

**DETECTION OF MICROBES IN ENVIRONMENTAL SYSTEM USING
ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS**

Chayut Yaempho

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University
in Academic Partnership with
The University of Michigan, The University of Oklahoma,
Case Western Reserve University, and Institut Français du Pétrole
2015

I28368514

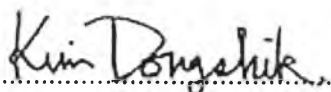
580016


Thesis Title: Detection of Microbes in Environmental System Using
Electrochemical Biosensors
By: Chayut Yaempho
Program: Petrochemical Technology
Thesis Advisors: Assoc. Prof. Dong Shik Kim
Asst. Prof. Pomthong Malakul

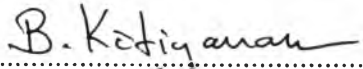
Accepted by The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn
University, in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master of
Science.


..... College Dean
(Asst. Prof. Pomthong Malakul)

Thesis Committee:


.....
(Assoc. Prof. Dong Shik Kim)


.....
(Asst. Prof. Pomthong Malakul)


.....
(Asst. Prof. Boonyarach Kitiyanan)


.....
(Dr. Veerapat Tantayakom)

ABSTRACT

5671005063: Petrochemical Technology Program
Chayut Yaempho: Detection of Microbes in Environmental System
Using Electrochemical Biosensors
Thesis Advisors: Assoc. Prof. Dong Shik Kim and Asst. Prof.
Pomthong Malakul 46 pp.
Keywords: Electrochemical biosensor/ Self-assembled monolayer/ Sulphate
reducing bacteria/ Electrochemical impedance spectroscopy

The presence of sulfate-reducing bacteria (SRB) in environmental systems can be harmful to the environment. For example, the hydrogen sulfide which is a product of SRB will react with metal ions in the water to produce metal sulfides. These metal sulfides are insoluble leading to the dark color of sludge. Additionally, H₂S can be converted to sulfuric acid that jeopardize concrete and steel within wastewater environments which can be devastating. Moreover, SRB can provide a corrosion problem when metal structures are exposed to water which contains sulfate. An electrochemical biosensor that can detect the presence of bacteria even at a very low concentration is necessary in order to maintain the system free of microbial impacts. In this study, an electrochemical biosensor was investigated by immobilizing antibodies on a gold electrode. First the surface of gold electrode was modified with an alkanethiolate self-assembled monolayer (SAM). Then, the antibodies were attached to the SAM. SAMs with different alkyl chain lengths (3MPA, 6MHA, 8MOA, 11MUA) were studied in order to compare the effects of SAM's height on sensing efficiency using cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). The longer alkyl chains showed more blocking behavior against the electron transfer than the short chains. The immobilization of antibodies and binding of bacteria to the gold electrode was observed to increase the electron transfer resistance. In addition, the resistance to the electron transfer increased as the bacteria concentration increased.

บทคัดย่อ

ชยุด แฉ้มโพธิ์ : การตรวจวัดเชื้อจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมโดยอิเล็กโตรเคมีคอลไบโอเซนเซอร์ (Electrochemical Biosensors to Detect Microbes in Petrochemical Processes)
 อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. Dong Shik Kim และ ผศ. ดร. ปมทอง มาลากุล ณ อยุธยา 46 หน้า

เชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อมเช่น แบคทีเรียซัลเฟตรีดิวซิ่ง สามารถส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมได้ ยกตัวอย่างเช่น เมื่อไฮโดรเจนซัลไฟด์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากแบคทีเรียรีดิวซิ่งซัลเฟตสามารถทำปฏิกิริยากับโลหะในน้ำเกิดเป็นโลหะซัลไฟด์ได้ ซึ่งนำไปสู่การเกิดกากตะกอนในสิ่งแวดล้อมได้ นอกจากนี้ไฮโดรเจนซัลไฟด์สามารถเปลี่ยนเป็นกรดซัลฟิวริกซึ่งเป็นอันตรายต่อคอนกรีตและเหล็กกล้าในระบบบำบัดน้ำเสีย ดังนั้นการใช้อิเล็กโตรเคมีคอลไบโอเซนเซอร์ซึ่งสามารถตรวจวัดเชื้อแบคทีเรียแม้มีความเข้มข้นต่ำจึงมีความจำเป็นในการรักษาระบบให้ปราศจากผลกระทบของเชื้อแบคทีเรีย ในงานวิจัยนี้ทดลองศึกษาอิเล็กโตรเคมีคอลไบโอเซนเซอร์โดยการตรึงแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับเชื้อที่ต้องการศึกษาบนขั้วทองของเซนเซอร์ โดยกระบวนการแรกหยดสารอินทรีย์ประเภทอัลเคนไธออลลงบนพื้นผิวขั้วทองซึ่งเรียกว่า self-assembled monolayer (SAM) หลังจากนั้นตรึงแอนติบอดีบน SAM โดยมีการเปลี่ยนความยาวโซ่หมู่อัลคิลของอัลเคนไธออล (3MPA, 6MHA, 8MOA, 11MUA) เพื่อเปรียบเทียบผลความยาวของ SAM ที่มีผลต่อประสิทธิภาพของเซนเซอร์โดยการตรวจวัดด้วยเทคนิค cyclic voltammetry (CV) และ electrochemical impedance spectroscopy (EIS) จากการทดลองพบว่าสายโซ่หมู่อัลคิลที่มีความยาวมากกว่าสามารถด้านการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนได้ดีกว่าสายโซ่หมู่อัลคิลที่มีความยาวสั้นกว่า นอกจากนี้พบว่าตรึงแอนติบอดีและเชื้อแบคทีเรียบนผิวขั้วทองสามารถเพิ่มการด้านการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอน และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียพบว่าความต้านทานการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนสูงขึ้น

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Assoc. Prof. Dong Shik Kim for providing me a great opportunity to do the research in his research group at University of Toledo, Ohio, USA. I would also like to thank my co-advisor, Asst. Prof. Pomthong Malakul for giving suggestions. In addition, I am very grateful to have Asst. Prof. Boonyarach Kitiyanan and Dr. Veerapat Tantayakom as my thesis committees.

I am very thankful to my mentor, Hamid Feyzizarnagh, for helpful suggestions, valuable discussion and creating a friendly environment. I am also grateful for funding this thesis work that provided by the Ratchadapisek Sompoch Endowment Fund (2013), Chulalongkorn University (CU-56-900-FC) and Thailand Research Fund (IRG5780012).

Additionally, I would like to thank all my friends both Thais and foreigners at Toledo for making my time in Toledo a wonderful experience.

Finally, I am very thankful to my family for their support and encouragement. Without them, this project would not have been accomplished.

TABLE OF CONTENTS

	PAGE
Title Page	i
Abstract (in English)	iii
Abstract (in Thai)	iv
Acknowledgements	v
Table of Contents	vi
List of Figures	ix

CHAPTER

I	INTRODUCTION	1
II	LITERATURE REVIEW	
	2.1 Biosensor	3
	2.1.1 Electrochemical Biosensors	5
	2.1.2 Optical Biosensors	12
	2.1.3 Piezoelectric Biosensor	16
	2.1.4 Thermal Biosensor	18
	2.2 Self-assembled Monolayers	18
	2.3 Sulfate Reducing Bacteria (SRB)	19
III	EXPERIMENTAL	24
	3.1 Materials and Chemicals	24
	3.2 Equipment	24
	3.3 Software	25
	3.4 Methodology	25
	3.4.1 Gold Electrode Cleaning	25
	3.4.2 Functionalization Process	25
	3.4.3 Electrochemical Characterization	25

CHAPTER	PAGE
3.4.4 Activation Process	26
3.4.5 Antibody Attachment	26
3.4.6 Antigen Detection	26
IV RESULTS AND DISCUSSION	28
4.1 Preparation of the Biosensor	29
4.2 Cyclic Voltammetry Characterization	29
4.2.1 Cyclic Voltammetry of Gold Electrode After Each Assembly Step	29
4.2.2 Cyclic Voltammetry of Gold Electrode with Different Alkyl Chain Lengths of Alkanethiolate SAMs	30
4.3 Electrochemical Spectroscopy Impedance Characterization	31
4.3.1 Electrochemical Impedance Spectroscopy of Gold Electrode After Each Assembly Step	31
4.3.2 Electrochemical Impedance Spectroscopy of Gold Electrode with Different Alkyl Chain Lengths of Alkanethiolate SAM	33
4.3.3 Electrochemical Impedance Spectroscopy of the SAMs with Different Alkyl Chain Lengths After Immobilizing Antibodies and Binding Claudin 4 Recombinant Proteins	34
4.4 Detection of Claudin 4 Recombinant Proteins Using Electrochemical Impedance Spectroscopy	35
V CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS	37
5.1 Conclusions	37
5.2 Recommendation	37

CHAPTER	PAGE
REFERENCES	38
APPENDIX	42
CURRICULUM VITAE	46

LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
2.1	The major elements of a biosensor.	4
2.2	Electrochemical cell.	7
2.3	Reference (calomel) electrode.	8
2.4	Electrochemical biosensor as screen printed electrode.	9
2.5	Architecture of an optical biosensor.	12
2.6	Schematic of an optical biosensor.	13
2.7	Interaction of biomolecules with light.	13
2.8	Schematic set-up of the portable evanescent wave optical fiber biosensor (EWAB).	14
2.9	Structure of piezoelectric material and Structure of PZT under an electric field.	17
2.10	Natural piezoelectric materials that produce electricity under pressure and vice versa.	17
2.11	Gold thiolate monolayer.	19
2.12	Combining the action of SRBs and sulfide oxidizing microbes.	21
4.1	Schematic diagram of the fabrication of the biosensor.	28
4.2	Cyclic voltammetry of gold electrode after each assembly step.	30
4.3	Cyclic voltammetry of gold electrode with different alkyl chain lengths of alkanethiolate SAMs.	31
4.4	Electrochemical Impedance Spectroscopy of gold electrode after each assembly step.	32
4.5	Electrochemical impedance spectroscopy of gold electrode with different alkyl chain lengths of alkanethiolate SAM.	33

FIGURE		PAGE
4.6	Electrochemical impedance spectroscopy of the SAMs with different alkyl chain lengths after immobilizing antibodies and binding Claudin 4 Recombinant Proteins.	34
4.7	Detection of Claudin 4 Recombinant Proteins using Electrochemical impedance spectroscopy.	36
A1	Impedance plot (Nyquist plot) of the sensor with 3 MPA thiolate SAM after immobilizing antibodies and binding Claudin 4 Recombinant Proteins at different concentrations.	42
A2	Impedance plot (Nyquist plot) of the sensor with 6 MHA thiolate SAM after immobilizing antibodies and binding Claudin 4 Recombinant Proteins at different concentrations.	43
A3	Impedance plot (Nyquist plot) of the sensor with 8 MOA thiolate SAM after immobilizing antibodies and binding Claudin 4 Recombinant Proteins at different concentrations.	44
A4	Impedance plot (Nyquist plot) of the sensor with 11 MUA thiolate SAM after immobilizing antibodies and binding Claudin 4 Recombinant Proteins at different concentrations.	45