

БИОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ ПЛАТФОРМЫ НА ОСНОВЕ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ СИСТЕМ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ СОВРЕМЕННЫХ ПРОИЗВОДСТВ

Горох Г.Г., Захлебаева А.И., Песнякевич А.Г. (БГУИР, БГУ, г. Минск, Беларусь)
Тел.: +375 (17) 293-80-47; E-mail: gorokh@bsuir.by

Abstract: Structure of the biosensitive platform on the interdigital electrodes was developed. To improve the immobilization of the bacteria on electrodes the substrate surface was structured by nanoporous anodic alumina. Electrodes of bioplatfrom with 10 μm gaps were fabricated and tested. Responses on bacterium *Staphylococcus saprophyticus* concentrations were analyzed. It was found that increasing the number of bacteria on the interdigital electrodes leads to decrease of resistance at the terminals.

Keywords: biosensitive platform, biosensor, interdigital electrodes, bacteria detection, *Staphylococcus Saprophyticus*, nanoporous anodic alumina

Безопасность условий труда на предприятиях, в том числе машиностроительных, во многом связана с экологическими проблемами и необходимостью строгого контроля технологических процессов, загрязнения окружающей среды, своевременного обнаружения и предотвращения потенциальных заражений и распространением инфекций, особенно важно осуществлять постоянный контроль в ограниченных пространствах. Оперативный и непрерывный мониторинг окружающей среды в производстве обеспечивается химическими и биохимическими сенсорами. В биосенсорах биоактивный материал, обладающий способностью специфично взаимодействовать с определяемой субстанцией, иммобилизуется на поверхности преобразователя. При обнаружении и ликвидации микроорганизмов, представляющих угрозу для здоровья и жизни человека, первостепенное значение имеет их оперативное детектирование. Поэтому в настоящее время большое внимание уделяется разработке быстродействующих биочувствительных микросистем, а также улучшению их рабочих характеристик [1]. Широкое распространение получила конструкция биочувствительных платформ на основе встречно-штыревых электродов. Преимуществами таких систем являются их малые габариты и высокая скорость обработки сигнала. Массив встречно-штыревых электродов минимально подвержен воздействию со стороны окружающей среды, а детектирование микроорганизмов биосенсорами на его основе не требует инкубационной обработки проб. Дополнительная модификация электродов позволяет улучшить рабочие характеристики таких структур и придать им специфические свойства. Поскольку иммобилизация микроорганизмов осуществляется за счет физико-химических взаимодействий между биологическими компонентами и сорбирующей поверхностью биосенсора, увеличение активной площади сорбирующей поверхности приводит к увеличению количества свободных физико-химических связей и, соответственно, к увеличению чувствительности биосенсоров. Одним из перспективных методов увеличения площади сорбирующей поверхности биосенсора является формирование биочувствительных микросистем на основе наноструктурированных материалов, в частности, нанопористого анодного оксида алюминия (АОА), структурными характеристиками которого (величина удельной поверхности, диаметр пор и оксидных ячеек, толщина пленки) можно управлять в широких пределах. Применение наноструктурированного АОА позволит уменьшить время отклика, увеличить чувствительность сенсоров и минимизировать влияние влажной среды.

Схематическое изображение встречно-штыревых платформы показано на рис. 1а, параметры которой определяются длиной (L) и шириной (W) электродов,

зазором (S) между электродами и их количеством (N). Важными факторами, определяющими чувствительность биосенсора на встречно-штыревых электродах, является соотношение сигнал-шум, а также величина зазора между электродами. Величина сигнала сенсора пропорциональна площади поверхности всего массива электродов, а фоновый шум пропорционален их площади. Близость электродов друг к другу приводит к увеличению чувствительности и уменьшению времени отклика сенсора [2].

В таких биосенсорах чувствительный слой является резистором между двумя электродами, а откликом является изменение их сопротивления [3]. Ток протекает от одного электрода к другому через разрыв между ними, таким образом, эквивалентную схему измерения импеданса электродов можно представить в виде двух параллельных ветвей: ветви емкости и ветви импеданса. При отсутствии на электродах бактерий, емкость среды доминирует над общим сопротивлением, тогда как клетки бактерий, иммобилизированные на поверхности биосенсора, добавляют различные элементы импеданса к сопротивлению ветви [4]. Эквивалентная схема измерения импеданса резистивного биосенсора при отсутствии бактерий и с иммобилизованными на поверхности бактериями представлена на рис. 1б.

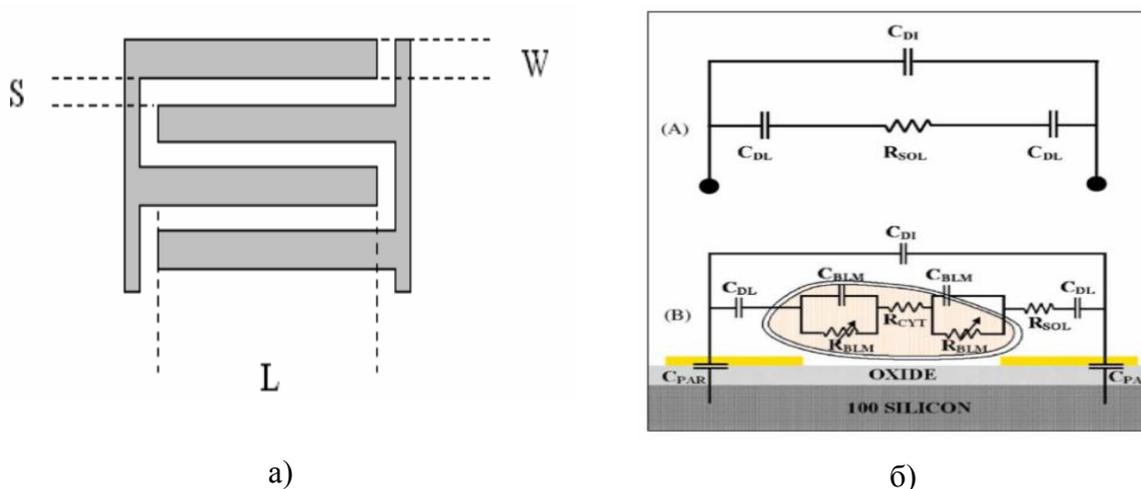


Рис. 1. Конструкция встречно-штыревых электродов биосенсора (а), эквивалентная схема измерения импеданса резистивного биосенсора без иммобилизованных (вверху) и с иммобилизованными (внизу) на поверхности бактериями (б)

В представленной на рис. 1б схеме C_{DL} – емкость двойного слоя между электродом и электролитом, C_{DI} – диэлектрическая емкость электролита, R_{SOL} – сопротивление раствора. Эквивалентная схема для иммобилизованной на поверхности сенсора бактерии включает в себя сопротивление бактерии, которое состоит из сопротивления цитоплазмы R_{CYT} и сопротивления мембраны клетки R_{BLM} . Также цепь включает в себя емкость клеточной мембраны C_{BLM} и паразитную емкость C_{PAR} , возникающую на границе раздела между электродами и кремниевой подложкой.

Были отработаны методики получения пористых слоев из АОА с различным структурированием поверхности и разработан технологический маршрут формирования наноструктурированных резистивных встречно-штыревых биочувствительных микросистем. На исходных кремниевых пластинах создавали слой SiO_2 , необходимый для пассивации электродов, на который напыляли слой алюминия. Методом двухстадийного анодирования Al формировали пленку АОА, на которую затем осаждали слой ванадия и алюминия. Электроды изготавливали плазмохимическим травлением биметаллического слоя V/Al . Последовательность технологических

операций изготовления резистивных встречно-штыревых систем схематично представлена на рис. 2.

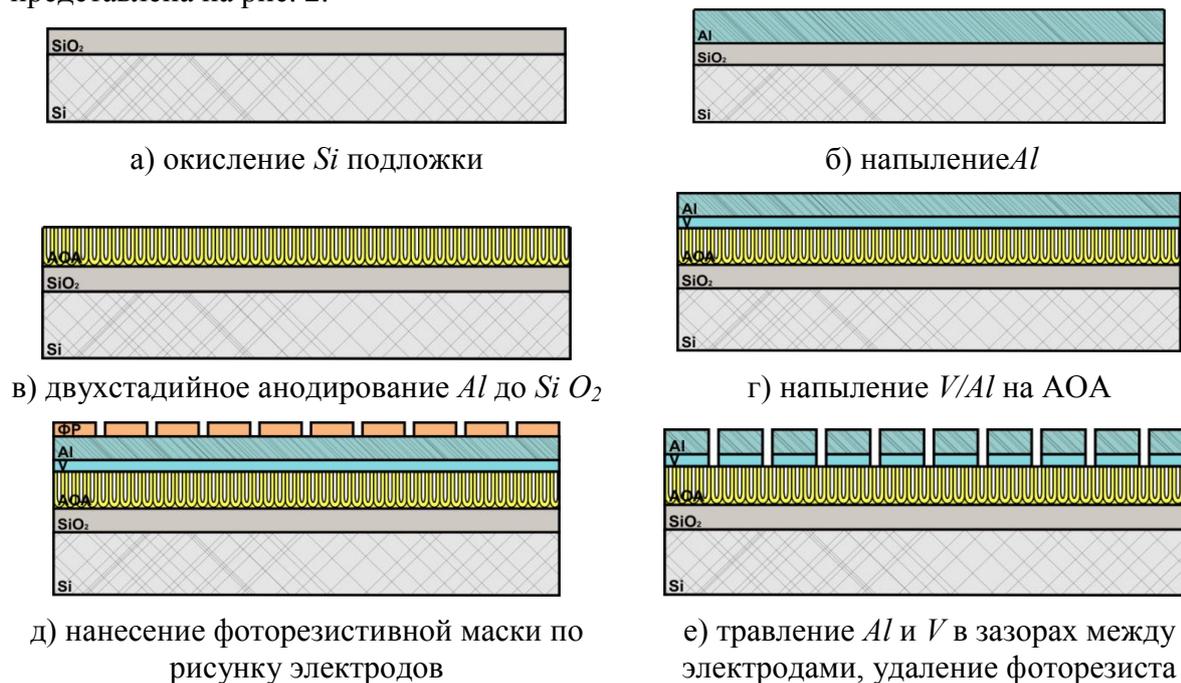


Рис. 2. Технологический маршрут формирования резистивных микросистем

По разработанному маршруту были изготовлены резистивные микросистемы, представляющие собой кремниевые подложки $3 \times 8 \text{ мм}^2$ с Al контактами $2,7 \times 1,75 \text{ мм}$ и массивом встречно-штыревых V/Al электродов. Оптимальные конструктивные размеры электродов, обеспечивающие максимальное соотношение сигнал-шум, были определены из соотношений, полученных в работе [5], связывающих ширину электрода (W), ширину зазора между электродами (S), их длину (L) и количество (N) и составили $W = 50 \text{ мкм}$, $S = 10 \text{ мкм}$, $L = 4000 \text{ мкм}$, $N = 40$ шт.

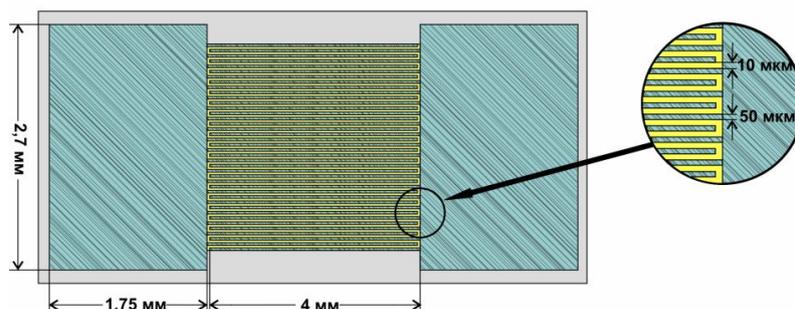


Рис. 3. Схематическое изображение кристалла с биосенсором резистивного типа

Были исследованы отклики изготовленных структур на бактерии *Staphylococcus Saprophyticus*. Для иммобилизации бактерий на поверхности структур образцы помещали в физиологические растворы, содержащие *Staphylococcus Saprophyticus* в количестве от $1,72 \times 10^3$ до $1,72 \times 10^8$ КОЕ/мл, и выдерживали в течение 30 мин. После извлечения образцов из растворов проводили измерение их сопротивлений. Измерения сопротивлений повторяли спустя 15 мин, 30 мин, 60 мин, 3,5 часа и на следующие сутки. Микрофотографии поверхности встречно-штыревых электродов с иммобилизованными бактериями приведены на рис. 4.

Величину отклика тестовых структур определяли как разность между сопротивлением структур с иммобилизованными на поверхности бактериями (R_b) и

исходным (т.е. при отсутствии бактерий на поверхности)сопротивлением структур (R_0): $\Delta R = R_b - R_0$. Относительное изменение сопротивления структур определяли как отношение ΔR и R_0 : $(R_b - R_0)/R_0$. Отклики структур на различные количества бактерий *Staphylococcus Saprophyticus* приведены на рис. 5.

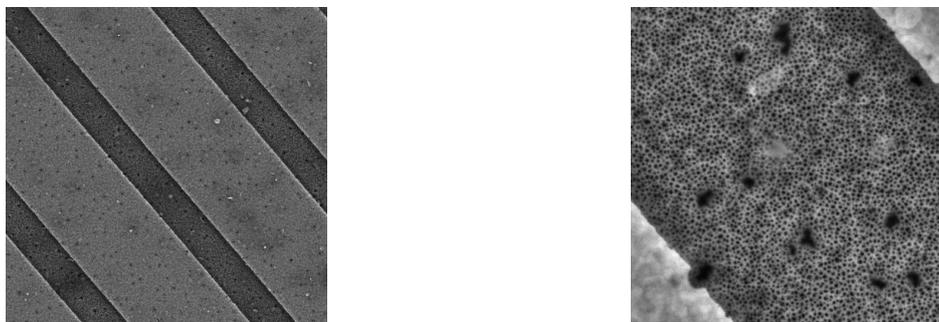


Рис. 4. Микрофотографии поверхности встречно-штыревых электродов с иммобилизованными бактериями *Staphylococcus Saprophyticus*

Зарегистрировано уменьшение сопротивления на клеммах гребенок с ростом количества бактерий, иммобилизованных на их поверхности. Зависимость проявлялась по мере высыхания образцов, что связано с испарением влаги. Создание биосенсорной платформы с максимально большим количеством свободных химических связей путем формирования на ее поверхности наноструктурированных слоев материалов из нанопористого анодного оксида алюминия позволило обеспечить высокую избирательность и чувствительность измерительных систем для определения количества микроорганизмов при минимальных затратах времени.

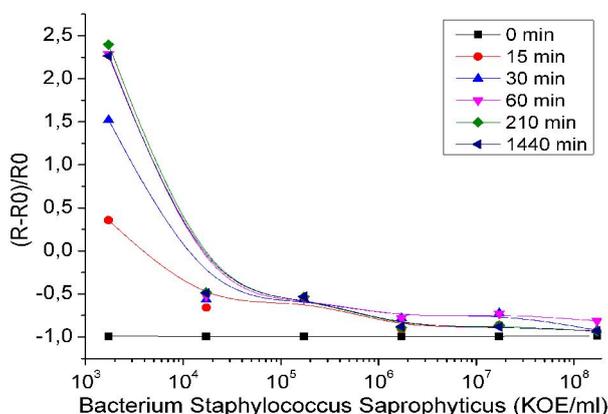


Рис. 5. Отклики встречно-штыревой структуры на *Staphylococcus Saprophyticus*

Список литературы: 1. Власов А.И., Денисов А.А., Елсуков К.А. Бионаноинженерия – М.: МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2011. – 215 с. 2. Ederle J., Blachard S.M., Bronzino J. Introduction to biomedical engineering – Elsevier Academic Press, 2005. – 1141 p. 3. Wang H., Wu X., Dong P. et al. Electrochemical biosensor based on interdigitated electrodes for determination of thyroid stimulin ghormone // Int. J. Electrochem. Sci. –2014. –Vol. 9. –P. 12–21. 4. Змитрович Т.В., Захлебаева А.И., Горох Г.Г. и др. Биосенсор на основе платформы со встречно-штыревыми электродами // Наноструктуры в конденсированных средах: сборник научных статей–2014. –С. 320–327. 5. Radke S., Alcilja E. Design and fabrication of an impedimetric biosensor – IE Sens.– 2004. – 440 p.