciał (np. Fe₃O₄/SiO₂NPs) wykorzystuje się do odseparowania kompleksów immunologicznych od koniugatów: pojedyncze przeciwciało – antygen, co wzmacnia sygnał analityczny i poprawia czułość i selektywność oznaczenia. Rozwiązanie takie zastosowali Zhang i in. [2013] w konstrukcji biosensora do wykrywania wirusów: pierścieniowej plamistości pomidora, pstrzości strąków fasoli oraz mozaiki gęsiówki porażających odpowiednio: pomidory, rośliny strączkowe oraz szereg roślin z rodzaju *Rubus*.

Biosensory immunologiczne są szeroko stosowane w monitoringu środowiska rolniczego i jak wynika z zestawionych w tabelach 2 i 3 danych mogą one także być przydatne w diagnostyce fitopatologicznej. Ich zaletą jest wysoka specyficznosc oraz z reguły niski próg detekcji analitu, natomiast wadą stosunkowo wysokie koszty pro-

dukcji przeciwciał i ewentualnie ich znakowania. W przypadku trwałego związania przeciwciał warstwy receptorowej z oznaczanymi antygenami użycie tego typu biosensorów jest jednorazowe [Cassedy i in. 2020].

Biosensory zawierające w warstwie receptorowej kwasy nukleinowe (zwane genosensorymi lub aptasensorymi) pozwalają na różnicowanie genotypowe drobnoustrojów na poziomie gatunku, rodzaju lub szczepu. Są też przydatne do detekcji wirusów roślinnych. Rozpoznanie analitu opiera się na reakcji hybrydyzacji pomiędzy komplementarnymi sekwencjami oligonukleotydów (DNA-DNA; DNA-RNA) lub interakcji kwasu nukleinowego z inną cząsteczką np. białkiem. Oddziaływanie pojedynczej nici DNA, tzw. sondy ssDNA warstwy receptorowej z komplementarną nicią (DNA lub RNA) znajdująca się w próbce (tzw. docelowym kwasem nukleinowym, ang. target nucleic acid; NA) polega na tworzeniu struktur dwuniciowych poprzez wiązania wodorowe między odpowiednimi zasadami sąsiadujących nici. Sygnał analityczny wywołany hybrydyzacją komplementarnych nici w takim biosensorze może być uzyskany za pomocą różnych metod: optycznych, elektrochemicznych, termicznych i mikrograwimetrycznych. Wśród nich, jak wynika z danych zamieszczonych w tabelach 1, 4, 5, jednymi z najczęściej wykorzystywanych do detekcji patogenów roślin są czujniki elektrochemiczne i optyczne. Przetworniki elektrochemiczne do detekcji hybrydyzacji często wykorzystują elektroaktywne znaczniki, które różnicują jedno- i dwuniciowe fragmenty DNA w warstwie receptorowej [Tichoniuk 2010]. Podejście takie w konstrukcji biosensorów zastosowali Lau i in. [2017] i Khater i in. [2019]. Opracowane przez nich urządzenia służyły do wykrywania patogenów pomidora – *Pseudomonas syringae* pv *tomato* oraz drzew cytrusowych – wirusa CTV (tristeza cytrusowych).

Sygnał analityczny w genosensorych może być też generowany za pośrednictwem zjawiska fluorescencji. Fluorescencja polega na emisji promieniowania elektromagnetycznego (świeceniu) pod wpływem promieniowania wzbudzenia. Funkcję układu sygnałowego wykazuje cząsteczka fluoroforu. Mogą nimi być naturalne składniki warstwy receptorowej np. niektóre białka czy porfiryny lub celowo wprowadzone znaczniki (ang. fluorophore labeled).

Znaczniki fluorescencyjne mogą być przyłączone do prostych sond DNA lub sond o strukturze szpilki do włosów tzw. latarni molekularnych (ang. molecular beacons) [Eun i Wong, 2000]. Hybrydyzacja, czyli powstanie dwuniciowych fragmentów DNA (dsDNA), jest sygnalizowana poprzez zmiany intensywności fluorescencji lub zjawisko przeniesienia energii między akceptorem a donorem (FRET). Coraz częściej zamiast organicznych znaczników fluorescencyjnych stosuje się nanomateriały, takie jak kropki kwantowe (QDs) czy nanoklastry srebra (ang. Ag nanoclusters, AgNCs), co jest korzystniejsze ze względu na ich wysoką wydajność kwantową, fotostabilność i możliwość manipulacji szerokością widma emisji [Rad i in. 2012].

Nanocząstki AuNPs umożliwiające kolorymetryczną (wizualną) transdukcję sygnału biologicznego zastosowali m.in. Khaledian i in. [2017], Zhao i in. [2011] i Vaseghi i in. [2013] do detekcji *Ralstonia solanacearum*, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* i różnych patowarów *Pseudomonas syringae*. Natomiast Lautner i in. [2010] wykorzystali w transdukcji sygnału biologicznego właściwości plazmoniczne AuNPs (SPRI). Autorzy ci po raz pierwszy w fitopatologii do rozpoznawania białek zastosowali w warstwie receptorowej biosensorów aptamery (jednociowe oligonukleotydy DNA, ssDNA). Opracowany przez nich genosensor wykrywał dwa homologiczne białka płaszczka wirusa jamkowatości pnia jabłoni (ASPV) [Lautner i in. 2010].

Biosensory genetyczne charakteryzują się wysoką czułością, ich czułość detekcji sięga czasami poziomu pojedynczej komórki patogenu lub ng ilości wirusa. Obok licznych zalet aplikacyjnych biosensory mają również wady, charakteryzują się często małą stabilnością w środowisku, co ogranicza ich funkcje biosensorowe [Xu i in. 2009]. Często przed oznaczeniem konieczne jest przeprowadzenie amplifikacji, czyli powielenia fragmentów DNA fitopatogena techniką PCR, gdyż na początkowym etapie infekcji jego ilość w próbce jest niewielka [Lau i in. 2017]. Innym ograniczeniem tego typu bioczuJNIKÓW jest wymóg syntezy określonej sondy DNA oraz wysoki koszt ich znakowania, a także mała przydatność (głównie biosensorów piezoelektrycznych) do oznaczeń w czasie rzeczywistym.

Komponentami warstw receptorowych biosensorów mogą być także enzymy. Stanowią one warstwę rozpoznającą w biosensorze lub wspomagają działanie innych receptorów, takich jak np. przeciwciała czy kwasy nukleinowe. W tym przypadku pełnią funkcję znaczników. Znacznik enzymatyczny w formie peroksydazy chrzanowej (HPR) zastosowali Zhao i in. [2014] i Freitas i in. [2019] w elektrochemicznych biosensorach do wykrywania wirusów roślinnych oraz patogennych bakterii *Pantoea stewartii* ssp. *stewartii*.

PODSUMOWANIE

Literatura naukowa opisuje wiele opracowanych prototypów biosensorów i nanobiosensorów, których przydatność do detekcji czynników infekcyjnych roślin została potwierdzona w warunkach laboratoryjnych. Jak wynika z przedstawionych danych są to głównie immuno- i genobiosensory bazujące na elektrochemicznej i optycznej detekcji sygnałów analitycznych. Większość opracowanych w ostatnich latach biosensorów wykorzystuje nanomateriały jako czynniki wzbogacające warstwy receptorowe lub przetwornikowe biosensorów. Dzięki interesującym właściwościom magnetycznym, elektrycznym, optycznym oraz katalitycznym poprawiają one czułość i specyficzność, a także skracają czas oznaczeń. Nie bez znaczenia jest to, że komponenty te są względnie tanie i ogólnie dostępne. Nanomateriały można także łatwo samodzielnie otrzymać, wykorzystując dostępne substraty oraz dobrze opracowane protokoły syntez. Poza tym, zmieniając środowisko reakcji można modyfikować ich właściwości elektrochemiczne i fizyczne, co umożliwia dostosowanie ich parametrów do konkretnych potrzeb. Ta cecha sprawia, że nanomateriały wykazują duży potencjał aplikacyjny w technologiach biosensorowych.

Pomimo dużej liczby opracowanych biosensorów do detekcji i ilościowego oznaczania fitopatogenów ich komercjalizacja, a co za tym idzie dostępność dla zainteresowanych odbiorców (rolników, sadowników) jest ciągle niewielka. Główną przeszkodą w upowszechnianiu tej technologii są trudności ilościowego oznaczania patogenów w warunkach polowych [Dyussebayev i in. 2021]. Istotnym czynnikiem ograniczającym postęp w upowszechnianiu biosensorów w diagnostyce chorób roślin jest także brak dostatecznej wiedzy o minimalnej ilości komórek patogenu (dawce infekcyjnej) potrzebnej do wywołania choroby u rośliny żywicielskiej. Ustalenie tego progu jest niezbędne do oszacowania ryzyka pojawienia się choroby na podstawie ilości wykrytych patogenów w tkankach roślin. W świetle tych danych, zarówno dalsze badania z zakresu interakcji patogen-gospodarz jak i samej technologii konstrukcji biosensorów (udoskonalanie warstw bioczułych biosensorów, jak i zintegrowanych z nimi przetworników) może doprowadzić do wzrostu

znaczenia tych urządzeń w najbliższej przyszłości.

PIŚMIENNICTWO

- Bhattacharjee A., Roy T.S., Haque Md.N., Pulok Md.A.I., Rahman Md.M., 2014. Changes of sugar and starch levels in ambient stored potato derived from TPS. *Int. J. Sci. Res. Public.* 4(11), 1–5.
- Cai H., Xu Y., Zhu N., He P., Fang Y., 2002. An electrochemical DNA hybridization detection assay based on a silver nanoparticle label. *Analyst.* 127(6), 803–808. <https://doi.org/10.1039/b200555g>
- Cassedy A., Mullins E., O’Kennedy R., 2020. Sowing seeds for the future: the need for on-site plant diagnostics. *Biotechnol. Adv.* 39. <https://doi.org/107358>. doi:10.1016/j
- Cebula Z., Zoledowska S., Dziąbowska K., Skwarecka M., Malinowska N., Białobrzeska W., Czaczyk E., Siuzdak K., Sawczak M., Bogdanowicz R., Nidzworski D., 2019. Detection of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* on antibody-modified gold electrodes by electrochemical impedance spectroscopy. *Sensors* 19. <https://doi.org/10.3390/s19245411>
- Chaudhary M., Verma S., Kumar A., Basavaraj Y.B., Tiwari P., Singh S., Chauhan S.K., Kumar P., Singh S.P., 2021. Graphene oxide based electrochemical immunosensor for rapid detection of groundnut bud necrosis orthotospovirus in agricultural crops. *Talanta* 235, 122717. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122717>
- Dickert F.L., Hayden O., Bindeus R., Mann K.J., Blaas D., Waigmann E., 2004. Bioimprinted QCM sensors for virus detection-screening of plant sap. *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 1929–1934. <https://doi.org/10.1007/s00216-004-2521-5>
- Dubs M.C., Altschuh D., Van Regenmortel M.H.V., 1992. Mapping of viral epitopes with conformationally specific monoclonal antibodies using biosensor technology. *J. Chromatogr. A.* 597 (1–2), 391–396. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)80136-i](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)80136-i)
- Dyussebayev K., Sambasivam P., Bar I., Brownlie J., Shiddiky M., Ford R., 2021. Biosensor technologies for early detection and quantification of plant pathogens. *Front. Chem.* 9, <https://doi.org/articles/10.3389/fchem.2021.63624>
- Dyussebayev K., Sambasivam P., Bar I., Brownlie J.C., Shiddiky M.J.A., Ford R., 2021. Biosensor technologies for early detection and quantification of plant pathogens. *Front. Chem.* 9. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.636245>
- Eun A.J.C., Huang L., Chew F.T., Li S.F.Y., Wong S.M., 2002. Detection of two orchid viruses using quartz crystal microbalance-based DNA biosensors. *Phytopathology* 92, 654–658.
- Eun A.J.C., Wong S.M., 2000. Molecular beacons. A new approach to plant virus detection. *Phytopathology* 90, 269–275.
- Fang Y., Ramasamy R.P., 2015. Current and prospective methods for plant disease detection. *Biosensors* 4, 537–561. <https://doi.org/10.3390/bios5030537>
- Freitas T.A., Proença C.A., Baldo T.A., Materón E.M., Wong A., Magnani R.F., Faria R.C., 2019. Ultrasensitive immunoassay for detection of Citrus tristeza virus in citrus sample using disposable microfluidic electrochemical device. *Talanta* 205. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.07.005>
- Gutiérrez-Aguirre I., Hodnik V., Glais L., Rupar M., Jacquot E., Anderluh G., Ravnikar M., 2014. Surface plasmon resonance for monitoring the interaction of Potato virus Y with monoclonal antibodies. *Anal Biochem.* 447, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.10.032>
- Haji-Hashemi H., Habibi M.M., Safarnejad M.R., Norouzi P., Ganjali M.R., 2018. Label-free electrochemical immunosensor based on electrodeposited prussian blue and gold nanoparticles for sensitive detection of citrus bacterial canker disease. *Sens. Actuators B Chem.* 275, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.07.148>
- Haji-Hashemi H., Safarnejad M.R., Norouzi P., Ebrahimi M., Shahmirzaie M., Ganjal, M.R., 2019. Simple and effective label free electrochemical immunosensor for Fig mosaic virus detection.

- Anal. Biochem. 566, 102–106. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.11.017>
- Jarocka U., Wasowicz M., Radecka H., Malinowski T., Michalczyk L., Radecki J., 2011. Impedimetric immunosensor for detection of plum pox virus in plant extracts. *Electroanalysis* 23, 2197–2204. <https://doi.org/10.1002/elan.201100152>
- Jian Y.S., Lee C.H., Jan F.J., Wang G.J., 2018. Detection of *Odontoglossum* Ringspot Virus infected *Phalaenopsis* using a nano-structured biosensor. *J. Electrochem. Soc.* 165. <https://doi.org/10.1149/2.0351809jes>
- Jin L., Yang K., Yao K., Zhang S., Tao H., Lee S.T., Liu Z., Peng R., 2012. Functionalized graphene oxide in enzyme engineering: a selective modulator for enzyme activity and thermostability. *ACS Nano*. 6(6), 4864–4875.
- Kaur R., Sharma S.K., Tripathy S.K., 2019. Advantages and limitations of environmental nanosensors. W: Deep A., Kumar S. (red.), *Advances in nanosensors for biological and environmental analysis*. Elsevier.
- Khaledian S., Nikkhab M., Shams-bakhsh M., Hoseinzadeh S., 2017. A sensitive biosensor based on gold nanoparticles to detect *Ralstonia solanacearum* in soil. *J. Gen. Plant Pathol.* 83, —9. <https://doi.org/10.1007/s10327-017-0721-z>
- Khater M., Alfredo de la E.M., Daniel Q.G., Merçoçi A., 2019. Electrochemical detection of plant virus using gold nanoparticle-modified electrodes. *Anal. Chim. Acta.* 1046, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.09.031>
- Korotkaya E.V., 2014. Biosensors: design, classification, and applications in the food industry. *Foods Raw Mater.* 2, 161–171. <https://doi.org/10.12737/5476>
- Lau H., Wu H., Wee E., Trau M., Wang Y., Botella J.R., 2017. Specific and sensitive isothermal electrochemical biosensor for plant pathogen DNA detection with colloidal gold nanoparticles as probes. *Sci Rep.* 7, 38896. <https://doi.org/10.1038/srep38896>
- Lautner G., Balogh Z., Bardoczy V., Meszaros T., Gyurcsanyi R.E., 2010. Aptamer-based biochips for label-free detection of plant virus coat proteins by SPR imaging. *Analyst.* 135. 918–926. <https://doi.org/10.1039/b922829b>
- Lee E., Yoon Y.S., Kim D.J., 2018. Two-dimensional transition metal dichalcogenides and metal oxide hybrids for gas sensing. *ACS Sens.* 3, 2045–2060, <https://doi.org/10.1021/acssensors.8b01077>
- 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. Technol.* 32, 3–13. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00232-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00232-6)
- Lin H.Y., Huang C.H., Lu S.H., Kuo I.T., Chau, L.K., 2014. Direct detection of orchid viruses using nanorod-based fiber optic particle plasmon resonance immunosensor. *Biosens. Bioelectron.* 51, 371–378. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.08.009>
- Liu S., Yuan L., Yue X., Zheng Z., Tang Z., 2008. Recent advances in nanosensors for organophosphate pesticide detection. *Adv. Powder Technol.* 19, 419–441. [https://doi.org/10.1016/S0921-8831\(08\)60910-3](https://doi.org/10.1016/S0921-8831(08)60910-3)
- Luo X.L., Xu J.J., Zhao W., Chen H.Y., 2004. A novel glucose ENFET based on the special reactivity of MnO₂ nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* 19(10), 1295–1300. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2003.11.019>
- Malecka K., Michalczyk L., Radecka H., Radecki J., 2014. Ion-channel genosensor for the detection of specific DNA sequences derived from plum pox virus in plant extracts. *Sensors* 14, 18611–18624. <https://doi.org/10.3390/s141018611>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0246-1>
- Papadakis G., Skandalis N., Dimopoulou A., Glynos P., Gizeli E., 2015. Bacteria Murmur: Application of an acoustic biosensor for plant pathogen detection. *PLoS ONE* 10(7), e0132773.

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132773>
- Puttharugsa C., Wangkam T., Huangkamhang N., Gajanandana O., Himananto O., Sutapun B., Amarit R., Somboonkaew A., Sriksirin T., 2011. Development of surface plasmon resonance imaging for detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) using specific monoclonal antibody. *Biosens. Bioelectron.*, 26(5), 2341–2346. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.10.007>
- Rad F., Mohsenifar A., Tabatabaei M., Safarnejad M.R., Shahryari F., Safarpour, H., Foroutan A., Mardi M., Davoudi D., Fotokian M., 2012. Detection of *Candidatus Phytoplasma aurantifolia* with a quantum dots fret-based biosensor. *J. Plant Pathol.* 94, 525–534. <https://doi.org/10.4454/JPP.FA.2012.054>
- Razmi A., Golestanipour A., Nikkhhah M., Bagheri A., Shamsbakhsh M., Malekzadeh-Shafaroudi S., 2019. Localized surface plasmon resonance biosensing of Tomato Yellow Leaf Curl Virus. *J. Virol. Methods* 267, 107. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.02.004>
- Regiart M., Fernández-Baldo M.A., Villarroel-Rocha J., Messina G.A., Bertolino F.A., Sapag K., 2017. Microfluidic immunosensor based on mesoporous silica platform and CMK-3/poly-acrylamide-co-methacrylate of dihydrolipoic acid modified gold electrode for cancer biomarker detection. *Anal. Chim Acta* 963, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.01.029>
- Renneberg R., Pfeiffer D., Lisdat F., 2008. Biosensing for the 21st Century. Series: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 109, 1–18.
- Rodriguez-Mozaz S., Marco M.P., Alda M.J.L., Barceló D., 2004. Biosensors for environmental applications: future development trends. *Pure Appl. Chem.* 76, 723–752. <https://doi.org/10.1351/pac200476040723>
- Rogers K.R., 2006. Recent advances in biosensor techniques for environmental monitoring. *Anal. Chim. Acta* 568, 222–231. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.12.067>
- Sarcina L., Macchia E., Loconsole G., D’Attoma G., Saldarelli P., Elicio V., Palazzo G., Torsi L., 2021. Surface plasmon resonance assay for label-free and selective detection of *Xylella fastidiosa*. *Adv. NanoBiomed Res.* 1, 2100043. <https://doi.org/10.1002/anbr.202100043>
- Schofield D.A., Bull C.T., Rubio I., Wechter W.P., Westwater C. Molineux I.J., 2013. Light-tagged bacteriophage as a diagnostic tool for the detection of phytopathogens. *Bioengineered* 4(1), 50–54. <https://doi.org/10.4161/bioe.22159>
- Sharma P., Pandey V., Sharma M.M.M., Patra A., Singh B., Mehta S., Husen A., 2021. A review on biosensors and nanosensors application in agroecosystems. *Nanoscale Res Lett.* 16, 136. <https://doi.org/10.1186/s11671-021-03593-0>
- Subrahmanyam S., Piletsky S.A., Turner, A.P.F., 2002. Application of natural receptors in sensors and assays. *Anal. Chem.* 74, 942–952. <https://doi.org/10.1021/AC025673+>
- Tichoniuk M. 2010. Elektrochemiczny biosensor DNA do wykrywania bakterii chorobotwórczych w żywności. *Zeszyty Naukowe. Uniwersytet Ekonomiczny. Poznań*, 183, 27–41.
- Tolba M., Ahmed M.U., Tlili C., Eichenseher F., Loessner M.J., Zourob M., 2012. A bacteriophage endolysin-based electrochemical impedance biosensor for the rapid detection of *Listeria* cells. *Analyst* 137, 5749–5756. <https://doi.org/10.1039/c2an35988j>
- Vaseghi A., Safaie N., Bakhshinejad B., Mohsenifar A., Sadeghizadeh M., 2013. Detection of *Pseudomonas syringae* pathogens by thiol-linked DNA–Gold nanoparticle probes. *Sens. Actuators B Chem.* 181, 644–651. <https://doi.org/10.1016/J.SNB.2013.02.018>
- Wang Y.X., Ye Z.Z., Ying Y.B., 2012. New trends in impedimetric biosensors for the detection of foodborne pathogenic bacteria. *Sensors* 12, 3449–3471. <https://doi.org/10.3390/s120303449>
- Xu K., Huang J., Ye Z., Ying Y., Li Y., 2009. Recent development of nanomaterials used in DNA biosensors. *Sensors* 9, 5534–5557. <https://doi.org/10.3390/s90705534>
- Yao K.S., Li S.J., Tzeng K.C., Cheng T.C., Chang C.Y., Chiu C.Y., Liao C.Y., Hsu J.J., Lin Z.P., 2009. Fluorescence silica nanoprobe as a biomarker for rapid detection of plant pathogens. *Adv. Mater. Res.* 79, 513–551.
- Zeng C., Huang X., Xu J., Li G., Ma J., Ji H.-F., Zhu S., Chen H., 2013. Rapid and sensitive detection of maize chlorotic mottle virus using surface plasmon resonance-based biosensor. *Anal.*

- Biochem. 440(1), 18–22. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.04.026>
- Zhang M., Chen W., Chen X., Zhang Y., Lin X., Wu Z., Li M., 2013. Multiplex immunoassays of plant viruses based on functionalized upconversion nanoparticles coupled with immunomagnetic separation. *J. Nanomater.* 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/317437>
- Zhao W., Lu J., Ma W., Xu C., Kuang H., Zhu S., 2011. Rapid on-site detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* by gold-labeled DNA strip sensor. *Biosens. Bioelectron.* 15, 26(10), 4241–4244. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.04.004>
- 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, 23, 21178–21183. <https://doi.org/10.1021/am506104r>

Źródło finansowania: Praca finansowana z dotacji Ministerstwa Edukacji i Nauki, projekt nr RKM/S/21/2022.

Summary. The aim of the study was to analyse literature data on design solutions for biosensors used to detect phytopathogens. The general principles of the operation of biosensors and the mechanisms of the generation of an analytical signal are discussed. Particular focus was placed on biosensors containing nanomaterials, known as nanobiosensors. Nanomaterials can enhance the receptor layer of the biosensor, the transducer surface, or both of these elements. They immobilize to the transducer surface and stabilize receptor layer molecules or act as labels enhancing the analytical signal. As a result, compared to biosensors based on standard solutions, they have better operating parameters. Nanobiosensors used in phytopathology are primarily genosensors (containing mainly single-stranded DNA oligonucleotides, ssDNA in the receptor layer) or immunosensors (containing antibodies capable of recognizing specific structures of phytopathogenic bacteria or the coat proteins of plant viruses). Electrochemical or optical transduction of the biological signal is usually used in both types of device. Genosensors with microgravimetric signal transduction, based on the quartz microbalance technique, are much less common. Good analytical parameters were obtained for the biosensors and nanobiosensors in laboratory conditions, which is indicative of their great practical potential.

Key words: biosensors, nanobiosensors, detection, phytopathogens

Otrzymano/Received: 13.09.2022
Zaakceptowano/Accepted: 21.12.2022

