

Aleksandra Wańczyk¹, Bogdan Łabędź¹, Zenon Rajfur^{1*}¹Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej, Uniwersytet JagiellońskiWpłynęło w lipcu 2015 r.
Zaakceptowano w październiku 2015 r.

1. Wstęp. 2. Przystosowanie układu do precyzyjnych pomiarów biologiczno-chemicznych. 3. Zastosowanie mikrobiosensorów beleczkowych w pomiarach biologicznych. 3.1. Mikrobiologia. 3.1.1. Wykrywanie mikroorganizmów. 3.1.2. Określanie masy mikroorganizmów. 3.1.3. Badanie wzrostu mikroorganizmów. 3.2. Proteomika. 3.3. Inne zastosowania mikrobiosensorów beleczkowych. 4. Podsumowanie

Application of cantilever-based microbiosensors in microbiology

Abstract: This paper presents applications of cantilever-based microbiosensors in microbiology and other biological fields. These devices can be employed in a wide range of experiments due to their high sensitivity and capability of performing label-free and real-time measurements. Cantilever-based microbiosensors are employed in a variety of measurements, such as single cell mass, concentration of specific substances, their density and viscosity, fluid flow velocity, heat of reaction or detection of trace amounts of specified substances. All these applications are possible, because cantilever surface can be specifically functionalized. In the last few years, the cantilever-based microbiosensors have been significantly improved to obtain even higher precision of measurement which allows for their new, unique applications with live biological systems.

1. Introduction. 2. Adaptation of the system for precise bio-chemical measurements. 3. Application of cantilever-based microbiosensors in biological measurements. 3.1. Microbiology. 3.1.1. Detection of microorganisms. 3.1.2. Microorganism mass determination. 3.1.3. Microorganism growth studies. 3.2. Proteomics. 3.3. Other applications of cantilever-based microbiosensors. 4. Summary

Słowa kluczowe: detekcja oddziaływań biologicznych, MEMS, mikrobiosensor beleczkowy, pomiar masy pojedynczych komórek
Key words: cantilever-based microbiosensors, detection of biological interactions, MEMS, single cell mass measurements

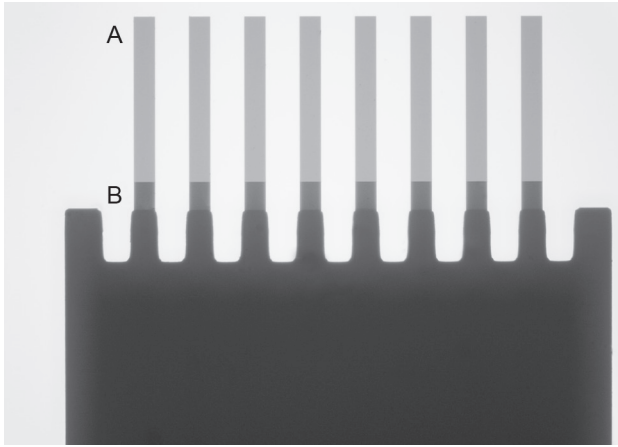
1. Wprowadzenie

W ostatnich latach w naukach biologicznych obserwuje się dynamiczny rozwój nowych metod i urządzeń badawczych, które umożliwiają znaczne poszerzenie dostępnego obszaru badań. Jednym z atrakcyjnych i bardzo obiecujących kierunków jest rozwój przyrządów i materiałów ogólnie zwanych biosensorami. Nazwa ta obejmuje szerokie spektrum narzędzi i metod takich jak: biosensory typu FRET (*Fluorescence/Forster Resonance Energy Transfer*), sensory chemiczne, elektryczne, czy nawet mechaniczne, których celem jest przekształcanie sygnału biologicznego w informację elektroniczną, która później może być opracowywana klasycznymi metodami. W pracy tej chcielibyśmy przedstawić zasady działania i zastosowania w badaniach biologicznych biosensorów należących do grupy urządzeń optomechanicznych – mikrobiosensorów beleczkowych. Są to urządzenia, w których sensorem przekształcającym sygnał biologiczny w informację elektroniczną jest elastyczna beleczka o mikrometrowych wymiarach. Wysoka czułość i precyzja tego

detektora umożliwia rejestrowanie sygnału na poziomie molekularnym [3, 5]. Pomiary wykorzystujące mikrobiosensory beleczkowe charakteryzują się możliwością wykonywania ich w czasie rzeczywistym, detekcją badanej substancji w bardzo małej koncentracji oraz możliwością pracy zarówno w środowisku ciekłym, gazowym, jak i w próżni [34, 35]. Ważną ich zaletą jest brak konieczności stosowania znaczników fluorescencyjnych i radioaktywnych (*label-free measurements*) w badanych substancjach.

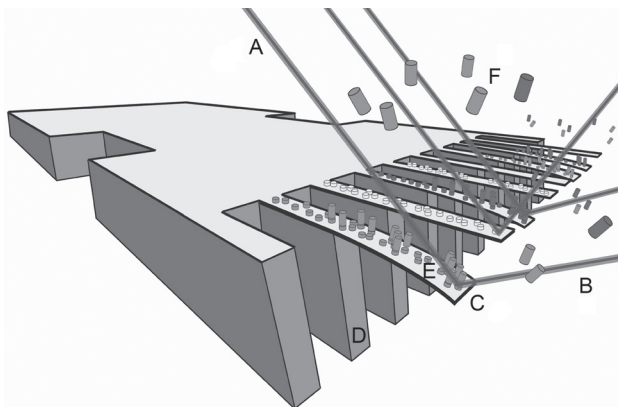
Pierwsze prace opisujące zastosowanie mikrobiosensorów beleczkowych do pomiarów adsorpcji molekuł powstały już przed 1970 r. [45], jednak dopiero w ostatnich kilkunastu latach wykorzystanie potencjału tej metody stało się możliwe dzięki postępom w miniaturyzacji sensorów oraz rozwojowi elektroniki pomiarowej. Podstawowym elementem mikrobiosensorów beleczkowych (Rys. 1) jest beleczka o wymiarach mikrometrowych, zazwyczaj unieruchomiona na jednym jej końcu poprzez wspornik. Współcześnie w pomiarach stosuje się zestawy beleczek zawierające od 2 do 8 osobnych beleczek. Działanie mikrobiosensorów beleczkowych

* Autor korespondencyjny: Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej, Uniwersytet Jagielloński, ul. prof. Stanisława Łojasiewicza 11, 30-348 Kraków; e-mail: zenon.rajfur@uj.edu.pl



Rys. 1. Zdjęcie zestawu beleczek. W skład sensora wchodzi osiem beleczek (A) opartych na wspornikach (B). Cały sensor jest wykonany z krzemu

opiera się na wykorzystaniu efektu wygięcia beleczy (statyczny tryb pracy sensora) bądź na zmianie częstotliwości jej drgań własnych (tryb dynamiczny) w odpowiedzi na działanie zewnętrznego bodźca [3] (Rysunek 2). Ważnym elementem przygotowania próbki do pomiarów w trybie statycznym jest chemiczne rozróżnienie stron beleczy. Takiego rozróżnienia dokonuje się dzięki odpowiedniej procedurze funkcjonalizacji chemicznej powierzchni beleczy z obu jej stron. W wyniku interakcji różnie sfunkcjonalizowanych stron beleczy z bodźcem chemicznym lub biologicznym powstają różnialne naprężenia powierzchniowe. Różnica pomiędzy tymi naprężeniami powoduje wygięcie beleczy (Rysunek 2) [3]. Amplituda wygięcia jest proporcjonalna do wielkości działającego bodźca (Równanie 1). Zmiana naprężenia na powierzchni beleczy może nastąpić



Rys. 2. Schemat mikrobiosensorów beleczkowych. Zestaw ośmiu beleczek (C) jest osadzony na wspornikach (D). Wiązka światła laserowego (A) odbija się od powierzchni beleczy, a odbite światło (B) jest rejestrowane na detektorze pozycyjnym. Powierzchnia beleczy jest sfunkcjonalizowana – pokryta receptorami zaznaczonymi schematycznie jako niskie walce (E) wiążące specyficznie substancję zaznaczoną tutaj jako wysokie walce (F) danego koloru. W zależności od stężenia badanej substancji następuje proporcjonalne wygięcie beleczek, co zostało pokazane na rysunku.

wskutek zjawiska adsorpcji molekuł (np. adsorpcja DNA) lub wskutek zmian oddziaływań w zaadsorbowanych już molekułach (np. hybrydyzacja DNA, zmiany konformacyjne białka) [19].

$$\Delta z = \frac{3(1-\nu)L^2}{Et^2} \Delta\sigma \quad (1)$$

Δz jest wychyleniem końca beleczy z położenia równowagi; $\Delta\sigma$ jest powstałą różnicą naprężeń powierzchniowych między obiema stronami beleczy; ν i E to odpowiednio współczynnik Poissona oraz moduł Younga charakteryzujące materiał z którego wykonana jest beleczy; L i t oznaczają długość i grubość beleczy [50].

Przeprowadzanie pomiarów w trybie dynamicznym wymaga wzbudzenia drgań w beleczy. Mierzając amplitudę drgań beleczy określa się kształt i położenie krzywej rezonansowej w domenie częstotliwości charakterystycznej dla beleczy. Parametry te zależą od właściwości beleczy (takich jak masa i moduł Younga [18, 22]) oraz od właściwości ośrodka otaczającego beleczy (jak gęstość i lepkość [40]). Jeśli dokonuje się pomiarów w stabilnym środowisku, to obserwowana zmiana częstotliwości rezonansowej drgań beleczy wynika ze zmiany jej masy efektywnej następującej wskutek adsorpcji molekuł o znaczącej masie (np. adsorpcja komórki) lub zmiany masy zaadsorbowanej substancji na jej powierzchni (np. wzrost komórki) (Równanie 2). Tryb dynamiczny wykorzystywany jest głównie w pomiarach masy [18, 22], ale także w wyznaczaniu gęstości i lepkości ośrodka [40], prędkości przepływu [10, 11], czy analizie krzywych adsorpcji i desorpcji [13, 32].

$$\Delta m = \frac{\lambda_n^4 k}{4\pi^2} \left(\frac{1}{f_1^2} - \frac{1}{f_0^2} \right) \quad (2)$$

λ_n jest stałą charakterystyczną dla danego modu drgań; k to stała sprężystości beleczy zależna od wymiarów beleczy oraz materiału z którego jest wykonana; f_0 and f_1 to odpowiednio częstotliwość rezonansowa drgań beleczy przed i po adsorpcji molekuł [24].

2. Przystosowanie układu do precyzyjnych pomiarów biologiczno-chemicznych

Dążenie do uzyskania dużej czułości sensorów wywołało rozwój metod detekcji oraz sposobów wzbudzenia drgań beleczy. Oprócz tego pojawiły się także prace opisujące modyfikacje warunków pomiaru zwiększające czułość układu sensorów beleczkowych.

Podstawową metodą odczytu zmiany wychylenia końca beleczy, zaczerpniętą z mikroskopii sił atomowych (*Atomic Force Microscopy*), jest metoda optyczna. Światło lasera pada na koniec beleczy i po odbiciu od

beleccki pada na detektor pozycyjny [6]. Elektronicznie przetworzony sygnał z detektora jest miarą wielkości wygięcia beleccki lub częstotliwości jej drgań. Kolejną metodą odczytu stosowaną w sensorach mikrobeczkowych jest użycie beleccek jako czujników piezorezystancyjnych, gdzie wykorzystywany jest efekt zmiany rezystancji materiału pod wpływem jego ugięcia [21, 43]. Na podobnym efekcie oparte jest wykorzystanie analizatora impedancji do pomiaru wygięcia beleccki [23, 37]. Taki system detekcji sygnału jest tańszy i prostszy niż optyczny, jednak piezorezystor zajmuje znaczną część beleccki. Alternatywnym rozwiązaniem są beleccki oparte na transduktorze MOS (*Metal-Oxide-Semiconductor*), który zajmuje miejsce tylko przy wsporniku beleccki [43].

W pomiarach w trybie dynamicznym wykorzystuje się element wzbudzający belecckę do drgań. Powszechnie stosowany jest materiał piezoelektryczny – pod wpływem doprowadzonego do niego prądu zmiennego następuje jego okresowe odkształcanie [23, 37]. Powstałe wibracje są przekazywane na belecckę wzbudzając ją do drgań. Możliwe jest także wzbudzanie drgań beleccki poprzez elektrotermiczne dostarczanie ciepła do beleccki [48] albo przez oświetlanie laserem (fototermicznie) [41].

Największą trudność w badaniach biologicznych z wykorzystaniem mikrobiosensorów beleczkowych stanowi znaczące tłumienie oscylacji beleccki przez ośrodek ją otaczający (zazwyczaj ciecz). W pracy [41] zaprezentowano modyfikację, która pozwala znacznie zwiększyć czułość tej metody. W metodzie tej beleccki wzbudzane są do drgań w płaszczyźnie poziomej, przez co zmniejsza się tłumienie – podczas drgań beleccka zamiast ścisnąć ośrodek, raczej „przecina” go. Także nowy typ beleccek tzw. SMR (*Suspended Micro-channel Resonator*) może znaleźć szerokie zastosowanie w biologii komórki [4, 15]. Innym sposobem jest umieszczenie beleccki w próżni, co zapewnia bardzo wysoką czułość metody. W tym przypadku w beleczcze jest utworzony kanał, przez który przepływa ciecz zawierająca badane obiekty. Ciągły w czasie pomiar częstotliwości rezonansowej beleccki pozwala na bardzo szybkie zmierzenie masy całej populacji komórek lub pomiar masy pojedynczej komórki w czasie wraz ze śledzeniem fazy cyklu komórkowego, w której się ona znajduje.

3. Zastosowanie mikrobiosensorów beleczkowych w pomiarach biologicznych

3.1. Mikrobiologia

Niski próg detekcyjny, kontrola pomiaru w czasie rzeczywistym i wysoka specyficzność odpowiedzi [34, 35] stanowią o dużym potencjale mikrobiosensorów

beleczkowych w badaniach mikrobiologicznych. Mikrobiosensory beleczkowe mogą być stosowane zarówno do samej detekcji [7, 8, 25, 26, 28, 33, 46], jak i do określania parametrów biologicznych takich jak masa [18, 22], tempo wzrostu [30, 34–35] czy dynamika metabolizmu badanych drobnoustrojów. Obiektem badań są głównie organizmy modelowe takie jak *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* czy *Saccharomyces cerevisiae*. Co więcej, w niektórych pracach pokazano, że czułość mikrobiosensorów beleczkowych umożliwia detekcję na poziomie wirusów czy prionów [8, 46].

Wykrywanie drobnoustrojów

Wysoka czułość mikrobiosensora beleczkowego umożliwia mierzenie niskiej koncentracji patogenów, a w związku z tym – wczesne ich wykrycie. Z kolei odpowiednia funkcjonalizacja zapewnia specyficzność detekcji sensora.

W pracy [7] wykazano możliwość detekcji komórek *E. coli* w bardzo niskiej koncentracji za pomocą mikrobiosensora. Belecckę sfunkcjonalizowano przeciwciałami monoklonalnymi *anti-E. coli O157:H7* i zanurzono w zawiesinie patogenu (od 70 do 70 milionów komórek na mililitr w kolejnych próbach). Wykazano, że możliwa jest detekcja *E. coli* nawet w ilości 700 komórek/ml. Dla porównania we wcześniejszych pracach z wykorzystaniem mikrobiosensora beleczkowego *E. coli* wykrywano w liczbie od 100 tysięcy do 10 milionów CFU/ml (*Colony Forming Unit per milliliter*) [49].

Detekcję wirionów WSSV (*Whitespot Syndrome Baculovirus*) za pomocą mikrobiosensora beleczkowego opisano w pracy [8]. Beleccki sfunkcjonalizowane przeciwciałami *anti-VP28* umieszczano w zawiesinie od 50 do 100 tysięcy wirionów/ml. Najniższą wykrywalną koncentrację określono jako 100 wirionów/ml. Analogicznie przeprowadzono detekcję nukleokapsydów wirusa WSSV, otrzymując podobną czułość sensora. Stwierdzono, że ta metoda dorównuje czułością metodzie reakcji łańcuchowej polimerazy (*polymerase chain reaction*) i zapewnia wykonanie równie szybkich pomiarów (poniżej 30 minut) *in situ* [8].

W pracy [46] wykazano, że możliwa jest również detekcja białka prionowego. Aby zwiększyć czułość sensora, pomiar w trybie dynamicznym wykonano w próżni. W tym celu unieruchomiono białko prionowe metodą „kanapki” (*sandwich assay*) między dwiema warstwami przeciwciał monoklonalnych. Częstotliwość rezonansową układu wyznaczano po każdym kroku pomiaru, tj. po ekspozycji na warstwę przeciwciał pierwszorzędowych, następnie na białka prionowe oraz na zawiesinę przeciwciał drugorzędowych. Wykazano, że częstotliwość rezonansowa maleje z każdym krokiem, co oznacza skuteczną adsorpcję kolejnych warstw. W ten sposób wykazano możliwość detekcji białek prionowych w ilości 2 µg/ml. Następnie

przez adsorpcję znacznika o większej masie – nano-cząstek silikonowych – wykazano, że czułość detekcji białek prionowych za pomocą mikrobiosensora beleczkowego może osiągnąć nawet wartość 2 ng/ml.

Możliwa jest również pośrednia metoda wykrywania patogenów, jak na przykład detekcja glikoproteiny ludzkiego wirusa niedoboru odporności (HIV-1) [28], czy wykrywanie wirusa *Vibrio cholerae* O1 [26] oraz sinic *Microcystis aeruginosa* [25] poprzez detekcję DNA. Polska grupa badawcza wykazała możliwość specyficznej detekcji endotoksyn bakterii gram ujemnych *Hafnia alvei* PCM 1185 oraz PCM 1186 za pomocą beleczki sfunkcjonalizowanej odpowiednimi przeciwciałami [33].

Określanie masy drobnoustrojów

Masa jest jednym z istotnych parametrów charakteryzującym stan i właściwości komórek. Mikrobiosensor beleczkowy pracujący w trybie dynamicznym pozwala na precyzyjne określenie zmian masy efektywnej beleczki po adsorpcji molekuł, co zostało wykorzystane w wyznaczaniu masy drobnoustrojów, w tym także pojedynczych komórek.

W 2001 roku Illic i wsp. [22] za pomocą mikrobiosensora beleczkowego określili, że sucha masa komórki *E. coli* wynosi 665 fg. Pomiar wykonano w trybie dynamicznym, unieruchamiając na beleczce – za pomocą funkcjonalizacji przeciwciałami *anty-E. coli* O157:H7-inaktywowane termicznie komórki. W kolejnych pomiarach wykazano liniową zależność zmiany częstotliwości rezonansowej beleczki w funkcji liczby zaadsorbowanych komórek – w tym także pojedynczej komórki. Natomiast w pracy [32] wyznaczono średnią masę wirusa ospy jako 9,5 fg. Wyznaczono także liniową zależność zmiany częstotliwości rezonansowej drgań beleczki w funkcji liczby zaadsorbowanych wirusów. Podobnie jak w pracy [22] potwierdzono zmianę częstotliwości rezonansowej drgań beleczki w wyniku adsorpcji pojedynczego wirusa.

Badanie wzrostu drobnoustrojów

Ocena żywotności drobnoustrojów jest jednym z zadań zarówno diagnostyki medycznej oraz rolniczej, jak i monitorowania jakości żywności i wody. W poniżej przedstawionych pracach pokazano, że mikrobiosensory beleczkowe są doskonałym narzędziem do określania żywotności oraz dynamiki wzrostu organizmów.

W 2004 roku Gfeller, Nugaeva i Hegner [13] zaprezentowali możliwość szybkiej detekcji wzrostu *E. coli* XLI-Blue za pomocą mikrobiosensora beleczkowego. Sensor umożliwia detekcję aktywnego wzrostu komórek *E. coli* w czasie 1 godziny oraz selektywnej detekcji wzrostu antybiotyko-opornych komórek w czasie 2 godzin. Komórki umieszczono na beleczce z agarem (grupa 1), agarem i antybiotykiem – 10 ug/ml *kanamy-*

cyny – hamującym wzrost *E. coli* XLI-Blue (grupa 2) oraz agarem i antybiotykiem – 10 ug/ml *tetracyklina* – wobec którego *E. coli* XLI-Blue wykazuje oporność (grupa 3). Pomiary wykonywano w środowisku gazowym (powietrze, 37°C, 93% RH). Zaobserwowane zmiany częstotliwości rezonansowej drgań beleczki dla grupy 1 i 3 – a tym samym zmiany masy kolonii – zostały przybliżone modelem Gompertza. Zaobserwowano: okres adaptacyjny, okres wzrostu eksponencjalnego – obserwowany już po 1 lub 2 godzinach pomiaru odpowiednio dla grupy pierwszej i trzeciej oraz fazę stacjonarną. Wspomagając pomiar obserwacją komórek na beleczce za pomocą elektronowego mikroskopu skaningowego oceniono wzrost liczby komórek z 1000 do 8000. Dla grupy 2 nie zaobserwowano zmiany częstotliwości rezonansowej ani liczby komórek.

Drożdże *A. niger* i *S. cerevisiae* są łatwe w hodowli i odpowiadają ludzkim patogenom *Candida Albicans* i *Aspergillus fumigatus* [34]. Za pomocą mikrobiosensora beleczkowego dokonano pomiaru wzrostu komórek *A. niger* i *S. cerevisiae* w trakcie 4 godzin (96–97% RH, 27°C) [35], co daje dziesięć razy szybszą detekcję wzrostu niż w standardowych metodach [34]. W pracy [34] wykorzystując tryb dynamiczny sensora zaobserwowano pączkowanie drożdży oraz rozwój grzybni *A. niger*, co następnie potwierdzono za pomocą zdjęć mikroskopowych. Wyznaczono także masę pojedynczej komórki *S. cerevisiae* jako 69 pg i pojedynczego zarodnika *A. niger* jako 47 pg. Porównano także immobilizację na beleczkach tych drobnoustrojów za pośrednictwem białek konkanawaliny, fibronektyny i immunoglobuliny G. Wykazano, że immunoglobulina G zapewnia maksymalną immobilizację zarodników, rozwój i wzrost grzybni. W pracy [30] potwierdzono możliwość szybkiej detekcji wzrostu *A. niger* (4 godziny). Wykazano także, że podczas gdy masa pojedynczego zarodnika na początku pomiaru wynosi ok. 34 pg, tuż przed podziałem osiąga 270 pg. Wyznaczono prędkość wzrostu grzybni jako 9 μm/h.

3.2. Proteomika

Wśród najważniejszych makromolekuł występujących w żywych komórkach wyróżniamy białka oraz kwasy nukleinowe [20]. Kontrola aktywności białek jest jednym z najważniejszych zagadnień dotyczących wielu dziedzin biologii (np. proteomika) czy medycyny (np. stosowanie leków). Aktywność białek zależy od ich konformacji, która może ulegać zmianie pod wpływem zmian środowiska, takich jak pH, temperatura, czy pojawienie się wiążącego ligandu. Mikrosensory beleczkowe umożliwiają obserwację zmian konformacyjnych białka w czasie rzeczywistym [1]. W pracy Gruber'a i wsp. [17] zbadano za pomocą sensorów beleczkowych odpowiedź enzymu ludzkiego topoizo-

merazy II na różne ligandy. Stwierdzono korelację między ilością ATP a szybkością zmian konformacyjnych badanego enzymu. Na podstawie otrzymanych wyników stworzono model opisujący ten proces oraz pokazano działanie akklarubicyny – leku przeciwrakowego jako inhibitora zmian konformacyjnych w topoizomerazie II.

Sensory mikrobeczkowe ze względu na swoją wysoką czułość znajdują także szerokie zastosowanie w medycynie, głównie do wykrywania markerów danej choroby. W tym celu ważne jest właściwe sfunkcjonalizowanie belecзки, aby specyficznie wykrywała poszukiwane markery. Najczęściej stosuje się wiązania antygen-przeciwciało [16]. Między innymi możliwe jest wykrycie swoistych antygenów prostaty oraz białek C-reaktywnych, które są specyficznymi markerami raka prostaty oraz choroby serca [44], czy przeciwciał wiążących specyficznie antygeny choroby w celu wykrycia tej choroby [39].

Sensory beleczkowe mogą być także wykorzystane do badania węglowodanów i ich oddziaływań z białkami. Przykładem jest stosowanie tychże sensorów do wykrycia wiązań pomiędzy mannozydazą a białkiem Cyanovirin-N, które wiąże i blokuje ludzki wirus niedoboru odporności (HIV) [17]. Stwierdzono także możliwość wykrycia białek wiążących węglowodany w stężeniach rzędu pikomoli.

Ważną zaletą mikrobiosensorów beleczkowych z punktu widzenia biologii jest możliwość badania interakcji pomiędzy białkami a kwasami nukleinowymi. Wiele procesów metabolicznych takich jak naprawa DNA, replikacja, transkrypcja czy translacja jest od tego zależna. Głównym białkiem biorącym udział w tych procesach jest białko wiążące jednoniciowe DNA (*single-stranded DNA-binding protein*). Mikrobiosensory beleczkowe pozwalają na wykrycie śladowych ilości tego białka bez znakowania fluorescencyjnego badanej substancji [20].

W wielu badaniach wykorzystuje się sensory mikrobeczkowe do rozpoznawania sekwencji DNA ze względu na ich wysoką czułość [6]. W pracy [50] analizie poddano konformacje jednoniciowego DNA (ssDNA), a tym samym powinowactwo do sfunkcjonalizowanej belecзки ze względu na różne warunki, takie jak gęstość pokrycia powierzchni czy zmienne pH. Pomiar pojedynczych nici DNA wiąże się jednak z niepożądanymi reakcjami krzyżowymi z białkami lub fragmentami nie docelowych nici DNA. Wykrywanie stabilniejszej podwójnej nici DNA daje dokładniejsze rezultaty. Obecnie istniejące metody polegają na pomiarze masy poszczególnych fragmentów nici DNA, jednak wymagane jest porównanie ich do wzorca. W ostatnich latach wykorzystano sensor beleczkowy do tego typu pomiarów [49]. Wykorzystano tryb dynamiczny do pomiaru masy całej nici DNA, a następnie wprowadzono enzym, który przecina nić DNA w określonym

stosunku długości (a także masy fragmentów). Proces ten jest mierzony w czasie rzeczywistym i możliwe jest obliczenie zmiany masy, dzięki czemu nie jest konieczne porównywanie wyników do wzorca.

3.3. Inne zastosowania mikrobiosensorów beleczkowych

Główną zaletą sensorów mikrobeczkowych w zastosowaniach fizycznych jest możliwość wykrycia obecności poszukiwanej substancji w bardzo małych stężeniach. Wykorzystywane jest to w wielu dziedzinach nauki takich jak meteorologia, kontrola środowiska, a także w działaniach antyterrorystycznych [36]. W celu wykrycia obecności substancji stosowane są głównie metody chromatografii, spektroskopii masowej czy też spektroskopii ruchliwości jonów. Metody te jednak wiążą się z dużymi kosztami, skomplikowanym przygotowaniem próbki lub długim czasem pomiaru [39]. Sensory mikrobeczkowe pozwalają na szybki i czuły pomiar w czasie rzeczywistym, wolny od znaczników próbek [50, 20].

Zastosowanie wysokiej czułości sensorów mikrobeczkowych pokazano w pomiarach w środowisku ciekłym. Jak przedstawiono w pracy [42], belecзка pokryta sfunkcjonalizowaną wiązaniami tiolowymi mezoporowatą krzemionką wykrywa jony Hg^{+} z czułością 100 ppb. Natomiast w pracy [9] wykorzystano białko AgNt84-6 wiążące specyficznie jony metali do detekcji Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} oraz Cd^{2+} . Zdemontowano także możliwość wykrywania innych związków chemicznych z wykorzystaniem tej metody [2].

Potwierdzono także zdolność do wykrywania małych stężeń przez sensory beleczkowe w gazach. W pracy [37] rozróżniono stosunek składników mieszaniny helu, argonu i azotu za pomocą sensora mikrobeczkowego. Idea pomiaru opiera się na zmianie częstości rezonansowej drgającej belecзки między środowiskami o różnej gęstości. Możliwe jest wykrycie różnicy gęstości ośrodka gazowego z dokładnością do 88 mg/l (czułość 49 mg/Hz). Podczas analizy środowiska gazowego za pomocą sensora możliwe jest także określenie wilgotności lokalnej [2].

Ponadto sensory mikrobeczkowe są wykorzystywane do wykrywania oparów substancji chemicznych. W pracy [43] zaobserwowano powstawanie wygięcia belecзки w wyniku chemisorpcji oparów acetonu, etanolu, nitroetanolu oraz wody do belecзки sensora. Analizując wygięcie belecзки w czasie rozróżniano adsorbowane substancje. Pomiar tego typu mogą przyczynić się do zrozumienia mechanizmów chemisorpcji różnych substancji. Sensory beleczkowe mają także zastosowanie do wykrywania niebezpiecznych substancji oraz materiałów wybuchowych [39]. Aby zwiększyć czułość wykrycia oparów badanej substancji,

często stosuje się pokrycia beleczek powłokami polimerowymi lub warstwami samoorganizującymi (*self-assembled monolayers* – SAMs) [31].

Sensory mikrobeleczkowe znalazły także zastosowania w kalorymetrii ze względu na dużą czułość temperaturową (efekt bimetaliczny). Dzięki temu zjawisku w pracy [27] badano przebieg reakcji chemicznych zachodzących na ich powierzchni i wyznaczono ciepło tej reakcji z dokładnością do 15 fJ. Możliwe jest także wyznaczenie temperatury lokalnej z dokładnością do 10 μC dla temperatury 27°C [14]. We współczesnych badaniach rozwinięto tę metodę poprzez wykorzystanie struktur Janusa jako nanostudni na powierzchni beleczki. Taka konstrukcja pozwala na pomiar kalorymetryczny bez wykorzystywania efektu bimetalicznego [29].

Oprócz tego opisano także wykorzystanie sensorów mikrobeleczkowych do pomiarów przepływu i kierunku wiatru [10], gdzie otrzymano wysoką czułość (60 $\mu\text{V}/(\text{m/s})$) dla wysokiej szybkości wiatru (18 m/s), czy też do pomiarów zmian gęstości ośrodka z dokładnością do 2 mg/l [11].

Sensory mikrobeleczkowe w pomiarach fizycznych oraz chemicznych zyskały tak szerokie zastosowanie głównie dzięki możliwości szybkiego i taniego wykrycia bardzo małych stężeń substancji. Mikrometrowe rozmiary beleczek pozwalają na zmniejszenie wymiarów i wagi aparatury, co w przyszłości może pozwolić na zbudowanie przenośnych sensorów o wysokiej czułości.

4. Podsumowanie

Sensory mikrobeleczkowe mają zastosowanie w wielu dziedzinach nauki ze względu na wysoką czułość, brak konieczności znakowania badanej substancji znacznikami radioaktywnymi czy fluorescencyjnymi, a także możliwość pomiaru w czasie rzeczywistym. Służą do pomiarów takich wielkości jak masa obiektów, stężenie badanej substancji, prędkość przepływu płynu, gęstość, lepkość i skład ośrodka, w którym znajduje się sensor, a także pomiaru ciepła reakcji czy wykrywania śladowych ilości substancji. Dzięki funkcjonalizacji beleczek możliwa jest także wysoka specyficzność odpowiedzi przy jednoczesnej różnorodności zastosowań.

Z powodu powyższych zalet sensory mikrobeleczkowe zyskały szczególne miejsce w badaniach biologicznych, głównie w mikrobiologii. Dzięki nim możliwy stał się pomiar w czasie rzeczywistym zmian masy żywych układów biologicznych na poziomie pojedynczej komórki. Metoda ta może być wykorzystana nie tylko do analizy dynamiki wzrostu układów biologicznych, ale również ich odpowiedzi biologicznej na czynniki zewnętrzne, takie jak podawane leki czy zmiany środowiskowe. Dodatkowo możliwość detekcji śladowych

ilości patogenów w niekosztowny i szybki sposób może być wykorzystywana w diagnostyce medycznej we wczesnym diagnozowaniu chorób.

W ostatnich latach pojawiły się prace rozwijające układ pomiarowy w kierunku uzyskania lepszej precyzji pomiaru oraz uzyskania przez sensor nowych, unikalnych zastosowań. Świadczy to o jeszcze nie odkrytych możliwościach tego typu sensora, szczególnie w pomiarach biologicznych. W ciągu kolejnych lat można się spodziewać także dalszej miniaturyzacji sensora – możliwość wykrycia śladowych ilości substancji w czasie rzeczywistym za pomocą kompaktowego sensora staje się coraz bardziej realna.

Piśmiennictwo

1. Alonso-Sarduy L., De Los Rios P., Benedetti F., Vobornik D., Dietler G.: Real-Time Monitoring of Protein Conformational Changes Using a Nano-Mechanical Sensor. *PLoS ONE*, **9**, e103674 (2014)
2. Boisen A., Thaysen J., Jensenius H., Hansen O.: Environmental sensors based on micromachined cantilevers with integrated read-out. *Ultramicroscopy*, **82**, 11–16 (2000)
3. Boisen A., Dohn S., Keller S.S., Schmid S., Tenje M.: Cantilever-like micromechanical sensors. *Rep. Prog. Phys.* **74**, 1–30 (2011)
4. Bryan A. K., Goranov A., Amon A., Manalis S. R.: Measurement of mass, density, and volume during the cell cycle of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 999–1004 (2010)
5. Burg T.P., Godin M., Knudsen S.M., Shen W., Carlson G., Foster J.S., Babcock K., Manalis S.R.: Weighing of biomolecules, single cells and single nanoparticles in fluid. *Nature*, **446**, 1066–1070 (2007)
6. Calleja M., Nordstro M., lvarez M. A., Tamayo J., Lechuga L. M., Boisen A.: Highly sensitive polymer-based cantilever-sensors for DNA detection. *Ultramicroscopy*, **105**, 215–222(2005)
7. Campbell G.A., Mutharasan R.: *Escherichia coli* O157:H7 Detection Limit of Millimeter-Sized PZT Cantilever Sensors is 700 Cells/mL. *Anal. Sci.* **21**, 355–357 (2007)
8. Capobiano J.A., Shih W.H., Leu J.H., Lo G.C.F., Shih W.Y.: Label free detection of white spot syndrome virus using lead magnesium niobate-lead titanate piezoelectric microcantilever sensors. *Biosens. Bioelectron.* **26**, 964–969 (2010)
9. Cherian S., Gupta R. K., Mullin B. C., Thundat T.: Detection of heavy metal ions using protein-functionalized microcantilever sensors. *Biosens. Bioelectron.* **19**, 411–416(2003)
10. Du L., Zhao Z., Fang Z.: Drag force micro solid state silicon plate wind velocity sensor. *Sens. Actuator A-Phys.* **151**, 35–41(2009)
11. Du L., Zhao Z., Fang Z.: A micro-wind sensor based on mechanical drag and thermal effects. *Sens. Actuator A-Phys.* **155**, 66–72 (2009)
12. Ferrari M.C., Piccinini E., Baschetti M.G., Doghieri F., Sarti G.: Solvent-Induced Stresses during Sorption in Glassy Polycarbonate: Experimental Analysis and Model Simulation for a Novel Bending Cantilever Apparatus. *Ind. Eng. Chem. Res.* **47**, 1071–1080 (2008)
13. Gfeller K.Y., Nugaeva N., Hegner M.: Rapid Biosensor for Detection of Antibiotic-Selective Growth of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 2626–2631 (2005)
14. Gimzewski J.K., Gerber Ch., Meyer E., Schlittler R.R.: Observation of a chemical reaction using a micromechanical sensor. *Chem. Phys. Lett.* **217**, 589–594 (1994)

15. Godin M., Delgado F.F., Son S., Grover W.H., Bryan A.K., Tzur A., Jorgensen P., Payer K., Grossman A.D., Kirschner M.W., Manalis S.R.: Using buoyant mass to measure the growth of single cells. *Nat. Methods*, **7**, 387–390 (2010)
16. Gopinath P.G., Anitha V.R., Mastani S.A.: Microcantilever based Biosensor for Disease Detection Applications. *J. Med. Biol. Eng.* **4**, 307–311, (2015)
17. Gruber K., Horlacher T., Castelli R., Mader A., Seeberger P.H., Hermann B.A.: Cantilever Array Sensors Detect Specific Carbohydrate-Protein Interactions with Picomolar Sensitivity. *ACS Nano*, **5**, 3670–3678 (2011)
18. Gupta A., Akin D., Bashir R.: Single virus particle mass detection using microresonators with nanoscale thickness. *Appl. Phys. Lett.* **11**, 1976–1978 (2004)
19. Hansen K.M., Ji H.F., Wu G., Datar R., Cote R., Majumdar A., Thundat T.: Cantilever-Based Optical Deflection Assay for Discrimination of DNA Single-Nucleotide Mismatches. *Anal. Chem.* **73**, 1567–1571 (2001)
20. Hou H., Bai X., Xing Ch., Lu B., Hao J., Ke X., Gu N., Zhang B., Tang J.: Label-free detection of single-stranded DNA binding protein based on a cantilever array. *Talanta*, **109**, 173–176 (2013)
21. Hyun S.J., Kim H.S., Kim Y.J., Jung H.I.: Mechanical detection of liposomes using piezoresistive cantilever. *Sens. Actuators B Chem.* **117**, 415–419 (2006)
22. Ilic B., Czaplowski D., Zalalutdinov M., Craighead H.G., Neuzil P., Campangolo C., Batt C.: Single cell detection with micro-mechanical oscillators. *J. Vac. Sci. Technol. B* **19**, 2825–2828 (2001)
23. Johnson B. N., Mutharasan R.L.: The origin of low-order and high-order impedance-coupled resonant modes in piezoelectric-excited millimeter-sized cantilever (PEMC) sensors: Experiments and finite element models. *Sens. Actuators B*, **155**, 868–877 (2011)
24. Johnson B.N., Mutharasan R.: Biosensing using dynamic-mode cantilever sensors: A review. *Biosens. Bioelectron.* **32**, 1–18 (2012)
25. Johnson B.N., Mutharasan R.: A Cantilever biosensor-Based Assay for Toxin-Producing Cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* using 16S rRNA. *Environ. Sci. Technol.* **47**, 12333–12341 (2013)
26. Khemthongcharoen N., Wonglumsom W., Suppat A., Jaruwongrunsee K., Tuantranont A., Promptmas Ch.: Piezoresistive microcantilever-based DNA sensor for sensitive detection of pathogenic *Vibrio cholerae* O1 in food sample. *Biosens. Bioelectron.* **63**, 347–353 (2015)
27. Lai J., Perazzo T., Shi Z., Majumdar A.: Optimization and performance of high-resolution micro-optomechanical thermal sensors. *Sens. Actuators A*, **58**, 113–119 (1997)
28. Lam Y., Abu-Lail N.I., Alam M.S.: Zauscher S., Using microcantilever deflection to detect HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *Nanomedicine: NBM*, **2**, 222–229 (2006)
29. Lee D., Kim S., Chae I.: Nanowell-patterned TiO₂ microcantilevers for calorimetric chemical sensing. *Appl. Phys. Lett.* **104**, 141903 (2014)
30. Maloney N., Lukacs G., Jensen J., Hegner M.: Nanomechanical sensors for single microbial cell growth monitoring. *Nanoscale*, **6**, 8242–8250 (2014)
31. McCaig H.C., Myers E., Lewis N.S.: Vapor Sensing Characteristics of Nanoelectromechanical Chemical Sensors Functionalized Using Surface-Initiated Polymerization. *Nano Lett.* **14**, 3728–3732 (2014)
32. Mochev B., Filenko D., Nikolov N., Popov C., Ivano T., Petkov P., Rangelow I.W.: Investigation of the sorption properties of thin Ge-S-AgI films deposited on cantilever-based gas sensor. *Appl. Phys. A*, **87**, 31–36 (2007)
33. Nieradka K., Kapczyńska K., Rybka J., Lipiński T., Grabiec P., Skowicki M., Gotszalk T.: Microcantilever array biosensors for detection and recognition of Gram-negative bacterial endotoxins. *Sens. Actuators B*, **198**, 114–124 (2014)
34. Nugaeva N., Gfeller K.Y., Backman N., Lang H.P., Duggelin M., Hegner M.: Micromechanical cantilever array sensors for selective fungal immobilization and fast growth detection. *Biosens. Bioelectron.* **21**, 849–856 (2005)
35. Nugaeva N., Gfeller K.Y., Backmann N., Duggelin M., Lang H.P., Guntherodt H.J., Hegner M.: An Antibody-Sensitized Microfabricated Cantilever for the Growth Detection of *Aspergillus niger* Spores. *Microsc. Microanal.* **13**, 13–17 (2007)
36. Pinnaduwa L., Ji H. F., Thundat T.: Moore's law in homeland defense: an integrated sensor platform based on silicon microcantilevers. *IEEE Sens. J.* **5**, 774–785 (2005)
37. Rosario R., Mutharasan R.: Piezoelectric excited millimeter sized cantilever sensors for measuring gas density changes. *Sens. Actuator B*, **192**, 99–104 (2014)
38. Sangeetha P., Juliet A.V.: Biosensor for Tuberculosis detection using MEMS device. *3rd International Conference on Electronics, Biomedical Engineering and its Applications (ICEBEA'2013)*, 52–56 (2013)
39. Senesac L., Thundat T.G.: Nanosensors for trace explosive detection. *Materials Today*, **11**, 28–36 (2008)
40. Shih W.Y., Li X., Gu H., Aksay I.A.: Simultaneous liquid viscosity and density determination with piezoelectric unimorph cantilevers. *J. Appl. Phys.* **89/2**, 1497–1507 (2001)
41. Stahl S. W., Puchner M., Gaub H. E.: Photothermal cantilever actuation for fast single-molecule force spectroscopy. *Rev. Sci. Instrum.* DOI: 10.1063/1.3157466 (2009)
42. Tao Y., Li X.: Resonant cantilever sensors operated in a high-Q in-plane mode for real-time bio/chemical detection in liquids. *Sens. Actuator B*, **157**, 606–614 (2011)
43. Wang J., Feng B.: Chemisorption sensing and analysis using silicon cantilever sensor based on n-type metal-oxide-semiconductor transistor. *MICROELECTRON ENG.* **99**, 1019–1023 (2011)
44. Wee K.W., Kang G.Y., Park J., Kang J.Y., Yoon D.S., Park J.H., Kim T.S.: Novel electrical detection of label-free disease marker proteins using piezoresistive self-sensing micro-cantilevers. *BIOSENS BIOELECTRON*, **20**, 1932–1938 (2005)
45. Wilfonger R.J., Bardell P.H., Chhabra D.S.: The resonator: a frequency selective device utilizing the mechanical resonance of a silicon substrate. *IBM J. Res. Dev.* **12**, 113 (1968)
46. Varshney M., Waggoner P.S., Tan C.P., Aubin K., Montagna R.A., Craighead H.G.: Prion Protein Detection Using Nanomechanical Resonator Arrays and Secondary Mass Labeling. *Anal. Chem.* **80**, 2141–2148 (2008)
47. Xu T., Yu H., Xu P., Xu W., Chen W., Chen C., Li X.: Real-time enzyme-digesting identification of double-strand DNA in a resonance-cantilever embedded micro-chamber. *Lab Chip*, **14**, 1206–1214 (2014)
48. Yang J.P., Lau G.K., Tan C.P., Chong N.B., Thubthimthong B., He Z. M.: An electro-thermal micro-actuator based on polymer composite for application to dual-stage positioning systems of hard disk drives. *Sens. Actuator A*, **187**, 98–104 (2012)
49. Zhang J., Ji H.F.: An Anti E. Coli O157:H7 Antibody-Immobilized Microcantilever for the Detection of *Escherichia coli* (*E. coli*). *Anal. Sci.* **20**, 585–587 (2004)
50. Zhang J., Lang H. P., Yoshikawa G., Gerber C.: Optimization of DNA Hybridization Efficiency by pH-Driven Nanomechanical Bending. *Langmuir*, **28**, 6494–6501 (2012)

