

Biosensory – nowoczesne narzędzia analityczne detekcji patogenów roślinnych



Biosensors – novel analytical tools for the plant pathogen detection

Małgorzata Łabańska✉, Włodzimierz Przewodowski

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy Radzików, Oddział w Boninie

✉ e-mail: m.labanska@ihar.edu.pl

Ochrona upraw przed chorobami pełni kluczową rolę w zwiększaniu efektywności produkcji roślinnej. Do tej pory opracowano szereg metod dedykowanych identyfikacji patogenów roślinnych. Najważniejsze z nich to metody molekularne wykorzystujące reakcję łańcuchowej polimerazy DNA – PCR (ang. Polymerase Chain Reaction) oraz metody immunologiczne bazujące na specyficznych oddziaływaniach przeciwciał z odpowiadającymi im antygenami. Jednak wiele z konwencjonalnych metod są czasochłonne i kosztowne, wymagają złożonych urządzeń laboratoryjnych oraz nie są dostosowane do przeprowadzania analiz w warunkach polowych. Z tego względu poszukiwane są szybsze, tańsze metody detekcji patogenów roślinnych, które pozwoliłyby na diagnostykę zarówno w warunkach laboratoryjnych jak i środowiskowych. Od wielu lat biosensory cieszą się niesłabnącym zainteresowaniem jako urządzenia o szerokim potencjale aplikacyjnym. Wysoka czułość i selektywność, możliwość pomiarów w czasie rzeczywistym, a także często niewielkie rozmiary czynią je niezwykle atrakcyjnymi narzędziami analitycznymi. W pracy przedstawiono rutynowe metody identyfikacji patogenów roślinnych, a także budowę, zasadę działania oraz szeroki zakres zastosowań biosensorów. Szczególną uwagę poświęcono elektrochemicznym oraz optycznym biosensorom zawierającym w warstwie receptorowej przeciwciała – immunosensory lub fragmenty kwasów nukleinowych – sensory DNA zaprojektowanym do detekcji patogenów roślinnych.

Słowa kluczowe: biosensory, detekcja patogenów roślinnych, DNA-biosensory, immunosensory.

Crop protecting plays a key role in increasing the efficiency of plant production. So far, a number of methods dedicated to the identification of plant pathogens have been developed. The most important of them are molecular methods employed polymerase chain reaction – PCR and immunological methods based on specific interactions of antibodies with antigens. However, current methodologies are time-consuming, expensive, require complex laboratory equipment, are being not suitable for in-vivo plant pathogen detection. Therefore there is a strong need to develop alternative, low-cost, rapid and with high specificity methods for the detection of plant pathogens which would enable diagnostics both in laboratory and environmental conditions. Over the years biosensors are gaining increasing attention due to their wide range of applications. High sensitivity and selectivity, the possibility of real-time measurements, and often small sizes make them extremely attractive analytical tools. In this work the conventional methods of the plant pathogens identification as well as the structure, principle of operation and a wide range of applications of biosensors are described. Special attention was paid to electrochemical and optical biosensors including as sensing elements antibodies – immunosensors or fragments of nucleic acids – DNA sensors designed for the detection of plant pathogens.

Keywords: biosensors, DNA-biosensors, immunosensors, plant pathogens detection.

Wstęp

Liczba ludności na świecie z roku na rok wzrasta i przewiduje się, że do 2050 roku osiągnie poziom 9 miliardów. Przekłada się to bezpośrednio na rosnące zapotrzebowanie na żywność. Ostatnie badania wskazują, że w latach 2005–2050 globalny popyt na rośliny uprawne zwiększy się o 100% (Tilman i in., 2011). Zaspokojenie wciąż zmieniającego się popytu na produkty żywnościowe oraz zredukowanie negatywnego wpływu rolnictwa na środowisko stanowią kluczowe wyzwania, które stoją przed współczesnym światem (Godfray i in., 2010). Proponowaną przez naukowców oraz organizacje międzynarodowe

odpowiedzią jest zrównoważona intensyfikacja rolnictwa opierająca się na pozyskaniu większej ilości żywności z istniejących gruntów rolnych przy jednoczesnym zmniejszeniu jego wpływu na środowisko (Lichtfouse i in., 2009).

Kluczową rolę w zwiększeniu efektywności produkcji roślinnej odgrywa ochrona roślin, a zwłaszcza zabezpieczenie upraw przed chorobami i ich skutkami. Szacuje się, że roczne straty w plonach spowodowane przez patogeny, zwierzęta oraz chwasty sięgają 20-40% (Savary i in., 2012). W celu zminimalizowania szkód spowodowanych chorobami w uprawach w czasie ich wzrostu, zbiorów, przechowywania

oraz przetwarzania, a także w celu maksymalizacji produktywności i zapewnienia zrównoważonego rozwoju rolnictwa, niezbędna jest szybka i efektywna diagnostyka oraz bezpieczna ochrona.

Metody diagnostyczne patogenów roślinnych

Do tej pory opracowano szereg bezpośrednich oraz pośrednich metod służących do rozpoznawania patogenów roślinnych. Metody serologiczne, molekularne oraz mikrobiologiczne zaliczane są do metod bezpośrednich, które umożliwiają analizę wielu próbek jednocześnie. W tych metodach patogeny takie jak wirusy, bakterie czy grzyby wywołujące chorobę są oznaczane bezpośrednio. Za pomocą metod z drugiej grupy choroba jest diagnozowana na podstawie różnych parametrów takich jak: temperatura, zmiany morfologiczne, poziom transpiracji czy wydzielanie lotnych związków organicznych (Fang i Ramasamy, 2015).

Metody molekularne opierają się na analizie DNA patogenu znajdującego się w ekstrakcie z części badanej rośliny (Leonard i in., 2003). Najczęściej wykorzystywane są testy oparte na reakcji łańcuchowej polimerazy DNA – PCR (ang. Polymerase Chain Reaction) i jego liczne modyfikacje m.in.: Multiplex PCR czy Real-Time PCR, a także fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* – FISH (ang. Fluorescence *In situ* Hybridization) (Salamońska i in., 2016). Metoda FISH polega na jednoczesnej molekularnej i immunologicznej analizie bakterii dzięki zastosowaniu znakowanych fluorescencyjnie sond rRNA oraz przeciwciał specyficznych wobec badanych patogenów. Metody te charakteryzują się wysoką czułością, specyficznością oraz dokładnością. Stanowią one dobrze poznaną technologię, która pozwala na detekcję pojedynczego patogenu w mieszaninie zawierającej kilka analitów. Z drugiej strony, próbki podatne są na zanieczyszczenia, co może doprowadzić do fałszywie pozytywnego wyniku testu. Dodatkowo pojawiające się w próbkach inhibitory polimerazy mogą zahamować przebieg reakcji co skutkuje błędnym rezultatem badań (Martinelli i in., 2015; Khater i in., 2017; Fang i Ramasamy, 2015).

Drugą grupą metod stosowanych do detekcji patogenów są metody serologiczne. Wykorzystują one specyficzne oddziaływania przeciwciał z odpowiadającymi im antygenami tworząc w ten sposób kompleks immunologiczny. Do przeciwciał dołączone są odpowiednie znaczniki (markery) tworząc tzw. koniugaty, które pozwalają na wykrycie powstałego kompleksu immunologicznego. Zastosowany znacznik determinuje metodę detekcji patogenu. Jako markery wykorzystywane są najczęściej

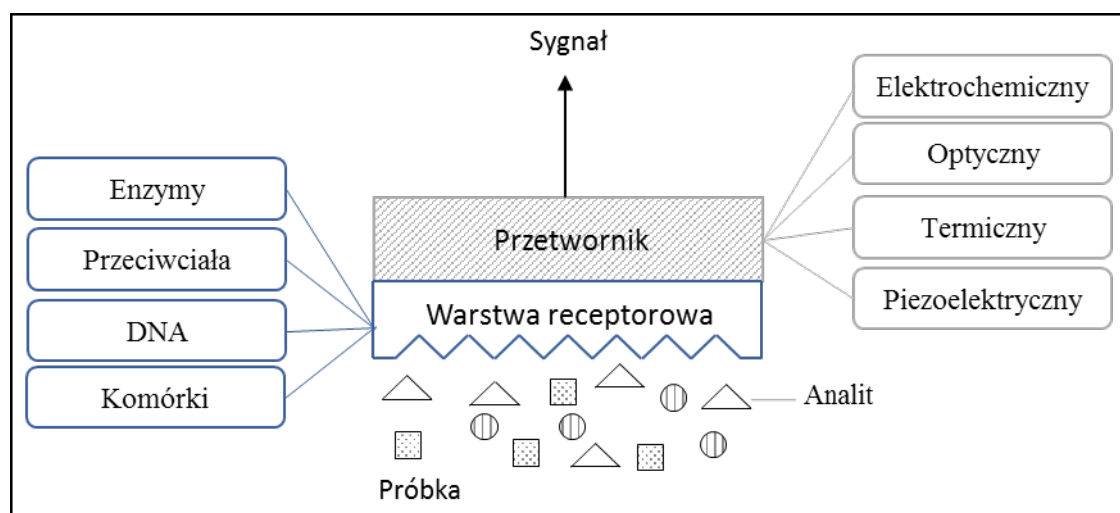
enzymy, barwniki fluorescencyjne lub radioizotopy (Stochła i in., 2017). Immunoenzymatyczny test ELISA (ang. Enzyme-linked Immunosorbent Assay) opracowany w latach 70-tych jest jednym z najczęściej wykorzystywanych, ze względu na możliwość badania dużej liczby prób w czasie pojedynczej analizy. Chociaż metody molekularne są bardziej specyficzne i czulsze niż metody serologiczne, to te ostatnie są szybsze, tańsze i pozwalają wykrywać nie tylko organizmy patogenne, ale również ich biotoksyny, które mogą nie być wyrażane w genomie organizmu (Leonard i in., 2003). Najstarszą techniką detekcji patogenów jest metoda mikrobiologiczna, w której zliczane są komórki bakterii hodowane na odpowiednich pożywkach. Wciąż jest ona stosowana jako metoda referencyjna potwierdzająca pozytywny wynik testu przeprowadzonego alternatywną techniką. Wadą tej metody jest czasochłonność, gdyż testy mogą trwać nawet kilkanaście dni (Lazcka i in., 2007). Pomimo, że zarówno metody molekularne jak i te wykorzystujące tworzenie kompleksów immunologicznych znacznie skróciły czas analizy w porównaniu do klasycznych metod mikrobiologicznych nadal brakuje możliwości wykrywania patogenów w czasie rzeczywistym tzw. *real-time* w warunkach polowych. Stosowane dotychczas metody analityczne są kosztowne, czasochłonne, a także wymagają wyspecjalizowanego sprzętu oraz personelu. Z tego powodu nieustannie trwają badania nad udoskonalaniem rutynowo stosowanych metod laboratoryjnych, a także poszukiwaniem nowych rozwiązań. Opracowane do tej pory metody diagnostyczne umożliwiające wykonanie analizy poza laboratorium (na polu, w szklarni) najczęściej wykorzystują tworzenie kompleksów przeciwciał-antygen (podobnie jak w testach ELISA), co wiąże się z mniejszą czułością w porównaniu do metod molekularnych. Te natomiast wymagają izolowania RNA/DNA oraz stosowania kosztownej aparatury przez co możliwe są do wykonania tylko w laboratorium. Poszukiwane są nowe techniki, które skrócą czas, koszt oraz pracochłonność analizy, będą charakteryzowały się wysoką czułością, selektywnością, a także umożliwią prowadzenie analiz bezpośrednio w warunkach środowiskowych. Od wielu lat wśród kierunków badań rozwijanych przez naukowców biosensory cieszą się niesłabnącym zainteresowaniem jako urządzenia o szerokim potencjale aplikacyjnym.

Biosensory

Biosensory to rodzaj czujników chemicznych, które w swojej budowie zawierają element

biologiczny służący do rozpoznawania analitu (oznaczanej substancji). Zgodnie z definicją Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC, ang. International Union of Pure Applied Chemistry) są to samodzielne, zintegrowane urządzenia, które dostarczają specyficznych ilościowych lub pół-ilościowych informacji analitycznych za pomocą biologicznych elementów receptorowych (bioreceptorów) znajdujących się w bezpośrednim kontakcie z przetwornikiem (Thevenot i in., 2001). W budowie czujników chemicznych wyróżniane są dwie główne części: warstwa receptorowa oraz przetwornik. Warstwa receptorowa stanowi najważniejszy element, ponieważ odpowiada za specyficzne rozpoznanie analitu. W biosensorych tworzą ją elementy biologiczne takie jak: enzymy, nici DNA, przeciwciała, białka, porfiryny czy organelle komórkowe (rys. 1).

Warunkuje ona podstawowe parametry pracy czujnika, które decydują o jego użyteczności. Najważniejsze z nich to: selektywność, czułość, zakres dynamiczny i liniowy krzywej kalibracji, granica oznaczalności i wykrywalności oraz czas odpowiedzi. Istotne są również stabilne i powtarzalne odpowiedzi czujników, ich czas życia, a także wiarygodność otrzymywanych rezultatów (Brzózka i Wróblewski, 1999; Sankiewicz i in., 2014). Zadaniem przetwornika jest konwersja sygnału chemicznego na sygnał mierzalny fizycznie np. elektryczny lub optyczny. Detekcja może wiązać się ze zmianą mierzonego sygnału, jego pojawieniem się lub zanikiem. Najczęściej stosowane są przetworniki elektrochemiczne oraz optyczne. W literaturze opisywane są również biosensory zawierające przetworniki piezoelektryczne lub termiczne.



Rys.1 Schemat budowy biosensora wraz z przykładowymi przetwornikami oraz substancjami biologicznymi w warstwie receptorowej

Fig. 1. Schematic diagram of biosensor with exemplary transducers and biological substances forming receptor layer

Oddziaływanie bioreceptora z analitem generuje sygnał chemiczny charakterystyczny dla danego zjawiska biologicznego. Jest on następnie przetwarzany przez przetwornik na sygnał użyteczny analitycznie, a na końcu rejestrowany np. przez komputer. Mechanizm rozpoznawania i wiązania się analitu z receptorami w warstwie chemoczułej porównywany jest do dopasowania klucza do zamku. Tylko w przypadku odpowiedniego dopasowania analitu – klucza do receptora – zamku, inicjowany jest sygnał (Kłós-Witkowska, 2015).

Biosensory są najczęściej klasyfikowane ze względu na zawarty w warstwie receptorowej element biologiczny jak również rodzaj przetwornika. Najstarszą grupę stanowią biosensory enzymatyczne, w których enzymy (biokatalizatory)

selektywnie rozpoznają substraty i katalizują ich reakcję. Najpopularniejszym przedstawicielem tej grupy bioczujników jest glukometr. Często warstwę receptorową tworzą przeciwciała, które specyficznie (selektywnie) tworzą kompleksy z antygenami. Takie kompleksy stosowane są m.in. w komercyjnie dostępnych testach ciążowych. Wykorzystywane są poliklonalne, monoklonalne, a także rekombinowane przeciwciała zależnie od ich sposobu syntezy i selektywności. W literaturze przedstawiane są również biosensory w których elementem biologicznie aktywnym są antygeny, białka, porfiryny a także całe organizmy takie jak bakterie czy wirusy. Interesującą nową grupą biosensorów są aptasensory, zawierające aptamery czyli jednoniciowe, syntetyczne oligonukleotydy (krótkie fragmenty DNA

badź RNA) lub peptydy, które dzięki możliwości przyjmowania ściśle określonych form przestrzennych specyficznie wiążą dany analit (Chambers i in., 2008).

Ze względu na rodzaj sygnału generowanego przez przetwornik, jako wyniki oddziaływania receptora z analitem, biosensory dzielą się na cztery główne grupy: elektrochemiczne, optyczne, piezoelektryczne oraz termiczne (Kłós-Witkowska 2015, Perumal i Hashim, 2014). W ostatnich latach wykorzystywane są również inne przetworniki np. magnetyczne lub mikromechaniczne. Najstarszą grupę stanowią biosensory elektrochemiczne, które dalej dzielą się na amperometryczne, potencjometryczne, konduktometryczne oraz impedancyjne w zależności od generowanego sygnału. Jest to odpowiednio: natężenie prądu, potencjał (siła elektromotoryczna ogniwa), przewodność lub impedancja. Są one wciąż jednymi z najczęściej stosowanych typów czujników (Grieshaber i in., 2008). Charakteryzują się niskim kosztem produkcji, łatwością obsługi, wysoką czułością, krótkim czasem odpowiedzi oraz możliwością miniaturyzacji. Z drugiej strony wykazują wrażliwość na zakłócenia pola magnetycznego oraz na zmiany pH środowiska pomiarowego, co może stanowić przeszkodę gdy zmiana ta jest wywołana innym czynnikiem niż oddziaływanie pomiędzy bioreceptorem a analitem. Zmiana pH lub siły jonowej badanego roztworu np. buforu zawierającego analit lub substrat reakcji enzymatycznej może skutkować zarejestrowaniem różnej wartości sygnału biosensora.

W ostatnich latach wielu naukowców prowadziło intensywne badania nad biosensorymi optycznymi. Są one równie popularne co biosensory elektrochemiczne (Łazcka i in., 2007). Dzięki wysokiej czułości, małym rozmiarom, możliwością bezpośredniej analizy bez użycia znaczników w czasie rzeczywistym oraz równoczesnemu oznaczeniu kilku analitów stanowią alternatywę w stosunku do konwencjonalnych metod. Czujniki te rejestrują zmiany parametrów optycznych wykorzystując takie zjawiska jak: luminescencja, fluorescencja, fosforescencja, absorpcja, polaryzacja oraz załamania światła. Coraz częściej spotykane w literaturze są optyczne biosensory opierające się na zjawisku powierzchniowego rezonansu plazmowego (SPR, ang. Surface Plasmon Resonance). Za pomocą metody SPR badane są zmiany współczynnika załamania promieniowania spowodowane związaniem się cząsteczek analitu na powierzchni metalu (Sankiewicz i in., 2014). Nieco rzadziej stosowane są przetworniki piezoelektryczne które opierają się na zjawisku odkrytym przez braci Curie

w 1880 r. Polega ono na pojawianiu się ładunków elektrycznych na powierzchni materiałów (piezoelektryków) pod wpływem naprężeń mechanicznych. W takich czujnikach przetwornik wykonany jest z materiału piezoelektrycznego, najczęściej kwarcu, pokrytego warstwą receptorową, który drga z pewną częstotliwością. Oddziaływanie analitu z bioreceptorem powoduje zmianę częstotliwości, kontrolowaną przez zewnętrzny sygnał prądowy. Wywołana zmiana prądu dostarcza informacji o masie analitu. Z reguły stosowane są dwa typy przetworników piezoelektrycznych: mikrowaga kwarcowa (QMB, ang. Quartz Microbalance) oraz czujniki bazujące na zjawisku akustycznej fali powierzchniowej (SAW, ang. Surface Acoustic Wave). W przeciwieństwie do wyżej opisywanych czujników, biosensory piezoelektryczne charakteryzują się niskimi czułościami i wysokimi granicami oznaczalności (Kłós-Witkowska, 2014). Za pomocą biosensorów termicznych rejestrowana jest zmiana ciepła wynikająca z rozpoznania przez bioreceptor analitu. Może być ona powiązana z ilością powstałego produktu lub ubytkiem substratu reakcji. 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.

Historia biosensorów rozpoczęła się w latach 50 ubiegłego wieku wraz z badaniami prof. Lelenda C. Clarka Jr., nad elektrochemiczną redukcją tlenu na elektrodzie platynowej. Rezultatem jego badań był sensor czuły na tlen nazwany później elektrodą Clarka. Służył do określania zawartości tlenu we krwi, wodzie i innych cieczach w czasie rzeczywistym. W 1962 r. L. C. Clark Jr. oraz C. Lyons opracowali pierwszy enzymatyczny biosensor do oznaczania glukozy. Opracowana technologia została przeniesiona do firmy Yellow Springs International Company (YSI), która w 1975 r. wprowadziła na rynek pierwszy analizator do bezpośredniego pomiaru glukozy. Urządzenia te były głównie wykorzystywane w laboratoriach klinicznych ze względu na swoją wysoką cenę. Pod koniec lat 60 został zaprezentowany pierwszy potencjometryczny biosensor służący do oznaczania mocznika. Była to jonoselektywna elektroda z unieruchomioną ureazą czuła na jony amonowe. W połowie lat 70 w warstwie receptorowej zastosowano po raz pierwszy przeciwciała, tworząc immunosensor. Biosensory zyskały popularność w latach 80. XX wieku, odzwierciedlając rosnący nacisk na biotechnologię. W ciągu tej dekady wprowadzono

nowe przetworniki, w tym optyczne (światłowodowy) i piezoelektryczne (masowe). Pierwszy biosensor do samodzielnego monitorowania poziomu glukozy we krwi był wielkości długopisu i został wprowadzony na rynek 1987 r. przez firmę Medisense Inc. Dalsze badania nad biosensorymi doprowadziły w latach 90 do opracowania podskórnie wszczepianych elektrod wielkości igły do ciągłego monitorowania poziomu glukozy. Kolejnym przełomowym odkryciem był biosensor zawierający kwasy nukleinowe (DNA) w warstwie receptorowej. Ostatnie dwie dekady to przede wszystkim połączenie nanotechnologii i biosensorymi poprzez m.in. wykorzystanie nanotechnologii krzemu, nanocząstek złota czy nanorurek węglowych (Kim i in., 2019). Można stwierdzić, że początkowo siłą napędową rozwoju biosensorymi była potrzeba opracowania czujnika do monitorowania poziomu glukozy we krwi w warunkach domowych (Magner, 2013). Z czasem projektowano biosensory do oznaczania wielu innych analitów. W przeciągu ostatnich dwudziestu lat liczba publikacji naukowych o tematyce

biosensorymi wzrosła ponad 10-krotnie, jak podaje baza danych Web of Science. Jest to potwierdzenie ogromnego zainteresowania nie tylko naukowców ale również przedstawicieli przemysłu, którzy wspierają finansowo badania nad biosensorymi (Kłós-Witkowska, 2014).

Początkowo biosensory projektowano do zastosowań medycznych, przede wszystkim oznaczania glukozy we krwi (Wang, 2008). Z czasem jednak zakres ich zastosowań stopniowo się powiększał. Wysoka czułość i selektywność, możliwość pomiarów w czasie rzeczywistym, a także często niewielkie rozmiary czynią je niezwykle atrakcyjnymi narzędziami analitycznymi. W literaturze odnaleźć można szereg prac przeglądowych przedstawiających wykorzystanie biosensorymi w medycynie, analizie żywności, ochronie środowiska, przemyśle obronnym czy w badaniach biofarmaceutycznych. W tabeli 1 zebrano przykładowe zastosowania biosensorymi w różnorodnych dziedzinach.

Tabela 1. Przykładowe zastosowania biosensorymi w różnych dziedzinach

Table 1. Examples of applications of biosensorymi in various fields

Obszar zastosowań Field of application	Cel analizy Aim of the analysis	Referencja Reference
Medycyna	Monitorowanie poziomu glukozy we krwi	Wang, 2008
	Diagnostyka chorób nowotworowych	Cynk i Gaweł, 2012
	Wykrywanie wirusa HIV (ang. <i>Human Immunodeficiency Virus</i>)	Farzina i in. 2020
	Detekcja hormonów	Eguilaz i in. 2010
	Wykrywanie markerów chorób układu sercowo-naczyniowego	Pultar, J. 2009
Produkty spożywcze	Kontrola żywności modyfikowanej genetycznie	Radecki i in. 2006
	Detekcja patogenów w żywności	Leonard i in. 2003
	Wykrywanie alergenów w żywności	Zhou i in. 2019
	Oznaczanie pestycydów	Cesarino i in. 2019
Ochrona środowiska	Ocena jakości wody	Kołwzan 2009
	Detekcja jonów metali ciężkich w wodzie	Gumpu i in. 2015
	Oznaczanie pestycydów	Pundira i in. 2019
Przemysł obronny	Detekcja węgla	Hao i in. 2009
	Wykrywanie rycyny	Cunningham i in. 2015
	Detekcja jadu kielbasianego	Shi i in. 2015

Zastosowanie biosensorymi do detekcji patogenów roślinnych

Intensywnie rozwijanym obszarem zastosowań biosensorymi jest rolnictwo. Prowadzone są badania nad bioczujnikami, które pozwoliłyby na szybką, niedrogą, łatwą oraz możliwą do przeprowadzenia w warunkach polowych detekcję patogenów roślinnych. Najczęściej do tego celu projektowane

są czujniki zawierające w warstwie receptorowej przeciwciała – immunosensory lub fragmenty kwasów nukleinowych – sensory DNA w połączeniu z przetwornikiem elektrochemicznym oraz optycznym.

W biosensorymi elektrochemicznych możliwe są dwa sposoby detekcji (rys 2). Elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna (EIS, ang.

Electrochemical Impedance Spectroscopy) wykonywana jest jako metoda bezpośrednia, w której wartość rejestrowanego sygnału bezpośrednio jest związana z ilością oznaczanego patogenu w badanym materiale. Biosensorem impedancyjnym jest zwykle elektroda wykonana z metalu szlachetnego (złoto, platyna) lub węgla szklстого z unieruchomionym receptorem np. przeciwciałem lub pojedynczą nicią DNA. Rozpoznanie molekularne tj. utworzenie kompleksu z antygenem lub hybrydyzacja nici DNA (odpowiednio) generuje zmianę na granicy faz elektroda/roztwór czego wynikiem jest rejestrowana zmiana impedancji. Tego typu czujniki charakteryzują się wysoką czułością, jednak ich niewystarczająca selektywność w próbkach o złożonym składzie pozostaje nierozwiązanym wyzwaniem ograniczającym ich komercjalizację. Dodatkową trudnością jest interpretacja uzyskanych wyników. Współpraca dwóch polskich grup badawczych Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN oraz Instytutu Ogrodnictwa kilka lat temu zaprezentowała immunosensory impedancyjne do detekcji dwóch patogenów wywołujących choroby roślin: wirusa ospowatości śliwy (PPV) (Jarocka i in., 2011) oraz wirusa nekrotycznej pierścieniowej plamistości (PNRSV) (Jarocka i in., 2013). Opracowany czujnik do detekcji PNRSV charakteryzował się dobrą czułością oraz selektywnością, a także wymagał niewielkiej objętości próbki (10 ml). Zademonstrowano zdolności dyskryminacyjne biosensora, który rozróżniał próbki z ekstraktów zdrowych roślin od próbek zawierających 0,01% ekstraktu z zakażonego materiału roślinnego (Jarocka i in., 2013).

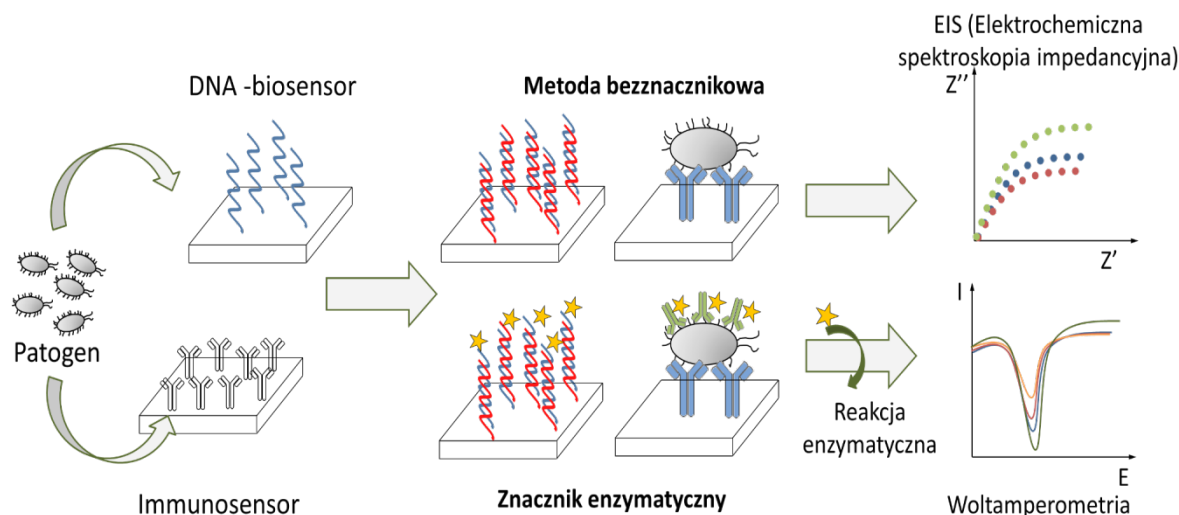
Metody pośrednie tzw. znacznikowe wymagają obecności odpowiedniej substancji, którego ilość z jednej strony wpływa na wielkość rejestrowanego sygnału, a z drugiej jest bezpośrednio związana z ilością patogenu w próbce. Jest to połączenie immunologicznej metody ELISA z technikami amperometrycznymi lub woltamperometrycznymi (Felix i Angnes, 2018; Kokkinos i in., 2016). Rejestrowany sygnał prądowy jest efektem reakcji utleniania lub redukcji produktu reakcji katalizowanej przez enzym, która zachodzi na powierzchni elektrody pracującej. Utworzenie kompleksu immunologicznego pomiędzy przeciwciałem a antygenem determinuje zajście reakcji enzymatycznej, analogicznie do testu ELISA. Przeciwciała znakowane są najczęściej peroksydazą chrzanową (HRP) lub alkaliczną fosfatazą (AP) ze względu na szeroki wybór substratów reakcji które katalizują, ich wysoką wydajność oraz warunki reakcji sprzyjające pomiarom prądowym (pH, stężenie, rozpuszczalność

w wodzie). Niestety niewielka dostępność koniugatów przeciwciał z enzymami stanowi istotne ograniczenie tej metody (Khater i in., 2017). Mendes wraz ze współpracownikami opracował woltamperometryczny immunosensor do wczesnej detekcji rdzy soi wywoływanej przez grzyba *Phakopsora Pachyrhiz*. Na powierzchnię zminiaturyzowanej elektrody węglowej (ang. screen-printed) nakładano zawieszinę zawierającą zmodyfikowane magnetyczne cząstki. Na ich powierzchni powstawał kompleks immunologiczny antygen-przeciwciało znakowane alkaliczną fosfatazą. Zaobserwowano nie tylko znaczą różnicę rejestrowanego sygnału w obecności antygeny w próbce, ale również liniową zależność pomiędzy jego zawartością a natężeniem prądu (Mendes i in., 2012). Woltamperometryczny immunosensor do detekcji bakterii *Pantoea stewartii* sbsp. *Stewartii* (PSS) przyczyny bakteryjnego więdnienia kukurydzy przedstawił Zhao i wsp. (Zhao i in., 2014). W celu amplifikacji sygnału zastosowano nanocząstki złota (AuNP), które powleczone przeciwciałami znakowanymi peroksydazą chrzanową. Dzięki temu uzyskano granicę detekcji na poziomie $7,8 \times 10^3$ CFU/ml co w porównaniu do wyników konwencjonalnego testu ELISA – $1,5 \times 10^5$ CFU/ml stanowiło 20-krotnie niższą granicę detekcji. Podobnie, woltamperometryczna detekcja wirusa mozaiki ogórka (CMV, *Cucumber Mosaic Virus*) z wykorzystaniem przeciwciał znakowanych HRP charakteryzowała się 5-krotnie niższą granicą detekcji w stosunku do referencyjnej metody ELISA połączonej ze spektrofotometryczną detekcją o-fenylendiaminy (Jiao i in., 2000).

W biosensorach elektrochemicznych dedykowanych do detekcji patogenów roślinnych jako bioreceptory stosowane są również pojedyncze fragmenty nici DNA (tzw. sondy DNA). Obecność w próbce komplementarnej nici do tej unieruchomionej na powierzchni elektrody prowadzi do reakcji hybrydyzacji, którą można obserwować za pomocą technik prądowych. Biosensor DNA do oznaczania wirusa śliwy (*Plum Pox Virus*) był efektem współpracy grup badawczych z Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN oraz Instytutu Ogrodnictwa (Malecka i in., 2014). Reakcja hybrydyzacji unieruchomionego na powierzchni elektrody z węgla szklстого zmodyfikowanego oligonukleotydu NH_2 -ssDNA i dwóch komplementarnych nici DNA o różnych długościach generowała sygnał rejestrowany za pomocą woltamperometrii fali prostokątnej w obecności sondy redoks $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Uzyskano granicę detekcji na wynoszącą 12,8 pg/ml. Khater wraz z współpracownikami opracował

impedancyjny DNA-biosensor do oznaczania wirusa CTV (*Citrus tristeza virus*) atakującego cytrusy (Khater i in., 2019). Warstwę receptorową stanowiła powierzchnia sitodrukowanej elektrody węglowej (SPCE, ang. Screen-Printed Carbon Electrode) z osadzonymi nanocząsteczkami złota, do której przyłączono nici DNA zmodyfikowane

grupą tiolową. Pomiary prowadzono za pomocą spektroskopii impedancyjnej (EIS) w obecności sondy redoks $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Otrzymano logarytmiczną zależność pomiędzy rejestrowaną wartością impedancji a stężeniem DNA wirusa w zakresie 0.1–10 μM .



Rys. 2 Schemat identyfikacji patogenów za pomocą biosensorów elektrochemicznych

Fig. 2. Schematic of pathogen identification strategies using electrochemical biosensors

Do detekcji patogenów roślinnych projektowane są również biosensory z przetwornikami optycznymi. Opisywane w literaturze immunosensory optyczne opierają się na systemach typu latera-flow (testy paskowe), zjawisku fluorescencji oraz powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR). Testy paskowe od wielu lat cieszą się niesłabnącym zainteresowaniem ze względu na ich prostotę, niewielki koszt oraz możliwość wykonania analizy w warunkach środowiskowych (Stochła i in., 2017). W warstwie receptorowej tego typu czujników stosowane są nie tylko przeciwciała, ale również pojedyncze nici DNA oraz aptamery. Często w celu intensyfikacji sygnału wykorzystuje się nanocząstki metali np. złota, platyny lub srebra. Przewodowski wraz ze współpracownikami opracował i opatentował testy paskowe do identyfikacji bakterii *Clavibacter Sepedonicus* comb. nov. sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka. Zaprojektowane testy charakteryzowały się granicą detekcji na poziomie 5×10^3 CFU/ml (Przewodowski i Barnyk, 2009). Podobne rozwiązanie do detekcji wirusa ziemniaka X zaprezentował Drygin wraz ze współpracownikami (Drygin i in., 2012) uzyskując granicę detekcji 2 ng/ml. Selektowność testu zbadano względem innych wirusów ziemniaka Y, M

oraz A. Wciąż prowadzone są badania nad biosensorymi tego typu głównie pod kątem zwiększenia ich czułości oraz możliwości ilościowej analizy.

Fluorescencyjny immunosensor wykorzystano do oznaczania kilku patogenów roślinnych jednocześnie, bakterii *Acidovorax avenae subsp. Citrulli* (AAC) oraz trzech wirusów *Chilli vein-banding mottle virus* (CVbMV), *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) i *Melon yellow spot virus* (MYSV). W badaniach posłużono się magnetycznymi mikrosferami powleczonymi przeciwciałami specyficznymi względem każdego z badanych antygenów oraz przeciwciałami znakowanymi barwnikiem fluorescencyjnym R-fikoerytryną. Jednoczesne oznaczanie kilka patogenów w próbce to innowacyjne podejście, o dużym potencjale aplikacyjnym jednak wadą tego rozwiązania jest złożoność analizy (Charlermroj i in. 2013).

Biosensory SPR powstały ponad 20 lat temu i od tego czasu trwają intensywne prace nad ich udoskonalaniem (Damborsky i in., 2016). Immunosensor SPR zawierający nanopręty złota opracowano do detekcji wirusów rośliny storczykowatych (*Cymbidium Mosaic Virus* – CymMV oraz *Odontoglossum Ring Spot Virus* – ORSV) (Lin i in. 2014). Warstwa receptorowa zawierała przeciwciała

specyficzne względem wirusów zmodyfikowane za pomocą nanoprętów złota dzięki czemu uzyskano szersze spektrum w którym widoczne były zmiany sygnałów związane z rozpoznaniem molekularnym. W ten sposób rozwiązano problem interferencji matrycy próbki. Uzyskano granice oznaczalności na poziomie 48 pg/ml (CymMV) i 42 pg/ml (ORSV). Laboratoryjny prototyp immunosensora SPR wykorzystano do detekcji grzyba *Pseudocercospora fijiensis* sprawcy czarnej Sigatoki atakującej banany (Luna-Moreno i in. 2019). Zaprezentowany czujnik charakteryzował się granicą oznaczalności wynoszącą 11.7 µg/ml oraz zakresem liniowym 39.1 – 122 µg/ml. Wielu naukowców prowadzi badania nad immunosensorem SPR, rezultatami ich pracy są czujniki do detekcji wirusa mozaiki tytoniu (TMV) (Boltovets i in. 2002) czy grzyba *Phytophthora infestans* sprawcy zarazy ziemniaka.

Przetwornik optyczny SPR połączono również warstwą receptorową złożoną z nici DNA. Za pomocą takiego biosensora w połączeniu z reakcją PCR przeprowadzono detekcję grzyba *Fusarium culmorum* wywołującego choroby zbóż (Zezza i in. 2006). Sondę DNA unieruchomiono na powierzchni biosensora za pomocą niekowalencyjnego wiązania biotyna-streptawidyna. Hybrydyzacja sondy DNA z produktami reakcji PCR (dsDNA) generowała rejestrowany sygnał.

Popularnym rozwiązaniem optycznych biosensorów DNA jest detekcja kolorymetryczna z wykorzystaniem nanocząstek złota w testach paskowych oraz testach agregacji. Bakterie *Acidovorax avenae subsp. Citrulli* wywołujące bakteryjną plamistość owoców oznaczono za pomocą testu paskowego z unieruchomionymi na powierzchni nanocząstek złota sondami pojedynczymi nićmi DNA. Potwierdzono skuteczność oznaczenia patogenu oraz możliwość analizy półilościowej (Zhao i in., 2011). Przepływowy mikroczip do detekcji patogenów z gatunku *Phytophthora* zaprezentowała Schwenkbier wraz z współpracownikami (Schwenkbier i in., 2015). W opracowanym biosensorze wykorzystano izotermiczną amplifikację za pomocą helikazy do zaprojektowania starterów DNA. Hybrydyzacja komplementarnych nici DNA a następnie osadzenie nanocząstek srebra umożliwiło zarejestrowanie sygnału. W literaturze odnaleźć można wiele innych bioczuJNIKÓW zawierających różnorodne biologiczne elementy oraz wykorzystujące najnowsze odkrycia zakresu technologii materiałów dedykowane detekcji patogenów roślinnych. Przedstawione zostały przykładowe prototypy biosensorów. W laboratoriach na całym świecie trwają intensywne

prace nad czujnikami opartymi na innych metodach detekcji, a także nad udoskonalaniem dotychczas wykorzystywanych metod.

Podsumowanie

Detekcja patogenów roślinnych stanowi ważny kierunek badań naukowych. Opracowanie szybkiej, prostej oraz niedrożej metody wczesnego wykrywania patogenów roślinnych pozwoliłoby na większą kontrolę zdrowotności roślin co mogłoby się przełożyć na wzrost produktywności rolnictwa. Pomimo dobrze poznanych dotychczas stosowanych metod molekularnych i serologicznych, wciąż poszukiwane są nowe rozwiązania umożliwiające wykonanie analizy w warunkach polowych oraz redukcję czasu i kosztów pojedynczej analizy. Jednym z potencjalnych rozwiązań jest wykorzystanie biosensorów. Charakteryzują się prostą budową oraz możliwością miniaturyzacji, a mnogość potencjalnych materiałów do ich konstrukcji roślinie. Historia rozwoju biosensorów ściśle wiąże się z intensywną potrzebą opracowania urządzenia pozwalającego samodzielnie kontrolować poziom cukru we krwi. Z czasem zakres zastosowań tych urządzeń stopniowo się powiększał, od diagnostyki medycznej przez ochronę środowiska, kontrolę jakości produktów spożywczych po wykrywanie materiałów niebezpiecznych. Nadal jednak stanowią one znaczny obszar badawczy dla wielu naukowców. W literaturze zaprezentowano biosensory służące do detekcji wirusów, grzybów oraz bakterii wywołujących choroby roślin. Z reguły są to elektrochemiczne lub optyczne czujniki zawierające warstwę receptorową złożoną z przeciwciał lub sond DNA. Wciąż jednak większość z nich to laboratoryjne prototypy, które być może w przyszłości zostaną skomercjalizowane i spopularyzowane.

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego MINIATURA 3 Nr DEC-2019/03/X/NZ9/01197 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

Literatura

- Boltovets, P.M., Boyko, V.R., Kostikov, I.Y., Dyachenko, N.S., Snopok, B.A., Shirshov, Y.M. (2002). Simple method for plant virus detection: effect of antibody immobilization technique J. Virol. Methods 105, 141–146.
- Brzózka, Z., Wróblewski, W. (1999) Sensory elektrochemiczne W: Z. Brzózka, W. Wróblewski (red), Sensory chemiczne (21–74). Warszawa. Oficyna Wyd. Politechniki Warszawskiej,
- Cesarino, I., Moraes, F.C., Lanza, M.R.V., Machado, S.A.S. (2012). Electrochemical detection of carbamate pesticides in fruit and vegetables with a biosensor based

- on acetylcholinesterase immobilised on a composite of polyaniline–carbon nanotubes. *Food Chem.* 135, 873–879
- Chambers, J.P., Arulanandam, B.P., Matta, L.L., Weis, A., Valdes, J.J. (2008). *Biosensor Recognition Elements*. *Curr. Issues Mol. Biol.* 10, 1–12.
- Charlarmroj, R., Himananto, O., Seepiban, C., Kumposiri, M., Warin, N., Opladowska, M., Gajanandana, O., Grant, I.R., Karoonuthaisiri, N., Elliott, C.T. (2013). Multiplex Detection of Plant Pathogens Using a Microsphere Immunoassay Technology *PLoS One* 8, e62344.
- Cynk P., Gaweł E. (2012). Zastosowanie biosensorów w diagnostyce choroby nowotworowej. *Prz. Med. Univ. Rzesz. Inst. Leków* 3, 373–378
- Cunningham, J.C., Scida, K., Kogan, M.R., Wang, B., Ellington, A.D., Crooks, R.M. (2015). Paper diagnostic device for quantitative electrochemical detection of ricin at picomolar levels. *Lab. Chip* 15, 3707–3715
- Damborsky, P., Svitel, J., Katrlík, J. (2016). Optical biosensors, *Essays Biochem.* 60, 91–100.
- Drygin, Y.F., Blintsov, A.N., Grigorenko, V.G., Andreeva, I.P., Osipov, A.P., Varitzev, Y.A.,
- Uskov, A.I., Kravchenko, D.V., Atabekov, J.G. (2012). Highly sensitive field test lateral flow immunodiagnosics of PVX infection *Appl. Microbiol. Biotech.* 93, 179–189.
- Eguilaz, M., Moreno-Guzman, M., Campuzano, S., González-Cortés, A., Yanez-Sedeno, P., Pingarrón, J.M. (2010). An electrochemical immunosensor for testosterone using functionalized magnetic beads and screen-printed carbon electrodes. *Biosens. Bioelectron.* 26, 517–522
- Fang, Y., Ramasamy, R.P. (2015). Current and prospective methods for plant disease detection. *Biosensors*, 4, 537–561.
- Farzin, L., Shamsipur, M., Samandari, L., Sheibani, S. (2020). HIV biosensors for early diagnosis of infection: The intertwine of nanotechnology with sensing strategies. *Talanta* 206, 120201.
- Felix, F. B., Angnes, L. (2018). Electrochemical immunosensors – a powerful tool for analytical applications. *Biosens. Bioelectron.*, 102, 470–478
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Voros, J., Reimhult, E. (2008). *Electrochemical Biosensors – sensor principles and architectures*. *Sensors* 8, 1400–1458
- Godfray, H.C.J., Beddington, J.R., Crute, I.R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J.F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S.M., Toulmin, C. (2010). Food Security: The challenge of feeding 9 billion people. *Science*, 327, 812–818.
- Gumpu, M.B., Sethuraman, S., Krishnan, U.M., Rayappan, J.B.B. (2015). A review on detection of heavy metal ions in water – An electrochemical approach. *Sens. Actuators B. Chem.* 213, 515–533
- Hao, R.Z., Wang, D.B., Zhang, X.E., Zuo, G.M., Wei, H.P., Yang, R.F., Zhang, Z.P., Cheng, Z.X., Guo, Y.C., Cui, Z.Q. (2009). Rapid detection of bacillus anthracis using monoclonal antibody functionalized QMC sensor. *Biosens. Bioelectron.*, 24, 1330–1335
- Huang, X., Xu, J., Ji, H.F., Li, G., Chen, H., (2014). Quartz crystal microbalance based biosensor for rapid and sensitive detection of Maize Chlorotic Mottle Virus. *Anal. Methods*, 6, 4530–4536
- Jarocka, U., Radecka, H., Malinowski, T., Michalczyk, L., Radecki, J. (2013). Detection of Prunus Necrotic Ringspot Virus in plant extracts with impedimetric immunosensor based on glassy carbon electrode. *Electroanalysis*, 25, 433–438
- Jarocka, U., Wąsowicz, 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.
- Jiao K., Sun W., Zhang S-S. (2000). Sensitive detection of plant virus by electrochemical enzyme-linked immunoassay. *Fresenius J. Anal. Chem.* 367, 667–671.
- Khater, M., de la Escosura-Muniz, A., Merkoci, A. (2017). Biosensors for plant pathogen detection. *Biosens. Bioelectron.*, 93, 72–86.
- Kim, J., Campbell, A. S., Esteban-Fernández de Ávila, B., Wang, J. (2019). Wearable biosensors for healthcare monitoring. *Nat. Biotechnol.* 37, 389–406
- Kłós – Witkowska, A. (2014). Ewolucja i rozwój biosensorów – problemy i perspektywy. *PAK*, 60, 1178–1180.
- Kłós – Witkowska, A. (2015). Biosensory. *PAK*, 19, 37–40.
- Kokkinos, C., Economou, A., Prodromidis, M. I. (2016). Electrochemical immunosensors: Critical survey of different architectures and transduction strategies. *Trends Anal. Chem.* 79, 88–105
- Koźwzan, B. (2009). Zastosowanie czujników biologicznych (biosensorów) do oceny jakości wody – Ochrona środowiska 4, 3–14
- Lazcka, O., Del Campo, F. J., Munoz, F.X. (2007). Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosens. Bioelectron.*, 22, 1205–1217
- 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.
- Lichtfouse, E., Navarrete, M., Debaeke, P., Souchere, V., Alberola, C., Menassieu, J. (2009). Agronomy for sustainable agriculture. A review. *Agron. Sustain. Dev.*, 29, 1–6.
- 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.
- Luna-Moreno, D., Sanchez-Alvarez, A., Islas-Flores, I., Canto-Canche, B., Carrillo-Pech, M., Villarreal-Chiu, J.F., Rodríguez-Delgado, M. (2019). Early detection of the Fungal Banana Black Sigatoka Pathogen *Pseudocercospora fijiensis* by an SPR Immunosensor Method.

- Sensors 19, 465–477.
- Magner, E. (2013). Biosensory elektrochemiczne – możliwości i ograniczenia komercjalizacji. *Chemik*. 67, 11–13.
- 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.
- 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.
- Mendes, R.K., Laschi, S., Stach-Machado, D.R., Kubota L.T., Marrazza G. (2012) A disposable voltammetric immunosensor based on magnetic beads for early diagnosis of soybean rust. *Sens. Actuators B Chem* 166–167, 135–140.
- Perumal, V., Hashim, U. (2014). Advances in biosensors: principle, architecture and applications, *J. Appl. Bio-med.* 12, 1–15.
- Przewodowski, W., Barnyk, A. (2009). Szybki test do identyfikacji bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. *Post. Ochr. Rośl.* 49, 696–700.
- Pultar, J. (2009). Aptamer–antibody on-chip sandwich immunoassay for detection of CRP in spiked serum – *Biosens. Bioelectron.*, 24, 1456–1461
- Pundira, C.S., Malik, A., Pretty, M. (2019) Bio-sensing of organophosphorus pesticides: A review *Biosens. Bioelectron.* 140, 11134
- Radecki, J., Radecka, H., Cieśla, J. (2006). Sensory i biosensory w kontroli żywności modyfikowanej genetycznie, *Biotechnol.* 3, 67–78
- Salamońska, K., Stochła, W., Przewodowski, W. (2016). Nowoczesne metody diagnostyczne w identyfikacji molekularnej bakterii kwarantannowych ziemniaka. *Ziemn. Pol.*, 4, 41–45.
- Savary, S., Ficke, A., Aubertot, J.-N., Hollier C. (2012). Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. *Food Sec.*, 4, 519–537
- Sankiewicz, A., Puzan, B., Gorodkiewicz E. (2014). Bioczułniki SPRI – narzędzia diagnostyczne przyszłości. *Chemik* 68, 528–535
- Schwenkbier, L., Pollok, S., König, S., Urban, M., Werres, S., Cialla-May, D., Weber, K., Popp, J., (2015). Towards on-site testing of *Phytophthora* species. *Anal. Methods* 7, 211–217
- Shi, J.Y., Guo, J.B., Bai, G.X., Chan, C.Y., Liu, X., Ye, W.W., Hao, J.H., Chen, S., Yang, M. A. (2015). Graphene oxide based fluorescence resonance energy transfer (FRET) biosensor for ultrasensitive detection of botulinum neurotoxin a (BoNT/A) enzymatic activity. *Biosens. Bioelectron.* 65, 238–244
- Skottrup, P., Nicolaisen, M., Justesen, A.F., (2007). Rapid determination of *Phytophthora infestans* sporangia using a surface plasmon resonance immunosensor. *J. Microbiol. Methods* 68, 507–515
- Stochła W., Przewodowski, W., Przewodowska, A., Salamońska, K. (2017). Immunodiagnostyczne metody wykrywania i identyfikacji bakteryjnych patogenów ziemniaka – *Ziemn. Pol.*, 1, 14–21.
- Thevenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification – *Biosens. Bioelectron.* 16, 121–131
- Tilman, D., Balzer C., Hill, J., Belfort, B.L. (2011). Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108, 20260–20264.
- Wang, J. (2008). Electrochemical glucose biosensors. *Chem. Rev.* 108, 814–825
- Zeza, F., Pascale, M., Mulè, G., Visconti, A., (2006). Detection of *Fusarium culmorum* in wheat by a surface plasmon resonance-based DNA sensor. *J. Microb. Methods* 66 (3), 529–537
- Zhao, Y., Liu, L., Kong, D., Kuang, H., Wang, L., Xu, C. (2014). Dual amplified electrochemical immunosensor for highly sensitive detection of *Pantoea stewartii* sbsp. *stewartii* ACS Appl. Mater. Interfaces, 6, 21178–21183.
- Zhao, W., Lu, J., Ma, W., Xu, C., Kuang, H., Zhu, S., (2011). Rapid on-site detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citullii* by gold-labeled DNA strip sensor. *Biosens. Bioelectron.* 26, 4241–4244
- Zhou, J., Qi Q., Wang, C., Qian, Y., Liu, G., Wang, Y., Fu, L. (2019). Surface plasmon resonance (SPR) biosensors for food allergen detection in food matrices – *Biosens. Bioelectron.* 142, 111449