

De microbiële electrode
Bouw en ontwikkelingen

Doctoraalscriptie van Marian Heijne
Groningen, juli 1992

INHOUDSOPGAVE

Inhoudsopgave	1
Voorwoord	2
I. Inleiding	3
II. Historie	5
III. Bouw	7
IV. Verbeteringen	18
V. Toepassingen	23
VI. Toekomstperspectieven	24
Literatuur	26

VOORWOORD

Er bestaat een bonte verzameling aan beschreven micro-organismen op aarde en die verzameling wordt steeds groter. Men ontdekt en beschrijft met de regelmaat van de klok nieuwe micro-organismen. Nieuw beschreven organismen hebben vaak nieuwe, bijzondere eigenschappen. Vooral bacteriën zijn beroemd om hun specialismen. Ze kunnen de meest bizarre niches in de natuur en in de door de mens gevormde omgeving opvullen.

Het bijzondere van deze eigenschappen is, dat vele bruikbaar zijn voor de mens. Zo worden micro-organismen ingezet voor het uitloggen van lage kwaliteitserzen en het bereiden van voedingsmiddelen zoals brood, kaas, yoghurt, zuurkool, bier, wijn en salami. De mens maakt al eeuwen gebruik van micro-organismen, ook al wist men toen nog niet hoe een produkt als wijn ontstond. Nu bekend is wat een micro-organisme is en wat het doet, wordt het uitgebreid ingezet voor bijvoorbeeld analytische doeleinden.

Een zeer recente ontwikkeling is dat van de biosensoren; de koppeling van biologisch materiaal aan een elektrode. Het biologisch materiaal bestond uit enzymen, totdat in 1975 de eerste microbiële elektrode werd beschreven.

Voor een Microbiologe met interesse in praktische toepassingen van micro-organismen lijkt de keuze van dit jonge onderwerp voor de hand te liggen.

I. INLEIDING

Er zijn verschillende methoden om gegevens te vergaren over iets onbekends. De meest gebruikte methoden zijn kijken, voelen en ruiken. Er zijn echter een veelvoud aan parameters die via deze methodes niet meetbaar zijn. Bovendien is het handig om parameters te kunnen kwantificeren. Zodra bepaalde parameters in getallen zijn uitgedrukt kan men voorwerpen of omstandigheden met elkaar vergelijken.

Tegenwoordig is er een veelvoud aan eenvoudige tot zeer ingewikkelde analyse apparatuur ontwikkeld. Kijken gebeurt met spectrofotometers en electronenmicroscopie, voelen met thermometers en tensiometers en ruiken met gaschromatografen. Op deze grote hoeveelheid fysisch/chemische apparatuur zijn een aantal biologische variaties gemaakt, zodat ook een veelvoud aan biologische parameters of producten gekwantificeerd kan worden.

Een voorbeeld is een enzymreactie, resulterend in een kleurverandering, die gemeten kan worden met de spectrofotometer. Hierbij wordt een biocatalytisch materiaal (de enzymen) gekoppeld aan een transducer (de spectrofotometer) om het geschikte signaal (de kleurverandering) om te zetten in een elektronisch signaal (de uitlezing op de meter).

Dit is de definitie van een biosensor in nauwe zin.

In brede zin kan een biosensor elke sensor zijn die gebruik maakt van biologisch materiaal. Bijvoorbeeld het vogeltje dat in een kooitje door de mijnwerkers in de ondergrondse mijn werd meegenomen. Als het vogeltje letterlijk van zijn stokje viel, hadden de mijnwerkers een indicatie over de kwaliteit van de lucht in de mijn. Ook een waakhond zou in de brede definitie een biosensor voor onraad zijn.

In deze scriptie zal de term biosensor exclusief worden gebruikt voor :

Een biologisch herkenningssysteem (de receptor), gekoppeld aan een geschikte transducer, zodat de biologische prikkel in elektronische signalen wordt omgezet (Scheller & Schubert 1989, Corcoran & Rechnitz 1985, Higgins *et al.* 1987, TNO 1992).

Een sprekend voorbeeld is het onderzoek dat bij TNO in Den Helder wordt uitgevoerd naar de vervuiling van de Noordzee. Hierbij worden mosselen als biosensoren gebruikt, omdat deze de kleppen sluiten als ze verontreinigingen waarnemen. Door twee kleine spoeltjes op de schelpen te lijmen is het mogelijk te meten of de kleppen open of dicht zijn en in welke mate (TNO Den Helder).

Een voorbeeld dichterbij huis wordt ook wel bioreceptor genoemd. Een mens zit vol bioreceptoren, die chemische en fysische prikkels omzetten in elektronische signalen. Hierdoor zijn bioreceptoren de oudste biosensoren die er bestaan.

Deze definitie is mogelijk te beperkt. Sensoren, die geen biologisch materiaal bevatten, maar wel in

aanraking komen met biologisch materiaal (zoals intraveneuze bloeddruk- en bloedpH-meters) zouden ook binnen de definitie van biosensoren kunnen vallen (Bergveld 1986). Hierbij wordt uitgegaan van een directe interactie tussen het biologisch materiaal en de transducer (TNO 1992). Verderop in deze scriptie zal blijken dat Bergveld doelt op een derde generatie biosensor, terwijl de definitie in deze scriptie uitgaat van een eerste generatie biosensor.

In deze scriptie zal gewerkt worden met de definitie, zoals die op bladzijde 3 gegeven is. Het biocatalytisch materiaal in de receptor kan bijna alles zijn. Zo worden enzymen, anti-lichamen en plakjes dierlijk of plantaardig weefsel veel gebruikt. Maar komen ook biosensoren met receptoren, menselijke of zoogdiercellen (Parce *et al.* 1989, Racek & Petr 1990), celorganellen of zelfs ionkanalen voor (Minami *et al.* 1991).

Er zijn biosensoren die met hele organismen werken. De meest gebruikte organismen hiervoor zijn de micro-organismen, waarbij vaak bacteriën de voorkeur genieten. Omdat de micro-organismen zich prima lenen voor toepassing op een transducer in elektrodevorm worden deze biosensoren microbiële elektrodes genoemd. Meer specifiek spreekt men over bacteriële elektrodes en gistelektrodes.

Deze scriptie zal de microbiële elektrode in de ruimste zin behandelen. Er wordt gekeken naar de historie van biosensoren, de opbouw van de microbiële elektrode, de toepassingen ervan en de toekomstperspectieven.

II. HISTORIE

De oudste biosensoren zijn wel de receptoren in ons eigen lichaam, zoals die in de loop van de evolutie zijn ontstaan. De eerste door de mens gemaakte biosensor is waarschijnlijk een bloedglucose-sensor, ontwikkeld door Clark. Op zijn O₂-elektrode bracht hij glucoseoxydase aan, afgescheiden van het testmateriaal door een semipermeabele membraan (Scheller & Schubert 1989).

Het tijdperk van de enzymelektrodes was aangebroken. Al gauw ontstond er een grote hoeveelheid publikaties over enzymelektrodes. Nieuwe nomenclatuur was nodig. Bijvoorbeeld de glucose enzymelektrodes kunnen worden onderverdeeld in eerste, tweede of derde generatie elektrodes, afhankelijk van het principe waarop de elektrode is gebaseerd (Gunasingham *et al.* 1990). Nog steeds verschijnen veel artikelen over enzymelektrodes met de nieuwste technieken (Nakajima *et al.* 1991, Mulchandani *et al.* 1990).

De eerste bacteriële elektrode werd beschreven door Divies in 1975 (Corcoran & Rechnitz 1985). Het principe van deze elektrode was simpel: *Acetobacter xylinum* zet ethanol met behulp van zuurstof om in azijnzuur en water. De afname van de hoeveelheid zuurstof is een maat voor de hoeveelheid ethanol aanwezig.

Ook in 1975 publiceerde Janata een artikel over de eerste immuno-elektrode, gebaseerd op het gebruik van antilichamen. Nog geen jaar later kwam Guilbault met de NADH-sensor gebaseerd op mitochondriën. De ontwikkelingen gaan door en in 1986 komen Belli & Rechnitz met een receptrode, gebaseerd op natuurlijke receptoren (Scheller & Schubert 1989).

Voor hun biosensor voor prikkelende aminozuren maken zij gebruik van intacte antennes van de krab *Callinectes sapidus*, waarbij de actiepotentialen direct van de zenuwen worden afgeleid, nadat er kunstmatig zeewater met aminozuren langs het gevoelige deel van de antenne was geleid (Buch & Rechnitz 1989).

De eerste bacteriële elektrode beschreven door Divies was een amperometrische elektrode. De eerste potentiometrische elektrode werd beschreven door Rechnitz en medewerkers, een jaar later (Rechnitz *et al.* 1977).

Vergelijking van de meest toegepaste bioelektrode, de enzymelektrode, met de microbiële elektrode levert een aantal voor- en nadelen op.

Een voordeel van de enzymelektrode is de hoge selectiviteit. Er wordt maar één reactie gecatalyseerd, dus met een gespecialiseerd enzym zijn er geen nevenreacties (Riedel 1991).

Een ander voordeel is de korte respons- en recoverytijd (Corcoran & Rechnitz 1985, Riedel 1991). Hierbij is de responstijd de tijd die nodig is om van de nulwaarde of steady state naar de meetwaarde te gaan. De recoverytijd is de tijd die nodig is om van de meetwaarde weer terug te komen naar de nul of de steady state.

Deze voordelen zijn van zeer groot belang. De voordelen van de microbiële elektrodes zijn echter groter in aantal.

Het eerste voordeel is wel dat de enzymen niet gezuiverd hoeven te worden. Dit spaart tijd bij de preparatie van de elektrode en voorkomt afname van enzymactiviteit door zuivering. Ook zijn niet alle enzymen te koop, of alleen tegen een hoge prijs (Rechnitz 1981).

Een belangrijk voordeel van de microbiële elektrode is dat multi-enzymstappen in één keer genomen kunnen worden. Alle enzymen van een metabolische route zijn in de cel aanwezig, samen met de benodigde co-factoren. Vooral deze co-factoren geven een probleem bij de enzym elektrode, omdat ze eruit diffunderen of niet geregenereerd worden.

De gevoeligheid van de bacteriële elektrode is groter dan die van de enzymelektrode (Margineanu *et al.* 1985).

De levensduur van de microbiële elektrode is circa 20 tot 30 dagen, in tegenstelling tot de enkele uren tot dagen van de enzymelektrode. Vooral dit punt geeft de microbiële elektrode een duidelijke voorsprong in het gebruik.

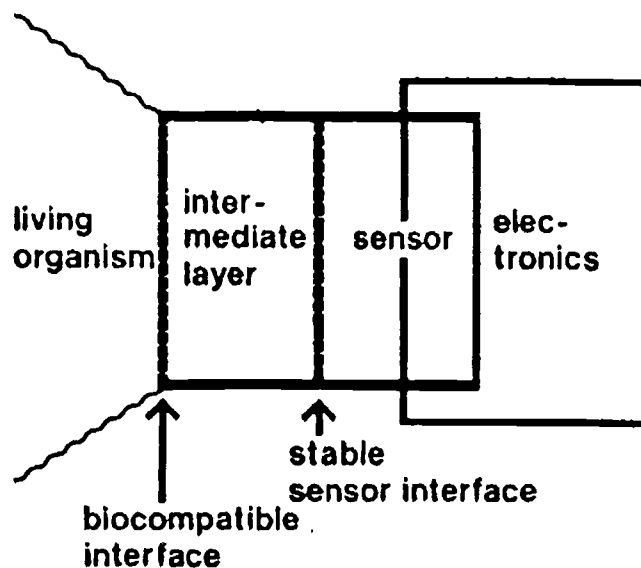
Een volgend voordeel is de mogelijkheid tot regeneratie. Omdat er met hele organismen wordt gewerkt, is het mogelijk deze te vernieuwen door de elektrode onder de juiste omstandigheden in het groeimedium te dopen (Corcoran & Rechnitz 1985). Ook dit draagt bij aan de langere levensduur van de elektrode en de gevoeligheid (*de novosynthese* van enzymen).

De slechte selectiviteit van de microbiële elektrode is meteen ook een voordeel. Er kunnen complexe metingen worden gedaan, zoals BOD (Biological Oxygen Demand), mutagentia en toxiciteit.

Door de grote variëteit aan micro-organismen bestaan er ook grote potentiële toepassingen voor de microbiële elektrode (Margineanu *et al.* 1985).

III. B O U W

Globaal bestaat een biosensor uit 3 gedeeltes: de receptor, de transducer en de elektronica.



Afbeelding 1. Schematische weergave van een biosensor waarbij in de "intermediate layer" het biocatalytisch materiaal gelegen is.

De receptor staat in contact met de buitenwereld of met het monster en zet de te meten prikkel om in een signaal dat geschikt is om te meten voor de transducer. Bijvoorbeeld als de transducer een pH-elektrode is, bevat de receptor vaak zuurproducerende bacteriën. De transducer zet het geschiktste signaal om in een elektronisch signaal dat de elektronica ingaat om afgelezen te worden op een display of recorder, of het kan worden opgeslagen in een computer.

III.1 De receptor.

In het geval van de microbiële elektrode bestaat de receptor uit een laag bacteriën.

III.1.1 De keuze van deze bacteriën berust vaak op hun specificiteit. De bacterie of gist die heel specifiek één reactie uitvoert op het te meten substraat wordt vaak gekozen.

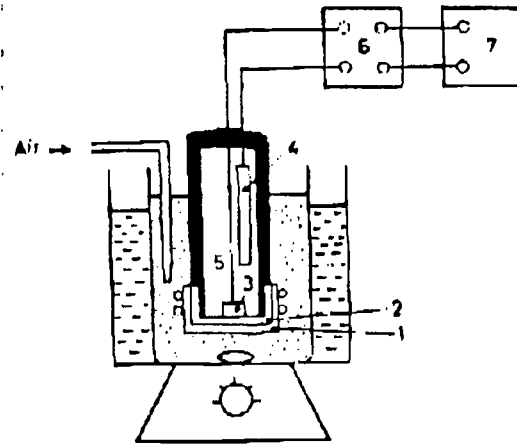
Een probleemsubstraat is bijvoorbeeld glucose. Merendeel van de microben kunnen naast glucose andere suikers metaboliseren. Vaak wordt niet gezocht naar totaal metaboliseerbaar suiker, maar naar de exacte glucose concentratie.

Een van de eerste bacteriële glucose-sensoren, beschreven door Karube *et al.* (1979a), had met dit probleem te maken. De glucose-sensor reageerde ook op fructose, galactose, mannose en saccharose. Hoewel deze suikers maximaal 10% van het glucosesignaal gaven, werkten ze toch storend. De glucose-sensor was bedoeld voor metingen in melasse, dat ook saccharose bevat.

Andere auteurs laten een vergelijking met andere suikers simpelweg achterwege (Vais *et al.* 1985).

Ook Park en Kim hebben in hun gemodificeerde microbiële elektrodes, gebruikmakend van geperforeerde *Zymomonascellen*, last van 5% storing door suikers als mannose, xylose en galactose. Bovendien geeft fructose een dusdanig signaal af, dat mengsels van fructose en glucose niet gemeten kunnen worden.

De gistelektrode beschreven door Racek is zelfs nog gevoeliger voor andere suikers (Racek 1991). Zo geeft mannose 73% van het glucosesignaal en fructose 68%. Ook maltose, galactose, ribose, xylose, ethanol en aceton geven een positief signaal, terwijl juist saccharose in dit geval geen reactie geeft. De auteur noemt zijn elektrode vergeleken met andere (Karube *et al.* 1979a, Grobler & Rechnitz 1980) meer specifiek.



Afbeelding 2. De door Karube *et al.* beschreven amperometrische glucose sensor. 1) bacteriën, 2) teflon membraan, 3) kathode, 4) anode, 5) electrolyt, 6) amperometer, 7) recorder.

Ook de hybride biosensor voor sucrose, bestaand uit de celwanden van *Saccharomyces cerevisiae* en het enzym glucose oxydase, heeft nogal last van andere suikers. Glucose en mannose geven zelfs hogere signalen dan sucrose. De auteurs van dit artikel dragen hier meteen oplossingen voor aan: gelijktijdig meten van glucose met een glucose-sensor en het zelden gelijktijdig voorkomen van mannose met sucrose.

Hoewel de laatste twee artikelen ruim 12 jaar na het eerst genoemde glucose-sensorartikel verschenen, is het probleem van de slechte selectiviteit op glucose nog niet echt opgelost. Verdere ontwikkelingen staan in hoofdstuk IV.

Bij andere substraten ligt de selectiviteit wat eenvoudiger. Bijvoorbeeld bij de NO_2 -gas sensor. Deze sensor maakt gebruik van nitrificeerders uit actief slib van een zuiveringsinstallatie voor afvalwater. De bacteriën werden niet geïdentificeerd en gebruiken NO^- als enige energiebron. De afname van O_2 is een maat voor NO_2 . De NO_2 -elektrode bestaand uit deze bacteriën en een zuurstofelektrode reageerde alleen op NO_2 . Vergelijking met conventionele NO_2 analysemethoden gaf een correlatie van 0,99 (Okada *et al.* 1983).

Voor substraten die slecht metaboliseerbaar zijn is het makkelijker een specialist te vinden dan voor substraten die makkelijk metaboliseerbaar zijn zoals glucose.

III.1.2 Voor een snelle reactietijd van de microbiële elektrode is de dikte van de microbiële laag van belang. Uit het kinetisch model van Vais en Margineanu (1986) blijkt dat de laag zo dun mogelijk moet zijn, maar dat de dichtheid aan bacteriën zo hoog mogelijk moet zijn voor (amperometrische of) zuurstofelektrodes. Andere auteurs zeggen, dat niet de hoeveelheid micro-organismen van belang is, maar hoe actief ze op dat moment zijn. Uit het artikel van Kingdon (1985) blijkt dat voor elk micro-organisme, dragermateriaal en elektrode een ideale balans moet worden gezocht, tussen hoge

celconcentratie met lange responstijd en lage celconcentratie met zwak signaal.

III.1.3 Voor de dikte van de microbiële laag is vooral de manier van immobilisatie belangrijk.

Voor microbiële cellen zijn er 3 methoden:

1 sterisch invangen,

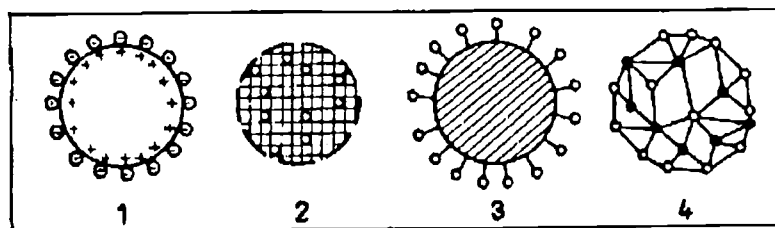
2 adsorptie aan een dragermateriaal en

3 opsluiten in een gel.

Voor andere biosensoren met bijvoorbeeld enzymen kan aan dit rijtje de volgende immobilisatiemethoden worden toegevoegd:

4 covalente binding aan dragermateriaal en

5 verknoping met biomolekullen (Scheller & Schubert 1989).



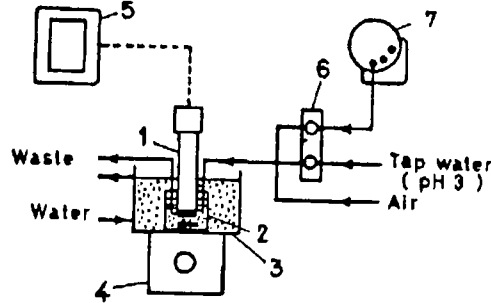
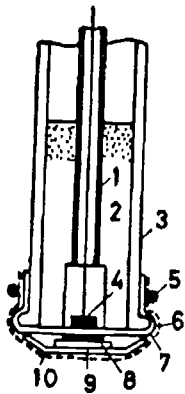
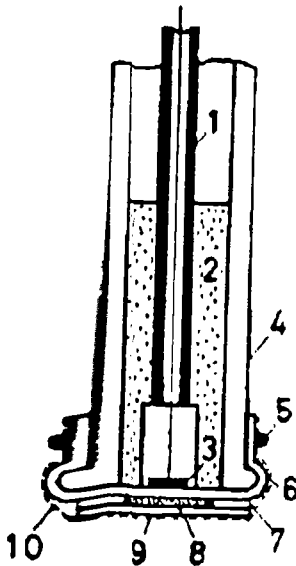
Afbeelding 3. Enkele immobilisatiemethoden. 1) adsorptie, 2) opsluiting in gel, 3) covalente binding, 4) verknoping.

Het sterisch invangen van microbiële cellen wordt weinig gebruikt. Hieronder wordt verstaan het inklemmen van de cellen tussen het elektrodemembraan en een (dialyse)membraan.

Het is de simpelste methode van immobilisatie. Door middel van centrifugatie worden de cellen geconcentreerd, zodat een pasta ontstaat. Deze pasta wordt dan op het elektrodeoppervlak aangebracht en afgesloten met een dialyse membraan, eventueel toegedekt met een extra gaspermeabele membraan (Corcoran & Kobos 1987, Ihn & Kim 1989, Ciucu *et al.* 1991).

Om de centrifugestap over te slaan en omdat het dialysemembraan moeilijk hanteerbaar is, wordt immobilisatie door absorptie op een filter veel gebruikt (Walters *et al.* 1980). Hierbij wordt de celsuspensie op een filter gedruppeld, soms onder licht vacuüm. Het filter wordt dan met een O-ring of op andere wijze aan de elektrode vastgemaakt. Als filter gebruikt men vaak een acetyl-cellulosefilter met $0,45\mu\text{m}$ poriegrootte (Hikuma *et al.* 1979a, Hikuma *et al.* 1979b, Hikuma *et al.* 1980a, Karube *et al.* 1980, Karube & Tamiya 1987, Karube *et al.* 1989, Okada *et al.* 1983, Vincke *et al.* 1984). Ook worden cellulosenitrat $0,45\mu\text{m}$ (Karube & Sode 1988) of gewoon filtreerpapier gebruikt (Karube *et al.* 1979b). In een enkel geval brengt men de cellen op een nylon netwerk aan. Waarna het netwerk met behulp van een cellofaanmembraan en een O-ring aan de elektrode wordt gekoppeld (Kulys & Kadziauskiené 1980, Hikuma *et al.* 1980b), of met een polypropyleen membraan en een O-ring wordt toegedekt (Svorc *et al.* 1990).

Abbeelding 4. Voorbeeld van een sterische immobilisatie. 1-4) electrode, 5) rubber ring, 6) teflon membraan, 7) spacer, 8) micro-organismen, 9) acetylcellulose membraan, 10) nylon net.



Abbeelding 5. Weergave van A) de electrode en B) de meetopstelling. A: idem als figuur 4, maar nu B) micro-organismen, 9) acetylcellulose membraan, 10) poreuze teflon membraan. B: 1) electrode, 2) flow cell.

Een derde immobilisatiemethode is het invangen in een gel. Hierbij worden de cellen met de gel gemengd en in een dunne laag gedroogd, zodat er een film of membraan met cellen ontstaat, waar water en kleine moleculen doorheen kunnen diffunderen. Voorbeelden van deze gelen zijn:

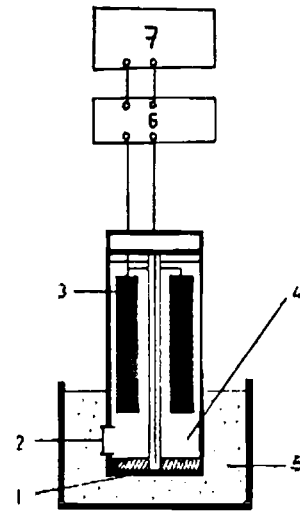
agargel	(Matsunaga <i>et al.</i> 1978b, Vais <i>et al.</i> 1985, Karube & Tamiya 1987),
calciumalginaat	(Vais <i>et al.</i> 1985, Rawson <i>et al.</i> 1989, Suzuki <i>et al.</i> 1990, Racek 1991),
collageengel	(Karube <i>et al.</i> 1979a),
polyacrylamide	(Karube <i>et al.</i> 1980),
gelatine	(Park & Kim 1990),
polyvinylalcohol	(Riedel <i>et al.</i> 1991) en
zijdevezel	(Demura <i>et al.</i> 1989).

Zelfs PVC wordt als dragermateriaal genoemd (Alegret & Martinez-Fabregas 1989).

Slechts een enkel artikel laat meerdere immobilisatiemethoden naast elkaar zien. Matsunaga *et al.* (1980) gebruiken filterpapier, polyacrylamide, agar en agar op acetylcellulosefilter. Steeds blijkt dat

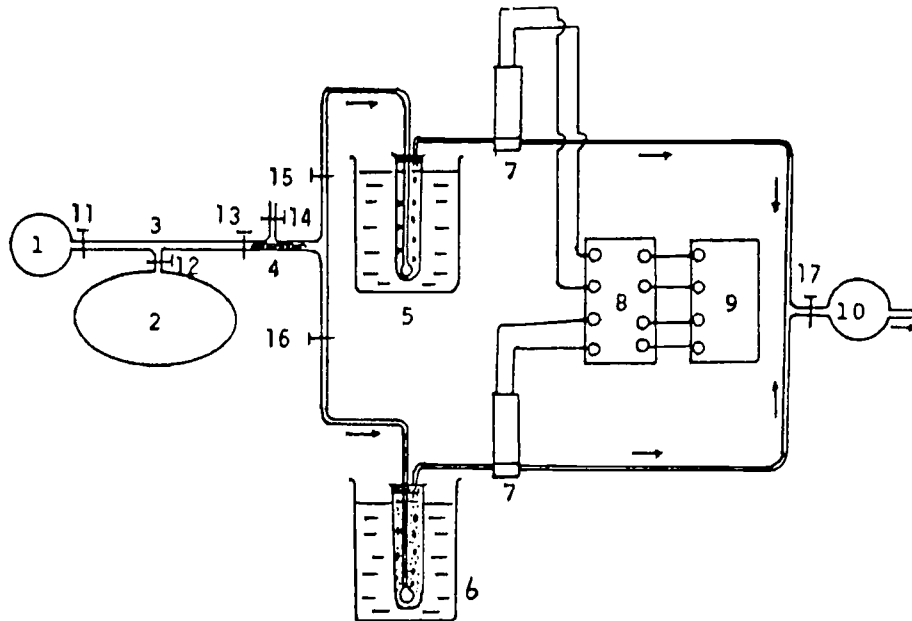
de adsorptie aan een filter het beste signaal geeft (Matsunaga *et al.* 1980), makkelijk hanteerbaar is en een snellere responstijd heeft (Walters *et al.* 1980). Zeoliet wordt genoemd als mogelijk dragemateriaal in toekomstige biosensoren (Weisenhorn *et al.* 1990). Helaas zal dit niet zo geschikt zijn voor microbiële cellen.

Er zijn een aantal microbiële elektrodes die niet met een geïmmobiliseerde laag cellen werken (Karube *et al.* 1982, Thavarungkul *et al.* 1991). Een voorbeeld is het assay voor vitamine B₁, beschreven door Matsunaga *et al.* (1978a). 5 mL medium wordt met 5 mL testoplossing gemengd en gesteriliseerd. Na toevoeging van een suspensie van *Lactobacillus fermenti* werd 6h bij 37°C geïncubeerd en vervolgens met een elektrode gemeten. De hoeveelheid vitamine B₁ in de testoplossing is lineair gecorreleerd aan de toename van de stroom van de elektrode.



Afbeelding 6. Voorbeeld van een microbiële elektrode zonder immobilisatie. 1) anode, 2) anion membraan, 3) kathode, 4) electrolyt, 5) medium met vitamine B₁ en bacteriën, 6) amperometer, 7) recorder.

Een andere elektrode uit dezelfde onderzoeksgroep (Karube *et al.* 1982) is de methaangassensor. Ook deze sensor bestaat uit een elektrode die ruimtelijk gescheiden is van zijn biocatalytisch deel. Het methaangas monster wordt door een reactor geleid waarin zich het kweekmedium met *Methylomonas flagellata* cellen bevindt. Deze bacteriën zetten methaan met zuurstof om in methanol en water. De afname van zuurstof in dit reactievat ten opzicht van eenzelfde reactievat zonder *M.flagellata*, is een maat voor de hoeveelheid methaangas in het gasmengsel.



Afbeelding 7. Schema van de microbiële methaangas sensor. 1) vacuümpomp, 2) monster, 4) katoenfilter, 5) controle reactor, 6) methaangas bacterie reactor, 7) zuurstof elektrode, 8) versterker, 9) recorder, 10) vacuümpomp.

Een ander type microbiële sensor dat ook niet de vorm heeft van een microbiële elektrode is recentelijk beschreven door Thavarungkul *et al.* (1991). Cellen van *Pseudomonas cepacia* worden geïmmobiliseerd in calciumalginaatkorrels en in een kolom gebracht. Deze kolom zit voor de zuurstofelektrode in het sensorsysteem. Door de celkolom stroomt de testoplossing die door de cellen gemetaboliseerd wordt, zodat een daling van de hoeveelheid zuurstof in de oplossing te zien is. Elke twee minuten wordt de testoplossing ook langs de zuurstofelektrode geleid zonder dat deze door de celkolom stroomt.

III.1.4 De laatst beschreven microbiële elektrodes lijken meer op complete analysetoestellen dan op handzame elektrodes. In het algemeen wordt meer gewerkt aan makkelijk hanteerbare elektrodes. Een methode om de selectiviteit van deze elektrodes te verhogen is het plaatsen van een extra membraan voor het biocatalytisch deel. Dit membraan doet dienst als selector. Het streven is de hoeveelheid handelingen die het monster voor de meting moet ondergaan zo gering mogelijk te houden. Zo moet het mogelijk zijn om in onverdunde, ongefiltreerde oplossingen te meten. Daar in het algemeen vele stoffen een reactie met het elektrodeoppervlak kunnen geven, moet de selector redelijk specifiek zijn.

In een aantal gevallen wordt selectiviteit al bereikt door de immobilisatiemethode. Een dialysemembraan laat alleen de kleine moleculen door (Corcoran & Kobos 1987, Ihn & Kim 1989, Ciucu *et al.* 1991). In de meeste gevallen echter, is het immobilisatiefilter of de gel alleen niet voldoende en wordt er een selector toegevoegd.

Voor de sensoren die gassen aantonen wordt vaak een gaspermeabele membraan over het filter aangebracht:

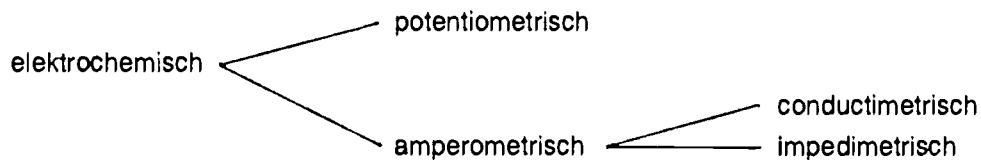
Zo werd op de NO₂-sensor (Okada *et al.* 1983) met een acetylcellulosefilter een gaspermeabele Teflon membraan aangebracht, en de CO₂-sensor (Suzuki *et al.* 1987) met cellulosenitratmembraan en een PTFE membraan (=poly tetra fluoro ethyleen) uitgerust. Ook werd een ammoniumsensor met een gaspermeabele membraan beschreven (Karube *et al.* 1980, Okada *et al.* 1982).

Maar niet alleen de microbiële elektrodes die gassen aantonen zijn soms uitgerust met een extra membraan. Zo zijn sensoren voor mutagentia (Karube *et al.* 1989), voor BOD (Karube & Sode 1988) en voor glutaminezuur (Riedel & Scheller 1987) allen, naast hun immobilisatiefilter, uitgerust met een dialysemembraan. Ook een extra filtratiemembraan (Vincke *et al.* 1984) of een capillaire membraan (Riedel *et al.* 1991) worden genoemd. Maar het vaakst wordt toch een gaspermeabele Teflon membraan toegepast. Voor bijvoorbeeld alcoholen (Hikuma *et al.* 1979a, Karube *et al.* 1980), mierzuur (Matsunaga *et al.* 1980), azijnzuur (Hikuma *et al.* 1979b) en voor toxiciteit (Dorward & Barisas 1984). Al deze stoffen zijn vluchtig genoeg om de gaspermeabele membraan te passeren.

III.2 Het receptorgedeelte van de microbiële elektrode is hiermee grotendeels besproken. Het volgende gedeelte is de transducer; het gedeelte dat het biologische signaal omzet in een elektrisch signaal. Dit kan elektrochemisch, optisch, calorimetrisch of acoustisch/mechanisch (Higgins *et al.* 1987).

III.2.1 ELEKTROCHEMISCHE SENSOREN

Sensoren met elektrochemische transducers kunnen worden onderverdeeld naar diverse technieken:

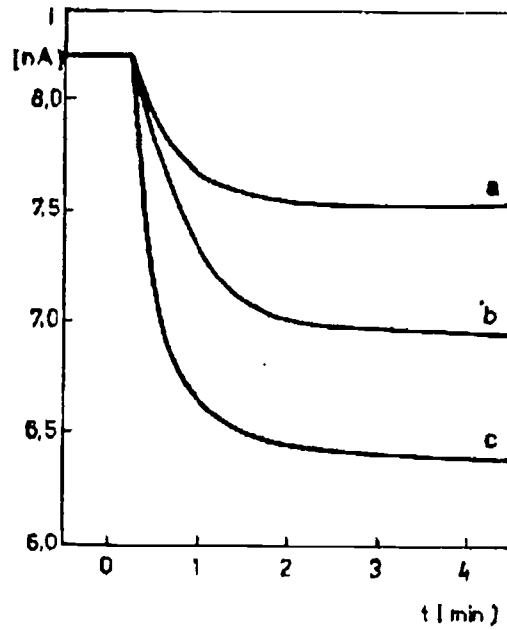


III.2.1.1 Het duidelijkste voorbeeld is de amperometrische elektrode als transducer. Amperometrisch betekent dat stroomverschillen worden gemeten. Tussen de meet- en referentie-elektrode wordt een spanning aangelegd. Hierdoor vinden er reacties plaats met elektronenoverdracht, zodat er een constante elektrische stroom ontstaat. Deze stroom is lineair gerelateerd aan de concentratie van de elektro-actieve verbinding in de oplossing (Higgins *et al.* 1987). De meest voorkomende amperometrische elektrode is de zuurstofelektrode (vaak de Clark oxygen elektrode), maar behalve zuurstof zijn ook andere mediators mogelijk als: benzoquinone, ferricyanide en phenazine methosulfaat (Riedel *et al.* 1989). Ferrocene, 7,7,8,8 tetracyano-p-quinodimethane en tetrathiafulvalenes worden ook genoemd (Higgins *et al.* 1987).

In dit voorbeeld van de zuurstofelektrode wordt gewerkt in een geëereerde oplossing, zodat een hoge basislijn wordt verkregen.

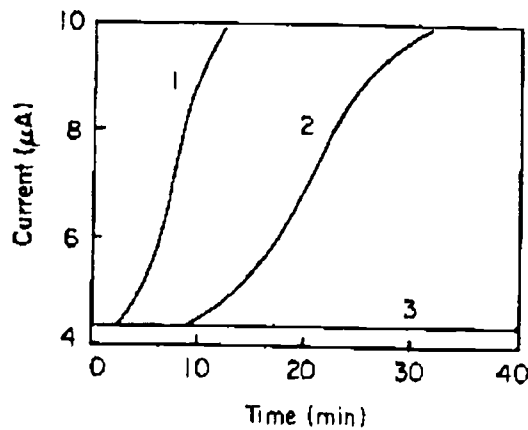
Als er een metaboliseerbare verbinding in de testoplossing wordt gebracht, gaan de micro-organismen zuurstof verbruiken en daalt de basislijn van de zuurstofelektrode (de stroom neemt af). Met deze methode worden : suikers (Karube *et al.* 1979a, Vais *et al.* 1985, Svorc *et al.* 1990, Barlikova *et al.* 1991), alcoholen (Hikuma *et al.* 1979a, Karube *et al.* 1980), gassen (Hikuma *et al.* 1980a, Karube *et al.* 1982, Okada *et al.* 1983, Karube & Sode 1988), organische zuren (Hikuma *et al.* 1979b), totaal metaboliseerbare verbindingen (BOD) (Karube & Tamiya 1987), fenol (Ciucu *et al.* 1991) en 3-

chloorbenzoesaat (Riedel
et al. 1991) gemeten.



Afbeelding 8. Typische curves voor een amperometrische electrode, waarin de stroom van de electrode tegen de tijd is uitgezet. a) 20, b) 40 en c) 60 μ l van 0,1M lactose oplossing per 5 mL buffer.

Het omgekeerde is het geval bij bijvoorbeeld de antibiotica sensor (Karube *et al.* 1979b). Hierbij wordt uitgegaan van een geätereerde glucose rijke oplossing zodat een lage stroom van de elektrode afkomt. Voegt men nu nystatin toe, dan stijgt de stroom vanaf de elektrode weer.



Afbeelding 9. Responscurves van een amperometrische electrode waaraan nystatin wordt toegevoegd in de concentraties 1) 81 units, 2) 27 units en 3) 0 units per mL.

Ook andere sensoren berusten op de toename van O_2 gemeten door de elektrodes door de afname van levende cellen op de biocatalytische laag. Zoals de microbiële sensor voor mutagentia (Karube & Tamiya 1987, Karube *et al.* 1989).

III.2.1.2 Naast de amperometrische elektrodes bestaan de potentiometrische elektrodes. Deze meten geen fluxen, maar potentiaal verschillen onder evenwichtscondities veroorzaakt door ionen in oplossing. Voorbeelden hiervan zijn de overbekende pH-meter en de ammoniak elektrode.

Gas elektrodes, zoals CO₂-, H₂S- en NH₃-gaselektrodes berusten ook op potentiometrie. Voor de elektrode wordt een gaspermeabele membraan aangebracht, waarachter zich een geschikte vloeistof bevindt. Door het oplossen van het gas in deze vloeistof verschuift het evenwicht en ontstaat er een nieuwe elektrode potentiaal (Riedel *et al.* 1989).

De potentiometrische elektrodes reageren niet lineair op de te analyseren verbinding, maar volgens de vergelijking van Nernst dus logaritmisch. Hierdoor dient een potentiometrische elektrode altijd in combinatie met een stabiele referentie elektrode te worden gebruikt en zijn filters nodig om de elektronische ruis weg te nemen (Higgins *et al.* 1987).

III.2.1.3 De derde methode van elektrochemische detectie is impedimetrie. Deze weinig gebruikte methode wordt vooral toegepast in sensoren die biomassa meten en valt dan ook buiten de grenzen van deze scriptie.

III.2.1.4 De toepassing van de conductimetrische methode voor transductie in biosensoren wordt beperkt door zijn gevoeligheid voor de geleidbaarheid en de temperatuur van de oplossing (Higgins *et al.* 1987).

III.2.2 OPTISCHE SENSOREN.

Het principe van de optische sensor is dat de te analyseren verbinding een interactie met de biocatalysator aangaat, zodat de optische eigenschappen van het systeem veranderen. Dit kan een kleurverandering, reflectie of luminiscentie zijn.

Ondanks de vele voordelen:

1) specificiteit; 2) verkleining mogelijk; 3) geen referentie elektrode nodig; 4) *in situ* metingen; 5) metingen op 1km afstand mogelijk; 6) *in vivo* veilig meten; 7) verschillende analyses in één keer doen en 8) weinig storing, worden ze slechts met enzymen, antilichamen of receptoren toegepast (Abdel-Latif *et al.* 1990). Dat de cellen niet in een optische biosensor worden gebruikt, wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de dikte van de cellen, waardoor ze de lichtweg verstoren.

III.2.3 CALORIMETRISCHE SENSOREN zijn gebaseerd op enthalpieveranderingen. Kleine temperatuurverschillen van 0,01 °C, veroorzaakt door bijvoorbeeld een enzymatische reactie, worden gemeten. Dit systeem is toepasbaar in enzym-, antilichaam-, cel- en weefselsensoren (Higgins *et al.* 1987).

III.2.4 Andere sensorprincipes zijn:

1 ARD (=acoustic resonance densitometry), een manier om met resonantie de dichtheid van een microbiële cultuur te meten.

2 Piëzo-elektrische kristal biosensoren.

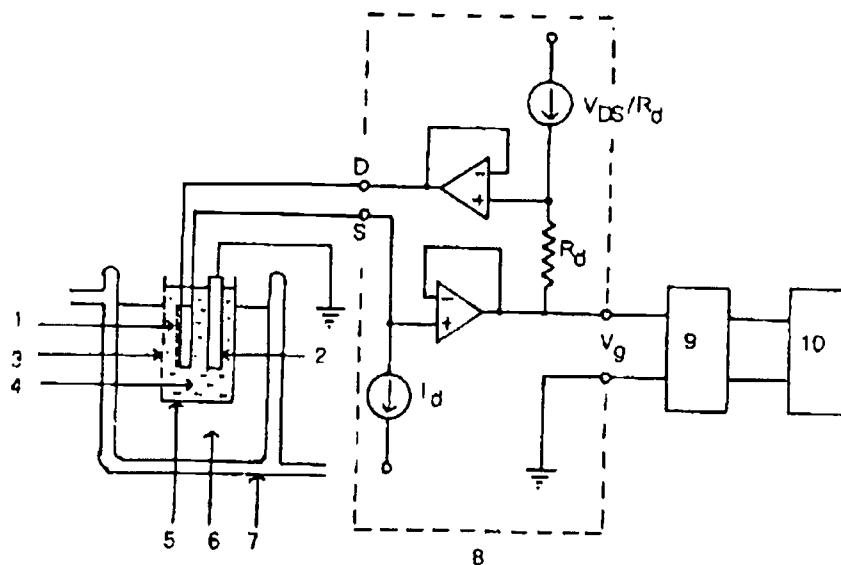
Deze sensoren zijn gebaseerd op het principe, dat de resonantiefrequentie van een kristal verandert als er stoffen aan het oppervlak van het kristal adsorberen (Higgins *et al.* 1987).

Beide laatst beschreven principes zijn niet of moeilijk bruikbaar in combinatie met micro-organismen

in een biosensor.

Uit de voorafgaande opsomming van mogelijke transducers blijkt wel dat de mogelijkheden voor de microbiële elektrode beperkt zijn. Vaak wordt dit veroorzaakt door de grootte van het organisme ten opzichte van bijvoorbeeld een antilichaam, maar ook door de complexiteit van het micro-organisme. Gelukkig zijn er door die complexiteit er vele variaties mogelijk met de amperometrische en potentiometrische elektrodes, die simpel in het gebruik zijn.

III.2.5 Een heel ander type biosensor is de ISFET. De Ion Sensitive Field Effect Transistor is geen elektrodetype sensor, maar een sensor in chip-vorm. Het is afgeleid van zijn elektronische analogoog de MOSFET (Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor). Baanbrekend werk op dit terrein is voornamelijk verricht door de Nederlander Bergveld (1986). De voordelen van de ISFET zijn zijn kleine afmetingen, de snelheid, de geschiktheid voor massaproductie en de mogelijkheid om in te bouwen in multifunctionele meettoestellen (Kitagawa *et al.* 1987, Karube 1991).



Afbeelding 10. De meetopstelling van de microbiële ethanol sensor van Kitagawa *et al.* Met 1) ISFET met geïmmobiliseerde micro-organismen, 2) referentie elektrode, 3) gaspermeabele membraan, 4) binnen buffer, 6) buiten buffer.

In het artikel van Kitagawa *et al.* (1987) wordt de ISFET als pH-meter gebruikt bij het aantonen van ethanol. De ISFET is opgebouwd uit SiO_2 (silicium dioxyde) en Si_3N_4 dat gevoelig is voor H^+ ionen. Daarop worden de bacteriecellen geïmmobiliseerd met behulp van calciumalgiinaat.

De microbiële ISFET en een Ag/AgCl referentie-elektrode worden beide in een (binnen) bufferoplossing gebracht en afgesloten met een gaspermeabele membraan. Na stabilisatie van het signaal wordt het monster aan de (buiten) bufferoplossing toegevoegd. Omdat *Acetobacter aceti* ethanol omzet in azijnzuur is het mogelijk de ethanolconcentratie in het monster te meten. Een nadeel van deze ISFET is de beperkte stabiliteit. De meeste microbiële sensoren zijn 20 tot 30 dagen stabiel, deze echter maar 15 uur.

III.3 Is het signaal in de transducer eenmaal elektronisch geworden dan kan het verder verwerkt of opgeslagen worden. Het verwerken van een signaal betekent vaak versterken, filteren of veranderen. Een stabiel signaal werkt sneller en prettiger dan een instabiel of verlopend signaal. Het gemodificeerde signaal kan afgevoerd worden naar een meter of display, maar kan ook worden vastgelegd. Dit kan op een eenvoudige recorder of in een geavanceerd computerprogramma dat on-line registraties doet van een bepaald proces.

Het modificeren van het elektronische signaal is het terrein van de micro-elektronica, waarover de vele publikaties spaarzaam of geen mededelingen doen. Het is het gebied van de partner van de microbiologie in het veld van de biosensoren, de (micro-)elektronicus. De meeste artikelen worden echter door de microbiologen en biochemici gepubliceerd. Vandaar de lacune in deze scriptie over dit onderdeel.

IV VERBETERINGEN

Het **grote** probleem van de microbiële elektrode ten opzichte van de enzym- of de immuno-elektrode is de **matige** selectiviteit van de elektrode. Het verbeteren van deze selectiviteit is nodig om de microbiële elektrode te laten prefereren boven andere biosensoren en de conventionele methodes als **gaschromatografie**.

Een **aantal** methoden zijn daarvoor al beproefd.

IV.1) **inductie**;

IV.2) **inhibitie**;

IV.3) **gecombineerde biosensoren**;

IV.4) **genetische modificatie**;

IV.5) **mediatoren, 1^o, 2^o en 3^o generatie biosensoren**.

Hieraan voorafgaande zijn natuurlijk al de optimale pH, temperatuur en buffer gezocht.

IV.1 In het artikel, geschreven door Walters *et al.* (1980), gaat het zoeken naar de optimale temperatuur verder. Het blijkt dat een eenmalige hitteperiode van een uur, de gevoeligheid van de bacteriële elektrode doet toenemen. Dit is voornamelijk gebaseerd op een lagere achtergrond, doordat meer ammoniak uit de cel diffundeert. Deze hittebehandeling is een vorm van inductie. De cel wordt (meer) geschikt gemaakt voor de taak die het moet uitvoeren.

Een **veel** gebruikte vorm van inductie is het kweken van microbiële cellen in het juiste medium. Zo wordt *Bacillus pumilus* voor de nicotinamide sensor gekweekt in een medium met nicotinamide, waardoor *B.pumilus* gevoeliger voor de verbinding wordt (Vincke *et al.* 1984).

In het **geval** van de microbiële elektrode voor het aantonen van 3-chloorbenzoesaat wordt *Pseudomonas putida* gekweekt in een mineraal medium met als enige koolstofbron 3-chloorbenzoesaat. Hierdoor reageert de microbiële elektrode redelijk specifiek op 3-chloorbenzoesaat, alleen ongechlororeerde benzoesaat geeft een sterker signaal. Echter Riedel en medewerkers hebben ook een andere vorm van inductie toegepast, namelijk met incuberen van de sensor gedurende 1h in een te meten substraat. Alleen benzoesaat en 3-chloorbenzoesaat gaven een inductie voor alle vier substraten (benzoesaat, 2-, 3- en 4-chloorbenzoesaat). Incubatie van de sensor in 2-, 4- of 2,4-chloorbenzoesaat geeft een remming op bijna alle substraten te zien (Riedel *et al.* 1991).

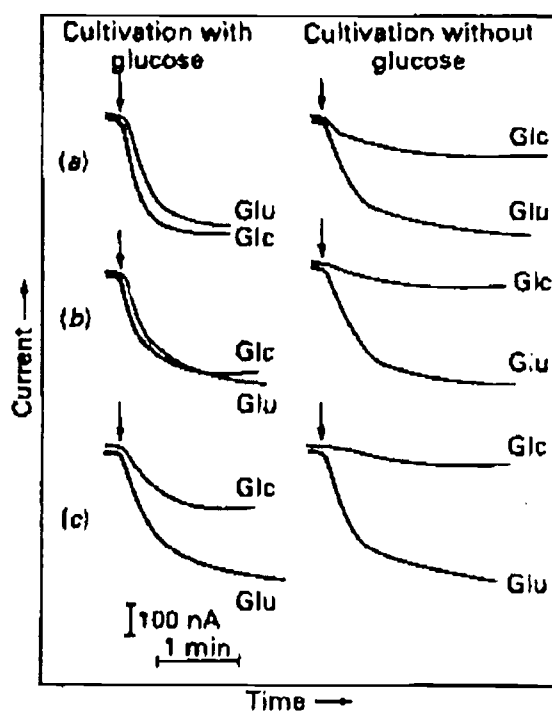
IV.2 Het induceren van gewenste metabolische routes verhoogt de gevoeligheid van de microbiële sensor. Het remmen van ongewenste metabolische routes kan de selectiviteit van de sensor verhogen. Naast het remmen van de enzymen in metabolische routes kan ook het remmen van het transport een selectiviteitverhoging geven. Vooral bij die biosensoren die gebaseerd zijn op de detectie van ammoniak is het van belang dat de inhibitor specifiek is, zodat niet de gewenste reactie wordt geremd. Maar het is vooral van belang dat geen van de andere reacties over het hoofd wordt gezien (Corcoran & Kobos 1987).

De meest storende verbinding bij een ammoniak gebaseerde biosensor is het aminozuur L-glutamine. Corcoran en Kobos hebben in hun artikel gekeken naar een enzyminhibitor (DONL) en een transportinhibitor (τ -L-glutamylhydrazide) voor dit aminozuur. Het blijkt dat het toevoegen van de afzonderlijke inhibitors al een lager elektrodesignaal voor glutamine geeft, maar dat het toevoegen van beide inhibitors nodig is voor een irreversibel effect.

Een andere biosensor gebaseerd op ammoniak determinatie is de L-histidine bacteriële elektrode. Deze elektrode wordt met een hitte voorbehandeling gevoeliger gemaakt voor L-histidine, doordat ammoniak bij hogere temperaturen sneller uit de elektrode diffundeert. Echter bij lagere concentraties histidine begonnen de cellen ammoniak te accumuleren om het tekort weer aan te vullen. Deze accumulatie kon geremd worden door het toevoegen van INH (Isonicotinic Acid Hydrazide), dat de transaminerende reacties competitief remt. Deze remming gaf goede resultaten. Een nadeel van competitieve remming is echter dat het niet irreversibel is en door de bacterie kan worden omzeild door aanmaak van nieuwe enzymen (Walters *et al.* 1980).

Een inhibitievoorbeld van een microbiële sensor die niet gebaseerd is op de detectie van NH_3 maar van O_2 is het volgende.

Riedel en Scheller (1987) hebben een sensor ontwikkeld voor glutamine, waarbij de metabolische activiteit van de micro-organismen wordt gemeten. Indien de cellen gekweekt worden op aanwezigheid van glucose zijn ze even gevoelig voor glucose als voor glutamine. Kweken in afwezigheid van glucose verhoogt de gevoeligheid voor glutamine al, maar nog niet voldoende. Het toevoegen van CMB (chloro mercuri benzoaat) geeft een irreversibele remming op het transport van glucose en NaF versterkt dat effect door de assimilatie te remmen. Zo is het mogelijk glutamine op aanwezigheid van glucose te meten.



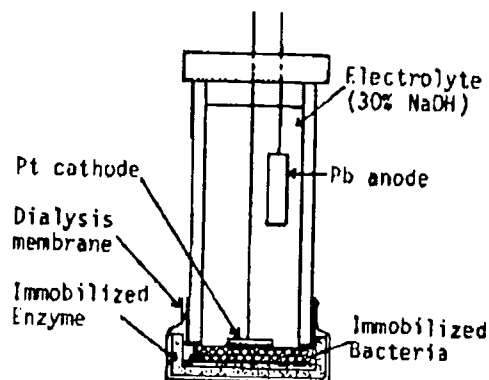
Afbeelding 11. De invloed van het kweken in aanwezig of afwezigheid van glucose en de invloed van CMB(0,1mM) en NaF(50mM) op de curves van glucose(1,2mM) en glutamine(1,2mM). a) controle, b) CMB en c) CMB + NaF.

IV.3 Tot nu toe zijn de verbeteringen besproken die een invloed hadden op het metabolisme van de micro-organismen. Het is ook mogelijk om de selectiviteit te verhogen door de cellen te koppelen aan enzymen (Riedel 1991).

Enzymen die reacties catalyseren zonder daarbij elektro-actieve stoffen te produceren of te consumeren, zijn direct toepasbaar in combinatie met micro-organismen. Twee voorbeelden van zo'n

hybride biosensor worden beschreven door Kubo en medewerkers (1983). Zij koppelden de enzymreactie: creatinine $\xrightarrow{\text{creatininase}}$ N-Methylhydantoin + NH₃ aan de microbiële NH₃-sensor en de enzym reactie:

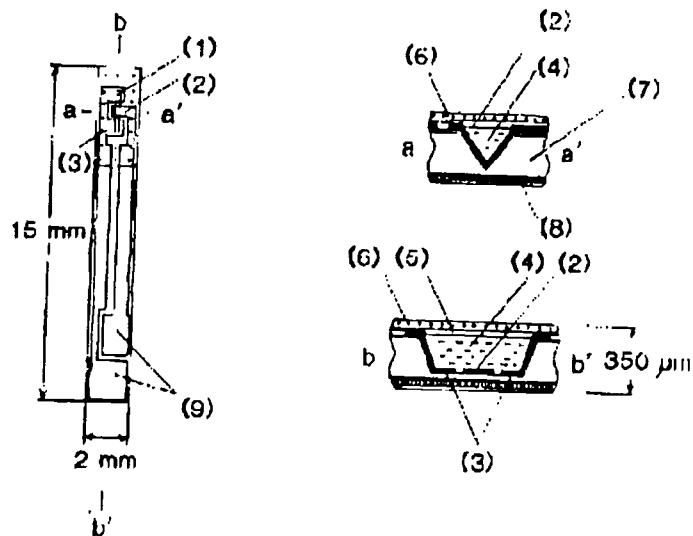
Ureum $\xrightarrow{\text{urease}}$ CO₂ + NH₃ aan eenzelfde NH₃-elektrode voor het aantonen van ureum. Deze microbiële ammoniak elektrode werd eerder al beschreven (Hikuma *et al.* 1980a), maar was nu geoptimaliseerd. De resultaten van beide hybride elektrodes zijn zo goed dat ze voor klinische analyses kunnen worden gebruikt.



Afbeelding 12. Een hybride biosensor waarbij de bacteriële laag tegen de elektrode aanligt en de enzymlaag het contact met de testoplossing vormt.

Voor klinische analyses en nog beter voor *in situ* analyses is het van belang dat de biosensoren van wegwerpkwaliteit zijn in verband met de hygiëne (Hilditch & Green 1991). Dit is getracht te bereiken in de ontwikkeling van een hybride wegwerp L-lysinesensor (Suzuki *et al.* 1990).

Op een silicium chip met V-vorm werd een laag bacteriën in calciumalginaatgel samen met electrolyt aangebracht. Daaroverheen werd een gaspermeabele membraan aangebracht waarop de enzymen werden geïmmobiliseerd met behulp van BSA en glutaraaldehyde. De elektrode heeft een uitstekende selectiviteit voor L-lysine, omdat het niet reageert op 18 andere geteste L-aminozuren.



Afbeelding 13. De schematische weergave van de L-lysine sensor. 1) gevoelig gebied, 2) kathode, 3) anode, 4) calcium alginaatgel met bacteriën en electrolyt, 5) gaspermeabele membraan, 6) enzym, 7) silicium, 8) isolator.

Meer recentere voorbeelden van hybride biosensoren zijn de biosensor voor lactose (Svorc *et al.* 1990) en voor sucrose (Barlikova *et al.* 1991).

De lactose-sensor werkt met β -galactosidase in de bacterie:

$\text{lactose} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{glucose} + \text{galactose}$

en met het enzym glucoseoxydase:

$\text{glucose} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{gluconzuur} + \text{H}_2\text{O}_2$

De afname van zuurstof wordt door de elektrode gemeten.

De sucrose-sensor werkt met de celwanden van de gist *Saccharomyces cerevisiae*:

$\text{sucrose} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \alpha\text{-glucose} + \beta\text{-glucose}$ waarbij

$\alpha\text{-glucose} \rightleftharpoons \beta\text{-glucose}$ door fosfaationen wordt gecatalyseerd.

De reactie $\beta\text{-glucose} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{gluconzuur} + \text{H}_2\text{O}_2$ werd door het enzym glucoseoxydase uitgevoerd, volgens hetzelfde principe als bij de lactose-sensor.

IV.4 Een andere mogelijkheid om de selectiviteit van de microbiële elektrode te verhogen is het micro-organisme genetisch te modificeren. Dit kan door op zoek te gaan naar geschikte mutanten (Corcoran & Kobos 1987) of door het toevoegen van complete metabolische routes aan de gewenste bacterie. Hiervoor komen de plasmid gecodeerde routes voor in aanmerking (Riedel 1991).

Het zoeken naar geschikte mutanten valt in feite onder het hoofdstuk over het zoeken naar een geschikte micro-organisme voor die bepaalde reactie. Het wordt echter een heel ander verhaal als er speciaal voor het doel mutanten gekweekt worden.

Voor de fenolbiosensor worden gistcellen van *Rhodotorula* in een medium gekweekt waaraan steeds hogere concentraties fenol worden toegevoegd. De stam die daaruit komt, is in staat 4,8 keer zoveel fenol af te breken in slechts een vierde van de tijd (Ciucu *et al.* 1991).

Door mutaties in het transportsysteem aan te brengen kan de selectiviteit verhoogd worden. Bijvoorbeeld een mutatie dat het glucose transportsysteem uitschakelt kan een oplossing betekenen voor de vele microbiële elektrodes die gestoord worden door glucose.

Het toevoegen van metabolische routes door middel van plasmid overdracht wordt beschreven voor E-caprolactam (Riedel 1991).

IV.5 Mediatoren

Het biocatalytisch deel kan ook als transducer fungeren. In dat geval geeft het bio-deel geen signaal maar elektronen af. Het biocatalytisch deel kan dan meteen aan de elektrode gekoppeld worden. De overdracht van elektronen tussen het biocatalytisch deel en het elektrode oppervlak heet elektrontransductie. Deze kan verbeterd worden door het toevoegen van een mediator, een elektronenshuttle. Veel onderzoek naar mediators beperkt zich tot het gebied van de enzymelektrodes (Higgins *et al.* 1987), uitbreiding naar het gebied van de microbiële elektrodes is beperkt. Het is echter in de toekomst wel nodig, om efficiëntere microbiële elektrodes te kunnen bouwen die commerciële haalbaarheid hebben (Katz *et al.* 1989, Delany *et al.* 1986).

1^o, 2^o en 3^o generatie biosensoren.

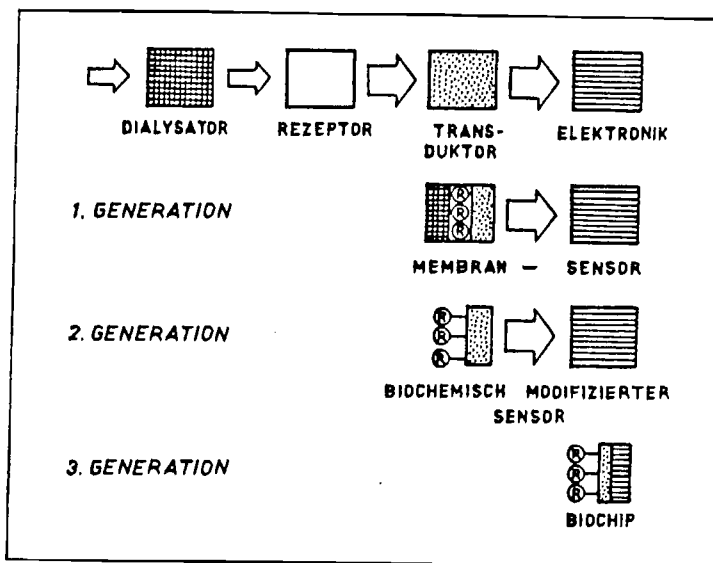
De vergelijking tussen deze typen biosensoren is gemaakt voor enzymelektrodes, maar vanwege enige

overeenkomst hier ook besproken.

Bij de eerste generatie biosensoren geschiedt de detectie op basis van waterstofperoxyde of zuurstof. Het biocatalytisch deel, opgesloten tussen aan de ene kant een membraan of filter en aan de andere kant de transducer, geeft H_2O_2 af of neemt O_2 op. Hierdoor verandert de stroom van elektroactieve verbindingen naar het elektrode-oppervlak.

Bij de tweede generatie is het biocatalytisch materiaal covalent gebonden aan de transducer (Scheller & Schubert 1989), of er is sprake van een (synthetische) elektronen mediator (Gunasingham *et al.* 1990). Deze mediator brengt de elektronen van het actieve centrum van het enzym naar de elektrode. Voorbeelden van mediators zijn ferrocenen, phenoxazine, tetracyanoquinodimethaan, tetrathiafulvaleen en diverse quinonen.

De derde generatie biosensoren heeft een gemodificeerd elektrode-oppervlak. De losse mediator is vervangen door een die op de elektrode is aangebracht, bijvoorbeeld tetrathiafulvaleen-tetracyanoquinodimethaan. Hierdoor is een directe koppeling van het biologisch materiaal aan de elektrode mogelijk. Een illustratief voorbeeld is de biochip. Hierbij zijn alle lagen stevig met elkaar verbonden, met als bovenste laag de microbiële cellen. Uit deze indeling blijkt dat Bergveld (zie inleiding) de juiste definitie voor biosensor hanteert.



Abbeelding 14. De indeling in 1^e, 2^e, en 3^e generatie biosensoren volgens Scheller & Schubert.

V. TOEPASSINGEN

Er zijn microbiële elektrodes voor zeer veel stoffen ontwikkeld. Diverse overzichten voeren ons langs: suikers (glucose, fructose, sucrose, mannose, hexosen, galactose), organische zuren (mierzuur, azijnzuur, pyrodruvezuur, melkzuur), alcoholen (methanol, ethanol), vele aminozuren en peptides, vitamines en co-factoren (vitamine B, B₁, C en NAD⁺), stereoïden (cholesterol, testosteron), antibiotica (cephalosporine, nystatin), giftige stoffen (fenol, herbicides), anorganische verbindingen (sulfaat, fosfaat, nitriet, nitraat), gassen (kooldioxyde, ammoniak, stikstofdioxyde), maar ook enzymactiviteiten (α -amylase, protease) en complexe parameters als BOD, visversheid en mutageniteit.

Ze vinden hun toepassing in de fermentatie industrie, waar strikte controle van de fermentatie omstandigheden nodig is (Karube *et al.* 1988, Brand *et al.* 1991) en in de klinische toepassingen waar analyses eenvoudiger kunnen worden uitgevoerd. Zelfs implantatie van microbiële elektrodes voor continue *in situ* metingen zou tot de mogelijkheden kunnen behoren (Schmidt 1991).

Ook kunnen de microbiële elektrodes hun toepassing vinden in de voedingsmiddelenindustrie, waar ze de kwaliteit en de versheid van de voeding controleren. Van belang zijn ook de toepassingen bij milieucontroles. Een snelle controle van parameters als toxiciteit, BOD en zuurstofgehalte van industrieel afvalwater, is niet alleen van belang voor het milieu, maar ook voor de (potentiële) vervuiler, gezien de huidige milieuwetgeving.

Mogelijke toepassingen zijn verder het aantonen van biologische of chemische oorlogvoering voor militaire doeleinden en het aantonen van giftige gassen in de mijnen, parkeergarages en industriegebieden.

Maar vooral in de microbiologische laboratoria zal de microbiële elektrode veel toepassingen kennen. Als voorbeelden worden een antibioticatester en het aantonen van biologische afbraak genoemd, maar het is wel duidelijk dat de toepassingen onbeperkt zijn.

VI TOEKOMSTPERSPECTIEVEN

Elk artikel, waarin weer een nieuwe microbiële biosensor wordt gepresenteerd, eindigt met de positieve opmerking "dat deze elektrode veelbelovende eigenschappen bezit en aantrekkelijk is voor de bepaling van"

Er zijn echter enkele schrijvers zo realistisch, dat ze eraan toevoegen dat het een en ander nog geoptimaliseerd kan worden.

In feite blijkt uit de kleine hoeveelheid commercieel verkrijgbare elektrodes dat er inderdaad nog veel gedaan moet worden om de microbiële elektrodes aantrekkelijk te maken.

Aan welke voorwaarden moet zo'n elektrode voldoen om te kunnen concurreren met de bestaande analyse methodes?

Naast de bestaande voordelen van het geringe reagentieverbruik en de mogelijkheid complexe parameters te meten (BOD, toxiciteit, mutageniteit), zijn vooral de volgende punten van belang uit concurrentie overwegingen:

- er is geen bestaande analysemethode,
- de bestaande analysemethode is zeer kostbaar, ingewikkeld of langdurig,
- de microbiële elektrode moet te gebruiken zijn voor onverdunde, niet voorbehandelde monsters,
- de microbiële elektrode moet handzaam zijn in het gebruik zodat het bijvoorbeeld ook bij analyses in het veld gebruikt kan worden,
- de elektrode moet over een lange tijd stabiel zijn.

Aan veel van deze punten wordt echter te weinig aandacht besteed. Ook aan de technische achtergrond van de microbiële elektrode zou meer onderzoek verricht kunnen worden.

Doordat het onderzoek naar biosensoren een snelgroeiend en nieuw terrein is, bestaat er nog geen coördinatiestructuur voor het onderzoek. Dit uit zich in het dubbel uitvinden van dezelfde biosensor (Rechnitz 1991), veel nieuwe sensoren en weinig fundamenteel onderzoek.

Een bijkomend probleem is dat van de geheimhouding. Omdat biosensoren een (mogelijk) commerciële groeimarkt vertegenwoordigen is er een sterke link met het bedrijfsleven.

Hierdoor worden onderzoeksresultaten niet uitgewisseld en kan er zelfs sprake zijn van diefstal van ontwerpen vanuit onderzoeksvorstellen (Rechnitz 1991). Vele onderzoekers, verbonden aan universiteiten, zijn als adviseur of anderszins verbonden aan de industrie. Dit bemoeilijkt het uitwisselen van onderzoeksresultaten nog meer.

Tijdens de workshop georganiseerd door TNO in juni 1992, werd geprobeerd om het bedrijfsleven te interesseren voor de ontwikkelingen op het gebied van de biosensoren (TNO Zeist). Met name de complexiteit van de biosensor en de onduidelijkheden over de behoefte in de markt zorgen voor een afwachtende houding van de (sensor)industrie.

Hoewel er in de literatuur gesproken wordt over commercieel toegepaste microbiële elektrodes, worden er geen concrete voorbeelden genoemd. Een rondgang langs enkele bedrijven die mogelijk microbiële elektrodes of biosensoren zouden kunnen verkopen, levert een triest beeld op. Het woord biosensor is meestal wel bekend maar verkopen doen ze het artikel niet.

Toch is er een groeiende tendens richting commercialisatie (mondelijke mededeling, R.B.M. Schasfoort). Dit geldt voor het gehele biosensor terrein. Omdat de microbiële elektrode hier slechts een klein gedeelte van beslaat zal de uitwerking van deze tendens zich wat gedempter laten merken.

Mijn visie is, dat er wel degelijk mogelijkheden zijn voor de microbiële elektrode. Er zijn nog vele problemen te overwinnen, zoals de sterilisatie bij gebruik in fermentaties en in klinische toepassingen, maar het enthousiasme van de vele onderzoekers is zeker niet ongegrond.

Nu de biosensortechniek wat ouder wordt, komt ook de wijsheid en inzicht. Er wordt al meer aan fundamenteel onderzoek gedaan en er zijn al diverse beschouwingen en reviews geschreven. Echter, goede samenwerking van de universiteiten op het niveau van fundamenteel onderzoek is nodig om de groei op het gebied van de microbiële elektrode in gezonde banen te leiden. Vooral de combinatie van diverse disciplines is van belang. Naast het juiste micro-organisme en groeiomstandigheden zijn ook de juiste mediators en elektrodes van belang. Ook de ontwikkelingen rond de chip dienen voldoende aandacht te krijgen. De samenwerking met de elektrotechniek zal verder moeten worden uitgebreid.

Op deze wijze zijn de gaten in de kennis rond de microbiële elektrode te dichten en is een snellere stroom van commercieel aantrekkelijke elektrodes richting de industrie mogelijk.

Een voordeel van het onderzoek aan de microbiële elektrode is dat het niet zeer kostbaar is. Hierdoor krijgen ook landen buiten Amerika, West Europa en Japan een kans. Waardevolle bijdragen komen ook uit: Roemenië, Tsjechoslowakije, Litouwen en Z.Korea. Een groter aantal wetenschappers dat zich met de microbiële elektrode bezig houdt geeft op den duur een grotere input aan nieuwe ideeën.

Dat er in Nederland belangstelling is voor biosensor onderzoek blijkt uit de activiteiten die rondom de biosensor worden georganiseerd: een sensorconferentie op 11 en 12 maart 1992, een workshop Biosensoren op 16 juni 1992 en een themadag over sensoren en meetresultaten op 28 oktober 1992.

Ik denk dat mede door het ontwikkelen van handzame microbiële elektrodes voor milieuonderzoek (een groeiemarkt), de markt voor alle biosensoren zich zal gaan ontwikkelen.

LITERATUUR

- Abdel-Latif, M.S., Suleiman, A., Guilbault, G.G., Dremel, B.A.A. and Schmid, R.D. 1990.**
Fiber optic sensors : recent developments. *Analytical letters* 23:375-399.
- Alegret, S. and Martinez-Fabregas, E. 1989.**
Biosensors based on conducting filled polymer all-solid-state PVCmatrix membrane electrodes. *Biosensors* 4:287-297.
- Barlíková, A., Svorc, J. and Miertus, S. 1991.**
Hybrid biosensor for the determination of sucrose. *Analytica chimica acta* 247:83-87.
- Bergveld, P. 1986.**
The development and application of FET-based biosensors. *Biosensors* 2:15-33.
- Brand, U., Brandes, L., Koch, V., Kullik, T., Reinhardt, B., Rütter, F., Scheper, T., Schügerl, K., Wang, S., Wu, X., Ferretti, R., Prasad, S. and Wilhelm, D. 1991.**
Monitoring and control of biotechnological production processes by bio-FET-FIA-sensors. *Applied microbiology and biotechnology* 36:167-172.
- Buch, R.M. and Rechnitz, G.A. 1989.**
Intact chemoreceptor-based biosensors: extreme sensitivity to some excitatory amino acids. *Analytical letters* 22:2685-2702.
- Ciucu, A., Magearu, V., Fleschin, S., Lucaciu, I. and David, F. 1991.**
Biocatalytical membrane electrode for phenol. *Analytical letters* 24:567-580.
- Corcoran, C.A. and Rechnitz, G.A. 1985.**
Cell-based biosensors. *Trends in biotechnology* 3:92-96.
- Corcoran, C.A. and Kobos, R.K. 1987.**
Selective enhancement of an *Escherichia coli* bacterial electrode using enzyme and transport inhibitors. *Biotechnology and bioengineering* 30:565-570.
- Delany, G.M., Bennetto, H.P., Mason, J.R., Roller, S.D., Stirling, J.L. and Thurston, C.F. 1986.**
Electron transduction from enzymes and bacteria. *Analytical proceedings* 23:143-144.
- Demura, M., Asakura, T. and Kuroo, T. 1989.**
Immobilization of biocatalysts with Bombyx mori silk fibroin by several kinds of physical treatment and its application to glucose sensors. *Biosensors* 4:361-372.
- Dorward, E.J. and Barisas, B.G. 1984.**

Acute toxicity screening of water pollutants using a bacterial electrode. *Environ. sci. technol.* **18**:967-972.

Gunasingham, H., Tan, C-H. and Aw, T-C. 1990.

Comparative study of first-, second- and third-generation amperometric glucose enzyme electrodes in continuous-flow analysis of undiluted whole blood. *Analytica chimica acta* **234**:321-330.

Higgins, I.J., Swain, A. and Turner, A.P.F. 1987.

Principles and application of biosensors in microbiology. *Journal of applied bacteriology symposium supplement* 93S-104S.

Hikuma, M., Kubo, T., Yasuda, T., Karube, I. and Suzuki, S. 1979a.

Microbial electrode sensor for alcohols. *Biotechnology and bioengineering* **21**:1845-1853.

Hikuma, M., Kubo, T., Yasuda, T., Karube, I. and Suzuki, S. 1979b.

Amperometric determination of acetic acid with immobilized *Trichosporon brassicae*. *Analytica chimica acta* **109**:33-38.

Hikuma, M., Kubo, T., Yasuda, T., Karube, I. and Suzuki, S. 1980a.

Ammonia electrode with immobilized nitrifying bacteria. *Analytical chemistry* **52**:1020-1024.

Hikuma, M., Obana, H., Yasuda, T., Karube, I. and Suzuki, S. 1980b.

A potentiometric microbial sensor based on immobilized *Escherichia coli* for glutamic acid. *Analytical chimica acta* **116**:61-67.

Hilditch, P.I. and Green, M.J. 1991.

Disposable electrochemical biosensors. *Analyst* **116**:1217-1220.

Ihn, G-S. and Kim, I-T. 1989.

Preparation and comparison of *Proteus vulgaris* and *Protues mirabilis* bacterial electrodes for the determination of DL-phenylalanine. *Bioelectrochemistry and bioenergetics* **21**:223-231.

Karube, I., Mitsuda, S. and Suzuki, S. 1979a.

Glucose sensor using immobilized whole cells of *Pseudomonas fluorescens*. *European journal of applied microbiology and biotechnology* **7**:343-350.

Karube, I., Matsunaga, T. and Suzuki, S. 1979b.

Microbioassay of nystatin with a yeast electrode. *Analytica chimica acta* **109**:39-44.

Karube, I., Suzuki, S., Okada, T. and Hikuma, M. 1980.

Microbial sensors for volatile compounds. *Biochimie* **62**:567-573.

Karube, I., Okada, T. and Suzuki, S. 1982.

A methane gas sensor based on oxidizing bacteria. *Analytica chimica acta* **135**:61-67.

Karube, I. and Tamiya, E. 1987.

Biosensors for environmental control. *Pure & appl. chem.* **59**:545-554.

Karube, I. and Sode, K. 1988.

Enzyme and microbial sensor. *Nato advanced study institute series. Serie C.* **226**:115-130.

Karube, I., Tamiya, E., Sode, K., Yokoyama, K., Kitagawa, Y., Suzuki, H. and Asano, Y. 1988.

Application of microbiological sensors in fermentation processes. *Analytica chimica acta* **213**:69-77.

Karube, I., Sode, K., Suzuki, M. and Nakahara, T. 1989.

Microbial sensor for preliminary screening of mutagens utilizing a phage induction test. *Analytical chemistry* **61**:2388-2391.

Karube, I. 1991.

Development of new microbiosensors. *Polymer Journal* **23**:573-581.

Katz, E.Y., Shkuropatov, A.Y., Vagabova, O.I. and Shuvalov, V.A. 1989.

Coupling of photoinduced charge separation in reaction centers of photosynthetic bacteria with electron transfer to a chemically modified electrode. *Biochimica et biophysica acta* **976**:121-128.

Kingdon, C.F.M. 1985.

Biosensor design: microbial loading capacity of acetylcellulose membranes. *Applied microbiology and biotechnology* **21**:176-179.

Kitagawa, Y., Tamiya, E. and Karube, I. 1987.

Microbial-FET alcohol sensor. *Analytical letters* **20**:81-96.

Kubo, I., Osawa, H., Karube, I., Matsuoda, H. and Suzuki, S. 1983.

Hybrid biosensor for clinical analysis. *Anal. chem. symp. ser.* **17**:660-665.

Kulys, J. and Kadziauskiene, K. 1980.

Yeast BOD sensor. *Biotechnology and bioengineering* **22**:221-226.

Margineanu, D-G., Vais, H. and Ardelean, I. 1985.

Bioselective electrodes with immobilized bacteria. *Journal of biotechnology* **3**:1-9.

Matsunaga, T., Karube, I. and Suzuki, S. 1978a.

Electrochemical microbioassay of vitamin B₁. *Analytica chimica acta* **98**:25-30.

Matsunaga, T., Karube, I. and Suzuki, S. 1978b.

Rapid determination of nicotinic acid by immobilized *Lactobacillus arabinosus*. *Analytica chimica acta*

99:233-230.

Matsunaga, T., Karube, I. and Suzuki, S. 1980.

A specific microbial sensor for formic acid. *European J. appl. microbiol. biotechnol* **10**:235-243.

Minami, H., Sugawara, M., Odashima, H., Umezawa, Y., Uto, M., Michaelis, E.K. and Kuwana, T. 1991.

Ion channel sensors for glutamic acid. *Analytical chemistry* **63**:2787-2795.

Mulchandani, A., Male, K.B. and Luong, J.H.T. 1990.

Development of a biosensor for assaying postmortem nucleotide degradation in fish tissues. *Biotechnology and bioengineering* **35**:739-745.

Nakajima, H., Koyama, H. and Suzuki, H. 1991.

Immobilization of *Pseudomonas* L-Phe oxidase on a nylon membrane for possible use as an amino acid sensor. *Agric. biol. chem.* **55**:3117-3118.

Okada, T., Karube, I. and Suzuki, S. 1982.

Ammonium ion sensor based on immobilized nitrifying bacteria and a cation-exchange membrane. *Analytica chimica acta* **135**:159-163.

Okada, T., Karube, I. and Suzuki, S. 1983.

NO₂ sensor which uses immobilized nitrite oxidizing bacteria. *Biotechnology and bioengineering* **25**:1641-1651.

Parce, J.W., Owicki, J.C., Kercso, K.M., Sigal, G.B., Wada, H.G., Muir, V.C., Bousse, L.J., Ross, K.L., Sikic, B.I. and McConnel, H.M. 1989.

Detection of cell-affecting agents with a silicon biosensor. *Science* **246**:243-247.

Park, J-K and Kim, H-S. 1990.

A new biosensor for specific determination of glucose or fructose using an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology and bioengineering* **36**:744-749.

Racek, J. and Petr, R. 1990.

Biosensor for determination of hydrogen peroxide based on catalase activity of human erythrocytes. *Analytica chimica acta* **239**:19-22.

Racek, J. 1991.

A yeast biosensor for glucose determination. *Applied microbiology and biotechnology* **34**:473-477.

Rawson, D.M., Willmer, A.J. and Turner, A.P.F. 1989.

Whole-cell biosensors for environmental monitoring. *Biosensors* **4**:299-311.

Rechnitz, G.A., Kobos, R.K., Riechel, S.J. and Gebauer, C.R. 1977.

A bio-selective membrane electrode prepared with living bacterial cells. *Analytica chimica acta* **94**:357-365.

Rechnitz, G.A. 1981.

Bioselective membrane electrode probes. *Science* **214**:287-291.

Rechnitz, G.A. 1991.

Biosensors into the 1990s. *Electroanalysis* **3**:73-76.

Riedel, K. and Scheller, F. 1987.

Inhibitor-treated microbial sensor for the selective determination of glutamic acid. *Analyst* **112**:341-342.

Riedel, K., Renneberg, R., Wollenberger, U., Kaiser, G. and Scheller, F. W. 1989.

Microbial sensors: fundamentals and application for process control. *J. chem. tech. biotechnol* **44**:85-106.

Riedel, K. 1991.

Biochemical fundamentals and improvement of the selectivity of microbial sensors - a minireview. *Bioelectrochemistry and bioenergetics* **25**:19-30.

Riedel, K., Naumov, A.V., Boronin, A.M., Golovleva, L.A., Stein, H.J. and Scheller, F. 1991.

Microbial sensors for determination of aromatics and their chloroderivatives I. Determination of 3-chlorobenzoate using a *Pseudomonas*-containing biosensor. *Appl. microbiol. biotechnol.* **35**:559-562.

Suzuki, H., Tamiya, E. and Karube, I. 1987.

An amperometric sensor for carbon dioxide based on immobilized bacteria utilizing carbon dioxide. *Analytica chimica acta* **199**:85-91.

Suzuki, H., Tamiya, E. and Karube, I. 1990.

Development of a disposable miniature L-lysine sensor. *Analytica chimica acta* **229**:197-203.

Svorc, J., Miertus, S. and Barlikova, A. 1990.

Hybrid biosensor for the determination of lactose. *Analytical chemistry* **62**:1628-1631.

TNO Den Helder.

TNO Zeist. *Biotechnologie* bulletin Juni 1992.

Thavarungkul, P., Hakanson, H. and Mattiasson, B. 1991.

Comparative study of cell-based biosensors using *Pseudomonas cepacia* for monitoring aromatic compounds. *Analytica chimica acta* **249**:17-23.

Vais, H., Oancea, F., Faghi, A.M., Delcea, C. and Margineanu, D-G. 1985.

Amperometric electrode for glucose with immobilized bacteria (*Pseudomonas fluorescens*). *Revue Roumaine de biochimie* **22**:57-62.

Vais, H. and Margineanu, D-G. 1986.

912- Kinetic model of amperometric selective electrodes with immobilized bacteria. *Bioelectrochemistry and bioenergetics* **16**:5-11.

Vincke, B.J., Devleeschouwer, M.J., Dony, J. and Patriarche, G.J. 1984.

Analytical determination of nicotinamide using bacterial electrodes. *International journal of pharmaceutics* **21**:265-275.

Walters, R.R., Moriarty, B.E. and Buck, R.P. 1980.

Pseudomonas bacterial electrode for determination of L-histidine. *Analytical chemistry* **52**:1680-1684.

Weisenhorn, A.L., Mac Dougall, J.E., Gould, S.A.C., Cox, S.D., Wise, W.S., Massie, J., Maivald, P., Elings, V.B., Stucky, G.D. and Hansma, P.K. 1990.

Imaging and manipulating molecules on zeolite surface with an atomic force microscope. *Science* **247**:1330-1333.

