바이오센서 적용을 위한 미생물이 고정된 부양형 탄소나노튜브 필름 제작과 유기인 화합물 검출

김인태¹ · 안태창² · 김창섭³ · 차형준³ · 김진호⁴ · 임수택⁴ · 임근배^{1,5,*}

Fabrication of Microbe-Attached SWNT Film for Biosensor Applications and Organophosphorus Compounds Detection

Intae Kim¹, Taechang An², Chang Sup Kim³, Hyung Joon Cha³, Jin Ho Kim⁴, Soo Taek Lim⁴, and Geunbae Lim^{1,5,*}

Abstract

Microbes have been used extensively in various fields of researches and industries but has not been used widely for microfluidic biosensor applications because it is difficult to immobilize properly to a small space. Therefore, we developed a microbial immobilization method for microfluidic devices using single-walled nanotubes and dielectrophoretic force. Single-walled nanotubes and *Escherichia coli* were aligned between two cantilever electrodes by a positive dielectrophoretic force resulting in a film of single-walled nanotubes with attached *Escherichia coli*. The optimal condition of film formation without a cell lysis was investigated. Diameter of single-walled nanotubes and electric field (intensity and duration of application) had an effect on the cell viability. On the other hand, the cell concentration of the suspension did not affect the cell viability. Paraoxon was detected using single-walled nanotubes film with attached *Escherichia coli* that expressed organophosphorus hydrolase. This film which is suspended from the substrate showed faster response time than sensors that are not suspended from the substrate.

Keywords: Microbial immobilization, Recombinant *Escherichia coli*, Suspended SWNT film, Organophosphorus hydrolase

1. 서 론

인류는 미생물의 존재를 알기 전부터 미생물의 효율적인 촉매작용을 이용해 왔다. 미생물의 합성 및 분해작용을 이용한

발효와 양조 과정이 대표적인 예이다. 근래에는 유전공학의 발달로 유전자 조작을 통해 필요한 대사과정을 갖거나 특정한 단백질 효소를 발현하는 미생물의 제작이 가능해졌다[1-3]. 그 결과 우수한 기능을 갖는 미생물들이 개발되었고 오염된 물과 토양의 정화, 바이오 연료전지, 바이오 연료 생산, 수소 생산, 바이오센서 등과 같은 다양한 분야에 성공적으로 응용되고 있다[2,4-8]. 또한 유전자 재조합을 통해 특정 단백질 생산이 가능해지면서 다양한 효소들이 미생물을 통하여 생산되고 있다. 미생물의 내부에 발현된 효소를 사용하기 위해서는 세포를 분쇄하고 효소와 부산물을 분리하는 정제과정이 필요하다. 이 과정에 소요되는 시간과 비용을 줄이기 위해 세포 자체를 효소로서 사용하려는 연구들이 보고되었다. 일반적으로 미생물에 발현된 효소는 세포 내부에 발현되기 때문에 세포외부의 물질과 직접적인 접촉이 어렵다. 효소가 발현되는 위치를 유전자 조작을 통하여 세포내부가 아닌 표면이나 간극으로 조정하면 세포 외부물질이 효소와 직접적으로 접촉할 수 있게 된다. 세포의 표면이나 간극에 효소를 발현시켜 세포 자체를 효소의 담체(carrier)로서 사용한 연구들이 바이오센서 제작에 응용되고 있다[9-12].

효소는 다양한 미세유체소자에 응용되고 있지만 효소를 대체할 수 있는 미생물은 미세유체 분야에 활발히 응용되고 있지 않

¹ 포항공과대학교 기계공학과 (Department of Mechanical Engineering, POSTECH)

Hyoja-dong, Nam-gu, Pohang, Gyungbuk 790-784, Korea

² 안동대학교 기계설계공학과 (Department of Mechanical Design Engineering, Andong National University)

Gyeongdong-ro, Andong 760-749, Korea

³ 포항공과대학교 화학공학과 (Department of Chemical Engineering, POSTECH)

Hyoja-dong, Nam-gu, Pohang, Gyungbuk 790-784, Korea

⁴ 예손병원 (Department of Orthopaedic Surgery)

Nae-dong, Ojeong-gu, Bucheon, Gyeonggi, 421-805, Korea

⁵ 포항공과대학교 융합생명공학부 (Division of Integrative Bioscience and Biotechnology, POSTECH)

Hyoja-dong, Nam-gu, Pohang, Gyungbuk 790-784, Korea

*Corresponding author: limmems@postech.ac.kr

(Received: Nov. 28, 2013, Revised: Dec. 14, 2013, Accepted: Dec. 27, 2013)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(<http://creativecommons.org/licenses/bync/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

다. 가장 큰 원인은 미세유체 소자에 적용 가능한 미생물 고정 방법의 부재이다. 고정되지 않은 세포는 사용 후 반응물에서 세포를 분리하기 위한 후 처리가 필수적이기 때문에 미생물을 효율적으로 사용하기 위해서는 적절한 고정방법이 필요하다. 하지만 기존의 미생물 고정방법들은 크기를 줄이는 것에 한계가 있기 때문에 미세유체 소자에 적용하기가 어렵다. 현재 사용되고 있는 대표적인 방법은 응집(flocculation), 화학적 부착, 가둠(gel entrapment, encapsulation), 생물막(biofilms)이다[6,13-16]. 위 방법 중 생물막 형성법이 미세유체 소자에 적용 가능한 방법이지만 생물막 형성에 시간이 오래 걸리며 위치제어가 어렵다. 미생물을 미세유체 소자에 성공적으로 적용하려면 세포부착 위치와 면적 및 농도의 제어가 가능한 미생물 고정방법이 필요하다.

탄소나노튜브는 주변의 자극이나 표면에 부착되는 물질에 의해 전기적 특성이 민감하게 변화하기 때문에 센서 분야에 다양하게 응용되고 있다[17-20]. 단일 가닥의 탄소나노튜브를 이용하여 센서를 제작한 연구들은 우수한 성능으로 주목을 받았지만[21,22] 낮은 재현성과 위치제어를 위해 많은 시간과 비용이 필요하다는 단점을 가지고 있다. 여러 가닥의 탄소나노튜브를 망의 형태로 사용하게 되면 단일 가닥의 탄소나노튜브의 단점을 극복할 수 있다. 탄소나노튜브 각각의 전기적 성질은 편차가 크지만 여러 가닥의 탄소나노튜브가 망으로 연결된 경우 평균적인 전기적 성질을 이용하게 되므로 낮은 재현성을 극복할 수 있고 다양한 방법으로 위치제어가 가능하며 넓은 반응면적을 확보할 수 있다[22]. 이러한 장점들로 인해 여러 가닥의 탄소나노튜브를 망 형태로 사용한 센서는 DNA, 단백질, 박테리아, 기체 분자 검출과 같은 분야에 성공적으로 적용되었다[21-24].

유전영동 현상은 세포를 포함한 대부분의 나노/마이크로 크기의 입자들을 제어할 수 있기 때문에 미세유체 분야에 널리 쓰이고 있다[25]. 유전영동(dielectrophoresis)은 극성이 없는 입자가 불균일한 전기장에 노출되었을 때 전기장과 유전특성에 의해 힘을 받게 되는 현상이다. 따라서 유전특성이 다른 입자들은 다른 크기 또는 방향의 유전영동 힘(dielectrophoretic force)을 받게 된다. 이러한 유전영동의 특성을 이용하여 미생물을 검출 또는 제거하려는 연구들이 보고되었다[26-31]. 또한 강력한 양(positive)의 유전영동 힘을 받는 탄소나노튜브의 특성을 이용하여 고가의 장비 없이 탄소나노튜브의 위치를 제어하는 연구들이 보고되었다[24,32-34].

본 연구에서는 미세유체 기반의 바이오센서에 적용하기 위한 미생물 고정방법으로서 탄소나노튜브와 유전영동을 이용하여 미생물이 부착된 탄소나노튜브 필름을 개발하였고 필름 형성에 영향을 미치는 인자에 대한 분석을 통해 최적화된 필름 형성 조건을 제시하였다. 또한 바이오센서로의 적용가능성을 알아보기 위해 유기인가수분해 효소가 발현된 대장균이 부착된 탄소나노튜브 필름을 제작하고 유기인 화합물인 paraoxon의 검출시험을 진행하였다. 이 연구는 본연구진이 보고했던 탄소나노튜브를 이용한 유기인 화합물 검출에 관한 연구[35]와 탄소나노튜브를 이용한 미생물 부착방법에 관한 연구[36]를 융합하여 발전시킨 연

구로서 바이오센서에 적용하기 위한 미생물 부착방법에 관한 연구이다.

2. 실험 방법

2.1 탄소나노튜브 용액 제조

탄소나노튜브의 분산을 위해 일반적으로 사용되는 Titon X-100, Sodium dodecyl sulfate와 같은 계면활성제는 세포 독성을 갖고 있다. 세포 독성을 피하기 위해 산치리를 방법을 이용하여 표면에 카르복시기가 생성된 탄소나노튜브 용액을 제조하였다[37]. 단일벽 탄소나노튜브(ASP-100F, Hanwha Chemical, Korea)를 50 ml의 $H_2SO_4:HNO_3$ (3:1, v/v) 혼합용액에 넣고 3 h 동안 초음파 처리를 하였다. 이 과정을 통해 탄소나노튜브가 분산되고 표면에 카르복시기가 생성되어 친수성을 갖게 된다. 탄소나노튜브 용액을 탈이온수로 희석하고 멤브레인 필터(Millipore, USA)에 진공여과시키고 탈이온수로 세척한다. 멤브레인 필터에 수집된 탄소나노튜브를 탈이온수에 부유시킨 후 필터를 제거하고 5 min 동안 초음파 처리를 한다. 24시간 상온 보관 후 분산도가 낮아 가라앉은 탄소나노튜브를 제거한다. 12000 rpm 으로 10 min 동안 원심분리하여 가라앉은 탄소나노튜브 다발(직경 150 nm 내외)과 떠있는 탄소나노튜브 다발(직경 15 nM 내외)을 분리한다.

2.2 유기인 가수분해효소가 발현된 대장균 배양

세포간극으로는 유기인 가수분해효소를 발현하고 세포질 내에는 GroEL/GroES를 발현하는 재조합 대장균을 50 μ g/ml 암피실린과 25 μ g/ml 클로람페니콜을 포함한 Luria-Bertani (LB) 배지(0.5% (w/v) 효모추출물, 1% (w/v) 트립토판, 1% (w/v) 염화나트륨)에서 배양하였다. 효율적으로 유기인 가수분해효소와 GroEL/GroES를 발현하기 위해, 배양액의 600 nm에서의 광학 밀도가 1.2에 도달하였을 때, 최종 농도가 1 mM인 IPTG와 10 ng/ml 테트라사이클린을 배양액에 첨가하였다. 37°C에서 12시간 동안 배양한 후, 4,000 g의 속도로 10분 동안 원심분리를 하여 대장균을 회수하였다. 이를 pH 8.0의 Tris-HCl 버퍼에 재부유시켰다.

2.3 외팔보 전극 제작

미생물이 부착된 부양형 탄소나노튜브 필름 제작에 필요한 마주보는 외팔보 전극은 일반적인 microelectromechanical systems (MEMS) 기술을 사용하여 제작되었다(Fig. 1a). 우선 실리콘 기판 위에 low-pressure chemical vapor deposition (LPCVD) 를 이용하여 1 μ m 두께의 SiN을 형성시키고, SiN 층 위에 E-beam 증착법으로 200 Å의 Cr 증착 후 2000 Å의 Au 층을 증착하고 lift-off 기법으로 전극 형상을 완성했다. 전극이 외팔보 형태를

Fig. 1. Schematic view for (a) fabrication of cantilever electrodes and (b) fabrication of suspended SWNT-film with attached microbes by DEP.

갖도록 SiN 층을 reactive-ion etching (RIE) 공정을 이용하여 식각한 후 등방성 습식 식각 방법으로 실리콘 기판을 식각하여 기판에서 떠 있는 구조가 되도록 했다.

2.4 미생물이 부착된 탄소나노튜브 필름 제작

미생물이 부착된 부양형 탄소나노튜브 필름은 유전영동힘과 세포와 탄소나노튜브, 탄소나노튜브와 전극간의 흡착을 이용하여 제작한다(Fig. 1b). 먼저 제작된 탄소나노튜브 용액과 세포를 혼합하여 탄소나노튜브/미생물 용액을 제작한다. 2 μ l의 제작된 용액을 마주보는 외팔보 전극 사이에 공급한 후 전극 양단에 전기장을 (1 MHz, 6~10 V_{pp}) 인가하여 탄소나노튜브와 세포를 전극 사이에 정렬시킨다. 다음으로 탄소나노튜브 용액을 제거하면 두 전극 사이에 남아있는 용액이 증발하면서 표면 장력에 의해 탄소나노튜브와 세포가 서로 흡착하게 되고 탄소나노튜브 또한

Fig. 2. SEM image of (a) *E. coli*-attached SWNT film and (b) a magnified view of the gap between the two electrodes. An AC voltage with an amplitude of 6 V_{pp} and a frequency of 1 MHz was applied between the two electrodes, across the mixed SWNT/*E. coli* suspension, for 5 s. (scale bar : 2 μ m).

전극에 흡착하게 된다.

3. 결과 및 고찰

3.1 대장균이 부착된 탄소나노튜브 필름 제작

미생물이 부착된 탄소나노튜브 필름의 위치와 형상은 외팔보 전극의 위치와 전극 사이의 형상에 의해 결정된다. 이러한 제작 방법의 특성으로 인하여 원하는 곳에 원하는 형상으로 제작이 가능하다. Fig. 2는 대장균이 부착된 탄소나노튜브 필름의 전자현미경 사진이다. 탄소나노튜브가 바닥에서 떠있는 두 전극 사이에 연결 되면서 전체적인 구조의 뼈대를 형성하고 대장균은 탄소나노튜브 표면에 van der Waals force에 의해 부착되었다. 형성된 필름은 전기적으로 두 외팔보 전극에 연결되어있고 구조적으로 바닥으로부터 떠있는 동시에 많은 공극을 갖고 있다. 이러한 특징으로 인해 기존의 미생물 고정방법들과 다르게 전기적인 측정이 가능하고 두 배 이상의 반응면적을 가지며 확산뿐만 아니라 대류에 의한 물질이동도 활발하기 때문에 전계효과 트랜지스터(field-effect transistor) 또는 전기화학 방식의 바이오센서 응용에 적합하다.

3.2 대장균이 부착된 탄소나노튜브 필름의 형성 조건

세포의 간극 또는 표면에 발현된 효소를 이용하기 위해서는 미생물 고정 후 세포가 용해되지 않고 세포막을 정상적으로 유지해야 한다. 탄소나노튜브의 세포독성에 관한 여러 다른 결과들이 보고되고 있다. 탄소나노튜브의 전기적, 물리적 성질과 표면처리에 따라 매우 다양한 환경에서 세포독성이 연구되었기 때문에 직접적인 비교가 어려우며 결과에 대한 명확한 원인분석이 부족한 상황이다[38,39]. 전기장 또한 세포의 용해에 영향을

Table 1. The optimal fabrication condition of the microbe-attached SWNT film. All experiments were performed at frequency of 1 MHz

Parameter	Failure	Success	Cell lysis	Other conditions
SWNTs diameter (nm)	-	~150	~15	7 V _{pp} 5 s, OD ₆₀₀ =0.05
Cell density of suspension (OD ₆₀₀)	-	0.025, 0.05, 0.1, 0.2	-	6 V _{pp} 5 s
Peak-to-peak voltage (V _{pp})	< 6	6, 6.5, 7, 8	8	5 s, OD ₆₀₀ =0.1
Duration of electric field application (s)	< 5	5, 10, 15	15	6 V _{pp} , OD ₆₀₀ =0.05

미치는 인자로 알려져 있다. 전기장을 이용한 세포의 용해는 고전압을 이용하는 경우가 일반적이지만 2 V의 직류 전류를 이용하여 세포 용해에 성공한 사례가 보고되었다[40].

세포의 용해는 피하면서 대장균이 부착된 탄소나노튜브 필름 형성이 가능한 조건을 찾기 위해 다양한 조건에서 형성된 필름을 전자현미경 사진으로 관찰하여 세포의 용해 유무를 판단하였다(Table 1, Fig. 3). 각각의 실험은 조절된 인자를 제외한 나머지 조건은 동일하게 유지하였으며 Table 1의 “Other condition”에 세부 조건을 기입하였다. 조절된 파라미터에 따라 필름 형성이 실패한 구간과 성공한 구간 그리고 필름형성은 성공하였으나 세포가 용해된 구간으로 나누어 정리하였다. 같은 조건에서 세포가 용해된 경우와 아닌 경우가 모두 관찰된 경우 양 쪽 모두 기입하였다. 탄소나노튜브 직경에 대한 실험을 제외한 모든 실험은 ~150 nm 직경의 탄소나노튜브로 진행하였다. 모든 실험의 전기장 주파수는 동일하며 (1 MHz) 가해진 전기장의 세기 (peak-to-peak voltage, V_{pp}), 전기장을 가한 시간(s), 사용된 용액의 세포농도(OD₆₀₀) 조건들은 따로 기재하였다. 먼저 탄소나노튜브의 세포독성을 최소화하기 위해 계면활성제를 사용하지 않는 산처리 방법으로 분산한 후 원심분리를 통해 약 150 nm의 직경을 갖는 탄소나노튜브 다발과 약 15 nm의 직경을 갖는 탄소나노튜브 다발을 분리하였다. 약 150 nm 직경의 탄소나노튜브 다발로 제작한 필름의 세포는 정상적인 표면을 유지하고 있지만 약 15 nm 직경을 갖는 탄소나노튜브 다발로 제작한 필름의 세포는 Fig. 3a와 같이 세포막을 유지하지 못하고 용해된 것을 볼 수 있다. 이는 탄소나노튜브의 크기가 바이러스와 유사하여 탄소나노튜브를 이물질로 인식하고 침투를 저지하려는 시도에서 비롯된 것으로 추측하고 있다[39]. 과도한 세포의 농도 또한 세포의 용해에 영향을 줄 수 있기 때문에 용액의 세포 농도에 따른 형성된 필름에 고정된 세포의 표면을 관찰하였다. 하지만 필름에 더 이상 세포가 붙은 공간이 없을 정도의 조건(Fig. 3b, OD₆₀₀ = 0.2)에서도 세포의 용해는 일어나지 않았다. 마지막으로 전기장에 대한 영향을 실험하였다. 전기장 세기를 결정하

Fig. 3. SEM image of *E. coli*-attached SWNT film which fabricated in harsh conditions: (a) SWNTs diameter, (b) cell density of suspension, (c) peak-to-peak voltage, and (d) duration of electric field application.

는 peak-to-peak 전압에 대한 결과를 살펴보면 6 V_{pp} 미만에서는 소량의 탄소나노튜브와 세포만이 전극 사이에 정렬되었고 용액을 제거하는 과정에서 소실되었다. 6~8 V_{pp}의 조건에서는 정상적으로 필름이 형성되었지만 8 V_{pp} 조건의 일부 전극에서 용해된 세포가 관찰되었다(Fig. 3c). 전기장을 가한 시간에 따른 결과는 5 s 미만에서는 일부 전극에서 필름형성에 실패하였고 5~20 s의 조건에서는 필름 형성에 성공하였으나 15 s 조건의 일부 전극에서 세포의 용해가 관찰되었다(Fig. 3d). 10 V_{pp}에서 30 s 이상의 조건에서는 모든 세포가 용해되었다.

3.3 유기인 화합물 검출 시험

유기인 가수분해효소가 세포간극에 발현된 대장균을 이용하여 대장균이 부착된 탄소나노튜브 필름을 제작하고 유기인 화합물 센서로서의 성능을 시험해 보았다. 모든 시료는 Phosphate buffered saline (PBS) buffer (pH 7.8)에 혼합하여 pH의 변화에 대한 요소를 배제하였다. 목표 검출 물질로써 대표적인 유기인 화합물 중 하나인 paraoxon을 다양한 농도의 용액으로 제조하여 사용하였다. paraoxon이 유기인 가수분해효소와 접촉하게 되면 p-nitrophenol (PNP)와 diethyl phosphate로 분해되고 수소가 발생한다. Semiconductor parameter analyzer (HP 4156A)를 이용하여 대장균이 부착된 탄소나노튜브 필름의 양단에 bias

Fig. 4. Real-time electrical detection of paraoxon using the *E. coli*-immobilized SWNT-film sensor.

전압을 걸어주고 필름을 통해 흐르는 전류를 측정했다.

Fig. 4는 paraoxon 용액을 농도에 따라 첨가했을 때 탄소나노튜브 필름을 통해 흐르는 전류 값의 변화를 측정해낸 그래프이다. 용액을 첨가하였을 때 아래쪽으로 나타나는 peak들은 검출 신호가 아닌 유동의 충격으로 인한 것이며 peak 후 회복된 전류 값과 첨가 전의 전류 값을 비교하여 검출 유무를 결정해야 한다. 버퍼 용액을 첨가했을 때는 전류 값의 변화가 없었지만 1 mM의 paraoxon 용액이 첨가되었을 때는 전류 값이 150 nA 정도 감소되었고 10 mM의 paraoxon 용액이 첨가되었을 때는 600 nA 정도의 전류 값의 변화를 보였다. 검출 원리는 아직 명확하게 밝혀지지 않았다. 기존의 관련된 연구들을 살펴보면 대표적인 부산물 중 하나인 PNP를 탄소나노튜브를 이용해 검출한 연구가 보고되었다[41,42]. 또한 유기인 가수분해효소가 촉매반응을 하는 동안 모양이 변한다고 보고되었고[17] 이러한 변화로 인해 효소의 표면 전하 상태도 변화할 수 있다. 따라서 유기인 가수분해 효소가 paraoxon을 분해해서 발생한 부산물에 의한 영향과 유기인 가수분해효소의 분해작용 자체에 의한 변화가 복합적으로 작용했을 것으로 추측하고 있다[35].

기존에 연구들과 비교해보면 바닥에 붙어있는 형태의 센서에 비해 빠른 반응시간을 보였다[42]. 이 결과는 유기인 가수분해 효소가 직접 부양형 탄소나노튜브 필름에 부착시킨 센서[35]의 결과와 비슷한 양상으로서 바닥에서 떠 있는 구조의 장점인 넓은 반응면적과 검출물질의 높은 물질이동 효율에 의한 효과이다. 하지만 민감도 부분에서는 효소를 직접 붙인 센서(50 μM)에 비해 낮은 감도(1 mM)를 보였다.

4. 결 론

미생물이 부착된 탄소나노튜브 필름을 제작하고 필름 형성에 영향을 미치는 인자들에 대한 분석을 통해 세포의 용해를 피하

면서 필름을 형성할 수 있는 조건을 제시했다. 세포의 용해를 피하기 위해서는 탄소나노튜브 다발의 직경이 약 150 nm 이상이어야 하고 세포에 가해지는 전기장의 크기(8 V_{pp})와 시간(15 s)을 일정 수준 이하로 유지해야 한다. 반면에 필름 제작을 위한 용액의 세포 농도는 세포의 안정성에 영향을 미치지 않았다. 또한 바이오센서의 응용 가능성을 시험하기 위해 유기인 가수분해효소가 발현된 대장균을 이용하여 미생물이 부착된 부양형 탄소나노튜브 필름을 제작하고 유기인 화합물인 paraoxon을 이용하여 유기인 가수분해 효소의 분해작용에 의한 주변의 변화를 필름을 통해 흐르는 전류의 변화를 측정하여 검출하였다. 기존에 보고되었던 기관 바닥에 붙어있는 형태의 센서에 비해 향상된 반응시간을 보였지만 효소를 직접 부착한 센서보다 감도가 떨어지는 결과를 얻었다. 센서의 감도를 높이기 위해 세포의 활성을 높이고 효소가 최적의 활성을 갖는 주변 환경을 제공하고 필름에 부착된 세포의 농도를 최대화 하는 연구가 필요하다.

감사의 글

이 논문은 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No.2012R1A1A2007580)

REFERENCES

- [1] H. P. Sørensen and K. K. Mortensen, "Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*", *J. Biotechnol.*, vol. 115, no. 2, pp. 113-128, 2005.
- [2] J. M. Clomburg and R. Gonzalez, "Biofuel production in *Escherichia coli*: the role of metabolic engineering and synthetic biology", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 86, no. 2, pp. 419-434, 2010.
- [3] F. Baneyx, "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*", *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 10, no. 5, pp. 411-421, 1999.
- [4] Z. Du, H. Li, and T. Gu, "A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy", *Biotechnol. Adv.*, vol. 25, no. 5, pp. 464-482, 2007.
- [5] H. Ben-Yoav, A. Biran, R. Pedahzur, S. Belkin, S. Buchinger, G. Reifferscheid, and Y. Shacham-Diamand, "A whole cell electrochemical biosensor for water genotoxicity bio-detection", *Electrochimica Acta*, vol. 54, no. 25, pp. 6113-6118, 2009.
- [6] M. B. Cassidy, H. Lee, and J. T. Trevors, "Environmental applications of immobilized microbial cells: A review", *J. Ind. Microbiol.*, vol. 16, no. 2, pp. 79-101, 1996.
- [7] Y. Lei, P. Mulchandani, W. Chen, J. Wang, and A. Mulchandani, "Whole cell-enzyme hybrid amperometric biosensor for direct determination of organophosphorous nerve agents with p-nitrophenyl substituent", *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 85, no. 7, pp. 706-713, 2004.

- [8] R. A. Bullen, T. C. Arnot, J. B. Lakeman, and F. C. Walsh, "Biofuel cells and their development", *Biosens. Bioelectron.*, vol. 21, no. 11, pp. 2015-2045, 2006.
- [9] P. Mulchandani, W. Chen, A. Mulchandani, J. Wang, and L. Chen, "Amperometric microbial biosensor for direct determination of organophosphate pesticides using recombinant microorganism with surface expressed organophosphorus hydrolase", *Biosens. Bioelectron.*, vol. 16, no. 7-8, pp. 433-437, 2001.
- [10] R. D. Richins, I. Kaneva, A. Mulchandani, and W. Chen, "Biodegradation of organophosphorus pesticides by surface-expressed organophosphorus hydrolase", *Nat Biotech.*, vol. 15, no. 10, pp. 984-987, 1997.
- [11] D. G. Kang, S. S. Choi, and H. J. Cha, "Enhanced biodegradation of toxic organophosphate compounds using recombinant escherichia coli with sec pathway-driven periplasmic secretion of organophosphorus hydrolase", *Biotechnol. Prog.*, vol. 22, no. 2, pp. 406-410, 2006.
- [12] C. S. Kim, B. H. Choi, J. H. Seo, G. Lim, and H. J. Cha, "Mussel adhesive protein-based whole cell array biosensor for detection of organophosphorus compounds", *Biosens. Bioelectron.*, vol. 41, pp. 199-204, 2013.
- [13] L. E. de-Bashan and Y. Bashan, "Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects", *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 6, pp. 1611-1627, 2010.
- [14] I. Moreno-Garrido, "Microalgae immobilization: current techniques and uses", *Bioresour. Technol.*, vol. 99, no. 10, pp. 3949-3964, 2008.
- [15] J. K. Park and H. N. Chang, "Microencapsulation of microbial cells", *Biotechnol. Adv.*, vol. 18, no. 4, pp. 303-319, 2000.
- [16] S. H. Song, S. S. Choi, K. Park, and Y. J. Yoo, "Novel hybrid immobilization of microorganisms and its applications to biological denitrification", *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 37, no. 6, pp. 567-573, 2005.
- [17] K. Besteman, J. O. Lee, F. G. M. Wiertz, H. A. Heering, and C. Dekker, "Enzyme-coated carbon nanotubes as single-molecule biosensors", *Nano Lett.*, vol. 3, no. 6, pp. 727-730, 2003.
- [18] P. G. Collins, K. Bradley, M. Ishigami, and A. Zettl, "Extreme oxygen sensitivity of electronic properties of carbon nanotubes", *Science*, vol. 287, no. 5459, pp. 1801-1804, 2000.
- [19] K. Maehashi, T. Katsura, K. Kerman, Y. Takamura, K. Matsumoto, and E. Tamiya, "Label-free protein biosensor based on aptamer-modified carbon nanotube field-effect transistors", *Anal. Chem.*, vol. 79, no. 2, pp. 782-787, 2007.
- [20] J. Kong, N. R. Franklin, C. Zhou, M. G. Chapline, S. Peng, K. Cho, and H. Dai, "Nanotube molecular wires as chemical sensors", *Science*, vol. 287, no. 5453, pp. 622-625, 2000.
- [21] H. M. So, K. Won, Y. H. Kim, B. K. Kim, B. H. Ryu, P. S. Na, H. Kim, and J. O. Lee, "Single-walled carbon nanotube biosensors using aptamers as molecular recognition elements", *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 34, pp. 11906-11907, 2005.
- [22] Q. Cao and J. A. Rogers, "Ultrathin films of single-walled carbon nanotubes for electronics and sensors: A review of fundamental and applied aspects", *Adv. Mater.*, vol. 21, no. 1, pp. 29-53, 2009.
- [23] H. R. Byon and H. C. Choi, "Network single-walled carbon nanotube-field effect transistors (SWNT-FETs) with increased Schottky contact area for highly sensitive biosensor applications", *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 7, pp. 2188-2189, 2006.
- [24] T. An, K. S. Kim, S. K. Hahn, and G. Lim, "Real-time, step-wise, electrical detection of protein molecules using dielectrophoretically aligned SWNT-film FET aptasensors", *Lab Chip*, vol. 10, no. 16, p. 2052, 2010.
- [25] C. Zhang, K. Khoshmanesh, A. Mitchell, and K. Kalantar-zadeh, "Dielectrophoresis for manipulation of micro/nano particles in microfluidic systems", *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 396, no. 1, pp. 401-420, 2009.
- [26] A. Sanchis, A. P. Brown, M. Sancho, G. Martnez, J. L. Sebastin, S. Muoz, and J. M. Miranda, "Dielectric characterization of bacterial cells using dielectrophoresis", *Bioelectromagnetics*, vol. 28, no. 5, pp. 393-401, 2007.
- [27] R. Zhou, P. Wang, and H.-C. Chang, "Bacteria capture, concentration and detection by alternating current dielectrophoresis and self-assembly of dispersed single-wall carbon nanotubes", *Electrophoresis*, vol. 27, no. 7, pp. 1376-1385, 2006.
- [28] B. H. Lapizco-Encinas, B. A. Simmons, E. B. Cummings, and Y. Fintschenko, "Dielectrophoretic concentration and separation of live and dead bacteria in an array of insulators", *Anal. Chem.*, vol. 76, no. 6, pp. 1571-1579, 2004.
- [29] R. S. Kuczenski, H.-C. Chang, and A. Revzin, "Dielectrophoretic microfluidic device for the continuous sorting of Escherichia coli from blood cells", *Biomicrofluidics*, vol. 5, no. 3, p. 032005, 2011.
- [30] P. Arumugam, H. Chen, A. Cassell, and J. Li, "Dielectrophoretic trapping of single bacteria at carbon nanofiber nanoelectrode arrays", *J. Phys. Chem. A*, vol. 111, no. 49, pp. 12772-12777, 2007.
- [31] J. Suehiro, N. Ikeda, A. Ohtsubo, and K. Imasaka, "Fabrication of bio/nano interfaces between biological cells and carbon nanotubes using dielectrophoresis", *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 5, no. 6, pp. 741-747, 2008.
- [32] M. Dimaki and P. Bggild, "Dielectrophoresis of carbon nanotubes using microelectrodes: a numerical study", *Nanotechnology*, vol. 15, no. 8, p. 1095, 2004.
- [33] J. Suehiro, G. Zhou, and M. Hara, "Fabrication of a carbon nanotube-based gas sensor using dielectrophoresis and its application for ammonia detection by impedance spectroscopy", *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 36, no. 21, pp. L109-L114, 2003.
- [34] P. Li and W. Xue, "Selective deposition and alignment of single-walled carbon nanotubes assisted by dielectrophoresis: From thin films to individual nanotubes", *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 5, no. 6, pp. 1072-1078, 2010.
- [35] I. Kim, T. An, and G. Lim, "Organophosphorus compounds detection using suspended SWNT films", *J. Sensor Sci. & Tech.*, vol. 22, no. 5, pp. 346-351, 2013.
- [36] I. Kim, T. An, W. Choi, C. S. Kim, H. J. Cha, and G. Lim, "Site-specific immobilization of microbes using carbon nanotubes and dielectrophoretic force for microfluidic

- applications”, *RSC Adv.*, 2013.
- [37] J. T. Cang-Rong and G. Pastorin, “The influence of carbon nanotubes on enzyme activity and structure: investigation of different immobilization procedures through enzyme kinetics and circular dichroism studies”, *Nanotechnology*, vol. 20, no. 25, p. 255102, 2009.
- [38] A. Magrez, S. Kasas, V. Salicio, N. Pasquier, J. W. Seo, M. Celio, S. Catsicas, B. Schwaller, and L. Forró, “Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials”, *Nano Lett.*, vol. 6, no. 6, pp. 1121-1125, 2006.
- [39] N. A. Kotov, J. O. Winter, I. P. Clements, E. Jan, B. P. Timko, S. Campidelli, S. Pathak, A. Mazzatenta, C. M. Lieber, M. Prato, R. V. Bellamkonda, G. A. Silva, N. W. S. Kam, F. Patolsky, and L. Ballerini, “Nanomaterials for neural interfaces”, *Adv. Mater.*, vol. 21, no. 40, pp. 3970-4004, 2009.
- [40] S. K. Jha, R. Chand, D. Han, Y. C. Jang, G.-S. Ra, J. S. Kim, B. H. Nahm, and Y. S. Kim, “An integrated PCR microfluidic chip incorporating aseptic electrochemical cell lysis and capillary electrophoresis amperometric DNA detection for rapid and quantitative genetic analysis”, *Lab. Chip*, vol. 12, no. 21, p. 4455, 2012.
- [41] T. An, I. Kim, and G. Lim, “Nitrophenol detection using suspended SWNT films for environmental monitoring”, in *Sensors, 2010 IEEE*, 2010, pp. 1514-1517.
- [42] N. Liu, X. Cai, Y. Lei, Q. Zhang, M. B. Chan-Park, C. Li, W. Chen, and A. Mulchandani, “Single-walled carbon nanotube based real-time organophosphate detector”, *Electroanalysis*, vol. 19, no. 5, pp. 616-619, 2007.