

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. Ломоносова

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи



Андреев Егор Андреевич

**ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ СЕНСОР
НА ОСНОВЕ ПОЛИ(3-АМИНОФЕНИЛБОРНОЙ КИСЛОТЫ)
ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ**

03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
д.х.н., профессор Карякин А.А.

Москва – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
<i>Глава 1. Применение борных кислот для биомиметики</i>	<i>13</i>
1.1. Фенилборная кислота	14
<i>Глава 2. Проводящий полианилин</i>	<i>20</i>
2.1. Структура, синтез и свойства проводящего полианилина	20
2.2. Боронат-замещенный полианилин	25
<i>Глава 3. Спектроскопия электрохимического импеданса</i>	<i>27</i>
3.1. Общие сведения	27
3.2. Эквивалентная схема для случая проводящих полимеров	30
<i>Глава 4. Обнаружение микроорганизмов</i>	<i>33</i>
4.1. Обнаружение при помощи биораспознающих элементов	33
4.2. Электрохимические системы без биораспознающих элементов.....	37
4.3. Методы обнаружения микроскопических грибов	40
4.4. Санитарно-эпидемиологические нормативы по предельно допустимым концентрациям плесневых грибов в воздухе	43
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	47
<i>Глава 5. Материалы, оборудование и методы</i>	<i>47</i>
5.1. Материалы.....	47
5.2. Оборудование	48
5.3. Методы.....	50
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	57
<i>Глава 6. Электрохимическое осаждение проводящих полимеров</i>	<i>57</i>
6.1. Потенциодинамическое осаждение полимеров анилина, 3-АФБК и 3-ТБК... 57	57
6.2. Электроактивность поли(3-АФБК), осажденной в потенциодинамическом режиме 63	63
6.3. Выбор оптимального числа циклов электроосаждения поли(3-АФБК)	64

6.4.	Гальваностатическое осаждение полианилина и поли(3-АФБК).....	65
6.5.	Модификация взаимопроникающих микроэлектродов поли(3-АФБК)	68
<i>Глава 7. Физико-химические основы взаимодействия соединений, содержащих 1,2- или 1,3-цис-диольные фрагменты, с поли(3-АФБК).....</i>		72
7.1.	Спектроскопия электрохимического импеданса проводящих полимеров	72
7.2.	Изменение сопротивления поли(3-АФБК) в результате специфических и неспецифических взаимодействий	75
7.3.	Оптимизация импедиметрического отклика в зависимости от числа циклов осаждения поли(3-АФБК)	79
7.4.	Определение $K_{набл}$ для взаимодействия глюкозы с поли(3-АФБК).....	80
7.5.	Влияние концентрации фторида в ростовом растворе на $K_{набл}$	83
7.6.	Зависимость $K_{набл}$ от времени гальваностатического осаждения	84
7.7.	Поведение $K_{набл}$ для взаимодействия различных веществ с поли(3-АФБК) ..	86
<i>Глава 8. Обнаружение микроорганизмов с использованием поли(3-АФБК)</i>		92
8.1.	Влияние глюкозы на сопротивление микросенсоров в жидкости и аэрозоле	92
8.2.	Исследование суспензии микромицетов <i>Penicillium chrysogenum</i>	95
8.3.	Обнаружение микромицетов в жидкости с помощью (микро)сенсоров	97
8.4.	Исследование биоаэрозоля, содержащего <i>Penicillium chrysogenum</i>	101
8.5.	Обнаружение микромицетов в аэрозоле при помощи микросенсоров	103
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....		107
ВЫВОДЫ.....		108
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ		110

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

3-АФБК – 3-аминофенилборная кислота или боронат-замещенный анилин

3-ТБК – 3-тиенилборная кислота

АТФ – аденозинтрифосфат

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КОЕ – колониеобразующая единица

ПДК – предельно допустимая концентрация

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СЭХИ – спектроскопия электрохимического импеданса

ХСЭ – хлоридсеребряный электрод

ЦВА – циклическая вольтамперограмма

K_a^B – константа кислотной диссоциации монозамещенной борной кислоты

K_a^D – константа кислотной диссоциации диол-содержащего соединения

$K_{набл}$ – наблюдаемая константа связывания вещества с монозамещенной борной кислотой

R_n – сопротивление полимера

ВВЕДЕНИЕ

Элементы биологического распознавания являются ключевыми компонентами большинства сенсорных систем. Биомолекулы в их составе специфически взаимодействуют с определяемыми веществами и обеспечивают тем самым высокую селективность сенсоров. Однако биомолекулы обладают низкой операционной стабильностью, высокой себестоимостью и требуют особых условий хранения. Кроме того, их применение в сенсорных системах часто сопряжено с использованием дополнительных реагентов и введением различных модификаций, например, каталитических или электроактивных меток. Это ограничивает практическое применение сенсоров из-за дополнительных стадий анализа и невозможности проводить длительный мониторинг.

Для увеличения операционной стабильности сенсоров применяют синтетические сенсорные материалы, обладающие достаточной селективностью и при этом низкой себестоимостью. Селективность таких материалов определяется специфическими взаимодействиями функциональных групп. Одним из примеров синтетических элементов распознавания являются материалы на основе фенилборной кислоты, способной образовывать устойчивые циклические эфиры с 1,2- и 1,3-*цис*-диольными фрагментами моносахаридов и гидроксикислот. Применение этого свойства для сенсорных приложений открывает путь к решению множества медицинских и биотехнологических задач: контроль биологически важных моносахаридов и их производных при различных болезнях (гликозурия, муковисцидоз, рак и др.), энантиомерная чистота синтетических лекарств, мониторинг процессов ферментации и пр.

Было показано, что фенилборная кислота способна специфически связываться с клеточной стенкой микроорганизмов, которая более чем на 60% состоит из олиго- и полисахаридов, содержащих большое количество 1,2- и 1,3-*цис*-диольных групп. Следовательно, сенсорные системы на основе фенилборной кислоты могут использоваться для микробиологических задач, например, контроля микробного заражения воздуха или жидких сред. Однако применение фенилборной кислоты в сенсорных системах сопряжено с модификациями чувствительного слоя или введением дополнительных реагентов. Основные методы обнаружения микробного заражения также имеют ограниченное практическое применение, так как предполагают дополнительные стадии предобработки или анализа, требуют наличия дорогостоящего оборудования, труднодоступных расходных материалов.

Для устранения указанных ограничений фенилборную кислоту можно включить в цепь проводящего полимера, например, полианилина, чувствительного к изменению свойств заместителей его основной цепи. Применение электрохимического анализа в таком случае позволит отказаться от дополнительных реагентов и использовать преимущества электрохимических методов: экспрессность, простота применения и несложное оборудование.

Несмотря на перспективность разработки электрохимических сенсоров на основе фенилборной кислоты, аналитически значимый сигнал на диольные фрагменты не был получен. Так, например, разработанный ранее потенциометрический сенсор с использованием поли(аминофенилборной кислоты) демонстрирует максимальную величину отклика на 40 мМ глюкозы порядка 2 мВ. С учетом дрейфа базовой линии в несколько мВ, сенсор неприменим для анализа реальных объектов.

Итак, необходимо разработать электрохимический сенсор на основе фенилборной кислоты, обладающий селективностью к 1,2- и 1,3-*цис*-диольным группам, позволяющий проводить безреагентное экспрессное определение соединений, содержащих указанные фрагменты. Для демонстрации практической применимости сенсора требуется провести обнаружение микроорганизмов.

Цель исследования:

Создание безреагентного сенсора на основе боронат-замещенного проводящего полианилина, способного генерировать электрохимический сигнал в результате специфических взаимодействий с 1,2- или 1,3-*цис*-диольными фрагментами различных молекул; а также в обнаружении микроорганизмов с помощью разрабатываемого сенсора в водной и воздушной среде.

Задачи исследования:

- электрохимический синтез боронат-замещенного полианилина в оптимальных условиях для получения проводящего полимера, специфически взаимодействующего с веществами, содержащими 1,2- или 1,3-*цис*-диольные фрагменты;
- исследование изменений проводящих свойств боронат-замещенного полианилина при взаимодействии с соединениями, содержащими или не содержащими 1,2- или 1,3-*цис*-диольные фрагменты методом спектроскопии электрохимического импеданса;
- получение концентрационных и рН-зависимостей сопротивления полимера при взаимодействии с различными соединениями с целью выявления физико-химических закономерностей, служащих причиной изменения свойств полимера при специфическом связывании;
- исследование изменений проводящих свойств боронат-замещенного полианилина в водной среде в присутствии микроорганизмов (на примере *Penicillium chrysogenum*);
- электрохимическое осаждение боронат-замещенного полианилина на взаимопроникающие микроэлектроды для получения микросенсоров, способных функционировать по двухэлектродной схеме;

- исследование изменений свойств микросенсоров при связывании в жидкости и аэрозоле с соединением, содержащим 1,2- или 1,3-*цис*-диольные фрагменты, методом спектроскопии электрохимического импеданса;
- выявление изменений проводящих свойств микросенсоров в водной и воздушной среде в присутствии микроорганизмов (на примере *P. chrysogenum*), проведение обнаружения микроорганизмов.

Научная новизна

В результате электрополимеризации 3-аминофенилборной кислоты синтезирован боронат-замещенный проводящий полианилин. Возникновение «нуклеационной петли» на первых циклах вольтамперограммы в процессе роста и увеличение силы тока с числом циклов при максимальном анодном потенциале свидетельствуют о получении проводящего полимера.

Спектры импеданса синтезированной поли(3-аминофенилборной кислоты) были аппроксимированы эквивалентной схемой Рэндлса с диффузионным элементом. Относительные стандартные отклонения всех параметров не превышают нескольких процентов, что позволяет количественно охарактеризовать проводящие свойства полученного полимера. Впервые показано увеличение проводимости полимера, происходящее в результате специфического взаимодействия соединений, содержащих 1,2- или 1,3-*цис*-диольные фрагменты, с борнокислой группой поли(3-аминофенилборной кислоты). Предложенный механизм увеличения проводимости состоит в том, что в результате специфического взаимодействия диольного фрагмента с борнокислой группой образуется заряженный комплекс, приводящий к возникновению эффекта самодопирования.

Специфическое взаимодействие соединений с полимером является обратимым, что позволяет использовать поли(3-аминофенилборную кислоту) в качестве сенсорного материала. В случае соединений, не содержащих 1,2- или 1,3-*цис*-диольные фрагменты, а также в результате фоновых процессов сопротивление полимера возрастает, в то время как при специфических взаимодействиях сопротивление понижается. Таким образом, основное преимущество разработанного сенсорного материала состоит в возможности дифференцировать специфические и неспецифические взаимодействия.

Методом спектроскопии электрохимического импеданса продемонстрирован эффект понижения сопротивления поли(3-аминофенилборной кислоты), осажденной на торцевые электроды и взаимопроникающие микроэлектроды, в присутствии микроорганизмов. Данный эффект, возникающий в результате специфического взаимодействия с боронат-замещенным проводящим полианилином, является универсальным, поскольку проявляется как для отдельных молекул, содержащих 1,2- или 1,3-*цис*-диольные фрагменты, так и для целых микроорганизмов на примере плесневых грибов *Penicillium chrysogenum*.

Практическая и теоретическая значимость

Охарактеризованы проводящие свойства разработанного в работе материала – проводящей поли(3-аминофенилборной кислоты) – методом спектроскопии электрохимического импеданса.

Разработан сенсор на основе торцевых электродов, модифицированных поли(3-аминофенилборной кислотой), для определения содержания соединений, включающих в себя 1,2- или 1,3-*цис*-диольные фрагменты. Диапазоны определяемых содержаний (в мМ): для глюкозы – от 6 до 250, для галактозы – от 2 до 50, для сорбитола – от 0.02 до 0.34, для лактата – от 2 до 100. Пределы обнаружения: глюкозы – 3 мМ, лактата – 1 мМ, галактозы – 1 мМ, сорбитола – 0.01 мМ.

В отличие от большинства кондукто- и импедиметрических систем разработанный сенсор позволяет дифференцировать аналитический сигнал при специфических и неспецифических процессах.

Сенсор на основе поли(3-аминофенилборной кислоты) является безреагентным, что важно для практического применения.

Проведено обнаружение микроорганизмов в жидкой среде с помощью сенсора на основе торцевых электродов, модифицированных поли(3-аминофенилборной кислотой). Для функционирования сенсора в данной работе была сконструирована жидкостная электрохимическая ячейка с разделенными пространствами для рабочего и вспомогательного электродов и электрода сравнения. В качестве модельных микроорганизмов была использована культура микроскопических плесневых грибов *Penicillium chrysogenum*. Диапазон определяемых концентраций составил от 1200 до 26000 колониеобразующих единиц на мл (КОЕ/мл).

На основе взаимопроникающих микроэлектродов, модифицированных поли(3-аминофенилборной кислотой), разработан прототип микросенсора для обнаружения микроорганизмов. Прототип функционирует по двухэлектродной схеме без дополнительных внешних электродов. Микросенсор демонстрирует понижение сопротивления в присутствии соединения, содержащего 1,2- или 1,3-*цис*-диольные фрагменты (на примере глюкозы).

Микросенсор может применяться для обнаружения микроорганизмов как в водной среде, так и в воздушной среде, например, аэрозоле. Применимость микросенсоров продемонстрирована на примере обнаружения плесневых грибов *Penicillium chrysogenum*. Диапазон определяемых концентраций микроорганизмов составляет от 300 до 2100 КОЕ/мл для жидкости и от 200 до 800 КОЕ/м³ для аэрозоля. Микросенсор пригоден для обнаружения микроорганизмов, в том числе, в концентрациях, соответствующих гигиеническому нормативу на предельно допустимые концентрации плесневых грибов в атмосферном воздухе.

Методология и методы исследования

Данное исследование направлено на комплексное применение физико-химических методов для решения биотехнологических задач. Работа основывается на базе физико-химических знаний об электроактивных и проводящих свойствах полианилина и взаимодействиях 1,2- или 1,3-*цис*-диольных фрагментов с фенилборными кислотами. В работе применены современные методы электрохимического анализа (циклическая вольтамперометрия, хронопотенциометрия, спектроскопия электрохимического импеданса), оптическая микроскопия и сканирующая электронная микроскопия, микробиологические методы посева и культивирования микроорганизмов, а также методы математической статистики.

Положения, выносимые на защиту:

1. Получен сенсорный материал – проводящая поли(3-аминофенилборная кислота) – который способен специфически взаимодействовать с молекулами, содержащими 1,2- или 1,3-*цис*-диольные фрагменты, например, моносахаридами, полиолами и гидроксикислотами.
2. Методом спектроскопии электрохимического импеданса впервые показано увеличение проводимости полимера, возникающее в результате связывания с молекулами, содержащими 1,2- или 1,3-*цис*-диольные фрагменты. В случае неспецифических процессов (взаимодействие с соединениями, не содержащими диольные фрагменты) и фоновых процессов (деградация, дедопирование и пр.) проводимость понижается.
3. Исследованы физико-химические закономерности связывания сахаров, полиолов и гидроксикислот с разработанным сенсорным материалом. Показано, что увеличение проводимости поли(3-аминофенилборной кислоты) действительно является результатом специфического взаимодействия борнокислой группы полимера с соединениями, содержащими 1,2- или 1,3-*цис*-диольные фрагменты.
4. Показана применимость сенсора на основе торцевого электрода, модифицированного поли(3-аминофенилборной кислотой), для обнаружения микроорганизмов в жидкости на примере плесневых грибов *Penicillium chrysogenum*.
5. Создан микросенсор на основе взаимопроникающих микроэлектродов, модифицированных поли(3-аминофенилборной кислотой). Микросенсор демонстрирует эффект увеличения проводимости при специфическом связывании с соединением, содержащим 1,2- или 1,3-*цис*-диольные фрагменты (на примере глюкозы), в жидкости и в составе аэрозоля.
6. Показана применимость микросенсора для экспрессного обнаружения микроорганизмов на примере плесневых грибов *Penicillium chrysogenum* в жидкости и в потоке аэрозоля. Разработанный микросенсор пригоден для обнаружения микроорганизмов, в том числе, в

концентрациях, соответствующих гигиеническому нормативу на предельные допустимые концентрации плесневых грибов в атмосферном воздухе населенных мест.

Достоверность результатов и апробация работы

Достоверность полученных результатов подтверждена соответствующими статистическими характеристиками воспроизводимости экспериментальных данных и независимыми методами анализа. Результаты работы согласуются с известными теоретическими и практическими знаниями по теме диссертации, полученными другими группами исследователей с помощью альтернативных физико-химических методов.

Основные результаты работы опубликованы в 3 научных журналах из списка ВАК РФ:

1. Andreyev E.A., Komkova M.A., Nikitina V.N., Zaryanov N.V., Voronin O.G., Karyakina E.E., Yatsimirsky A.K., Karyakin A.A. Reagentless polyol detection by conductivity increase in course of self-doping of boronate-substituted polyaniline // *Analytical Chemistry*. — 2014. — V. 86, № 23. — P. 11690–11695
2. Komkova M.A., Andreyev E.A., Nikitina V.N., Krupenin V.A., Presnov D.E., Karyakina E.E., Yatsimirsky A.K., Karyakin A.A. Novel reagentless label-free detection principle for affinity interactions resulted in conductivity increase of conducting polymer // *Electroanalysis*. — 2015. — V. 27, № 9. — P. 2055–2062
3. Андреев Е.А., Комкова М.А., Крупенин В.А., Преснов Д.Е., Карякин А.А. Электрохимическое детектирование *Penicillium chrysogenum* на основе повышения проводимости полиаминофенилборной кислоты // *Электрохимия*. — 2017. — Т. 53, № 1. — С. 103–107 [Andreev E.A., Komkova M.A., Krupenin V.A., Presnov D.E., Karyakin A.A. Electrochemical Detection of *Penicillium chrysogenum* Based on Increasing Conductivity of Polyaminophenylboronic Acid // *Russian Journal of Electrochemistry* — 2017. — V. 53, № 1. — P. 92–96]

Результаты представлены на 9 российских и международных научных конференциях:

1. Андреев Е.А., Комкова М.А., Воронин О.Г., Карякин А.А. Повышение проводимости поли-3-аминофенилбороновой кислоты как результат комплексообразования с сахарами // Шестая Всероссийская Каргинская Конференция «Полимеры — 2014». Сборник тезисов. Москва, Россия — 2014. — Т. 2, Ч. 2 — С. 504
2. Andreev E.A., Komkova M.A., Nikitina V.N., Kotchetkov I.R., Voronin O.G., Karyakin A.A., Yatsimirsky A.K. Increase of Conductivity of Boronic Acid Substitued Polyaniline-Based Sensor upon Complexation with Polyols // 65th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry. Lausanne, Switzerland — 2014. — V. 1 — P. 1861
3. Egor Andreyev, Maria Komkova, Vita Nikitina, Arkady Karyakin. Electroanalytical system for microorganism detection in aerosol based on boronate-substitued polyaniline-modified

- interdigitated microelectrodes // International Conference "Biocatalysis-2015: Fundamentals and Applications", Moscow region, Avantel Club Istra. — 2015. — P. 71
4. Andreev E.A., Komkova M.A., Nikitina V.N., Karyakin A.A. Reagentless microorganism detection principle based on substituted polyaniline conductivity increase upon specific binding // 10th International Frumkin Symposium on Electrochemistry. Abstracts. Moscow, Russia — 2015. — P. 241
 5. Чухнина А.Б., Андреев Е.А., Комкова М.А. Создание новых сенсорных материалов на основе 3-аминофенил- и 3-тиенилборных кислот // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2016». Секция «Инновации в химии: достижения и перспективы». / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов. [Электронный ресурс] — М.: МАКС Пресс, 2016. — С. 43
 6. Андреев Е.А., Комкова М.А., Карякин А.А. Увеличение проводимости боронат-замещенного полианилина в присутствии *Penicillium chrysogenum* как основа создания безреагентного сенсора для детекции микроорганизмов // IX Всероссийская конференция по электрохимическим методам анализа с международным участием и молодежной научной школой "ЭМА 2016". Тезисы докладов. Ленева – Екатеринбург, Россия. — 2016. — С. 77
 7. Andreev E.A., Komkova M.A., Karyakin A.A. Electrochemical Detection of *Penicillium chrysogenum* by Conductivity Increase of Boronate-Substituted Polyaniline // 67th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry. Abstracts. The Hague, The Netherlands. — 2016. — P. 652
 8. Андреев Е.А., Комкова М.А., Карякин А.А. Новый принцип безреагентной регистрации аффинных взаимодействий на основе повышения проводимости проводящего полимера // Научные труды V Съезда физиологов СНГ, V Съезда Биохимиков России, Конференции ADFLIM. Спецвыпуск Acta naturae. Сочи – Дагомыс, Россия — 2016. — Т. 2. — С. 130
 9. Андреев Е.А., Комкова М.А., Карякин А.А. Детектирование микроорганизмов с использованием имитации биологической аффинности на основе боронат-замещенного проводящего полианилина // Материалы IX Международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва, Россия — 2017. — Т. 2. — С. 368
- По результатам диссертационной работы подано 2 заявки на патент РФ:
1. Андреев Е.А., Комкова М.А., Никитина В.Н., Зарянов Н.В., Карякина Е.Е., Карякин А.А. Способ изготовления сенсоров для определения концентрации сахаров и оксикислот. Заявка на изобретение №2016147032 от 30.11.2016 г.

2. Андреев Е.А., Комкова М.А., Никитина В.Н., Карякина Е.Е., Карякин А.А., Воронин О.Г., Преснов Д.Е., Крупенин В.А. Микросенсор для определения концентрации плесневых грибов на основе проводящей поли(3-аминофенилборной кислоты). Заявка на изобретение №2016148004 от 07.12.2016 г.

Вклад автора в представленную работу

Личный вклад автора заключается в анализе литературы по теме работы, постановке задач исследования, планировании, подготовке и проведении экспериментов, обработке и интерпретации полученных результатов, подготовке публикаций по теме диссертации и представлении работы на конференциях, а также формулировке защищаемых научных положений и выводов. Работа выполнена на химическом факультете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова во время обучения в очной аспирантуре кафедры химической энзимологии.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава 1. Применение борных кислот для биомиметики

Введенный в 1960-ые годы термин «биомиметика» обозначает научное направление, посвященное исследованиям и имитации природных систем и процессов [1, 2]. Биомиметика объединяет в себе различные области химии, физики, биологии и технических наук и направлена на создание различных материалов, искусственных систем и машин [3]. Идеи биомиметики широко применяются в регенеративной медицине, доставке лекарств, тканевой инженерии, сенсорных приложениях.

Элементы биологического распознавания, такие как антитела, рецепторы, ферменты, ДНК, обладают высокой селективностью, но в составе сенсоров демонстрируют низкую операционную стабильность, а кроме того высокую себестоимость и зачастую необходимость использования дополнительных реагентов. Подходы биомиметики направлены не только на прямое моделирование, но и на создание аналогичного подхода, который позволяет устранить недостатки с сохранением преимуществ сразу нескольких систем. Таким образом, например, можно моделировать специфические взаимодействия биораспознающих объектов с тем, чтобы создавать высокоэффективные искусственные рецепторы, сочетающие в себе высокую селективность и стабильность.

Селективность биораспознающих элементов обусловлена специфическими взаимодействиями определенных функциональных групп или целых фрагментов биомолекул. Для сенсорных приложений важно количественное описание селективности, такое, как, например, аффинность. Аффинность как тенденция одних молекул (лигандов) образовывать ассоциаты с другим типом молекул или полимеров (рецепторов) может быть охарактеризована набором химических или термодинамических параметров. Наиболее распространенной характеристикой является константа связывания или ассоциации, которая затем используется для вычисления свободной энергии связывания, энтальпии и энтропии связывания, а также кинетических констант и энергии активации процессов ассоциации и диссоциации.

Применение рецепторов для практических приложений в сенсорике требует количественного описания аффинности. Большинство сенсоров дают отклик на объемную концентрацию определяемого компонента. Однако чувствительные элементы, используемые в этих сенсорах (рефрактометрических, механоакустических, емкостных и др.), в сущности, дают информацию о поверхностной концентрации лигандов вблизи рецепторов. Таким образом, важным связующим звеном является градуировочная зависимость, определяющая взаимосвязь между объемной и поверхностной концентрацией аналита. Математическое описание этой

взаимосвязи предоставляет не только лучшее понимание процесса связывания, но также дает математический базис для интерполяции и экстраполяции данных градуировочной зависимости, что важно для аналитических приложений.

Другой важной причиной для количественного описания является взаимосвязь с задачами материаловедения. Количественная информация позволяет осуществить оптимальный выбор синтетических рецепторов для различных применений и предсказать пределы обнаружения и селективность для систем на базе этих рецепторов. Кроме того, полученные данные могут быть использованы в качестве входных данных для комбинаторной оптимизации и для открытия новых сенсорных материалов.

Одним из значимых примеров синтетических рецепторов являются борные кислоты и материалы на их основе, широко применяемые для детектирования биологически важных объектов, большая часть из которых принадлежит к классу углеводов [4, 5]. Углеводы, как известно, выполняют множество важных функций организма, начиная от метаболических процессов и заканчивая клеточным распознаванием. Содержание в углеводах большого количества гидроксидных групп, обладающих высокой энтальпией сольватации, приводит к значительному энергетическому барьеру для образования устойчивых комплексов с другими молекулами. Это является препятствием для синтетических рецепторов, преодолеть которое эффективно позволяют природные рецепторы лектины, использующие множественные нековалентные взаимодействия [6, 7]. Другой проблемой, влияющей на эффективность определения конкретного углевода, является структурное сходство сахаров, нарушаемое только конфигурацией отдельных стереоцентров, что делает их трудно различимыми для сенсоров. Следствием этих препятствий является относительно медленное развитие сенсоров на основе нековалентных взаимодействий [8]. Во избежание этих недостатков в практических приложениях в основном используют элементы биологического распознавания, такие как ферменты или лектины. Однако при использовании биообъектов возникают другие практические трудности, связанные с низкой операционной стабильностью, высокой себестоимостью и зависимостью от концентрации кислорода в системе. Устранить эти трудности возможно с помощью синтетических рецепторов на основе борных кислот, которые представляют собой перспективную альтернативу для определения сахаров и родственных соединений [9, 10].

1.1. Фенилборная кислота

Сенсорные материалы на основе фенилборной кислоты в качестве синтетических рецепторов применяются как отдельных молекул углеводов, так и для контролируемого захвата-высвобождения клеток [11], а также детектирования бактерий [12]. Фенилборные кислоты – соединения, представляющие собой монозамещенную арилборную кислоту R-

$B(OH)_2$ – часто применяются в качестве функциональных групп для сенсорных и иных материалов, имеющих сродство к углеводным фрагментам и другим соединениям, имеющим нуклеофильные группы или выступающие в качестве основания Льюиса или донора электронов [13]. Данное применение обусловлено уникальной электронной конфигурацией атома бора в борной кислоте. В исходном состоянии нейтральной формы борной кислоты sp^2 -гибридизованный атом бора имеет незавершенный внешний электронный уровень (6 валентных электронов – 3 собственных и 3 от ковалентно связанных соседних атомов) и поэтому имеет свободную p -орбиталь и обладает электроноакцепторными свойствами. Эта низкоэнергетическая орбиталь расположена ортогонально остальным трем заместителям при атоме бора, которые обладают тригональной планарной геометрией [14].

Обладея электроноакцепторными свойствами, атом бора может активно реагировать с основанием Льюиса, формируя устойчивую электронную конфигурацию октета. Благодаря этому свойству, борные кислоты способны обратимо связываться в устойчивые комплексы с простыми основаниями Льюиса: фторид-, гидроксид- и цианид-ионы, а также с 1,2- и 1,3-замещенными основаниями Льюиса, содержащими гидроксильные и карбоксильные группы [15]. Следствием этих уникальных свойств является применение борных кислот в качестве рецепторов для связывания с углеводами, α -гидроксикислотами, цианидом и фторидом. Дальнейшее рассмотрение борных кислот в качестве рецепторов будет ограничиваться только в ключе связывания с соединениями, содержащими диольные фрагменты, например, моносахаридами, полиолами и α -гидроксикислотами.

Отдельного рассмотрения в случае взаимодействий борных кислот с 1,2- и 1,3-*цис*-диольными фрагментами требует термин «селективность». В сенсорных приложениях важны как селективность связывания, так и селективность отклика [16]. Традиционно селективность достигается путем выбора подходящего рецептора, который термодинамически более предпочтительно связывается с целевой молекулой, нежели с другими потенциально также взаимодействующими с рецептором. В таком случае мы имеем дело с селективностью связывания или термодинамической селективностью. В то же время, существуют сенсоры, которые обладают селективностью в смысле проявления определенного отклика. При этом аффинность целевой молекулы к сенсорному материалу может быть не самой высокой среди интерферирующих соединений, однако взаимодействие «хозяин-гость» целевой молекулы создает уникальный отклик сенсорной системы, что приводит к селективности отклика. Тем самым, в ключе эффективности сенсора следует иметь в виду два типа селективности. Например, в случае проявления только селективности отклика, интерферирующие соединения будут давать отрицательный вклад в итоговый отклик из-за конкурентного связывания. Для

максимальной эффективности сенсорная система должна обладать обоими типами селективности.

Рассмотрим особенности комплексообразования фенолборной кислоты с диолом с точки зрения кислотно-основного равновесия. Кислотные свойства борной кислоты несколько отличаются от привычной кислотности Брэнстеда, заключающейся в ионизации путем высвобождения протона. В протонных растворителях кислотность борной кислоты обусловлена реакцией с молекулой растворителя с образованием анионного тетрагонального бороната и высвобождением протона (Рисунок 1).

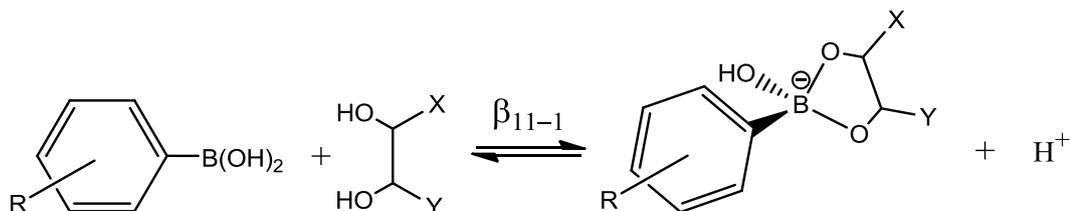


Рисунок 1. Схема взаимодействия фенолборной кислоты с 1,2-*цис*-диолом.

В действительности, депротонированию гидроксильной группы борной кислоты соответствует более высокое значение pK_a , чем для реакции взаимодействия с молекулой воды или спирта с образованием отрицательно заряженного бороната, и протекание такого процесса затруднительно, особенно после образования анионного комплекса. Таким образом, кислотность борной кислоты сама по себе является следствием ее льюисовской кислотности. В апротонных растворителях борная кислота проявляет исключительно свойства кислоты Льюиса. Она может реагировать с различными основаниями Льюиса, содержащими гидроксидные группы, равно как и с фторид- и цианид-ионами. В ходе реакции борной кислоты с молекулами, содержащими диольные фрагменты, образуется соответствующий простой эфир, который также обладает кислотными свойствами из-за незавершенного электронного уровня атома бора. В среде протонных растворителей также происходит высвобождение протона и образование заряженной анионной формы борного эфира, как и в случае борной кислоты.

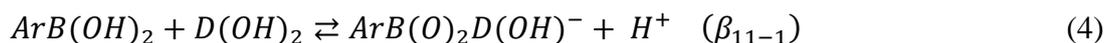
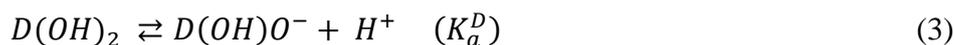
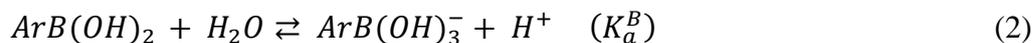
Рассмотрим взаимодействие фенолборной кислоты с диолом с образованием эфира в терминах традиционной « pqr » схемы (уравнение 1):



где A – нейтральная форма фенолборной кислоты, D – нейтральная форма диола. Символы p , q , r обозначают стехиометрические коэффициенты, при этом r может принимать как положительные, так и отрицательные значения, а также быть равным нулю [17].

Рассматривая образование эфира в широком диапазоне значений pH , необходимо принимать во внимание процессы депротонирования борной кислоты и диола, а также образование двух форм эфиров: нейтральную тригональную и анионную тетраэдрическую [18]. В разбавленных водных растворах доля тригональной формы незначительна [19], поэтому в

дальнейших рассуждениях пренебрежем этим процессом. Будут рассмотрены три одновременных процесса: кислотно-основного равновесия с участием фенолборной кислоты $ArB(OH)_2$ с константой кислотной диссоциации K_a^B (уравнение 2), диссоциация диола $D(OH)_2$ по первой ступени с константой диссоциации K_a^D (уравнение 3) и реакция образования эфира $ArB(O)_2D(OH)^-$, согласно приведенной выше схеме (Рисунок 1), с константой равновесия β_{11-1} (уравнение 4).



При рассмотрении взаимодействия фенолборной кислоты с диолом с учетом образования тетраэдрического комплекса $ArB(OH)_3^-$, можно записать выражение для $K_{тетр}$ связывания депротонированной кислоты с нейтральным диолом $D(OH)_2$ (уравнение 5):



Соответственно для $K_{тетр}$ получаем (уравнение 6):

$$K_{тетр} = \frac{\beta_{11-1}}{K_a^B} \quad \text{или} \quad \log K_{тетр} = \log \beta_{11-1} + pK_a^B \quad (6)$$

Важным экспериментальным параметром, отражающим степень протекания реакции образования эфира при данных условиях, является наблюдаемая константа связывания фенолборной кислоты с диолом ($K_{набл}$), определяемая через суммарные концентрации всех компонент (уравнение 7). Индекс Σ символизирует суммарные концентрации протонированной и депротонированной форм фенолборной кислоты и диола, а так как реакция протекает преимущественно по пути образования тетраэдрического эфирного комплекса [19], его концентрация совпадает с равновесной.

$$K_{набл} = \frac{[ArB(O)_2D(OH)^-]}{[(ArB(OH)_2)]_{\Sigma}[D(OH)_2]_{\Sigma}} \quad (7)$$

Комбинируя уравнение 7 с уравнениями баланса масс и выражениями для K_a^B и K_a^D , получаем выражение для $K_{набл}$ (уравнение 8):

$$K_{набл} = \frac{\beta_{11-1}[H^+]}{(K_a^D + [H^+])(K_a^B + [H^+])} \quad (8)$$

Таким образом, зависимость $K_{набл}$ от pH является кривой с экстремумом, положение которого отвечает pH наиболее эффективного связывания (уравнения 9 и 10).

$$pH_{опт} = \frac{(pK_a^D + pK_a^B)}{2} \quad (9)$$

$$K_{\text{набл}}^{\text{max}} = \frac{\beta_{11-1}/K_a^D}{\left(1 + \sqrt{K_a^B/K_a^D}\right)^2} \quad (10)$$

Следует отметить, что величина константы комплексообразования между остатком борной кислоты с диолом напрямую зависит от стереохимии последнего и числа 1,2- и 1,3-*цис*-диольных групп. Так, значения наблюдаемой константы связывания для фенилборной кислоты с различными соединениями при рН 7.4 изменяются следующим образом (приведены в М⁻¹): глюкоза – 4.6, галактоза – 15, сорбитол – 370 [20].

При нейтральных рН только 30% всей фенилборной кислоты образует комплекс с глюкозой [21]. Для аналитических приложений, где чаще всего содержание сахаров невелико и образование комплекса незначительно, важной задачей является увеличение сродства фенилборной кислоты к диолу. Одним из подходов увеличения констант связывания является введение электроноакцепторной группы в бензольное кольцо. Проводящий полианилин, основная цепь которого также обладает электроноакцепторными свойствами, также может применяться для этих целей.

Другим подходом для увеличения сродства борной кислоты к диол-содержащему соединению является имитация многоточечного связывания. Многоточечное связывание является одним из ключевых принципов молекулярного распознавания в биологических системах. Действительно, многоточечное связывание двух мультивалентных (например, фермент-субстрат) объектов часто обладает большей аффинностью, чем сумма отдельных моновалентных взаимодействий. Аналогичное явление известно из координационной химии как хелатный эффект: тридентатный лиганд образует более устойчивый комплекс с металлом, нежели три монодентатных лиганда.

Такой подход может быть легко реализован в случае борных кислот – при включении их в полимерную цепь образуется, в сущности, полидентатный лиганд, в котором множество соседних борнокислых групп способны связываться с молекулой сахара. Такой подход имитирует кластерный гликозидный эффект полипептидной цепи лектиновых рецепторов, имеющих множество центров связывания [22]. Таким образом, включение фенилборных кислот в полимерную цепь может повысить сродство борнокислой группы к диольным фрагментам.

Идея применения боронат-замещенного полианилина в сенсорной системе является перспективной с точки зрения биомиметики и электрохимической сенсорики. С одной стороны, фенилборные кислоты выступают в качестве синтетических рецепторов по отношению к диольным фрагментам углеводов. Однако известные системы для определения сахаров с использованием фенилборных кислот в качестве чувствительного элемента имеют различные ограничения. Это низкая чувствительность и стабильность, использование медиаторов,

невозможность дискриминировать полезный аналитический сигнал и неспецифический сигнал [23-26].

С другой стороны, образование заряженных комплексов с участием заместителей основной цепи – например, при связывании сахара с борнокислой группой – может повлиять на проводящие свойства полимера. Это дает возможность использовать в качестве отклика системы проводимость или сопротивление полимера. Кроме того, это позволит отказаться от использования медиаторов.

Таким образом, необходимо изучить условия синтеза проводящего борнат-функционализованного полианилина и его электроактивные свойства.

Глава 2. Проводящий полианилин

2.1. Структура, синтез и свойства проводящего полианилина

Проводящий полианилин – один из самых наиболее изученных и применяющихся на практике представителей класса проводящих полимеров. Эти материалы были открыты в 1977 году, когда ученые Хигер, МакДиармид и Ширакава получили проводящий полиацетилен путем химического допирования при помощи частичного окисления галогенами [27]. Это открытие послужило зарождением междисциплинарного направления под названием «синтетические металлы», которое образовалось на стыке химии, физики, материаловедения и биомедицинской инженерии. Дальнейшие исследования в области проводящих полимеров привели к открытию электрической проводимости других органических высокомолекулярных соединений, таких как полианилин, полипиррол, политиофен и др. За открытие и исследование электропроводящих полимеров упомянутые выше ученые в 2000 году были удостоены Нобелевской премии по химии. С точки зрения структуры полианилин – это органический электроактивный полимер, относящийся к классу гетерополиаренов, основная цепь которого состоит из строго чередующихся фенильных и амино- или иминогрупп.

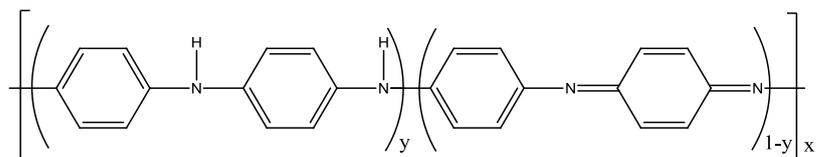


Рисунок 2. Общая формула полианилина.

Более чем 95% всей цепи полимера состоит из *para*-замещенных мономерных звеньев (обычно 1000 и более [28]), связанных по типу «голова-хвост» [29]. Полианилин при $\text{pH} > 1$ существует в трех основных формах: полностью восстановленная форма (при $y=1$, Рисунок 2) называется лейкоэмеральдин, промежуточная частично окисленная форма – эмеральдин, полностью окисленная (при $y=0$) – пернигранилин (Рисунок 3).



Рисунок 3. Формы полианилина в слабокислых рН.

Проводящий полианилин после синтеза обладает смешанной электронно-ионной проводимостью, что обуславливает интерес исследователей к нему как к сенсорному покрытию, поскольку изменение свойств полимера – проводимость, цвет, гидрофобность и гидрофильность и пр. – сопряжено с внешним физико-химическим воздействием среды.

Электронная проводимость полианилина обусловлена полисопряжением повторяющихся фрагментов, являющимся следствием перекрытия системы π -электронов бензольного кольца и электронов атомов азота. Проводимостью обладает только частично окисленная форма полианилина (эмеральдин), тогда как полностью восстановленная (лейкоэмеральдин) и полностью окисленная (пернигранилин) формы являются непроводящими [30]. Возникновение проводимости связывают с возникновением в запрещенной зоне дополнительных вакантных энергетических уровней для носителей заряда в результате процесса частичного окисления (p-допирование) или восстановления (n-допирование) материала. Для полианилина характерна дырочная проводимость, носителями заряда являются поляроны – квазичастицы со спином $1/2$, возникающие в результате образования катион-радикала – и биполярны – квазичастицы с нулевым спином, возникающие как объединение двух поляронов по аналогии с куперовской парой связанных электронов [31]. Полярон образуется в полианилине при частичном окислении атома азота и удалении одного электрона из неподеленной пары, а биполярон образуется при более глубоком окислении и представляет собой дикатион хиноидной структуры с локализацией заряда на мостиковых иминных атомах азота. Для полианилина характерно множество частично окисленных состояний эмеральдина, которые являются проводящими. С точки зрения области потенциалов, в которой полимер является проводящим, применяют термин «окно проводимости», эта область наглядно прослеживается на циклических вольтамперограммах полианилина в фоновом электролите, которые будут представлены ниже.

В настоящее время принята схема механизма полимеризации, изложенная далее. Начальной стадией индукционного периода считается образование в результате одноэлектронного процесса окисления катион-радикала анилина [32, 33], который вступает в реакцию электрофильного замещения с участием второй молекулы анилина с образованием димера типа «голова-хвост» – N-фенил-1,4-фенилендиамина или *para*-семидина (Рисунок 4). Далее происходит отщепление протонов и восстановление ароматичности структуры. Образовавшийся димер окисляется при меньшем потенциале [34], чем мономер, вступая в последующую стадию роста цепи.

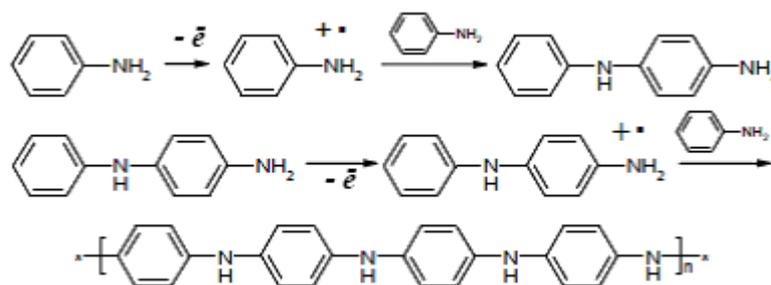


Рисунок 4. Схема процесса окислительной полимеризации анилина.

Окислительную полимеризацию анилина проводят двумя способами – химическим и электрохимическим. Последний способ обладает значительными преимуществами с точки зрения технологии производства покрытий. Во-первых, электрохимический способ не задействует дополнительные реагенты-окислители, что приводит к лучшей воспроизводимости роста и отсутствию побочных продуктов. Во-вторых, применение электрохимического оборудования позволяет легко осуществлять контроль процесса роста. И в-третьих, электрохимический способ позволяет селективно модифицировать поверхность электродов и микроэлектродов, поскольку электрополимеризация происходит только там, где протекает ток, не затрагивая при этом остальные поверхности.

Наиболее распространенными режимами электрохимического осаждения являются гальваностатический (при постоянной силе тока) и потенциодинамический (при циклическом изменении потенциала в заданном диапазоне с фиксированной скоростью развертки). Гальваностатический режим позволяет регулировать толщину покрытия, а также скорость роста, потенциодинамический режим делает возможным более информативный контроль электроактивности полимера непосредственно в процессе осаждения и позволяет избежать переокисления получающегося покрытия.

Потенциодинамическую электрополимеризацию анилина проводят в растворах кислот (серной, соляной, хлорной и др.) при pH обычно не выше 1 для увеличения растворимости мономера в водной среде и получения проводящей формы эмеральдина [35]. Часто электрополимеризацию полианилина проводят в серной кислоте, где наблюдается максимальная скорость осаждения, что связывают с экранирующим действием сульфат-аниона, необходимым для взаимодействия катион-радикалов в процессе роста цепи. Важнейшим параметром для такого режима осаждения является максимальный анодный потенциал развертки – он не должен превышать 0.8-0.9 В относительно хлоридсеребряного электрода сравнения (ХСЭ), чтобы обеспечить достаточную скорость образования катион-радикалов и при этом избежать переокисления образующегося полимера [36, 37], приводящего к потере проводимости. Выбор катодного потенциала, т.е. минимальной границы диапазона развертки

потенциалов, обусловлен обычно необходимостью контроля электроактивности в ходе полимеризации.

На циклических вольтамперограммах (ЦВА) торцевых стеклоуглеродных электродов наблюдаются особенности, характерные для образования проводящего полимера. На первых циклах вольтамперограмм наблюдается самопересечение кривых в области максимальных анодных потенциалов, называемое «нуклеационной петлей» (Рисунок 5). Причиной возникновения такого «самопересечения» на первых циклах вольтамперограммы является продолжение процессов окисления при обратной развертке потенциала – в сторону отрицательных значений. Образующиеся заряженные олигомеры далее реагируют с нейтральным мономером, окисляясь вблизи поверхности электрода при потенциале, меньшем, чем таковой для мономера, что в результате служит причиной анодных токов при обратной развертке потенциала [38]. Этому явлению способствует тот факт, что окисление нейтрального мономера является одной из скоростьлимитирующих стадий процесса окислительной полимеризации.

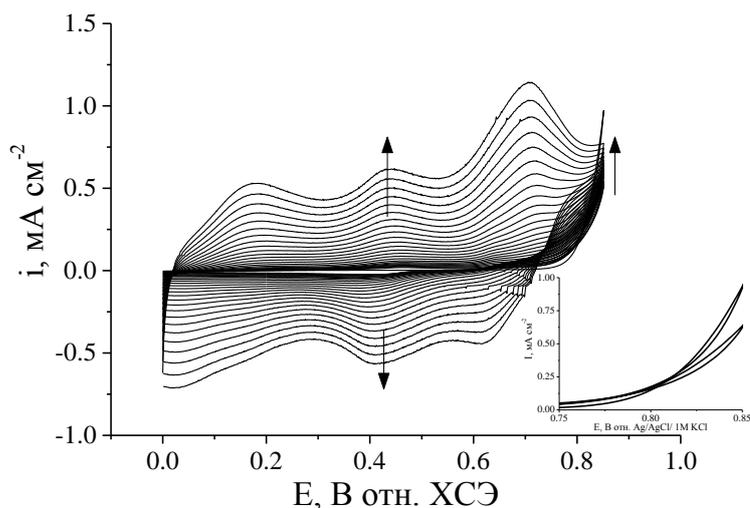


Рисунок 5. ЦВА в ходе электрополимеризации 0.1 М анилина в 0.1 М серной кислоте, скорость развертки 40 мВ/с. На вставке – «нуклеационные петли» на 1^{ом} и 2^{ом} циклах.

Кроме того, рост проводящего полимера сопровождается увеличением силы тока при максимальном анодном потенциале развертки с увеличением номера цикла. Это видно из последних циклов циклических вольтамперограмм. Действительно, при росте проводящей поверхности с течением времени плотность тока окисления практически не изменяется, что приводит к возрастанию силы тока.

Полианилин, полученный в различных режимах электрохимического осаждения, обладает сходными электроактивными свойствами. Более того, замещенный в *орто*- или *мета*-положении полимер также проявляет аналогичные свойства. В слабокислых водных растворах

на циклической вольтамперограмме полианилина наблюдается три пары пиков. Крайняя катодная (примерно 0.1 В) и анодная (примерно 0.6 В) пары пиков относятся к переходам эмеральдин/лейкоэмеральдин и пернигранилин/эмеральдин, соответственно (Рисунок 6). Между крайними парами пиков примерно при 0.4 В наблюдается пара расширенных пиков, которые, как считается, соответствуют дефектным структурам, возникающим при отклонении от линейной структуры полимера при электрофильном замещении, например, в *орто*- вместо *пара*-положения в ходе роста цепи [39].

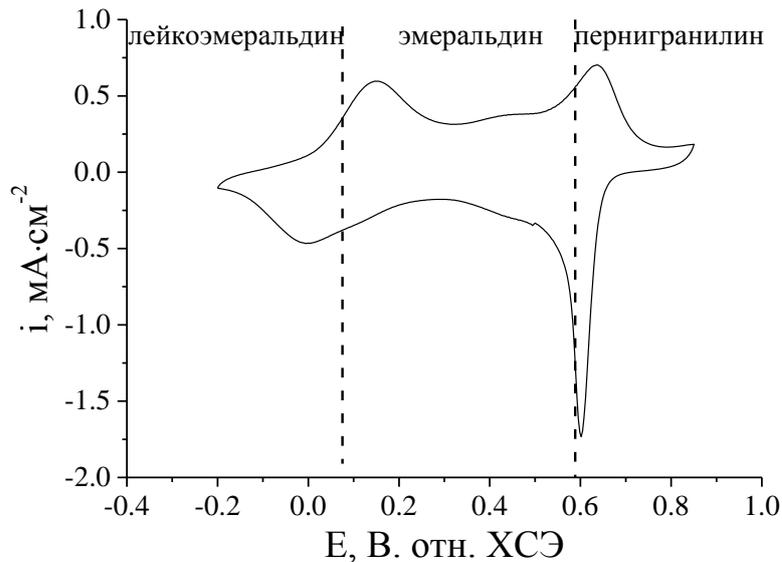


Рисунок 6. ЦВА полианилина в 0.1 М КСl в 0.1 М НСl, скорость развертки 40 мВ/с.

Для сенсорных приложений основной используемой формой полианилина является эмеральдин - единственная из трех форм, обладающая проводимостью. Потенциалы перехода между формами пернигранилина и эмеральдина зависят от рН (см. Рисунок 3). Это также означает, что область существования эмеральдина также зависит от рН, поскольку при повышении рН потенциал перехода эмеральдин/пернигранилин смещается, согласно уравнению Нернста, в область низких потенциалов со скоростью 120 мВ/рН. При этом потенциал перехода лейкоэмеральдин/эмеральдин не зависит от активности ионов гидроксония при рН > 1 [40]. Тем самым, при высоких рН пики обоих переходов становятся неразличимы, и полианилин перестает существовать в проводящей форме.

Проводимость полианилина зависит как от протонирования, так и от степени окисления полимера (т.е. соотношения окисленной и восстановленной групп, см. Рисунок 2). Для изменения проводимости процессов под действием рН или окислительно-восстановительных процессов применяют термин «допирование», т.е. изменение концентрации носителей заряда в материале. В результате протонирования или кислотного допирования основной цепи возникают носители заряда – полярон или биполярон, о которых было рассказано выше.

Однако для задач электрохимической сенсорики часто применяются нейтральные среды, в которых электроактивность полианилина быстро теряется [41]. В таких случаях применяют самодопированный полианилин. Термин «самодопированный», т.е. сохраняющий свою проводимость в отсутствие кислотного допирования, был впервые применен для замещенного полианилина, полученного введением сернокислой группы в качестве заместителя основной цепи [42]. В общем случае, отрицательно заряженные ионогенные группы способны поддерживать электроактивность полианилина вплоть до pH 9.0 [43].

Борнокислая группа может существовать в отрицательно заряженной форме и тем самым также является ионогенным заместителем, что позволяет ожидать от боронат-замещенного полианилина явления самодопирования.

2.2. Боронат-замещенный полианилин

Проводящие полимеры часто используются в качестве компонентов химических и биологических сенсорах – они обычно выполняют как функцию рецептора, так и трансдьюсера. Типичные примеры таких материалов – политиофены, полипирролы, полианилины и полифенилены. Эти полимеры без дополнительной модификации могут обладать сродством к определенным определяемым объектам, которые способны реагировать или каким-либо образом взаимодействовать с полимером, как например редокс-активные вещества или газообразные вещества, участвующие в кислотно-основном равновесии. Окислительно-восстановительные процессы и протонирование-депротонирование изменяют содержание переносчиков заряда в сопряженной цепи полимера, тогда как конформационные изменения влияют на планарность цепи, что приводит к изменению подвижности переносчиков заряда.

Материалы на основе боронат-замещенного полианилина были впервые синтезированы в виде сополимера 3-аминофенилборной кислоты (3-АФБК) с анилином группой Вольфбайса [44] и группой Фабре – в виде гомополимера [45]. Занимаясь разработкой анион-чувствительных полимеров, Фабре продемонстрировал неэффективность электрополимеризации 3-АФБК в отсутствие фторид-ионов, в противовес электрополимеризации фторид-замещенного.

Разработанный Фройндом потенциометрический сенсор для определения сахаридов с полимером аминофенилборной кислоты в качестве чувствительного слоя основан на изменении pK_a полимера в результате комплексообразования с аналитом [21]. Минусом разработанной системы является нестабильность базовой линии в отсутствие аналита. Более того, чувствительность сенсора невелика: потенциометрический отклик на 40 мМ глюкозы составляет примерно 2 мВ.

Другим электрохимическим инструментом при определении диолов с использованием боронат-замещенного полианилина является циклическая вольтамперометрия. В работе [46] авторы предлагают использовать в качестве аналитического сигнала изменение величины пика

редокс-активности полимера в составе композитной пленки в результате связывания с дофамином. Несмотря на принципиальную возможность использования потенциодинамических методов в контексте определения величины и положения пиков редокс-активности полимера при изменении концентрации аналита, циклирование полимера в нейтральных рН неизбежно приводит к его деградации. Таким образом, наблюдаемые авторами изменения ЦВА при добавлении наномолярных концентраций аналита, возможно, вызваны именно деградацией чувствительного слоя.

Изменение сопротивления сополимера 3-АФБК и Нафiona рассматривается в качестве аналитического сигнала в работе [47]. Взаимодействие остатка борной кислоты с сахарами и полиолами (сорбитол, маннитол, фруктоза) приводит к увеличению сопротивления пленки. Однако, к увеличению сопротивления полимера приводят также неспецифические и фоновые процессы, связанные с блокировкой поверхности, деградацией и дедопированием полимера. Таким образом, в ходе применения на практике невозможно определить причину возрастания сопротивления сенсорного материала, поскольку и отклик системы на связывание с сахарами и полиолами, и фоновые или неспецифические процессы приводят к увеличению сопротивления.

Как было показано в литературном обзоре, специфическое взаимодействие фенилборной кислоты с диолом приводит к образованию отрицательно заряженного соединения (Рисунок 1). Введение в структуру полимера дополнительного отрицательного заряда означает появление новых электронных уровней, что неизбежно должно повлиять на проводимость борнат-замещенного полианилина. Тем самым, для замещенного полианилина, содержащего борнокислую группу, необходимо провести исследования на предмет явления самодопирования. Следовательно, для изучения свойств замещенного полианилина целесообразно применить электрохимический метод, дающий информацию о проводимости или сопротивлении материала. Для этой цели одним из самых информативных, чувствительных и малодеструктивных методов является спектроскопия электрохимического импеданса.

Глава 3. Спектроскопия электрохимического импеданса

3.1. Общие сведения

Спектроскопия электрохимического импеданса (СЭХИ) – это наиболее чувствительный и наименее деструктивный метод исследования электрохимических систем, дающий исследователю информацию о поверхностных явлениях и об изменениях объемных свойств компонентов исследуемых систем.

Наиболее распространенной вариацией этого метода является применение к исследуемой системе синусоидальной развертки потенциала $E(t)$ малой амплитуды (обычно 5 мВ) с фиксированной угловой частотой колебаний ω и последующее измерение силы тока $I(t)$ с расчетом итогового импеданса и комплексного сопротивления системы Z (уравнение 11):

$$Z = \frac{E(t)}{I(t)} = \frac{E_M \sin(\omega t)}{I_M \sin(\omega t + \phi)} = \text{Re}(Z) + j \cdot \text{Im}(Z) \quad (11)$$

где E_M и I_M – амплитуды напряжения и тока, соответственно, ϕ – разность или сдвиг фаз между током и напряжением, $\text{Re}(Z)$ и $\text{Im}(Z)$ – действительная и мнимая часть импеданса. Импеданс представляют в виде комплексного числа, поскольку ток отличается от напряжения не только по величине амплитуды, но и по разности фаз ϕ при сравнении зависимостей тока и напряжения от времени. Такой тип отображения спектров импеданса, где изображается мнимая часть $\text{Im}(Z)$ от действительной части $\text{Re}(Z)$, называют координатами Найквиста (Рисунок 7).

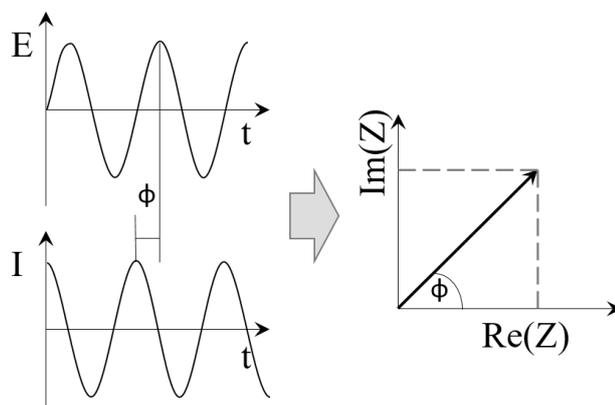


Рисунок 7. Сдвиг фаз между током и напряжением (слева) и представление импеданса в координатах Найквиста (справа).

Комплексное сопротивление или импеданс регистрируется для нескольких значений угловой частоты ω . Тем самым, экспериментальные данные представляют собой спектр для значений частоты, максимальные и минимальные значения которой обычно отличаются на несколько порядков. Благодаря такому подходу в пределах одного спектра одновременно получают информацию как о быстрых кинетических процессах, проявляющихся на высоких килогерцовых частотах, так и о медленных диффузионных процессах, проявляющихся при

развертке в десятки Гц и ниже. Таким образом, при помощи спектроскопии электрохимического импеданса возможно исследовать свойства различных поверхностей, мембран, а также обменные и диффузионные процессы. Для этих целей проводят анализ спектров импеданса на основании эквивалентных схем. Эквивалентная схема представляет собой, в сущности, обычную электрическую схему, состоящую, как правило, из резисторов и конденсаторов, моделирующих собой физико-химические процессы, происходящие в исследуемой системе. Иногда в схемах используются элементы, не имеющие аналогов в обычных электрических схемах, моделирующие электрокинетические процессы, диффузию, геометрию поверхностей и прочие особенности [48].

Применение эквивалентных схем подходит не только для феноменологического описания исследуемых систем, измерения могут быть использованы для аналитических задач. В таких случаях изменения параметров какого-либо элемента схемы приписывают изменениям состава системы. Иногда общий импеданс системы непосредственно используют как аналитический сигнал без применения эквивалентных схем и исследуют его изменения в зависимости от, например, концентрации. Это позволяет упростить процедуру анализа и проводить измерения при выбранном значении частоты или узком диапазоне частот, где относительные изменения импеданса наибольшие.

В спектроскопии электрохимического импеданса для описания поведения исследуемых систем предложено использовать четыре основных элемента: омическое сопротивление (резистор), емкость (конденсатор), элемент постоянной фазы и диффузионный импеданс.

Омическое сопротивление R возникает в спектре импеданса в тех случаях, когда переносчики заряда движутся через объем материала, тонкую пленку или границу раздела фаз. Идеальное омическое сопротивление не вносит разность фаз между током и напряжением при пропускании переменного тока, иными словами, величина импеданса Z_R не зависит от частоты осциллирующего сигнала и постоянна во всем диапазоне частот (уравнение 12):

$$Z_R = R \quad (12)$$

Емкость C возникает в системе в тех случаях, когда носители заряда претерпевают разделение на границах раздела фаз (например, двойной электрический слой) или мембранах или пленках. В простейшей модели элемент емкости представляет собой плоский конденсатор, где две «обкладки» разделены диэлектриком. В этом случае разность фаз между током и напряжением с течением времени остается постоянной и равной -90° , а величина импеданса Z_C зависит от частоты осцилляции ω следующим образом (уравнение 13):

$$Z_C = \frac{1}{j\omega C} \quad (13)$$

где j – мнимая единица, C – емкость. Отсюда, например, следует, что при низких частотах импеданс емкостного элемента становится значительной величиной.

Помимо этих двух базовых элементов в рассмотрение необходимо включить так называемые неоднородные элементы, используемые для описания импеданса реальных систем. Элемент постоянной фазы применяется в случае, когда поведение емкостного элемента отличается от идеального конденсатора – например, величина сдвига фаз отличается от -90° . Для такого поведения элемента применяется инженерный термин «конденсатор с утечкой». Физико-химические причины такого поведения могут иметь различные причины, однако часто это является следствием неоднородности поверхности (наличием микрошероховатости) или объемных характеристик исследуемого материала (например, содержание воды в полимерной мембране). У такого элемента основной характеристикой является параметр α , характеризующий степень частотного рассеивания: при $\alpha=1$ поведение соответствует идеальному конденсатору, уменьшение этого параметра приводит к проявлению свойств резистора и при $\alpha=0$ поведение элемента постоянной фазы соответствует идеальному резистору (уравнение 14):

$$Z_{CPE} = \frac{1}{A(j\omega)^\alpha} \quad (14)$$

где A – параметр, связанный с емкостью элемента постоянной фазы, j – мнимая единица.

Второй неоднородный элемент, часто используемый в эквивалентных схемах – импеданс Варбурга W . Этот элемент применяется при диффузионном контроле переноса зарядов в системе для случая идеальной линейной «полубесконечной» диффузии. Математически это означает, что изменение концентрации переносчиков заряда со временем подчиняется второму закону Фика для одномерного случая (уравнение 15):

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (15)$$

где D – коэффициент диффузии, C – концентрация электроактивных частиц.

Вклад элемента Варбурга в общий импеданс системы становится заметным на низких частотах и проявляется в виде прямой с наклоном 45° относительно оси абсцисс в координатах Найквиста.

Из данных аппроксимации спектров импеданса при помощи эквивалентной схемы можно вычислить коэффициент диффузии участвующих в процессе частиц. Однако, такое поведение спектра импеданса наблюдается только в случае, когда исследуемый синусоидальный режим диффузионного процесса никогда не достигает границы диффузионного слоя. В применении к реальным системам это означает, что выбранные частоты недостаточно низки для достижения гармонической диффузионной волной границы реального диффузионного слоя. Поскольку в

реальности толщина диффузионного слоя обычно имеет конечное значение, как, например, для ячейки с постоянным перемешиванием. Для таких случаев применяют элемент «конечной» диффузии с «пропускающими» граничными условиями, иными словами, когда возможен транспорт ионов через границу диффузионного слоя. В случае невозможности транспорта через границу исследуемого объекта с электролитом рассматривают конечную диффузию с отражающими граничными условиями W_0 . Последний случай применим для описания, например, проводящих полимеров. Выражение для элемента диффузионного импеданса с отражающими граничными условиями выглядит следующим образом (уравнение 16):

$$Z_{W_0} = \frac{R_0}{l\sqrt{\frac{j\omega}{D}}} \coth\left(l\sqrt{\frac{j\omega}{D}}\right) \quad (16)$$

где \coth – гиперболический котангенс, D – коэффициент диффузии, j – мнимая единица, l – толщина диффузионного слоя, R_0 (или W_0 -R) – диффузионное сопротивление при значении угловой частоты $\omega=0$. Поведение диффузионного импеданса с отражающими граничными условиями в координатах Найквиста представляет собой переход от прямого участка с углом наклона 45° к вертикальной прямой, характерной для идеального конденсатора, при уменьшении частоты осциллирующего сигнала.

Для учета неоднородности поверхности и несовершенства диффузионных процессов используется подход, аналогичный применению элемента постоянной фазы в случае диффузионного импеданса. Для этого вводится параметр неидеальности p (или W_0 -P) как показатель степени в выражении $(j\omega l^2/D)^p$, где l^2/D иногда вычисляют как отдельный параметр и обозначают как W_0 -T. Такой элемент называют обобщенным диффузионным элементом с отражающими граничными условиями, переход к обычному диффузионному элементу происходит при значении $p = 0.5$.

3.2. Эквивалентная схема для случая проводящих полимеров

Часто в спектроскопии импеданса встречается использование эквивалентной схемы Рэндлса и производных схем на ее основе (Рисунок 8). Основные элементы этой схемы – параллельный участок, возникающий из-за одновременного протекания процесса зарядки двойного электрического слоя, обычно представляемого конденсатором $C_{дс}$, и фарадеевского процесса Z_ϕ , и последовательно соединенного резистора R_Ω , соответствующего омическому сопротивлению раствора. Для случая проводящих полимеров фарадеевский импеданс представляют последовательно соединенным омическим сопротивлением полимера R_Π и диффузионным импедансом W_0 [49].

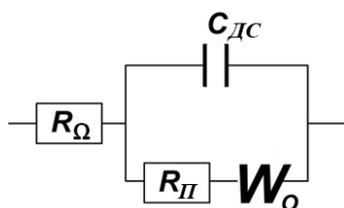


Рисунок 8. Эквивалентная схема для случая проводящих полимеров.

Сопротивление полимера характеризует протекание фарадеевского процесса на границе полимер | раствор. Спектр импеданса такой эквивалентной схемы в координатах Найквиста обладает характерными особенностями параллельной RC-схемы и диффузионного элемента: при высоких частотах наблюдается полукруг, переходящий при снижении частоты в прямую, асимптотически приближающуюся к вертикали (Рисунок 9).

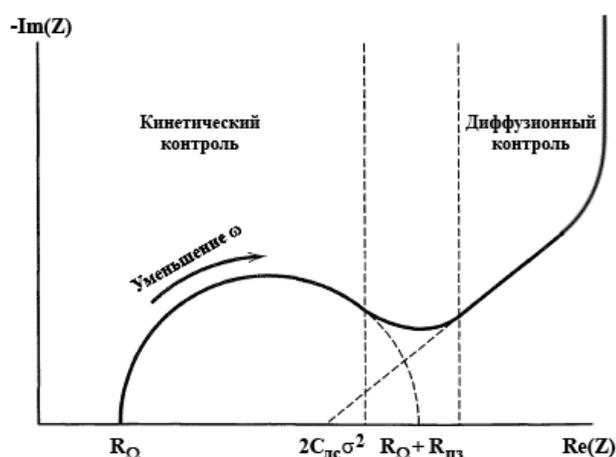


Рисунок 9. Общий вид спектра импеданса для эквивалентной схемы, приведенной выше.

Чтобы получить количественную оценку параметров исследуемой системы, необходимо провести аппроксимацию спектров выбранной эквивалентной схемой. Для аппроксимации спектров импеданса в настоящее время используют комплексный нелинейный метод наименьших квадратов. Суть метода, как и в случае обычного метода наименьших квадратов, заключается в минимизации суммы квадратов отклонений полученной зависимости от экспериментального набора данных. Поскольку спектр импеданса представляет собой набор точек в трехмерном пространстве (Рисунок 10) – действительная и мнимая часть импеданса, частота, – а эквивалентная схема – набор параметров соответствующих элементов, – задачу можно решить только с применением вычислительной мощности персональных компьютеров с подходящим программным обеспечением. Нелинейный метод требует начальных значений параметров и может иметь несколько локальных минимумов или, иными словами, несколько решений для набора параметров. Поэтому после проведения аппроксимации необходимо убедиться, что погрешности определения всех параметров имеют адекватные значения, которые обычно не превышают 10-15%.

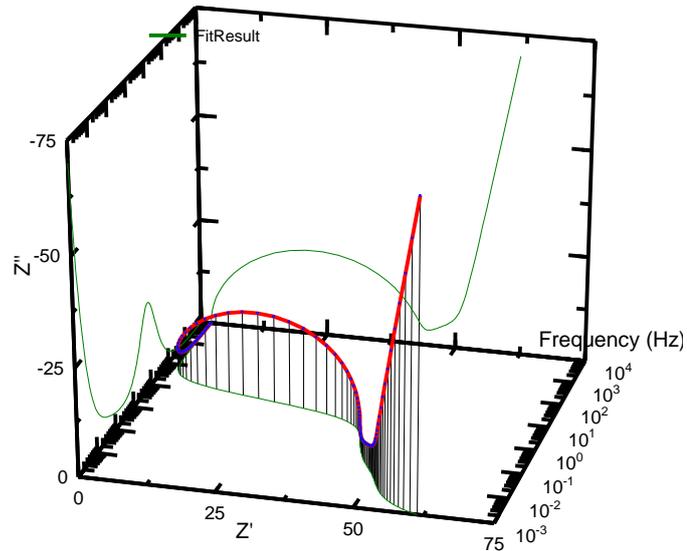


Рисунок 10. Трехмерный вид спектра импеданса в координатах действительная часть-мнимая часть-частота, сплошными линиями показаны проекции на соответствующие плоскости.

В ключе контроля проводящих свойств полимера ключевым параметром будет являться сопротивление полимера R_p , которое соответствует диаметру полукруга в координатах Найквиста. Поскольку проводящие полимеры являются полупроводниками и меняют свою проводимость под действием внешних факторов, значение параметра сопротивления полимера для борнат-функционализированного полианилина будет зависеть от того, связана ли группа борной кислоты с диолом или нет, и каково соотношение свободных и связанных заместителей.

Итак, спектроскопия электрохимического импеданса является чувствительным электрохимическим методом исследования свойств проводящих полимеров и в том числе проводящего полианилина. Борнат-замещенный полианилин при связывании с целевыми молекулами, содержащими диольные группы, образует заряженный комплекс (параграф 1.1), который может оказывать влияние на проводимость полимера, что говорит о возможности генерации электрохимического сигнала. Информативность спектроскопии электрохимического импеданса как нельзя лучше подходит для применения к материалам, созданным на основе подходов биомиметики, в ключе детального исследования связывания с исследуемыми объектами [50].

Глава 4. Обнаружение микроорганизмов

4.1. Обнаружение при помощи биораспознающих элементов

Традиционные методы определения бактерий и грибов, главным образом, основаны на принципах специфического связывания и предполагают использование биораспознающих элементов (антител, аптамеров и др.). В зависимости от типа аналитического сигнала среди разработанных сенсорных систем такого рода можно выделить амперометрические, потенциометрические, импедиметрические и кондуктометрические [51]. Селективность сенсорных систем для определения микроорганизмов практически полностью зависит от распознающего элемента. Так, например, моноклональные антитела могут взаимодействовать по механизму антиген-антитело с бактериями нескольких надтипов [52]. Лектины способны обратимо связываться с олиго- и полисахаридными структурами клеточных стенок бактерий и грибов [53]. Некоторые классы антибиотиков способны различать грамположительные и грамотрицательные бактерии по структурным особенностям их клеточных стенок [54]. Высокой аффинностью по отношению к микроорганизмам с учетом видовых особенностей обладают аптамеры (последовательности нуклеиновых кислот) [55]. Наиболее перспективные аналитические системы с использованием биораспознающих элементов перечислены ниже.

Примером электрохимического аптасенсора может служить импедиметрическая система определения жизнеспособных бактерий, описанная в работе [56] (Рисунок 11). Специфичные к *Salmonella typhimurium* последовательности олигонуклеотидов, полученные путем итерационного обогащения смеси олигонуклеотидов, согласно их способности связываться с мишенью (SELEX), наносились на поверхность модифицированного золотыми наночастицами печатного графитового электрода путем самосборки. В качестве медиатора выбрана редокс-пара $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$. Сенсор демонстрировал высокую селективность, в том числе, в присутствии других видов *Salmonella*, включая *S. enteritidis* и *S. choleraesuis*, и высокую чувствительность: 600 колониеобразующих единиц на 1 мл (КОЕ/мл) раствора или суспензии. Существенным недостатком системы является то, что в качестве аналитического сигнала взято увеличение сопротивления сенсорного материала. Помимо процесса специфического связывания, к увеличению сопротивления может приводить, например, неспецифическая адсорбция из раствора, блокирующая поверхность сенсора, деградация чувствительного слоя под действием внешних факторов, также приводящая к повышению сопротивления. Таким образом, на практике невозможно отличить отклик системы при связывании с микроорганизмами на фоне неспецифических процессов.

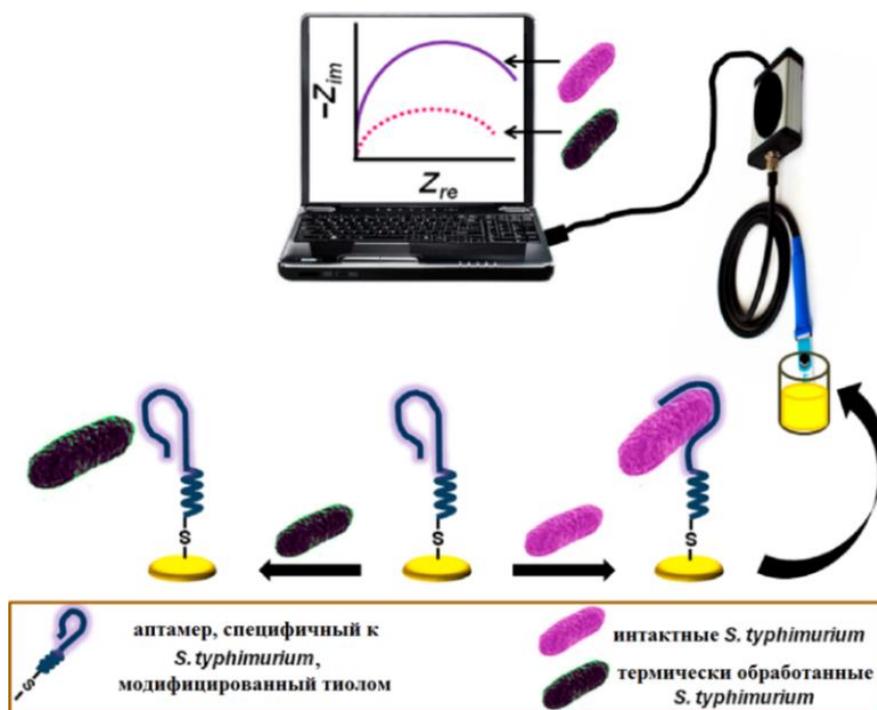


Рисунок 11. Схема импедиметрического аптасенсора для определения *S.typhimurium*

Интересным примером электроаналитической системы детекции бактерий выступает многослойная иммунологическая система для определения *E. coli*, *Salmonella*, *Campylobacter* [57], схема функционирования которой представлена ниже (Рисунок 12). Принцип ее действия состоит в определении методом инверсионной вольтамперометрии ионов металлов (Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+}), концентрация которых в растворе пропорциональна концентрации бактерий. Описанная электроаналитическая система позволяет достичь следующих пределов обнаружения: 400 клеток/мл – для *Salmonella*, 400 клеток/мл – для *Campylobacter*, 800 клеток/мл – для *E. coli*, линейный диапазон определяемых концентраций – $1 \cdot 10^3$ – $5 \cdot 10^5$ клеток/мл.

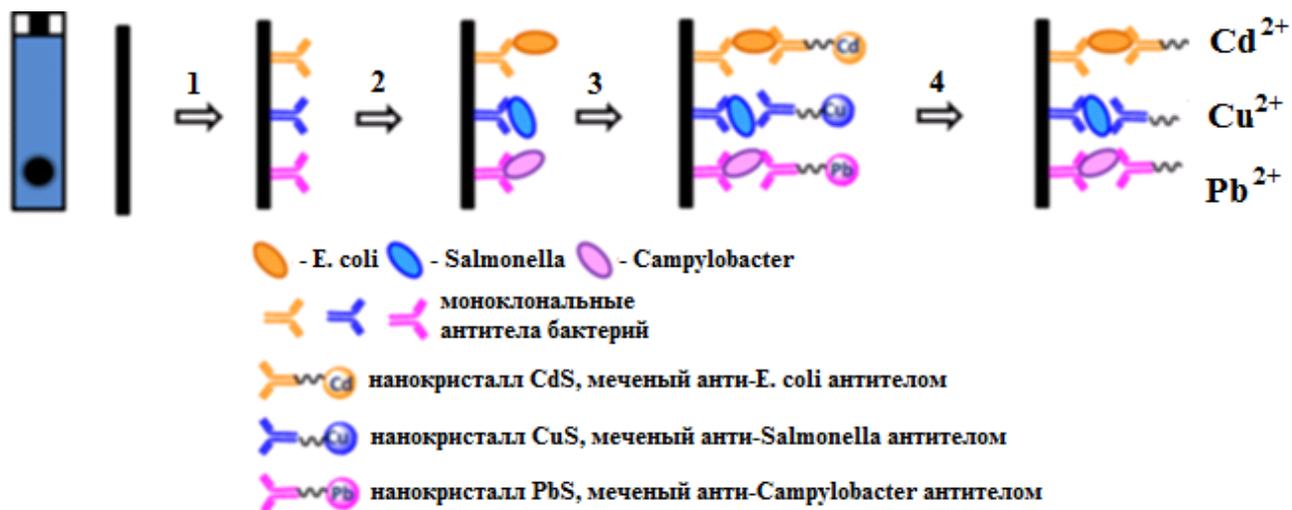


Рисунок 12. Многослойная иммунологическая система на основе антител для детекции *E. coli*, *Salmonella*, *Campylobacter*.

Принципы магнитного иммуноанализа сочетаются с использованием электрохимических методов в одноразовом иммуносенсоре для определения *Salmonella*, представленном в работе [58]. Основу сенсора составляет печатный графитовый электрод на поверхности постоянного магнита. Образцы, содержащие бактериальные клетки, обрабатывали смесью магнитно-чувствительной фазы с золотыми наночастицами, модифицированными анти-*Salmonella* антителами и исследовали методом дифференциальной вольтамперометрии. Подобная аналитическая система демонстрирует низкие пределы обнаружения (143 клетки/мл) и линейный диапазон определяемых концентраций $1 \cdot 10^3 - 1 \cdot 10^6$ клеток/мл. Несмотря на аналитические характеристики, практическое применение ограничено использованием наночастиц и антител, которые требуются для каждого анализа.

Оригинальный метод импедиметрического определения бактериальных клеток в суспензиях с использованием взаимопроникающих микроэлектродов предложен Янгом [59]. В основе его лежит взаимодействие определяемых клеток с соответствующими антителами на поверхности электродных структур. Изменение спектра электрохимического импеданса в деионизованной воде, рассматриваемое в качестве аналитического отклика, обусловлено привнесением в электрохимическую систему заряда поверхности бактериальных клеток и осмотиков внутриклеточной среды (Рисунок 13). Предел обнаружения бактериальных клеток с использованием описанной системы составил $3.45 \cdot 10^6$ КОЕ/мл, линейный диапазон определяемых концентраций – $10^6 - 10^{10}$ КОЕ/мл. Тем не менее, система непригодна для использования в буферных средах (аналитические отклики системы на различные концентрации клеток одинаковы).



Рисунок 13. Импедиметрический сенсор для определения бактериальных клеток в деионизованной воде.

В работе [60] описан импедиметрический сенсор для определения грамтрицательных *E. Coli* DH5a и *Enterobacter cloacae*, грамположительных *Bacillus subtilis*, грибов *Saccharomyces cerevisiae* и клеток *HeLa*. Концепция подобного рода систем заключается в функционализации поверхности электрода самособирающимся за счет электростатических взаимодействий монослоем чувствительного элемента (лектина), обладающим высокой аффинностью к компонентам клеточной стенки - гликозиловым комплексам (Рисунок 14). При связывании определяемых клеток с чувствительным слоем в среде, содержащей медиатор (1 мМ

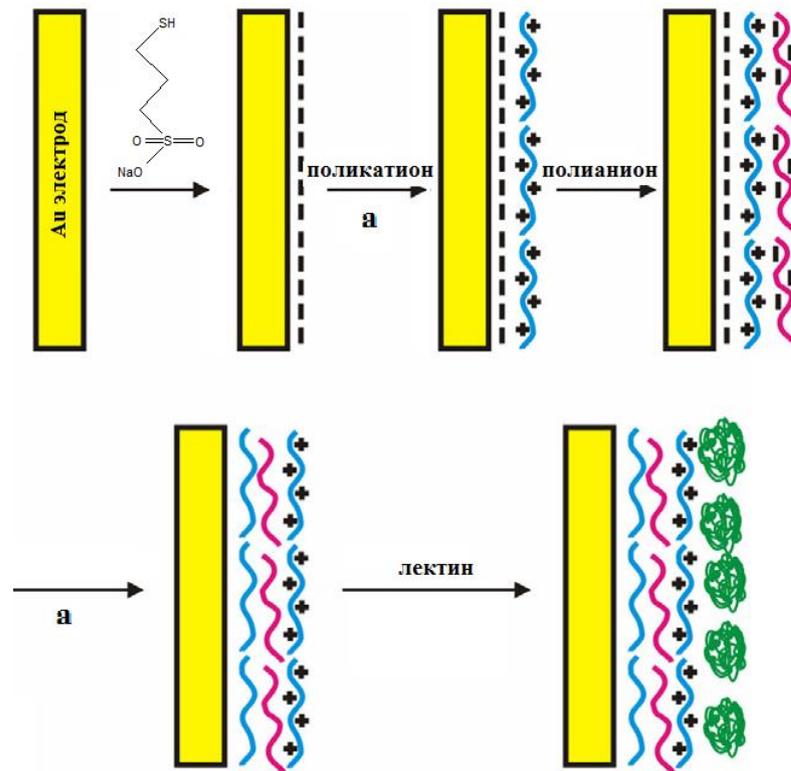


Рисунок 14 Схема модификации поверхности электрода самособирающимся монослоем лектина

$K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$), наблюдается линейное увеличение сопротивления с ростом числа клеток в растворе в диапазоне $1 \cdot 10^3 - 1 \cdot 10^7$ КОЕ/мл.

Несмотря на существующее многообразие систем биораспознавания и их привлекательность с точки зрения селективности и высокой аффинности, применение оных на практике ограничено невысокой операционной стабильностью, равно как и необходимостью обеспечения определенных условий хранения во избежание быстрой потери активности, а также, зачастую, однократностью применения. Актуальным направлением исследований в области создания аналитических систем определения микроорганизмов является разработка альтернативных биораспознаванию методов, позволяющих сочетать аффинность с приемлемой операционной стабильностью.

4.2. Электрохимические системы без биораспознающих элементов

Примером аналитических систем, не предполагающих использование элемента биораспознавания, могут служить электростатические сенсоры. В их основе лежат взаимодействия отрицательно заряженной клеточной стенки микроорганизмов с положительно заряженным чувствительным слоем (например, полилизин или хитозаном) с его последующей перезарядкой (Рисунок 15).

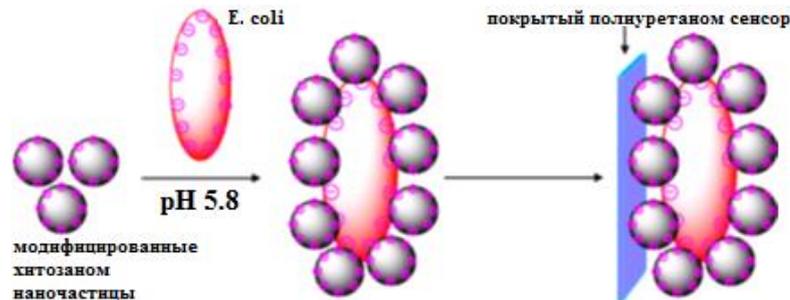


Рисунок 15. Схема функционирования иммуноаналитической системы для определения *E. coli* с использованием магнитных наночастиц Fe_3O_4 .

Подобная иммуноаналитическая система для детекции патогенных микроорганизмов *E. coli* O157:H7 с использованием магнитных наночастиц Fe_3O_4 , модифицированных хитозаном, в качестве усилителей сигнала разработана Лином и соавторами [61]. Отрицательно заряженная клеточная стенка *E. coli*, связываясь за счет электростатических взаимодействий с функционализированными хитозаном наночастицами, притягивается к поверхности магнитного сенсора. Зависимость частоты резонансных колебаний последнего от количества вещества на его поверхности позволяет определять концентрации *E. coli*. Сенсор демонстрирует низкие пределы обнаружения (вплоть до 10 КОЕ/мл) даже в присутствии небольших белков (бычий сывороточный альбумин).

Несмотря на операционную стабильность электростатических сенсоров, значительно превосходящую таковую для систем, содержащих биораспознающий элемент, их существенным недостатком является отсутствие специфичности и невозможность дифференцирования отклика системы при специфическом связывании на фоне неспецифических взаимодействий.

Сложность создания операционно стабильной системы детектирования микроорганизмов на основе биораспознающих элементов подтолкнула ученых к созданию так называемых «искусственных рецепторов» – синтетических соединений, обладающих заданными физико-химическими свойствами, в том числе, селективностью. Идеология множества работ, нацеленных на обнаружение микроорганизмов, заключается в создании сенсора для определения основных компонентов клеточных стенок и функциональных групп на поверхности клеток: олиго- и полисахариды (*Enterococcus faecalis*, *Penicillium chrysogenum*),

гликолипиды (*Pseudomonas aeruginosa*), оксикислоты (сиаловая кислота, *Escherichia coli*), коллаген, фибронектин, гликопротеиды (*Staphylococcus aureus*) [62, 63].

В этом ключе активное развитие получило направление биоимпринтинга, метода получения «отпечатков» определяемых структур, основанного, например, на полимеризации функциональных мономеров в присутствии специально введенных в среду роста или закрепленных на активной поверхности сенсорной структуры объектов-темплатов. Примером может служить разработанный группой Ки [64] сенсор для определения патогенных десульфатирующих бактерий (Рисунок 16).

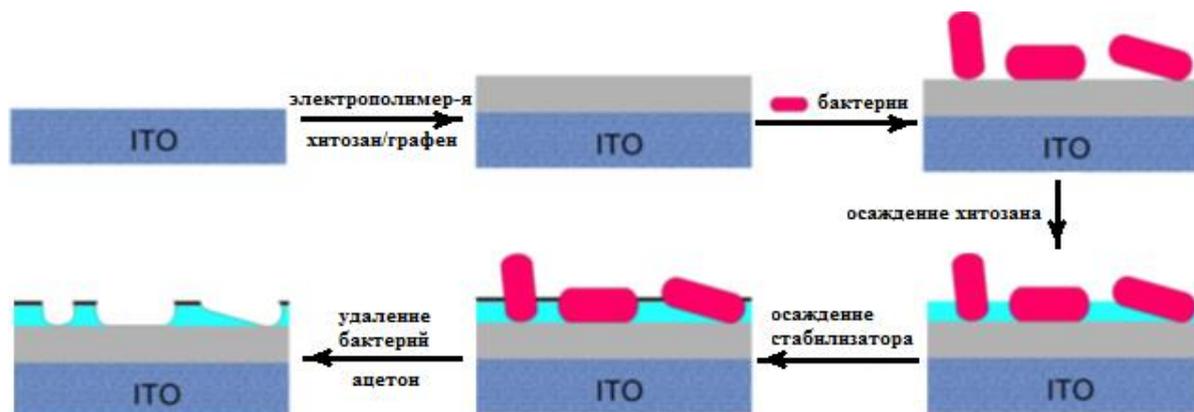


Рисунок 16. Схема создания чувствительного слоя на поверхности электрода методом импринтинга десульфатирующих бактерий в пленку хитозана.

В качестве аналитического отклика в предложенной Ки системе рассматривали изменение сопротивления материала, определяемое импедиметрически. При связывании бактерий с чувствительным слоем системы наблюдается увеличение сопротивления полимерной пленки хитозана. Диапазон определяемых концентраций составил $1 \cdot 10^4$ – $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл, а селективность связывания, исследованная в растворах, одновременно содержащих несколько видов бактерий (*Micrococcus luteus*, *S. aureus*, *Vibrio anguillarum* и *Vibrio alginolyticus*), не позволяет сделать вывод о возможности детектирования определенного вида при наличии в анализируемом растворе бактерий меньших размеров или схожей формы.

Своего рода вехой в создании «синтетических рецепторов» является использование боронат-замещенных полимеров. Так, известный с середины прошлого столетия эффект ковалентного связывания борных кислот с моносахаридами [65] (а как впоследствии показано, с 1,2- и 1,3-*цис*-диольными фрагментами) в водной среде положил начало целому направлению в создании хемосенсоров. Остаток борной кислоты (например, в замещенных ароматических соединениях) обратимо связываясь с 1,2- и 1,3- диолами (в том числе, олиго- и полисахаридов клеточных стенок множества микроорганизмов), образует устойчивый анионный комплекс с выделением протона в стехиометрии 1:1 (Рисунок 1) в диапазоне pH 6–10, согласно схеме [21]:

Примером использования описанного принципа взаимодействия фенолборных кислот с компонентами клеточных стенок может служить работа [12]. Использование золотых электродов, модифицированных монослоем 3-АФБК (Рисунок 17), позволяет определять концентрации *E. coli* в диапазоне $1.5 \cdot 10^2 - 1.5 \cdot 10^6$ КОЕ/мл.

Тем не менее, использование авторами изменения емкости двойного электрического слоя в качестве аналитического отклика и привлечение соответствующих аналитических зависимостей для трактовки экспериментальных данных неприемлемо. Длина Дебая – расстояние, на которое распространяется действие электрического поля в среде, содержащей

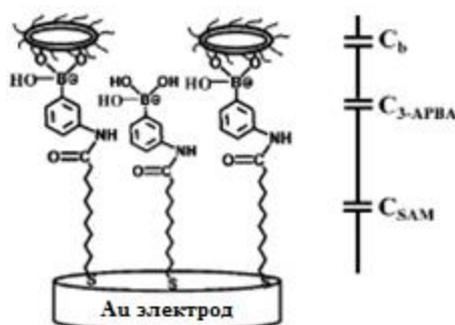


Рисунок 17. Схема емкостного сенсора для определения *E. coli*.

заряженные свободные частицы обоих знаков (в данном случае – электролит) – значительно меньше (для 0.1 М растворов электролита < 1 нм) расстояния от поверхности электрода до молекул- «рецепторов».

Суммируя вышесказанное, существующие методы детектирования микроорганизмов основаны на специфическом взаимодействии с сенсорными материалами либо на химических реакциях метаболитов или структурных компонентов микроорганизмов со специальными реагентами. Последняя группа методов, однако, имеет ограниченное применение в виду невозможности непрерывного определения. Детектирование бактерий и плесневых грибов с помощью сенсоров обычно включает в себя стадию преконцентрирования микроорганизмов на поверхности чувствительного слоя для достижения необходимых пределов обнаружения. Методы преконцентрирования делятся на три основные группы:

1. Использование заряженных поверхностей (например, полилизин или полихитозан) для кулоновского взаимодействия с ионогенными группами клеточных стенок микроорганизмов
2. Взаимодействие с биораспознающими элементами, такими как антитела, аптамеры, белки (лектины)
3. Имитации биологической аффинности при помощи синтетических функциональных элементов – биомиметика.

Последняя группа является наиболее перспективной в сенсорных приложениях, поскольку сочетает высокую стабильность и селективность, тем самым объединяя основные преимущества первых двух групп.

4.3. Методы обнаружения микроскопических грибов

Одним из наиболее распространенных микроорганизмов, с которым контактирует человек, являются микроскопические плесневые грибы, и в частности *Penicillium chrysogenum* [66]. Они являются представителями отдела Аскомицеты (Ascomycetes) или сумчатые грибы, названные так из-за особенной и наиболее характерной структуры, возникающей в результате полового процесса – сумки или аска [67]. Однако грибы рода *Penicillium* довольно часто встречаются в анаморфной (или бесполой) стадии роста. Их характерным отличием от других родов микроскопических плесневых грибов является строение конидиеносца в виде кисточки: на растущем из гифы конидиеносце образуются веточки или метулы, каждая из которых имеет мутовку стеригм (или фиалид), на которых формируются конидии (или споры). (Рисунок 18). Конидии непрочны удерживаются на стеригмах и потому легко отрываются и переносятся даже потоками воздуха.

Споры микроскопических грибов (микромицетов) практически всегда присутствуют в воздушной среде в составе биоаэрозоля и пыли наряду с другими клетками микроорганизмов [68, 69]. Повсеместное развитие и спороношение грибов в окружающей среде приводит к попаданию спор в воздушные потоки и делает неизбежным их контакт с органами дыхания человека.

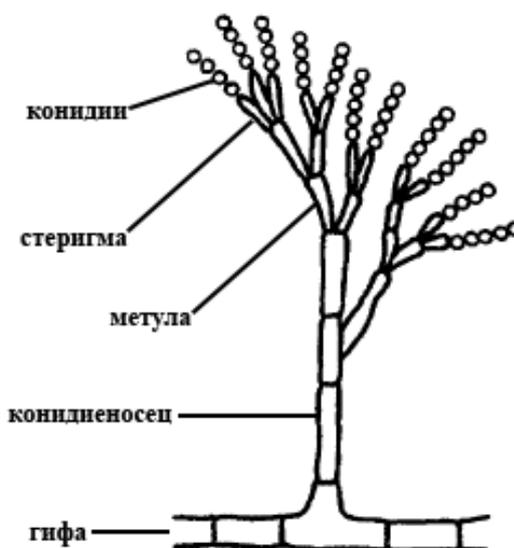


Рисунок 18. Строение плесневых грибов рода *Penicillium*

В последние десятилетия проблема контаминации (заражения) воздушного пространства и развития микроскопических грибов в закрытых помещениях приобрела чрезвычайную актуальность и социальную значимость нашей стране и за рубежом. Большинство

микровицетов, обитающих в антропогенных экосистемах города, условно-патогенны для человека. Плесневые грибы принимают участие в патогенезе различных заболеваний человека: микозов, микогенной аллергии, аспергиллеза, аллергического риносинусита, бронхиальной астмы, пищевые и лекарственные аллергии [70-72]. Такие болезни носят, как правило, местный характер. Механизм возникновения болезни связан с образованием антител в ответ на длительное воздействие антигенов. Считается, что некоторые люди имеют генетическую предрасположенность к атопиям (т.е. гиперчувствительностью к аллергенам), что обусловлено повышенной способностью клеток адсорбировать гаптены – вещества, не вызывающие в свободном виде полноценного иммунного ответа и обладающие обычно низкой молекулярной массой – или вырабатывать иммуноглобулины класса Е в ответ на естественные аллергены. Поэтому важной задачей биотехнологии является контроль микробиологической чистоты окружающей среды, а также жилых и производственных помещений, где человек проводит около 80% всего времени жизни [73].

Для определения микроорганизмов существуют различные методы, которые делятся на культуральные и некультуральные. К первым относятся типы исследований, направленные на выделение чистой культуры конкретного представителя плесневых грибов и его идентификацию. Второй тип методов не обладает специфичностью к конкретным микроорганизмам и использует общие физико-химические принципы для всех детектируемых объектов.

На первой стадии любого из типов методов проводится отбор пробы образца, содержащего грибы. В случае исследования микробиологической чистоты воздушной среды используют: мембранные фильтры, через которые пропускают исследуемый воздух и анализируют осевшие микроорганизмы [74]; прибор для принудительной циркуляции окружающего воздуха с регулируемой скоростью через плотную питательную среду для улавливания (например, чашки Петри с агарозными средами), также называемый импактор [75]; инъецирование образца в жидкую среду [76]; электростатические осадители, основанные на действии электрического поля на заряженные группы на поверхности микроорганизмов для их осаждения из воздушной среды [77].

В случае культуральных методов образец, содержащий искомым микроорганизм, помещают в специальные питательные среды для посева. Состав питательной среды зависит от целей исследования, а также наличия или отсутствия бактерий, других грибов и пр. Культивирование грибов осуществляют, как правило, в течение 1-2 недель, после чего проводят идентификацию. Основным недостатком таких методов является длительность анализа образца. Однако, простота и надежность культивирования на питательных средах делает этот метод по-прежнему востребованным для различных медицинских и научных исследований.

Некультуральные методы включают в себя различные виды микроскопических исследований с использованием обычного оптического, флуоресцентного, сканирующего электронного микроскопа [6], молекулярно-биологические исследования, основанные на взаимодействии с ДНК [3, 7], биолюминесцентные [13], масс-спектрометрические [5], а также проточные цитометрические исследования [78].

Прямое микроскопическое исследование образцов наряду с культивированием является одним из классических методов для идентификации микроорганизмов. Однако применение специальных красителей и, в случае флуоресцентной и сканирующей электронной микроскопии, высокотехнологичного оборудования также накладывает некоторые ограничения на применение этих методов, которые нельзя причислить к экспрессным.

Значительное распространение в биохимических исследованиях в последнее время получили методы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Суть метода ПЦР заключается в амплификации или, иначе говоря, создании значительного числа копий исходного генетического материала из исходного образца дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) с использованием специального фермента ДНК-полимеразы. Замечательными особенностями данного метода являются возможность работать с крайне малыми количествами исходной ДНК и экспрессность процедуры. Однако есть и определенные недостатки метода: необходимость специального пробоотбора для извлечения ДНК, что затрудняет применение *in situ*, а также использование значительного числа реагентов и необходимость дальнейшей обработки полученных данных для идентификации микроорганизма.

Также к методам, использующим взаимодействие с ДНК, относятся аптамерные сенсорные системы. Обычно они представляют собой чипы – массивы аптамеров, расположенные на подложке, – позволяющие параллельно проводить множество измерений. Очевидными недостатками таких систем являются однократное применение чипа, технологичность их изготовления, а также необходимость пробоподготовки и выделения генетического материала из образца.

Аденозинтрифосфат(АТФ)-зависимая биолюминесценция использует явление люминесценции, возникающее в присутствии АТФ, люциферина и фермента люциферазы. Поскольку АТФ используют все живые организмы, этот метод позволяет быстро оценить заражение микроорганизмами концентрацией от сотен КОЕ на 1 мл или 1 г образца. К недостаткам такого метода относятся предварительная пробоподготовка и использование реагентов, а также низкая чувствительность к загрязнению спорами, поскольку в них содержание АТФ снижено по сравнению с обычными клетками.

Масс-спектрометрические методы (например, матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация – времяпролетная масс-спектрометрия) также находят применение в

биоаналитической практике для определения бактерий и грибов благодаря своей чувствительности и меньшим затратам по сравнению с иммунологическими и биохимическими тестами. Однако метод имеет и существенные недостатки: дорогостоящее оборудование и использование баз данных для идентификации объектов по профилю масс-спектра.

Последняя группа методов – проточная цитометрия – использует взаимодействие различных излучателей с суспензией клеток для подсчета и характеристики микроорганизмов. После отбора образца суспензия клеток (иногда смешанная с красителями для определения живых клеток) пропускается через капилляр, снабженный измерительным «окном», через которое в суспензию поступает излучение. На основании рассеяния определяются такие параметры, как размер, форма, биохимические свойства и пр. Среди недостатков этого метода – дорогостоящее оборудование и расходные материалы, использование реагентов и неспецифичность анализа.

Итак, основные недостатки существующих методов – использование дополнительных реагентов, биораспознающих элементов, длительные стадии анализа, высокотехнологичное оборудование – ограничивают практическое применение и обуславливают интерес к созданию простых, безреагентных и экспрессных методов обнаружения микроорганизмов.

4.4. Санитарно-эпидемиологические нормативы по предельно допустимым концентрациям плесневых грибов в воздухе

Нормативные документы относительно содержания плесневых грибов в воздухе приводят различные пороговые значения в зависимости от страны: от 150 до 10 000 КОЕ/м³. Единого значения не установлено, что аргументируется отсутствием данных о взаимосвязи степени воздействия и оказываемого эффекта.

Согласно санитарно-эпидемиологическим нормативам в условно-чистых, чистых и особо чистых комнатах присутствие плесневых грибов в 1 дм³ воздуха не должно обнаруживаться [79]. Однако трактование такого норматива неоднозначно, и условная чистота воздуха будет зависеть от оборудования и метода детектирования. Кроме того, существуют действующие гигиенические нормативы, например, ГН 2.2.6.2178-07 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) микроорганизмов-продуцентов, бактериальных препаратов и их компонентов в воздухе рабочей зоны», а также ГН 2.1.6.2177-07 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) микроорганизмов-продуцентов, бактериальных препаратов и их компонентов в атмосферном воздухе населенных мест». На основании этих нормативов, а также методических указаний подсчета концентраций клеток микроорганизмов, ПДК *Penicillium chrysogenum* в воздухе рабочей зоны и населенной местности составляют, соответственно, 5000 КОЕ/м³ и 500 КОЕ/м³.

Для установления количества микроорганизмов в воздухе применяют два метода: седиментационный и аспирационный [80]. Седиментационный метод наиболее прост в

применении и основан на свободном осаждении микроорганизмов из воздуха на поверхность агара в чашке Петри с питательной средой [81]. Для подсчета колониеобразующих единиц микроорганизмов используют формулу Омелянского [82]:

$$X = \frac{5a \cdot 10^2 10^3}{10bt}$$

где X – количество КОЕ в 1 м³ воздуха, а – количество КОЕ в чашке Петри, b – площадь чашки Петри в см², t – время экспозиции в мин. Иногда используют частный случай: за 5 минут при из воздуха в помещении на поверхность агарозной среды площадью 100 см² оседает столько микроорганизмов, сколько их содержится в 10 дм³ воздуха [83]. Главным недостатком этого метода является необходимость многократного повторения пробоотбора для адекватной оценки заражения, поскольку в помещениях с естественным воздухообменом распределение микроорганизмов в воздухе может быть неравномерным. К тому же, не все микроорганизмы эффективно улавливаются агарозной средой и могут находиться в составе частиц пыли, не контактируя с питательной средой и, следовательно, не давая колоний на питательной среде.

Аспирационный метод, являющийся более точным, основан на фильтрации и осаждении микроорганизмов из создаваемого прибором потока воздуха из помещения на поверхность агара, мембранных фильтров и пр. В настоящее время для контроля в промышленности используется микробиологический прибор, основанный на принудительной циркуляции воздуха. Суть анализа сводится к пропусканию воздуха из помещения через чашку Петри с питательной средой, культивированию осевших на поверхности среды микроорганизмов и последующего подсчета выросших колоний. Прибор рассчитан на автоматический отбор проб воздуха объемом от 25 до 2000 л при скорости пропускания воздуха 180 л/мин [84]. Согласно методике, для выявления присутствия плесневых грибов используют чашки Петри со средой Чапека-Докса, посева на которых инкубируются в течение 3 суток. Время полного анализа заражения микроорганизмами в таком случае определяется микробиологической методикой, используемой для посева микроорганизмов. Для экспрессного детектирования уровня заражения такая процедура неприемлема. Кроме того, результаты измерений такого типа приборов будут неизбежно занижены, поскольку твердой питательной средой улавливаются только крупные споры больше 3 мкм [85], к тому же микроорганизмы могут находиться на поверхности аэрозольных частиц, не контактируя с питательной средой.

Таким образом, несмотря на актуальность обнаружения микроорганизмов, существующие методы обладают значительными недостатками, ограничивающими их применение для решения практических задач вне лаборатории. Отдельной задачей стоит анализ воздушной среды, проведение которого сопряжено с трудностями пробоотбора и применения существующих процедур. Необходимо создать метод, который бы позволил проводить простое

и надежное обнаружение микроорганизмов как в жидкости, так и в воздухе, и при этом, по возможности, не задействовал высокотехнологичное оборудование и являлся безреагентным, устранив тем самым недостатки перечисленных выше методов.

На основании обзора литературных данных были сделаны следующие выводы. Создание новых сенсорных материалов для обнаружения микроорганизмов, несмотря на значительный прогресс в биотехнологии, не потеряло своей актуальности. Однако использование природных биораспознающих элементов (белки, антитела, аптамеры и пр.), обладающих высокой селективностью, сопряжено с недостатками операционной стабильности и использованием дополнительных стадий и реагентов, что накладывает значительные ограничения на практическое применение вне лаборатории, а в особенности для анализа микробиологической чистоты воздуха. При помощи подходов биомиметики возможно решить указанные выше недостатки и при этом создать материал, обладающий достаточной аффинностью к исследуемым объектам.

Сенсорные материалы на основе фенилборной кислоты продемонстрировали сродство к поверхности живых клеток. Специфическое связывание происходит за счет свойства борнокислой группы образовывать циклические эфиры с 1,2- или 1,3-*цис*-диольными фрагментами, которые содержатся в структуре моносахаридов и гидроксикислот клеточных стенок большинства микроорганизмов. Свойство фенилборной кислоты специфически связываться с 1,2- и 1,3-*цис*-диольными фрагментами позволяет решать различные задачи биотехнологии: контроль энантиомерной чистоты лекарств, процессов ферментации, а также микробиологической чистоты окружающей среды и помещений и пр. Включение фенилборных кислот в цепь проводящего полианилина позволяет применять электрохимические методы, обладающие такими преимуществами, как экспрессность, простота применения и невысокая стоимость используемого оборудования. Одним из самых чувствительных и наименее деструктивных методов является спектроскопия электрохимического импеданса, широко применяемая для описания свойств проводящих полимеров. Однако существующие импедиметрические и кондуктометрические системы на основе фенилборной кислоты не способны дифференцировать аналитический сигнал от специфического взаимодействия с диольными фрагментами и неспецифические процессы.

Таким образом, создание сенсорного материала на основе фенилборной кислоты, включенной в цепь проводящего полимера, является актуальной задачей электрохимической сенсорики. Одним из главных требований к такому материалу является селективность отклика, т.е. способность отличать специфическое и неспецифическое связывание. Тем самым, для исследований сенсорных свойств нового материала также необходим метод анализа, обладающий высокой чувствительностью и информативностью. Наиболее подходящим методом в таком случае является спектроскопия электрохимического импеданса.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Глава 5. Материалы, оборудование и методы

5.1. Материалы

Все эксперименты проводились в дистиллированной воде. В работе были использованы следующие неорганические соли:

- хлорид калия KCl (х.ч., Химмед, Россия),
- гидроксид калия KOH (х.ч., Реахим, Россия),
- дигидрофосфат калия KH_2PO_4 (ч.д.а., Хеликон, Россия),
- гидрофосфат калия K_2HPO_4 (ч.д.а., Хеликон, Россия),
- фторид натрия NaF (х.ч., Химмед, Россия).

Растворы соляной и серной кислот готовили из фиксаналов Germen (Германия), фосфорную кислоту использовали в виде исходного концентрированного раствора 85% (х.ч., Хеликон, Россия).

В работе использовались растворы:

1. фоновый электролит – 0.1 М KCl, 0.1 М HCl;
2. фосфатные буферы – 0.1 М KCl, 0.05 М KH_2PO_4 / K_2HPO_4 , pH 5.4, 5.8, 6.0, 6.2, 6.6, 7.0, 7.4.

В качестве модельных растворов диол-содержащих соединений использовали растворы L-лактата калия, D-глюкозу, D-галактозу, D-сорбитол (Sigma Aldrich, Германия) в соответствующих фосфатных буферах. Также для экспериментов по изменению импеданса в присутствии различных соединений был использован фосфатный буферный раствор (pH 7.0) ацетата натрия.

В работе использованы мономеры: гидрохлорид 3-аминофенилборной кислоты $\text{C}_6\text{H}_8\text{BNO}_2 \cdot \text{HCl}$, гидрохлорид анилина $\text{C}_6\text{H}_7\text{N} \cdot \text{HCl}$, и 3-тиенилборную кислоту (3-ТБК) производства Sigma Aldrich, Германия (Рисунок 19).

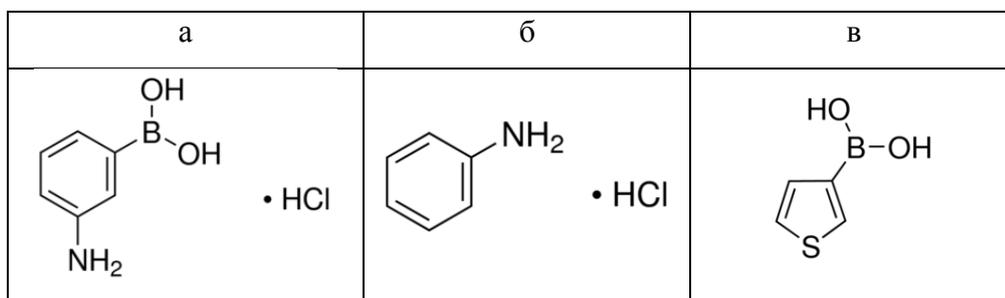


Рисунок 19. Мономеры, используемые в работе: а) гидрохлорид 3-аминофенилборной кислоты; б) гидрохлорид анилина; в) 3-тиенилборная кислота

В экспериментах с микроорганизмами использовали культуру плесневых грибов *Penicillium chrysogenum* Thom ATCC® 6061, выращенную на плотной питательной среде. Для посева образцов применяли чашки Петри с агаром YGC (Merck KGaA, Германия), содержащим хлорамфеникол.

5.2. Оборудование

5.2.1. Электроды

- дисковые стеклоглеродные электроды диаметром 2 мм марки SU-2500 производства НИИ «Графит» (Россия). Предобработка электродов включает несколько этапов:
 - 1) полировка порошком оксида алюминия Al_2O_3 (Sigma-Aldrich, США) до зеркального блеска (диаметр зерна 50 нм);
 - 2) полировка электрода с использованием водной суспензии оксида алюминия Al_2O_3 (диаметр зерна 50 нм) в воде.
- Взаимопроникающие (встречно-штыревые) золотые электроды с шириной зазора (равна ширине «ветвей» электродной структуры) 10 мкм, предоставленные лабораторией «Криоэлектроника» физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.
- В качестве электрода сравнения использовался хлоридсеребряный электрод $Ag|AgCl|1M\ KCl$. Все потенциалы, за исключением экспериментов с использованием взаимопроникающих микроэлектродов в качестве двухэлектродной схемы, в работе указаны относительно данного электрода.
- Платиновая сетка цилиндрической формы в качестве вспомогательного электрода для измерений методом спектроскопии электрохимического импеданса.
- Стеклоуглеродный стержень в качестве вспомогательного электрода для электрохимической полимеризации и измерений электроактивности полимера.

5.2.2. Электрохимические анализаторы

Циклическую вольтамперометрию для модификации торцевых и взаимопроникающих электродов, а также для исследования электроактивности полимера, проводили при помощи универсального потенциостата-гальваностата PalmSens3 (Palm Instruments BV, Нидерланды), сопряженного с персональным компьютером с программным обеспечением PS Trace®.

Измерения электрохимического импеданса проводили с помощью частотного анализатора 1255 HF (Solartron, Великобритания), сопряженного с внешним интерфейсом, под управлением персонального компьютера с программным обеспечением ZPlot® и ZView™ (Scribner Associates Incorporated, США).

5.2.3. Анализаторы размеров частиц

Анализ размеров частиц в аэрозоле проводили с помощью переносного счетчика аэрозольных частиц TSI AeroTRAK™ 9306-V2 (TSI Inc., США).

Определение размеров частиц в суспензии микроорганизмов производили при помощи лазерного дифракционного анализатора размеров частиц Analysette® 22 MicroTec Plus (Fritsch GmbH, Германия).

5.2.4. Растровая электронная микроскопия

Микрофотографии исходных микроэлектродов и модифицированных поли(3-АФБК) получены на растровом электронном микроскопе LeoSUPRA 50 VP (Zeiss, Германия) с использованием детекторов InLens и SE2.

5.2.5. Электрохимические ячейки

Модификацию электродов и микроэлектродов проводили в стеклянной ячейке с разделенными пространствами для электродов, соединенными жидкостным контактом.

В ходе регистрации спектров электрохимического импеданса использовали ячейку с разделенным пространством рабочего электрода и электрода сравнения. Измерения проводили по трехэлектродной (для торцевых электродов) и двухэлектродной (для микроэлектродов) схемам. При работе по трехэлектродной схеме использовали хлоридсеребряный электрод сравнения Ag|AgCl|1M KCl и платиновый полый цилиндр, коаксиальный рабочему электроду (торец рабочего электрода находился глубоко внутри платинового цилиндра), в качестве вспомогательного электрода.

Модифицированные поли(3-АФБК) взаимопроникающие золотые микроэлектроды (Рисунок 20) функционировали по двухэлектродной схеме: один из «гребней» выступал в качестве рабочего электрода, а второй – в качестве вспомогательного электрода, являющегося так же электродом сравнения. Для двухэлектродной схемы не требовалось использование ячейки с разделенными пространствами.

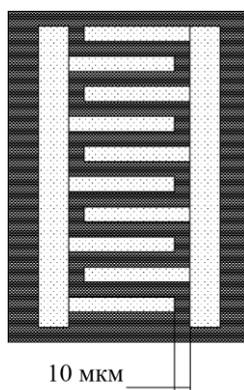


Рисунок 20 Структура взаимопроникающих микроэлектродов, состоящих из двух частей.

Перед модификацией проводилось измерение сопротивления между микроэлектродами при помощи цифрового мультиметра МЕТЕХ М-3860М (диапазон измерения сопротивлений от 0.1 Ом до 40 МОм) с целью определения структур с коротким замыканием. В случае короткого замыкания такие микроэлектроды не использовались для экспериментов.

5.2.6. Микробиологическое оборудование

Все микробиологические эксперименты с участием *Penicillium chrysogenum* проводились в ламинарном боксе БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,8 (ЗАО «Ламинарные системы», Россия) с защитой оператора и окружающей среды.

Культивирование микроорганизмов проводили в инкубаторе Binder KB53 (Binder GmbH, Германия) при температуре 26°C в течение 1-2 суток до появления заметных колоний.

5.3. Методы

5.3.1. Электрохимическое осаждение поли(3-АФБК)

Модификацию поверхности торцевых электродов проводили в ячейке с тремя разделенными пространствами для электродов, заполненной раствором фонового электролита: 50–250 мМ H₂SO₄, 40–240 мМ NaF. Пространство рабочего электрода заполняли раствором мономера 3-АФБК (40 мМ) в фоновом электролите. Электрополимеризацию осуществляли при развертке потенциала, подаваемого на рабочий электрод в диапазоне от 0 до 0.9 В при скорости развертки потенциала 40 мВ/с в течение 2–20 циклов. После электрополимеризации электроды тщательно ополаскивали раствором H₂SO₄ концентрации, равной концентрации в ростовом растворе.

Модификация взаимопроникающих электродов проводилась в потенциодинамических условиях, аналогичных описанным выше, путем одновременной модификации обеих взаимопроникающих частей. Полученный микросенсор без дополнительной обработки или модификации использовался для дальнейших экспериментов.

Гальваностатическое осаждение поли(3-АФБК) проводили из 0.04 М раствора 3-АФБК в 0.2 М фторида натрия в присутствии 0.1 М серной кислоты при плотностях тока 0.1–0.3 мА/см².

5.3.2. Электрохимическое осаждение полианилина

Модификацию поверхности торцевых электродов полианилином проводили в ячейке с тремя разделенными пространствами для электродов, заполненной раствором 0.1 М H₂SO₄. Пространство рабочего электрода заполняли 0.1 М раствором анилина и проводили электрополимеризацию при развертке потенциала, подаваемого на рабочий электрод в диапазоне от 0 до 0.85 В при скорости развертки потенциала 40 мВ/с в течение 25 циклов. После электрополимеризации электроды тщательно промывали 0.1 М водным раствором H₂SO₄.

Гальваностатическое осаждение полианилина проводили из раствора анилина состава, используемого при потенциодинамическом осаждении – 0.04 М 3-АФБК в присутствии 0.2 М фторида натрия в 0.1 М серной кислоте – при плотностях тока 0.1–0.6 мА/см².

5.3.3. Электрохимическое осаждение поли(3-ТБК)

Электрополимеризацию боронат-замещенного тиофена проводили из 50% водного раствора фосфорной кислоты. Перед осаждением мономер 3-ТБК выдерживали в растворе фосфорной кислоты в течение двух суток до появления желтоватого окрашивания, свидетельствующего о самопроизвольном образовании олигомеров тиофена в кислой среде. После этого проводили электрополимеризацию при развертке потенциала, подаваемого на рабочий электрод в диапазоне от 0 до 0.7–1.0 В при скорости развертки потенциала 40 мВ/с в течение 25 циклов.

5.3.4. Спектроскопия электрохимического импеданса проводящих полимеров

Импедиметрические измерения проводили в фосфатном буфере с рН 5.4–7.4 в диапазонах частот от 2 Гц до 50 кГц, амплитуда возмущающего сигнала составляла 5 мВ. После помещения рабочего электрода в раствор перед началом измерений его выдерживали при потенциале E_{dc} в течение 1 мин. Для снятия серии спектров в каждом новом значении рН использовали новый электрод.

5.3.5. Определение диол-содержащих и других соединений методом СЭХИ

Импедиметрические измерения проводили в фосфатном буфере с рН 7.0 в диапазоне частот от 1 Гц до 20 кГц, амплитуда возмущающего сигнала составляла 5 мВ. После помещения модифицированного торцевого электрода в фосфатный буфер применяли синусоидальную развертку напряжения с постоянным значением потенциала E_{dc} 0.05 В. Последовательную регистрацию спектров импеданса проводили до тех пор, пока не наблюдалось совпадение последних спектров. После этого в раствор фосфатного буфера постепенно добавляли растворы различных соединений (глюкозы, лактата калия, ацетата натрия, галактозы, сорбитола) и регистрировали спектры импеданса после каждой добавки до тех пор, пока последовательно полученные спектры не становились статистически неотличимы. При необходимости после этого заменяли раствор на чистый фосфатный буфер и снова проводили регистрацию спектров. В качестве аналитического сигнала использовали сопротивление полимера. Визуально сопротивление полимера соответствовало диаметру полуокружности в области высоких частот (Рисунок 21), точное значение вычисляли путем аппроксимации спектров простейшей эквивалентной схемой.

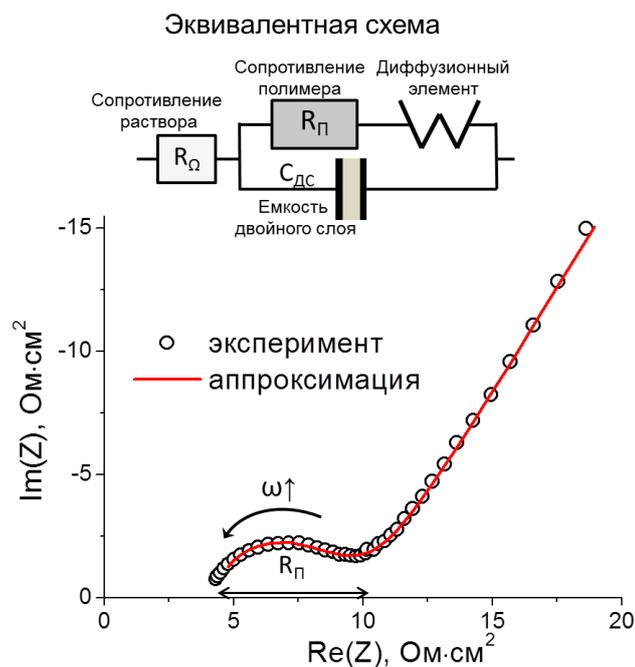


Рисунок 21. Спектр электрохимического импеданса (○) и результат аппроксимации (—) эквивалентной схемой, приведенной в верхней части рисунка.

Точное значение сопротивления полимера вычисляли на основании аппроксимации спектров импеданса простейшей эквивалентной схемой для проводящих полимеров, приведенной на рисунке выше. Сопротивление полимера вычисляли как для полимера в фосфатном буфере, так и для каждой добавки различных соединений, перечисленных выше. После этого строили градуировочную зависимость сопротивления полимера от концентрации растворенного соединения (Рисунок 22).

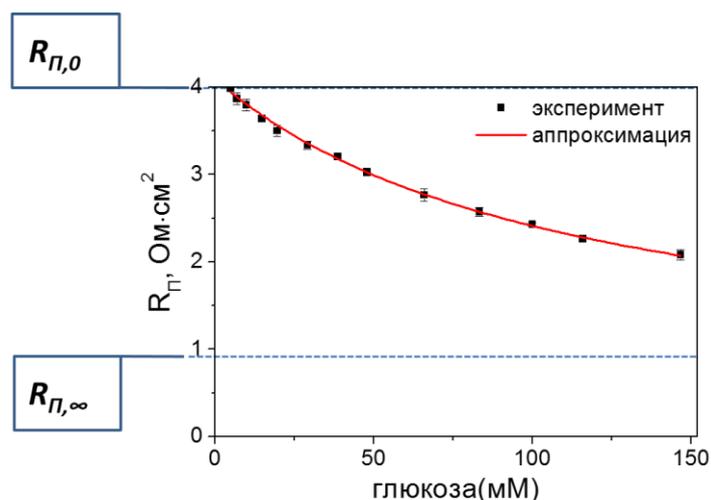


Рисунок 22. Градуировочная зависимость сопротивления полимера R_{Π} (○) от концентрации глюкозы в растворе и результат аппроксимации (—) уравнением, представленным ниже.

Градуировочную зависимость аппроксимировали следующим уравнением (подробное обсуждение проведено в параграфе 7.4):

$$R_{п}([S]) = \frac{R_{п,0} + R_{п,\infty}K_{набл}[S]}{1 + K_{набл}[S]}$$

где $[S]$ – равновесная концентрация растворенного соединения S , $R_{п,0}$ – значение сопротивления полимера в чистом фосфатном буфере, $R_{п,\infty}$ – значение сопротивления полимера при бесконечно большой концентрации растворенного соединения S , $K_{набл}$ – наблюдаемая константа связывания, соответствующая процессу ассоциации S с остатком борной кислоты в полимере. В результате аппроксимации определяли значение $K_{набл}$ для различных соединений.

Экспериментальные данные касательно рН-зависимости наблюдаемой константы связывания глюкозы или лактата с полимером получали из градуировочных зависимостей при различных рН: 5.4–7.4.

5.3.6. Влияние глюкозы на сопротивление взаимопроникающих микроэлектродов, модифицированных поли(3-АФБК)

Импедиметрические измерения в жидкости с использованием микроэлектродов проводили по двухэлектродной схеме в фосфатном буфере с рН 7.0 в диапазоне частот от 1 Гц до 20 кГц, амплитуда возмущающего сигнала составляла 5 мВ. После помещения микроэлектрода в фосфатный буфер применяли синусоидальную развертку напряжения с постоянным значением потенциала 0.05 В. Последовательную регистрацию спектров импеданса проводили до тех пор, пока не наблюдалось совпадение последних спектров. После этого в раствор фосфатного буфера добавляли раствор глюкозы и проводили измерения импеданса до получения статистически неразличимых последовательно зарегистрированных спектров.

Импедиметрические измерения в аэрозоле также проводили по двухэлектродной схеме. Для этого микроэлектрод закрепляли в специальной ячейке с двумя отсеками: в первом находился микроэлектрод и входное сопло для подачи аэрозоля, во втором – водный затвор для аэрозоля. Аэрозоль получали путем пропускания потока воздуха от воздушного насоса через промывалку с раствором фосфатного буфера. В условиях, указанных выше проводили измерения импеданса до получения статистически неразличимых последовательно зарегистрированных спектров. После чего в промывалку последовательно вносили 200 мМ раствор глюкозы в фосфатном буфере с рН 7.0 и снова проводили измерения импеданса до получения статистически неразличимых последовательно зарегистрированных спектров.

5.3.7. Приготовление суспензий плесневых грибов

Используемая в работе культура плесневых грибов *Penicillium chrysogenum* Thom ATCC 6061 была выращена на твердой питательной среде с хлорамфениколом. Как известно, *Penicillium chrysogenum* принадлежит к классу Аскомицеты или Сумчатые грибы. Их многоклеточный мицелий состоит из тонких нитей гиф с конидиеносцами, на которых образуются окрашенные споры, определяющие цвет колоний плесневых грибов. В течение

недели после посева плесневые грибы образовали колонии сине-зеленого оттенка с бархатистой поверхностью, обусловленной наличием ветвистых, имеющих вид кисточек, конидиеносцев со спорами.

Суспензии микроорганизмов получали следующим образом: при помощи микробиологической петли, предварительно прокаленной в пламени спиртовой горелки, отбирали поверхностный слой растущей культуры. Для упрощения процедуры петлю предварительно смачивали, погрузив в воду. В таком случае выросшие споры плесневых грибов попадали в капли жидкости на поверхности петли и не могли быть унесены внутренним потоком циркулирующего воздуха в ламинарном боксе в процессе подготовки суспензии. Отбор образцов петель повторяли несколько раз, после чего исходную суспензию тщательно перемешивали многократным встряхиванием. Таким методом получали суспензию с концентрацией плесневых грибов 50-100 тыс. КОЕ/мл. Из исходной суспензии путем десятикратного разбавления получали суспензии с меньшими концентрациями вплоть до сотен КОЕ/мл. После приготовления из каждой суспензии были отобраны несколько проб для посева и подсчета содержания микроорганизмов.

5.3.8. Определение содержания плесневых грибов по результатам посева

Для определения количества колоний в анализируемом растворе, на каждой стадии эксперимента аликвоты раствора, омывающего поверхность рабочего электрода, отбирали для посева на чашках Петри с питательной средой. Для контроля отбирали также аликвоту исходного буферного раствора, не содержащего микроорганизмы. После равномерного распределения пробы по поверхности агара при помощи стерильного микробиологического шпателя чашка Петри закрывалась крышкой и затем пленкой Parafilm[®]М для предотвращения высыхания агарозного геля и помещалась в инкубатор при температуре 26°C на 2 дня до появления колоний (Рисунок 23). Пробы исходного буфера без микроорганизмов не давали колоний на чашках Петри.



Рисунок 23. Колонии *Penicillium chrysogenum* на чашке Петри после 2 суток культивирования пробы клеток.

Выросшие колонии отмечали маркером на внешней стороне дна чашки Петри. Затем количество колоний определяли вручную путем подсчета количества отметок. Количество колониобразующих единиц в отобранных аликвотах позволяло определить содержание микроорганизмов в анализируемом растворе.

5.3.9. Обнаружение микроорганизмов в водной суспензии методом СЭХИ

Обнаружение плесневых грибов в суспензии проводилось с использованием двух различных типов электродов, модифицированных поли(3-АФБК): торцевые стеклоуглеродные дисковые электроды и взаимопроникающие золотые микроэлектроды с межэлектродным расстоянием 10 мкм (Рисунок 24).

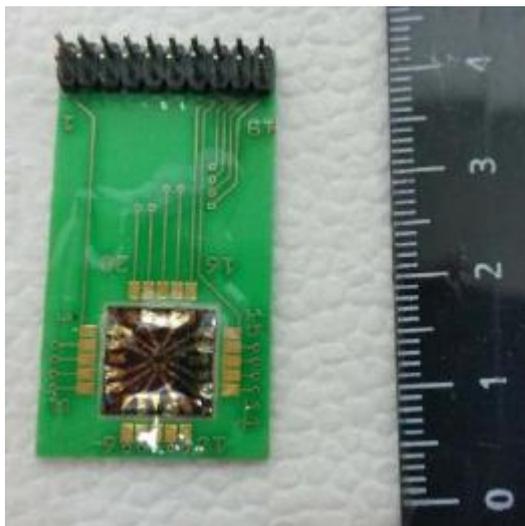


Рисунок 24. Взаимопроникающие микроэлектроды, используемые в работе.

Регистрация спектров импеданса в обоих типах систем проводилась в диапазоне от 2 до 20 000 Гц, напряжение постоянного тока составляло в обоих случаях 50 мВ относительно используемого электрода сравнения, амплитуда колебаний – 5 мВ. Перед детектированием микроорганизмов торцевые электроды или взаимопроникающие микроэлектроды погружали электрохимическую ячейку, содержащую раствор фосфатного буфера, и последовательно регистрировали спектры импеданса до тех пор, пока последние не станут совпадать друг с другом.

Для обнаружения микроорганизмов с помощью торцевых электродов использовали ячейку с двумя разделенными пространствами: одно – для торцевого рабочего электрода и платинового цилиндрического вспомогательного электрода, другое, отделенное капилляром Луггина – для хлоридсеребряного электрода сравнения. Различное содержание плесневых грибов в ячейке создавалось путем полной замены имеющегося раствора или суспензии микроорганизмов на другую суспензию с известным содержанием. После замены раствора снова проводили последовательную регистрацию спектров до совпадения последних.

Для обнаружения микроорганизмов с помощью взаимопроникающих микроэлектродов в электрохимической ячейке заполняли фосфатным буфером только пространство для рабочего электрода. В таком типе электродов, как рассмотрено в литературном обзоре, в качестве электрода сравнения и вспомогательного электрода выступает один из двух взаимопроникающих микроэлектродов, обеспечивая функционирование по двухэлектродной схеме без каких-либо дополнительных электродов, в отличие от классических торцевых.

5.3.10. Анализ размеров частиц в водных суспензиях

Размеры частиц в суспензиях микроорганизмов определяли при помощи автоматического лазерного дифракционного анализатора размеров частиц Analysette® 22 MicroTec Plus. Для этого готовили суспензию плесневых грибов с содержанием 30 000 – 100 000 КОЕ/мл в фосфатном буфере с pH 7.0. После чего в камеру для подачи образца загружали сначала исходный фосфатный буфер, не содержащий микроорганизмы, после чего загружали образец суспензии *Penicillium chrysogenum*. Анализ размеров частиц проводился в автоматическом режиме.

5.3.11. Характеристики аэрозоля

Для анализа биоаэрозоля применяли переносной счетчик аэрозольных частиц TSI AeroTRAK™ 9306-V2. Анализатор включали не ранее, чем через 15 минут после включения воздушного насоса, для насыщения потока воздуха при скорости 3 л/мин компонентами водной суспензии в камере объемом 30 см³ на пути воздушного потока.

5.3.12. Обнаружение плесневых грибов в потоке биоаэрозоля

Для детектирования плесневых грибов в потоке биоаэрозоля использовали ячейку той же конструкции, что и для экспериментов с аэрозолем, содержащим глюкозу (см. параграф 5.3.6).

Биоаэрозоль, представляющий собой аэрозоль с плесневыми грибами, получали путем пропускания потока воздуха, создаваемого насосом и имеющего скорость 3 л/мин, через стеклянную промывалку с суспензией плесневых грибов *Penicillium chrysogenum* различного содержания в фосфатном буферном растворе.

В основном отсеке неподвижно фиксировали модифицированные взаимопроникающие микроэлектроды, над рабочей поверхностью которых на расстоянии 1 мм располагалось входное сопло для подачи биоаэрозоля в ячейку. Для каждого содержания микроорганизмов в насыщающем растворе проводили измерения импеданса до получения статистически неразличимых последовательно зарегистрированных спектров.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Глава 6. Электрохимическое осаждение проводящих полимеров

6.1. Потенциодинамическое осаждение полимеров анилина, 3-АФБК и 3-ТБК

Для осаждения полимеров на поверхности электродов применяли метод электрополимеризации, что обусловлено его простотой и возможностью селективной модификации только той поверхности, через которую протекает электрический ток. Наибольшей информативностью в процессе роста обладает потенциодинамический способ, который и был выбран в качестве основного для данной работы. Дополнительно будет рассмотрен гальваностатический способ, позволяющий контролировать скорость окисления мономера, а также определять получающую форму полимера по устанавливаемому в ходе роста потенциалу.

Для потенциодинамического осаждения проводящего незамещенного полианилина были оптимизированы диапазон развертки потенциалов и состав ростового раствора.

Концентрация анилина составляла 0.1 М – обычно используемое значение для электрохимической полимеризации [43, 86]. Рост проводящего полимера происходит при $\text{pH} \leq 1$, помимо проводимости кислая среда обеспечивает растворимость анилина и его производных в водном растворе из-за протонирования аминогруппы. В качестве фонового электролита использовали 0.1 М серную кислоту, которая обеспечивает большую скорость роста по сравнению с другими кислотами, например, соляной, взятой в концентрации вплоть до 1 М [87].

Диапазон развертки потенциалов определяется двумя параметрами – анодным потенциалом, отвечающим за окисление мономера с образованием катион-радикала, и катодным потенциалом, значение которого выбирается для наблюдения за редокс-переходами в полимере в процессе роста и для восстановительной релаксации полимера, необходимой для того, чтобы избежать избыточного окисления и потери проводящих свойств. Максимальное значение 1.0 В является верхней границей рабочего диапазона потенциалов стеклоуглеродного материала в водных растворах – выше этого значения наблюдаются заметные токи окисления поверхности углерода в водных фоновых электролитах. Оптимальное значение находится, как было сказано в обзоре литературы, в диапазоне 0.8-0.9 В – при этом обеспечивается достаточная скорость окисления мономера и не возникает заметной конкуренции с процессом деградации олигомеров. В качестве оптимального значения для потенциодинамического

осаждения полианилина был выбран максимальный анодный потенциал 0.85 В, минимальный катодный потенциал - 0 В.

Как было сказано выше, потенциодинамическое осаждение позволяет контролировать электроактивные свойства полимера в процессе роста. На ЦВА торцевого стеклоуглеродного электрода в ростовом растворе наблюдаются особенности, характерные для роста проводящего полимера (Рисунок 25): увеличение силы тока при максимальном анодном потенциале с увеличением номера цикла и «нуклеационные петли» на первых циклах [88].

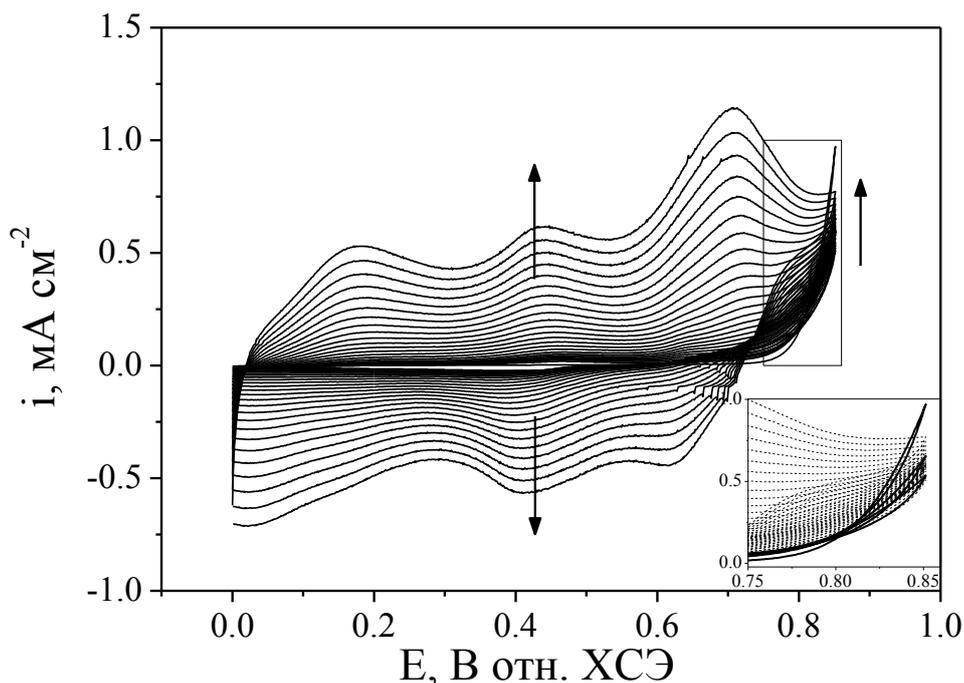


Рисунок 25. ЦВА торцевого электрода в ростовой смеси для осаждения полианилина, скорость развертки 40 мВ/с.

Возрастание силы тока при потенциале 0.9 В с номером цикла связано с увеличением площади проводящей поверхности в ходе синтеза полимера. Об образовании проводящего полимера можно судить не только по возрастанию силы тока, но и по появлению «нуклеационных петель» на циклических вольтамперограммах. Термином «нуклеационная петля» обозначают самопересечение на циклической вольтамперограмме. Причиной возникновения такого самопересечения на первых циклах вольтамперограммы является продолжение процессов окисления при обратной развертке потенциала – в сторону отрицательных значений, при которых обычно наблюдаются процессы восстановления. Образующиеся олигомеры окисляются вблизи поверхности электрода при потенциале, меньшем, чем таковой для мономера, что в результате служит причиной возникновения анодных токов при обратной развертке потенциала. Этому явлению способствует тот факт, что

окисление нейтрального мономера является одной из скоростьлимитирующих стадий процесса окислительной полимеризации.

Для подтверждения модификации торцевого электрода и исследования электроактивности полученного полимера регистрировали ЦВА в отсутствие мономера. Полученная кривая демонстрирует две отчетливо выраженные пары пиков редокс-процессов, характерных для полианилина (Рисунок 26).

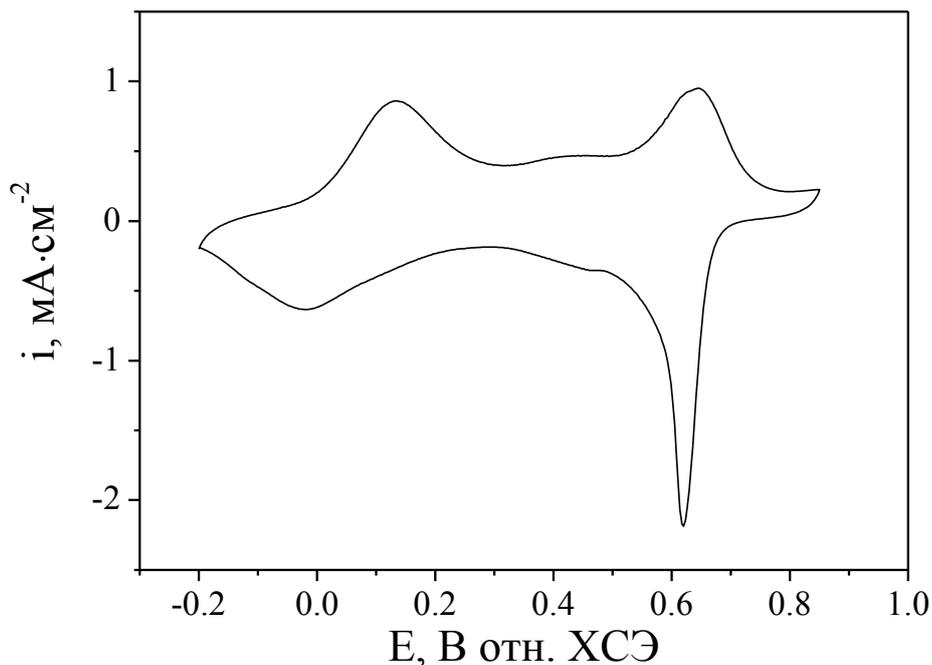


Рисунок 26. ЦВА полианилина, осажденного на торцевой электрод в потенциодинамическом режиме, в 0.1 М КСl в 0.1 М НСl, скорость развертки 40 мВ/с.

Пара пиков с формальным потенциалом полуволны ≈ 0.05 В, приблизительно вычисляемым как полусумма потенциалов катодного и анодного пиков, соответствует переходу между восстановленной непроводящей формой полианилина (лейкоэмеральдин) и частично окисленной (эмеральдин); пара пиков с потенциалом полуволны ≈ 0.6 В соответствует процессам окисления мономера и переходу между полностью окисленной непроводящей формой полианилина (пернигранилин) и проводящей частично окисленной формой эмеральдина (Рисунок 3). Таким образом, в настоящей работе в результате электрополимеризации действительно получен полианилин.

Для роста поли(3-АФБК) в режиме циклической вольтамперометрии с линейной разверткой потенциала был оптимизирован состав ростового раствора и диапазон развертки потенциала.

Как было указано выше, инициация окислительной полимеризации происходит за счет образования катион-радикала анилина при анодных потенциалах около 0.8-0.9 В. Таким образом, потенциалы значительно ниже 0.8 В не смогут обеспечить образование достаточного количества катион-радикалов анилина для проведения полимеризации. Напротив, выдерживание полимера при высоких анодных потенциалах значительно больше 0.8 В приводит к его деградации (например, за счет образования феназиновых структур [28]). В данной работе был выбран оптимальный анодный потенциал, при котором возможно проводить электрополимеризацию замещенного анилина, равный 0.9 В. Выбор катодного потенциала связан, главным образом, с возможностью наблюдать электроактивность синтезируемого полимера непосредственно в процессе роста. С учетом вышеуказанных особенностей был выбран диапазон потенциалов от 0 до 0.9 В.

Оптимальная концентрация мономера для полимеризации анилина обычно составляет 0.1 М. Для замещенных полианилинов можно использовать меньшие концентрации, поскольку некоторые заместители способны активировать *para*-положение относительно аминогруппы анилина, облегчая электрофильную атаку образующихся на начальных стадиях катион-радикалов. Борнокислый заместитель, являющийся акцептором электронной плотности, в определенных условиях способен выступать в качестве донора (будет рассмотрено ниже), активируя *para*-положение относительно аминогруппы анилина для электрофильной атаки, поэтому рост боронат-замещенного анилина происходит интенсивнее, чем незамещенного. Поэтому концентрация мономера была уменьшена и составила 0.04 М.

Для увеличения скорости полимеризации 3-аминофенилборной кислоты необходимо наличие фторид-ионов в растворе. В молекуле 3-аминофенилборной кислоты группа $-B(OH)_2$, находящаяся в *meta*-положении к аминогруппе (Рисунок 27а), обладает слабыми электроноакцепторными свойствами и за счет электронных и стерических эффектов блокирует электрофильную атаку катион-радикала анилина на соседний атом углерода в бензольном кольце, находящемся в *para*-положении к аминогруппе, тем самым ингибируя рост полимера, который протекает в направлении «голова к хвосту». Введение избытка фторид-ионов по отношению к содержанию мономера позволяет получить вместо $-B(OH)_2$ заместитель $-BF_3^-$ с электронодонорными свойствами (Рисунок 27б), который активирует электрофильную атаку в *para*-положение к аминогруппе [89].



Рисунок 27. 3-аминофенилборная кислота (а) в исходном состоянии и (б) в присутствии избытка фторид-ионов.

В ходе оптимизации состава ростового раствора были проанализированы данные по полимеризации 3-аминофенилборной кислоты в присутствии фторид-иона в концентрации 40–240 мМ (соотношение к концентрации мономера от 1:1 до 1:6). Максимальная скорость роста наблюдается при соотношении 1:5, т.е. при концентрации фторида 200 мМ. Дальнейшее увеличение концентрации фторида приводит к повышению рН ростового раствора за счет равновесия фторид-фтороводородная кислота. При этом проводимость образующегося полианилина становится меньше, поскольку протонное допирование полимерной цепи уменьшается. Уменьшение проводимости растущего полимера, в свою очередь, снижает скорость роста со временем. Поэтому дальнейшее увеличение концентрации фторида снижает скорость роста. Таким образом, оптимальное содержание фторида составило 200 мМ.

Оптимальное содержание серной кислоты в фоновом электролите определяли в диапазоне концентраций от 0.05 М до 0.25 М. В диапазоне потенциалов от 0 до 0.9 В максимальная скорость роста наблюдается именно в 0.1 М серной кислоте. Скорость роста боронат-замещенного полимера при повышении рН (или понижении концентрации кислоты) возрастает. В то же время, при понижении концентрации кислоты область проводимости полимера сдвигается в более катодную область, что приводит к образованию непроводящего полимера при потенциалах образования катион-радикалов, необходимых в процессе электрополимеризации. Оптимальной с этой точки зрения является концентрация 0.1 М.

Итак, оптимальный состав ростового раствора для электрополимеризации 3-АФБК: 0.04 М мономера в присутствии 0.2 М фторида натрия в 0.1 М серной кислоте.

Полимеризация проводящих полимеров сопровождается процессами нуклеации при высоких потенциалах, что находит отражение в циклических вольтамперограммах электрополимеризации 3-АФБК (Рисунок 28) – первые циклы осаждения сопровождаются возникновением «нуклеационной петли» [88]. Кроме того, области анодных потенциалов (около 0.9 В) наблюдается возрастание тока с числом циклов, что связано с увеличением проводящей поверхности в ходе синтеза. Таким образом, в ходе электрополимеризации 3-

АФБК наблюдаются те же закономерности, что и при осаждении незамещенного полианилина: процессы нуклеации на первых циклах и рост токов окисления при максимальном потенциале.

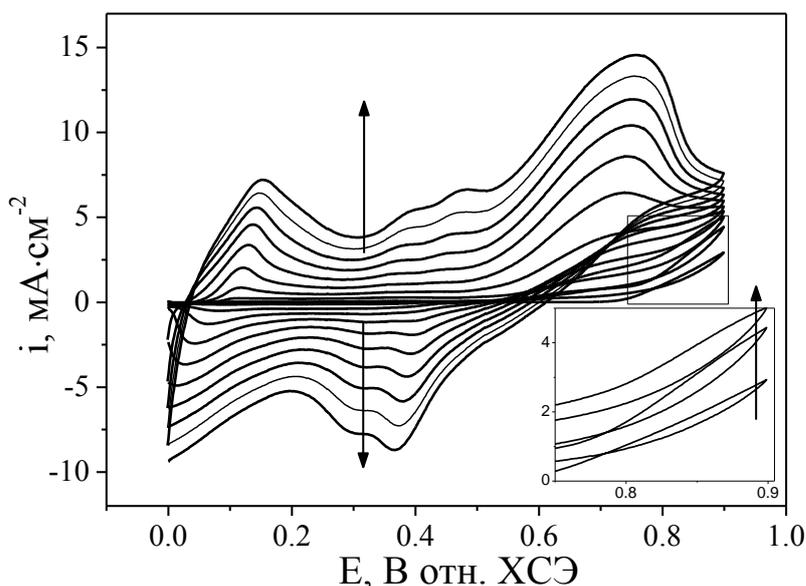


Рисунок 28. ЦВА торцевого электрода в ростовой смеси для электрополимеризации 3-АФБК (40 мМ 3-АФБК в 0.2 М NaF в 0.1М H₂SO₄), скорость развертки 40 мВ/с.

В настоящей работе были также проведены эксперименты по получению боронат-замещенного проводящего полимера на основе политиофена. Аналогично полианилину политиофен может быть получен электрохимической окислительной полимеризацией. Таким образом, для получения боронат-замещенного политиофена можно использовать 3-тиенилборную кислоту. С целью наблюдения электроактивности образующегося материала возможно применить потенциодинамический режим.

Осаждение замещенного политиофена проводили из 50 мМ раствора 3-ТБК, выдержанного в 85% фосфорной кислоте в течение 2 суток, в потенциодинамическом режиме в диапазоне потенциалов от 0 до 0.7–1.0 В. Исходный мономер 3-ТБК способен окисляться в водных растворах только при значительно более высоких потенциалах 1.4–2.3 В [75], при которых происходит электрохимическое окисление воды. Однако олигомеры тиофена, образующиеся самопроизвольно в концентрированной фосфорной кислоте [78], окисляются при потенциалах 0.9–1.0 В. Тем не менее, заметного роста на циклических вольтамперограммах чистых торцевых электродов не наблюдалось. Также не было выявлено электроактивности на торцевых электродах после модификации. Поэтому в дальнейшем эксперименты проводились только с использованием проводящего полианилина и поли(3-АФБК).

6.2. Электроактивность поли(3-АФБК), осажденной в потенциодинамическом режиме

Как известно, незамещенный полианилин быстро теряет свою электроактивность в растворах с $\text{pH} > 4$, что ограничивает его применение как сенсорного материала. Однако замещенный полианилин способен сохранять свою электроактивность вплоть до высоких значений $\text{pH} \approx 10$ [43].

Для исследования pH -зависимости электроактивности полученной в потенциодинамическом режиме поли(3-АФБК) регистрировали ЦВА в буферных системах с pH в диапазоне от 1.2 до 7.0 (Рисунок 29).

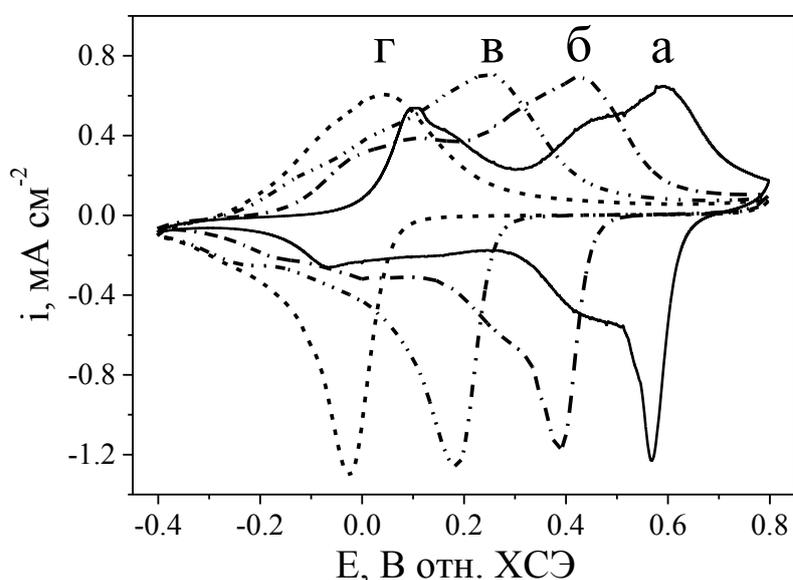


Рисунок 29. ЦВА поли(3-АФБК) на поверхности торцевого стеклоуглеродного электрода в растворах с pH : (а) 1.2, (б) 3.0, (в) 5.0 (г) 7.0, скорость развертки 40 мВ/с.

Наблюдаемые при pH 1.2 на ЦВА пары пиков по аналогии с незамещенным полианилином соответствуют следующим редокс-переходам основной цепи полимера: пара пиков в катодной области (0 В) – переходу эмеральдин/лейкоэмеральдин, пара пиков в анодной области (0.6 В) – переходу пернигранилин/эмеральдин. Пики редокс-активности в области потенциалов между основными переходами можно отнести к переходам бензохинон/гидрохинон (более катодная область потенциалов) и бензохинонимин/*para*-аминофенол (более анодная область). Дефектные структуры бензохинона и бензохинонимина, продукты частичного гидролиза, частично адсорбированы на поверхности растущей пленки – пики их электроактивности менее заметны на ЦВА в фоновом электролите в отсутствие мономера за счет растворения [90].

Таким образом, при рН 1.2 область существования проводящей формы эмеральдина представляет собой диапазон протяженностью около 500 мВ. С увеличением рН эта область уменьшается, поскольку потенциалы переходов могут зависеть от рН (Рисунок 3). Для рН 1.2 и 3.0 потенциал первого перехода (лейкоэмеральдин/эмеральдин) практически не зависит от рН, поскольку для полианилина в диапазоне рН от 1.0 до 4.0 редокс-процесс протекает с образованием биполяронов без участия протонов при отрыве двух электронов. При более высоких рН в этот процесс вовлечены два протона и два электрона, и поэтому потенциал перехода смещается в катодную область с соответствующей скоростью ≈ 60 мВ/рН. Пара пиков в области ≈ 600 мВ при рН 1.2, соответствующая второму переходу (эмеральдин/пернигранилин), рН-зависима для всей области рассматриваемых рН, и при переходе в более щелочные среды потенциал этого перехода также сдвигается в катодную область. Процесс окисления элементарного звена полимера протекает с одновременной потерей четырех протонов и двух электронов: при понижении рН потенциал перехода полимера из полностью окисленного состояния пернигранилина в частично окисленный эмеральдин смещается в катодную область со скоростью ≈ 120 мВ/рН. В нейтральной среде с рН 7.0 переходы практически не различимы. Однако в отличие от незамещенного полианилина поли(3-АФБК) сохраняет электроактивность в нейтральном рН, о чем свидетельствуют стабильные величины токов пиков редокс-активности на ЦВА. Область существования эмеральдина в поли(3-АФБК) представляет собой диапазон порядка 100 мВ.

Полученный боронат-замещенный полимер, таким образом, имеет сходную с полианилином электроактивность. Синтезированный полимер, в отличие от незамещенного полианилина, обладает электроактивностью и проводящими свойствами даже в нейтральных средах, что необходимо для применения его в качестве сенсорного материала.

6.3. Выбор оптимального числа циклов электроосаждения поли(3-АФБК)

В ходе оптимизации условий получения полимера 3-АФБК проварьировали число циклов электроосаждения в потенциодинамическом режиме. Проводимость полимера меньше металлической и поэтому электроосаждение слишком толстых пленок полимера может привести к тому, что полимер будет выступать в качестве изолятора и ухудшать электрохимические и аналитические характеристики создаваемого сенсора. Поэтому в ходе осаждения важно контролировать количество осажденного полимера. В потенциодинамическом режиме электрополимеризации количество вещества можно контролировать, изменяя число циклов осаждения: соответственно, с увеличением числа циклов увеличивается и количество полимера на поверхности электрода. В качестве параметра оптимизации числа циклов была выбрана величина силы тока анодного пика перехода пернигранилин/эмеральдин при ≈ 0.6 В (Рисунок 30). Сила тока была рассчитана из ЦВА полимера, полученного в ходе разного числа

циклов электрополимеризации, в фоновом электролите 0.1 М КСl в 0.1 М НСl. Как видно из рисунка, с увеличением числа циклов вплоть до 7 скорость роста полимера также возрастает. Однако при дальнейшем увеличении числа циклов наблюдается замедление темпов роста, что можно наблюдать также на ЦВА в ходе электрополимеризации (Рисунок 28). Общая площадь циклической вольтамперограммы в ходе каждого цикла свидетельствует о протекшем заряде, в том числе, затраченного на окисление. Поэтому визуальное уменьшение прироста площади циклической вольтамперограммы с номером цикла также отражает уменьшение скорости электрополимеризации. Одной из наиболее вероятных причин для этого может быть повышение сопротивления получающегося полимера из-за возрастания длины основной цепи и постепенного окисления проводящего эмеральдина до непроводящей формы пернигранилина.

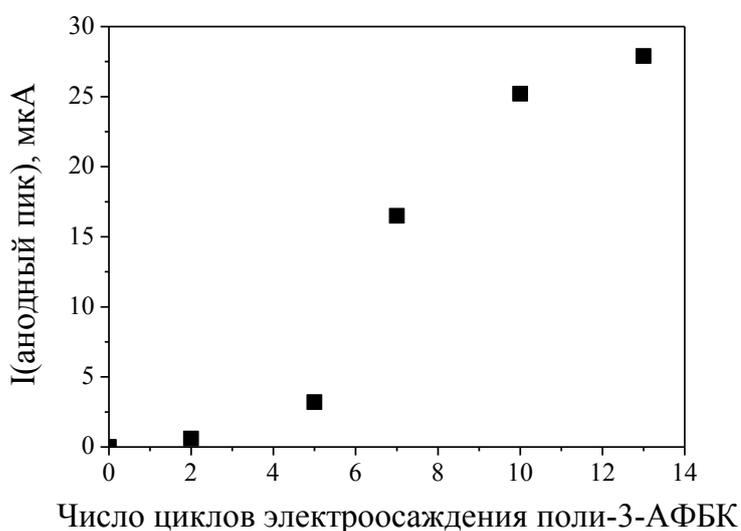


Рисунок 30. Зависимость величины тока максимума анодного пика редокс-перехода эмеральдин/пернигранилин от числа циклов электроосаждения.

При числе циклов электрополимеризации более 10 существенного прироста силы тока анодного пика не наблюдается. Таким образом, в дальнейшем в режиме потенциодинамического осаждения проводили электрополимеризацию в течение 10 циклов.

6.4. Гальваностатическое осаждение полианилина и поли(3-АФБК)

Помимо потенциодинамического в данной работе было рассмотрено гальваностатическое осаждение полимеров анилина и 3-АФБК. Использование постоянного тока для проведения полимеризации позволяет поддерживать постоянную скорость окисления мономера, а кроме того, осуществлять более точный контроль толщины пленки.

Гальваностатическое осаждение полианилина осуществлялось в растворе, состав которого оптимизирован для осаждения проводящего полианилина с концентрацией мономера анилина 0.1 М в 0.1 М H_2SO_4 .

Ключевыми параметрами электрополимеризации в гальваностатическом режиме являются плотность тока и время осаждения полимера. Оптимальная плотность тока обеспечивает рост проводящего полимера, являющегося частично окисленной формой. Время осаждения полимера коррелирует с толщиной получаемого полимерного покрытия.

Так, при высоких плотностях тока ($0.4\text{--}0.6\text{ мА/см}^2$) в ходе синтеза устанавливается потенциал выше 1 В, растущий со временем, что свидетельствует об избыточном окислении полимера в процессе синтеза и переходу проводящей частично окисленной формы в полностью окисленную непроводящую форму – пернигранилин. В свою очередь, низкие плотности тока (например, 0.1 мА/см^2) недостаточны для эффективного образования катион-радикалов в приэлектродном пространстве.

Ниже показана характерная хронопотенциометрическая кривая осаждения проводящего полимера при оптимальной плотности тока 0.2 мА/см^2 (Рисунок 31).

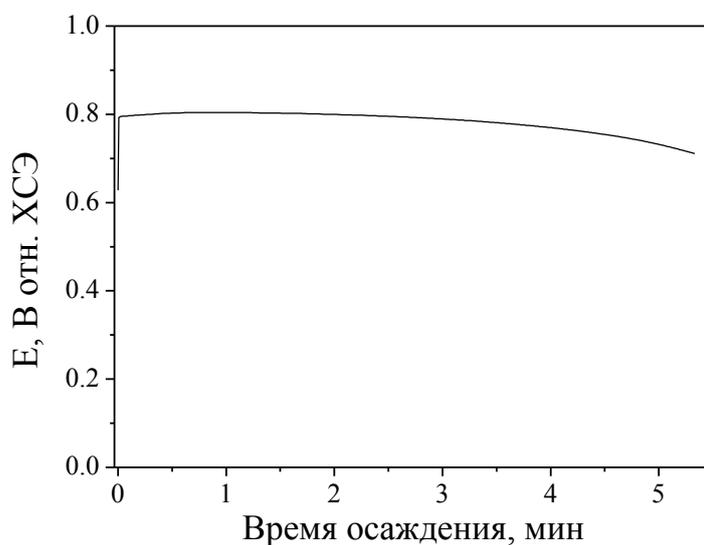


Рисунок 31. Осаждение полианилина в гальваностатическом режиме из 0.1 М раствора анилина в $0.1\text{ М H}_2\text{SO}_4$, плотность тока 0.2 мА/см^2 .

При данной плотности тока потенциал на электроде устанавливается в области перехода эмеральдин/пернигранилин – и, таким образом, не происходит переокисления полимерной пленки. О качестве осаждаемой пленки можно судить по ЦВА в фоновом электролите (0.1 М KCl в 0.1 М HCl) в отсутствие мономера (Рисунок 32). Наблюдаемые на ЦВА пары пиков соответствуют редокс-переходам эмеральдин/лейкоэмеральдин и пернигранилин/эмеральдин. Потенциалы переходов соответствуют таковым для полианилина, полученного в потенциодинамическом режиме.

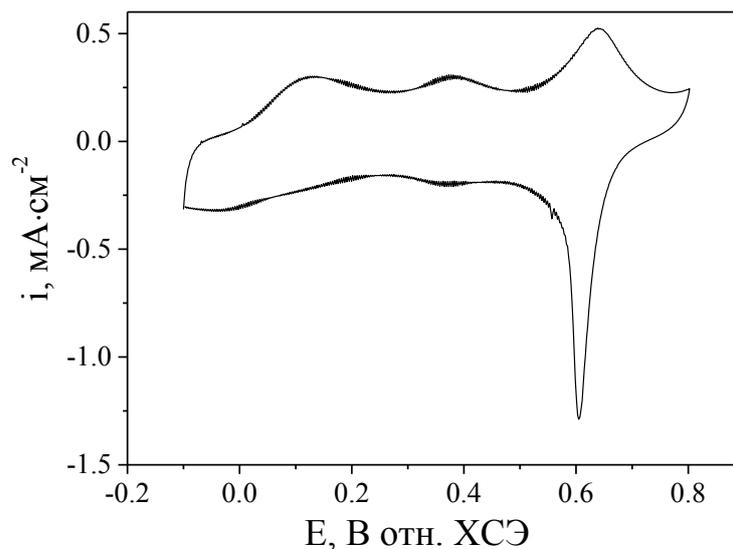


Рисунок 32. ЦВА полианилина, осажденного в гальваностатическом режиме при плотности тока 0.2 mA/cm^2 , в 0.1 M KCl в 0.1 M HCl , скорость развертки 40 мВ/с .

Как и в случае электрополимеризации незамещенного полианилина в гальваностатическом режиме, одним из ключевых параметров осаждения поли(3-АФБК) является плотность тока. В ходе осаждения при плотностях тока $0.1\text{--}0.2 \text{ mA/cm}^2$ устанавливается потенциал, соответствующий переходу пернигранилин/эмеральдин ($\approx 0.6 \text{ В}$, см. Рисунок 33, кривые а и б). Известно, что окисление мономера на проводящих олигомерных структурах происходит при меньших потенциалах, чем на чистой поверхности электрода. Тем самым, осаждение при плотностях тока $0.1\text{--}0.2 \text{ mA/cm}^2$ позволяет получить проводящий полимер.

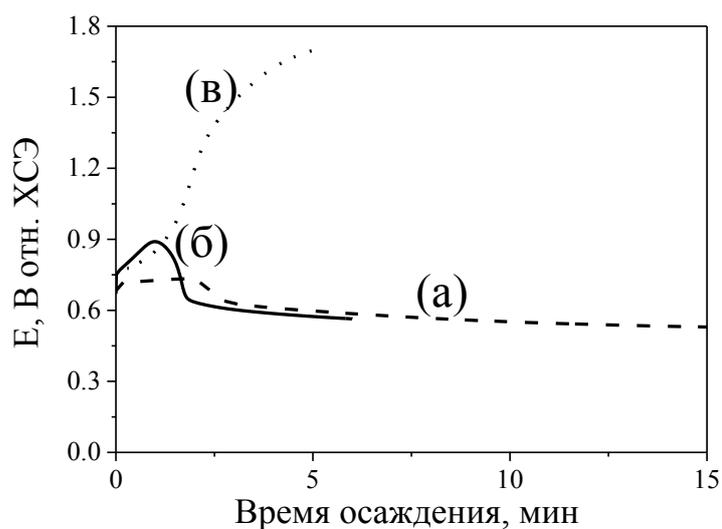


Рисунок 33. Осаждение поли-(3-АФБК) в гальваностатическом режиме в 0.04 M растворе 3-АФБК, 0.2 M NaF , $0.1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$, при плотности тока (в mA/cm^2): (а) 0.1 , (б) 0.2 , (в) 0.3 .

Оптимальная плотность тока составляет 0.2 mA/cm^2 . Плотности тока выше этого значения приводят к переокислению полимеров анилина и 3-АФБК (см. Рисунок 33, кривая в), в то время как меньшие плотности снижают скорость окисления мономера.

Электроактивность полученного полимера сравнивали с таковой для полученного в потенциодинамическом режиме при помощи регистрации ЦВА в фоновом электролите (Рисунок 34). Потенциалы редокс-переходов соответствуют таковым для боронат-замещенного полианилина, полученного в потенциодинамическом режиме. Положения этих редокс-переходов по шкале потенциалов для поли(3-АФБК), полученной в потенциодинамическом и гальваностатическом режимах, близки, что говорит о сходных электроактивных свойствах. Протяженность диапазона существования эмеральдина, полученного в обоих режимах, одинакова и составляет около 500 мВ.

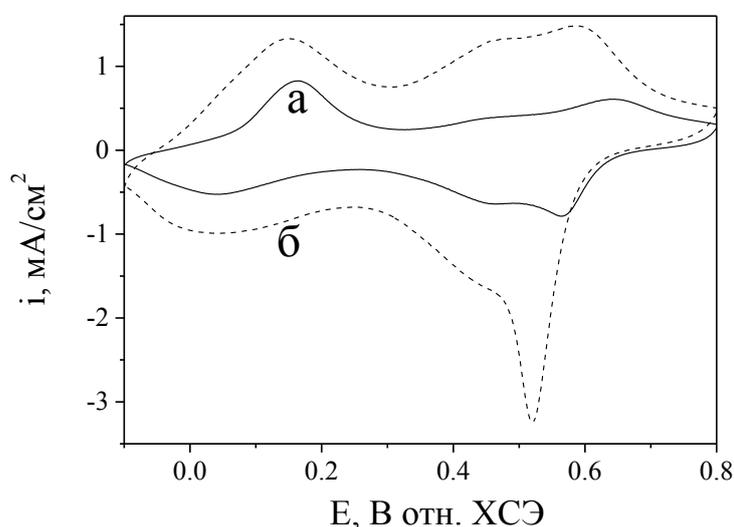


Рисунок 34. ЦВА пленок поли-(3-АФБК) на поверхности торцевого стеклоуглеродного электрода в 0.1 M KCl в 0.1 M HCl , осажденных: (а) в гальваностатическом режиме при плотности тока 0.2 mA/cm^2 , и (б) в потенциодинамическом режиме в течение 10 циклов при скорости развертки 40 mV/s .

Для дальнейшей работы осаждение полимера 3-АФБК в гальваностатическом режиме проводится при плотности тока 0.2 mA/cm^2 .

6.5. Модификация взаимопроникающих микроэлектродов поли(3-АФБК)

В настоящей работе помимо торцевых стеклоуглеродных электродов использовали взаимопроникающие золотые микроэлектроды с расстоянием между электродами, равным толщине самих электродных «ветвей», 10 мкм (Рисунок 35). Микроэлектроды наносились методом фотолитографии на подложку из термоокисленного кремния. Поскольку в ростовом растворе присутствует фтороводородная кислота, необходимо было убедиться, что в ходе

модификации полимером структуры не наблюдается заметного растворения подложки и разрушения микроструктур. Для этого микроэлектроды предварительно выдерживали в фоновом растворе без мономера в течение 15 мин. Сколько-либо заметных повреждений подложки и самих микроэлектродных структур не наблюдалось.

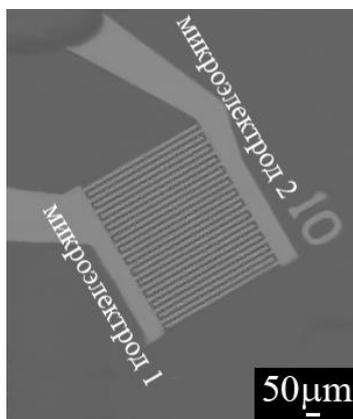


Рисунок 35. Микрофотография взаимопроникающих золотых микроэлектродов.

Полимеризацию 3-АФБК проводили по оптимизированной ранее методике для потенциодинамического режима в 0.04 М растворе 3-АФБК в присутствии 0.2 М фторида натрия в 0.1 М серной кислоте. В ходе модификации микроструктур при выбранных условиях синтеза, как и в случае торцевых электродов, образуется проводящий полимер: на первом цикле в анодной области потенциалов наблюдается «нуклеационная петля», а при потенциале 0.9 В наблюдается увеличение токов с ростом полимера, обусловленное увеличением поверхности (Рисунок 36).

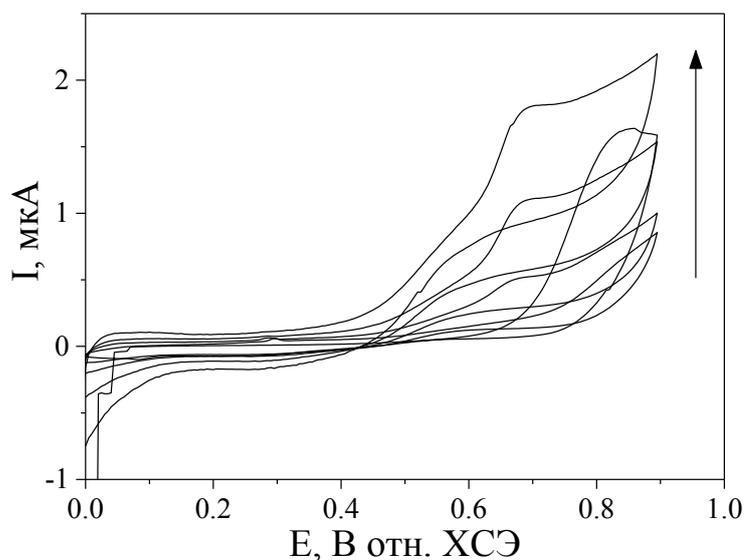


Рисунок 36. ЦВА роста полимера на взаимопроникающем золотом микроэлектроде в течение 5 циклов развертки потенциала со скоростью 40 мВ/с.

Сопротивление полимера не лимитирует рост пленки на поверхности электрода, а скорость окисления мономера на поверхности, покрытой полимером в ходе синтеза, сопоставима с таковой для окисления на поверхности чистого электрода.

О том, что результатом электросинтеза действительно является модификация поверхности электродной структуры поли(3-АФБК), можно судить по стабильной в ходе нескольких циклов развертки потенциала ЦВА полимера на поверхности взаимопроникающих электродов в фоновом электролите в отсутствие мономера. Полученная ЦВА (Рисунок 37) аналогична ЦВА поли(3-АФБК) на торцевых стеклоуглеродных электродах (Рисунок 29).

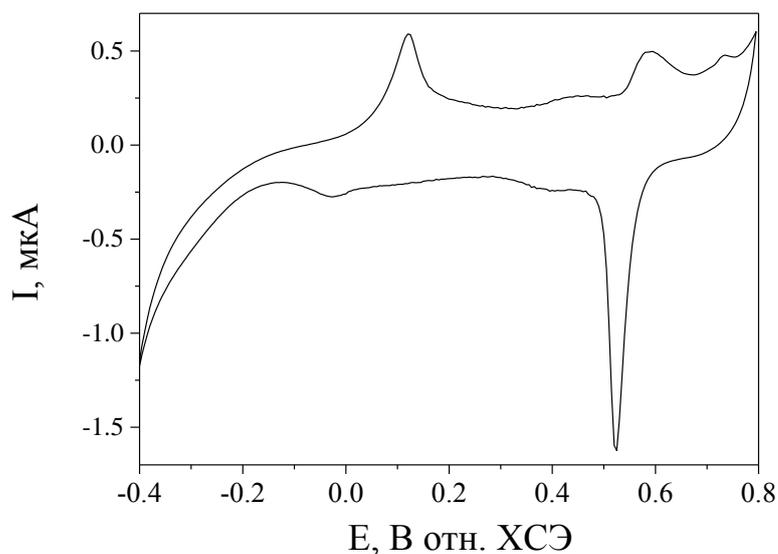


Рисунок 37. ЦВА модифицированного микроэлектрода в фоновом электролите.

Микроэлектродные структуры стабильны в среде ростового раствора, о чем можно судить как по циклической вольтамперограмме роста полимера, так и по данным электронной микроскопии. Видно, что после полимеризации не происходит разрушения или смещения микроструктур (Рисунок 38). На микрофотографиях электродов после модификации видны характерные нитевые структуры полимера в межэлектродном пространстве. Также по изменению морфологии поверхности самих электродных «ветвей» можно сделать вывод о том, что рост полимера происходит и на поверхности микроэлектрода.

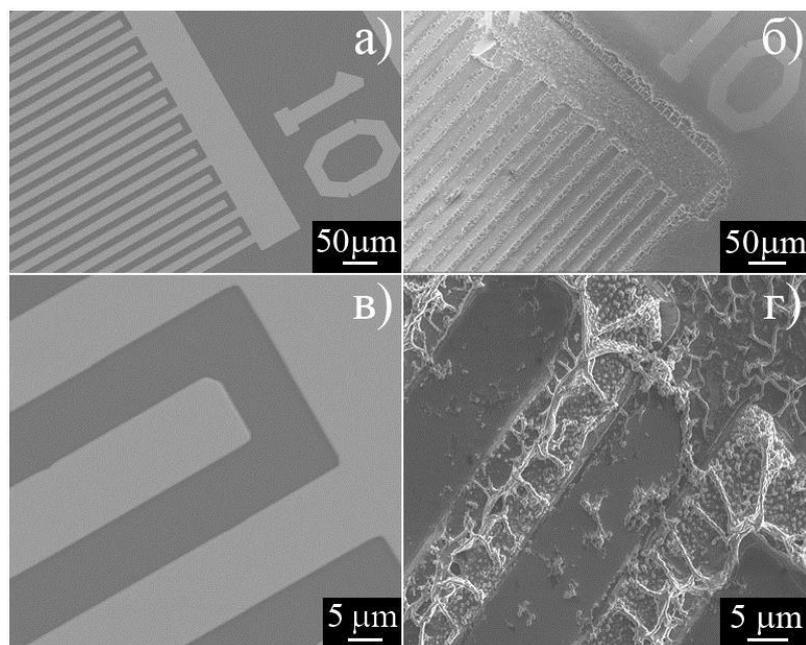


Рисунок 38. Микрофотографии поверхности взаимопроникающих микроэлектродов: до модификации (а) и (в); после модификации (б) и (г).

Итак, в настоящей работе путем электроосаждения из раствора 3-АФБК в оптимальных условиях на торцевые стеклоуглеродные электроды и взаимопроникающие золотые микроэлектроды был получен проводящий боронат-замещенный полианилин. О наличии электроактивности, характерной для полианилина, можно судить по характерным потенциалам переходов на циклических вольтамперограммах, полученных в отсутствие мономера. Наблюдаемые пары пиков соответствуют переходам лейкоэмеральдин/эмеральдин и эмеральдин/пернигранилин. О наличии проводящих свойств свидетельствуют признаки нуклеации в начале электрополимеризации, а также рост тока при максимальном анодном потенциале с числом циклов.

Глава 7. Физико-химические основы взаимодействия соединений, содержащих 1,2- или 1,3-цис-диольные фрагменты, с поли(3-АФБК)

В основу функционирования сенсора на основе поли(3-АФБК) положено взаимодействие 1,2- или 1,3-цис-диольных фрагментов с фенилборной кислотой. В результате этого взаимодействия образуется отрицательно заряженный тетраэдрический комплекс. Остаток борной кислоты при включении в полимерную цепь сохраняет способность к образованию заряженных комплексов с 1,2- или 1,3-цис-диолами, в том числе с сахарами, полиолами или гидроксикислотами. Влияние образования данных комплексов на проводящие свойства разработанного сенсорного материала поли(3-АФБК) исследовали с помощью спектроскопии электрохимического импеданса (СЭХИ), которая является одним из самых эффективных, информативных и малодеструктивных методов регистрации проводящих свойств полимеров. Обычно для исследований методом СЭХИ к системе применяют синусоидальные колебания напряжения E различной частоты ω с малой амплитудой E_0 в несколько милливольт:

На выходе регистрируют переменный ток I , совершающий колебания той же частоты ω , но в общем случае смещенный на некоторую разность фаз, получая итоговое сопротивление переменного тока Z на основании закона Ома (см. параграф 3.1, уравнение 11):

$$Z = \frac{E}{I} = Re(Z) + i \cdot Im(Z)$$

Данный метод практически не изменяет исходное состояние системы в ходе развертки при оптимальном выборе постоянного значения потенциала, вблизи которого совершаются колебания напряжения, поскольку амплитуды колебаний обычно не превышает 5 мВ. Кроме того, для некоторых систем, например, проводящих полимеров, из спектров импеданса возможно вычислить сразу несколько электрохимических параметров, таких как сопротивление полимера, емкость двойного электрического слоя, эффективную длину диффузии и прочие величины. Вычисления проводят на основании аппроксимации спектров эквивалентной схемой, описывающей физико-химические процессы, происходящие в системе в ходе протекания переменного тока.

7.1. Спектроскопия электрохимического импеданса проводящих полимеров

Для описания спектров импеданса полимерных пленок в растворах неэлектроактивных электролитов часто используют схемы Рэндлса и ее аналоги. Схема Рэндлса основана на разделении фарадеевского и нефарадеевского токов, что является обоснованным в случае, например, избытка фонового электролита по сравнению с редокс-активными веществами. В таком случае, нефарадеевский ток, протекающий при образовании двойного электрического слоя определяется конденсатором $C_{дс}$, соединенным параллельно с элементами схемы,

описывающими фарадеевский процесс. Для проводящих полимеров такими элементами являются сопротивление полимера R_p на границе полимер | электрод и диффузионный компонент W_0 (Рисунок 8):

Таким образом, элементам эквивалентной схемы в соответствие однозначно сопоставляются физические процессы в системе электрод | пленка полимера | электролит. Для вычисления этих параметров используют аппроксимацию экспериментальных данных теоретической моделью в соответствии с представленной эквивалентной схемой. Спектр импеданса представляет собой набор точек с тремя координатами: мнимая часть, действительная часть, частота. Наиболее часто используется представление спектра в координатах Найквиста – проекция трехмерного спектра на комплексную плоскость (Рисунок 39).

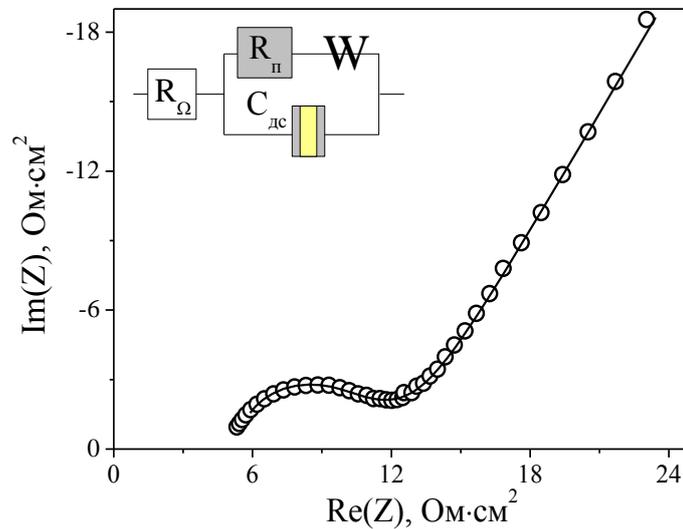


Рисунок 39. Спектры электрохимического импеданса поли(3-АФБК) в фосфатном буфере, $E_{dc} = 0.05$ В: (○) эксперимент; (—) аппроксимация; на вставке: эквивалентная схема.

Ограниченность набора частот и неизбежное наличие систематических и приборных ошибок в экспериментальных данных учитывают, прибегая к методу наименьших квадратов для комплексных значений в трехмерном пространстве с числом параметров, соответствующим элементам эквивалентной схемы. В случае простейшей эквивалентной схемы аппроксимация проводится по шести параметрам (Таблица 1).

Таблица 1. Значения параметров аппроксимации спектра импеданса простейшей эквивалентной схемой (Рисунок 8).

элемент	значение	S_r , %
R_Ω , Ом·см ²	5.4	2
C_{dc} , мкФ·см ⁻²	23	2

R_{Π} , Ом·см ²	4.3	1
W_0-R , Ом·см ²	9.7	3
W_0-T , мс	48	6
W_0-P	0.35	1

Спектры хорошо аппроксимируются с помощью предложенной схемы: стандартные отклонения S_r экспериментальных значений от теоретических не превышают 6 %. Таким образом, применение эквивалентной схемы Рэндлса с диффузионным элементом корректно, а экспериментальные данные спектроскопии электрохимического импеданса можно описать количественно.

В ряде случаев в работе прибегали к использованию элемента постоянной фазы вместо конденсатора как элемента эквивалентной цепи (более общий случай) – например, в случаях необходимости учета неоднородности или неидеальности пленки, слишком большого или малого сопротивления полимера (частотный диапазон прибора недостаточен для регистрации спектра канонического вида) и т.д.

При регистрации спектров электрохимического импеданса важным параметром является выбор потенциала поляризации электрода E_{dc} , относительно которого осуществляются колебания потенциала, прикладываемые к системе. Обращаясь к теоретическим аспектам модели Рэндлса для описания спектров электрохимического импеданса, необходимо отметить, что схема строится на предположении равновесия в системе [91] – и для идеальной системы потенциал поляризации электрода должен быть равен потенциалу редокс-перехода, когда токи прямого и обратного электрохимических процессов находятся в равновесии. Соответственно, при удалении от потенциала редокс-перехода увеличивается ток окисления или восстановления, протекающего через систему, что закономерно приводит к увеличению сопротивления полимера. Было показано [92], что (уравнение 17):

$$R_{\Pi} = - \frac{RT}{n^2 F^2} \frac{1}{\alpha \bar{k} c_O + (\alpha - 1) \bar{k} c_R} \quad (17)$$

и R_{Π} имеет минимум $E_{\text{мин}}$ на зависимости от потенциала вблизи потенциала E_0 (уравнение 18):

$$E_{\text{мин}} = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{\alpha}{1 - \alpha} \quad (18)$$

а для процессов с коэффициентом переноса $\alpha = 0.5$ потенциал совпадает с потенциалом E_0 .

Рассматривая проводимость проводящего полимера, важно также соотносить степень допирования полимера при изменении потенциала. При повышении pH «окно проводимости» полимера сужается и смещается в катодную область потенциалов. В то же время, максимальная проводимость для полианилина и его производных наблюдается, как известно, для частично окисленного состояния [28]. Так, например, в фосфатном буфере при pH 7.0 диапазон потенциалов E_{dc} для поли(3-АФБК), при которых наблюдается характерная форма спектров и

которые можно описать аналогом схемы Рэндлса с диффузионным элементом, составляет диапазон 0–100 мВ (Рисунок 40).

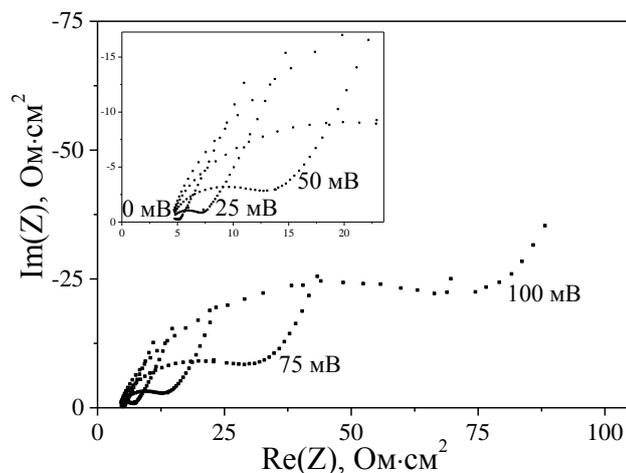


Рисунок 40. Спектры электрохимического импеданса поли(3-АФБК) в фосфатном буфере рН 7.0 в координатах Найквиста при различных потенциалах E_{dc} .

Спектры импеданса в зависимости от потенциала поляризации электрода E_{dc} , как и предсказано, демонстрируют уменьшение диаметра полуокружности (связанного с сопротивлением или проводимостью полимера) в области потенциалов, близких к редокс-переходу лейкоэмеральдин/эмеральдин. Несмотря на то, что наилучшая проводимость наблюдается при 0 и 25 мВ, оптимальным значением является потенциал 50 мВ: при меньших потенциалах E_{dc} надежность определения значения R_p понижается из-за малой абсолютной величины сопротивления полимера.

7.2. Изменение сопротивления поли(3-АФБК) в результате специфических и неспецифических взаимодействий

Ввиду возможности допирования полимера при его связывании с диолом [93], интерес представляет изменение физико-химических параметров системы, которые, как было показано выше, можно количественно определить путем аппроксимации экспериментальных данных спектроскопии электрохимического импеданса. В виду того, что концепция разрабатываемой системы детектирования *Penicillium chrysogenum* заключается в применении боронат-замещенного полимера, обладающего сродством к основным компонентам клеточной стенки микроорганизма – олиго- и полисахаридам, содержащим 1,2- и 1,3-*цис*-диольные группы, в настоящей работе будет использован ряд диол-содержащих соединений (глюкоза, галактоза, сорбитол и лактат). Рассмотрим поведение спектра электрохимического импеданса при добавлении в раствор глюкозы.

Синтез полимерной пленки осуществляется при рН значительно меньших (< 2), чем рН исследуемых растворов, таким образом, для установления равновесия в средах с нейтральным рН модифицированные поли(3-АФБК) электроды выдерживали в соответствующих буферных растворах в течение нескольких часов перед началом эксперимента. В ходе окислительной полимеризации 3-АФБК, описанной в настоящей работе, гидроксильные группы борной кислоты замещаются фторид-ионом (Рисунок 27). Согласно константам равновесия для фенолборных кислот, приведенным в работе [94], в условиях синтеза (0.2 М NaF, рН ~ 1.72), группы $-B(OH)_2$ переходят в $-BF_3^-$ практически количественно. В нейтральных средах $-BF_3^-$ гидролизует, а соотношение групп $-B(OH)_2$ и $-B(OH)_3^-$ зависит от рН среды и pK_a полимера.

Спектры электрохимического импеданса полимерных пленок 3-АФБК, предварительно выдержанных в буферах соответствующих рН, демонстрируют высокую стабильность (не менее трех последовательно зарегистрированных спектров при данных условиях совпадают). При добавлении глюкозы в буферный раствор спектр импеданса изменяется. Диаметр высокочастотной полуокружности в координатах Найквиста уменьшается, что свидетельствует об уменьшении сопротивления полимера R_p (Рисунок 41, ■). При замене буфера на несодержащий глюкозу наблюдается возврат спектра к первоначальному виду (Рисунок 41, Δ). Это означает, что отклик системы обратим, а сенсорный материал может быть использован многократно. Незначительное увеличение сопротивления полимера после замены буфера может быть связано с частичной деградацией или дедопированием полимера в ходе эксперимента.

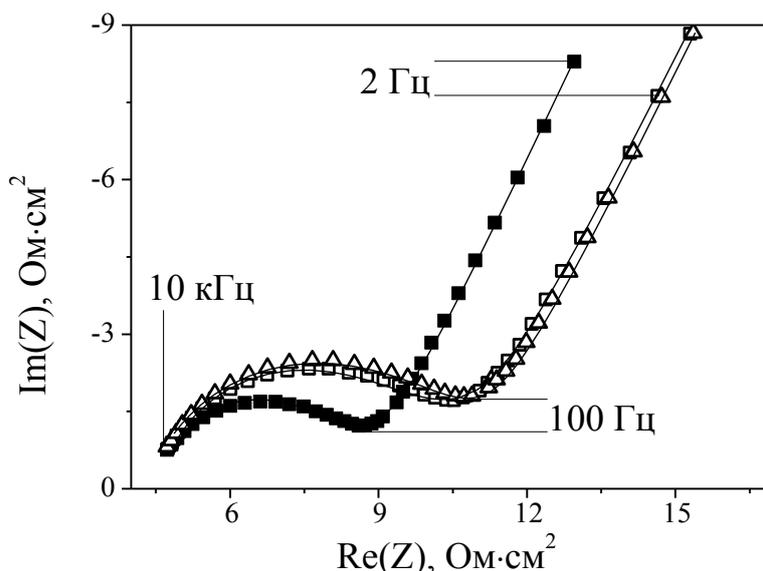


Рисунок 41. Спектры электрохимического импеданса модифицированного торцевого электрода в фосфатном буфере рН 7.0 при $E_{dc} = 50$ мВ: (□) в отсутствие глюкозы, (■) в присутствии 50 мМ глюкозы, (Δ) при замене раствора на несодержащий глюкозу; (—) теоретические кривые описания спектров эквивалентной схемой.

В результате описания приведенных спектров, согласно модели Рэндлса с диффузионным элементом, получены значения параметров аппроксимации, приведенные ниже (Таблица 2). Элементы R_{Ω} , $C_{дс}$, $R_{п}$ имеют по одному параметру аппроксимации (см. уравнения 12 и 13), тогда как диффузионный элемент W_0 (см. уравнение 16) определяется 3 параметрами.

Таблица 2. Значения параметров модели Рэндлса с диффузионным элементом для описания спектров электрохимического импеданса (Рисунок 41) до и после добавления глюкозы, а также после замены буфера на несодержащий глюкозу.

элемент	0 мМ глюкозы		50 мМ глюкозы		0 мМ глюкозы (замена буфера)	
	значение	S_r , %	значение	S_r , %	значение	S_r , %
R_{Ω} , Ом см ²	5.4	2	5.3	3	5.4	2
$C_{дс}$, мкФ см ⁻²	23	2	22	2	23	3
$R_{п}$, Ом см ²	4.3	1	3.1	2	4.6	1
W_0-R Ом см ²	9.7	4	7.0	4	9.3	5
W_0-T , мс	48	6	43	6	48	7
W_0-P	0.35	1	0.35	1	0.36	1

Наиболее значимо в результате связывания остатка борной кислоты поли(3-АФБК) с глюкозой изменяется сопротивление полимера $R_{п}$ (почти в 1.5 раза). Разницу величин сопротивлений $R_{п}$ из первоначального спектра в исходном буфере и спектра в присутствии глюкозы предложено рассматривать в качестве аналитического отклика.

Подобное увеличение проводимости полимера при добавлении диол-содержащего соединения можно объяснить, проведя аналогию с допированием полианилина при введении в бензольное кольцо ионогенных групп. Образующийся анионный комплекс локализует отрицательный заряд в цепи полимера, что приводит к повышению проводимости поли(3-АФБК). Итак, специфические взаимодействия глюкозы с полимером приводят к увеличению проводимости поли(3-АФБК).

В работе исследованы изменения проводящих свойств поли(3-АФБК) в присутствии соединения, не способного к специфическому взаимодействию с борнокислой группой. Например, с ацетатом натрия циклический эфир образовываться не может, поскольку одной ОН-группы недостаточно для связывания с борными кислотами, наиболее энергетически выгодно образовывать 5- и 6-членный цикл, для которых необходимо наличие 1,2- или 1,3-*цис*-диольного фрагмента.

Спектры электрохимического импеданса модифицированных электродов были зарегистрированы до и после добавления ацетата натрия в фосфатный буфер, находящийся в электрохимической ячейке (Рисунок 42).

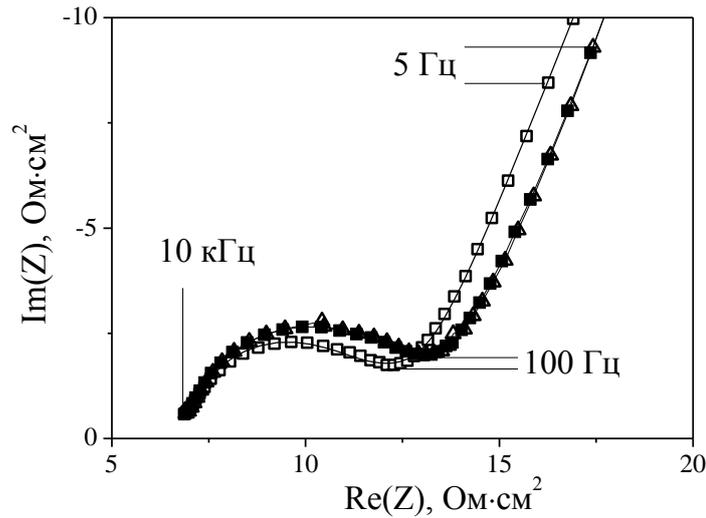


Рисунок 42. Спектры электрохимического импеданса поли(3-АФБК) на поверхности стеклоуглеродного электрода в координатах Найквиста, последовательно зарегистрированные в фосфатном буфере с рН 7.0 при $E_{dc} = 50$ мВ (\square) в отсутствие ацетата натрия, (\blacksquare) в присутствии 15 мМ ацетата натрия, (Δ) при замене раствора на несодержащий ацетат натрия.

Диаметр полуокружности, соответствующий высокочастотной области спектра, при добавлении ацетата увеличивается, по результатам аппроксимации спектров эквивалентной схемой сопротивление полимера увеличивается примерно на 20%. После замены буфера на несодержащий ацетат, сопротивление по-прежнему остается выше исходного. Итак, неспецифические взаимодействия приводят к увеличению сопротивления полимера, что противоположно эффекту при специфическом связывании. Кроме того, в присутствии глюкозы сопротивление незамещенного полианилина также увеличивается, причем необратимо (Рисунок 43). Этот результат указывает на то, что именно функциональная группа борной кислоты обеспечивает эффект увеличения проводимости полимера в присутствии соединений, содержащих 1,2- или 1,3-*цис*-диольные группы.

В работах других групп результатом связывания чувствительного слоя на основе фенилборной кислоты с полиолами было увеличение сопротивления материала [47, 95], что не позволяло дифференцировать отклик системы в результате взаимодействия с определяемым объектом на фоне деградации чувствительного слоя или неспецифического связывания.

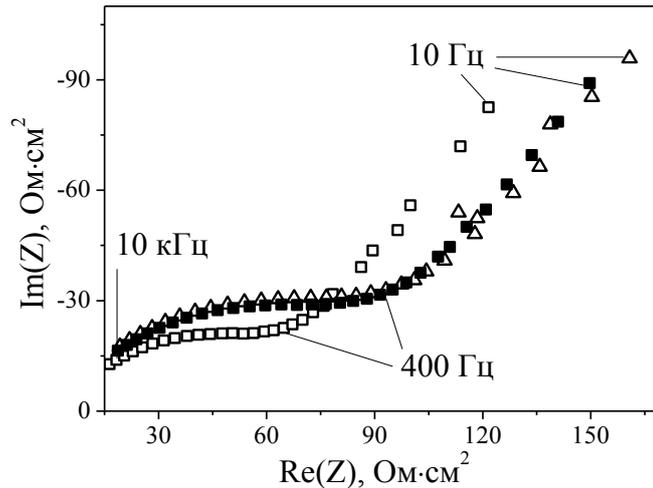


Рисунок 43. Спектры электрохимического импеданса полианилина на поверхности стеклоуглеродного электрода в координатах Найквиста, последовательно зарегистрированные в фосфатном буфере с pH 7.0, $E_{dc} = 50$ мВ (\square) в отсутствие глюкозы, (\blacksquare) в присутствии 50 мМ глюкозы, (\triangle) при замене раствора на несодержащий глюкозу.

Таким образом, разработанный материал позволяет дифференцировать специфические и неспецифические процессы в отличие от большинства кондукто- и импедиметрических систем. Обратимое изменение сопротивления полимера в ходе связывания с аналитом, определяемое из спектров электрохимического импеданса, предложено использовать в качестве аналитического отклика системы.

7.3. Оптимизация импедиметрического отклика в зависимости от числа циклов осаждения поли(3-АФБК)

Для разрабатываемого сенсора было оптимизировано количество осаждаемого полимера. Сопротивление полимерной пленки на поверхности торцевого стеклоуглеродного электрода определяется, в том числе, толщиной чувствительного слоя. Так, при увеличении числа циклов электрополимеризации (2–15) система демонстрирует увеличение сопротивления полимера. При рассмотрении откликов на глюкозу (50 мМ) для торцевых электродов, модифицированных поли(3-АФБК) в течение различного числа циклов электрополимеризации, и их обратимости, можно сделать следующие выводы. Относительное повышение проводимости полимерной пленки при добавлении аналита с числом циклов имеет тенденцию к уменьшению (Рисунок 44).

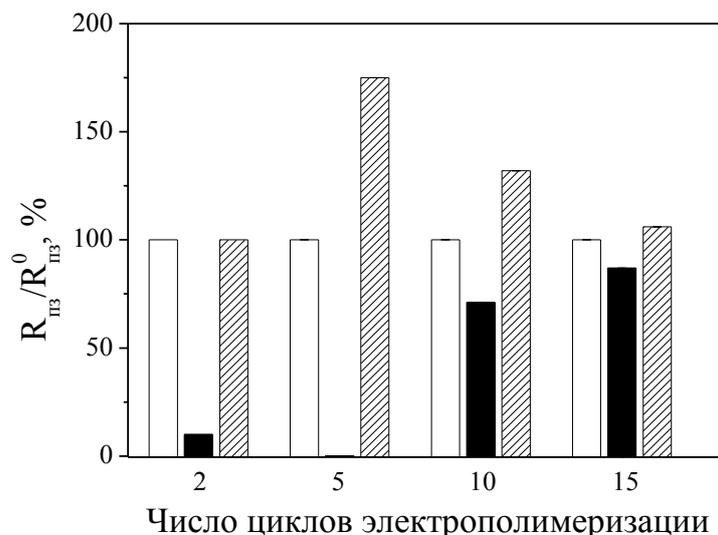


Рисунок 44. Импедиметрический отклик системы и его обратимость в зависимости от числа циклов электрополимеризации 3-АФБК на поверхности торцевого стеклоуглеродного электрода в фосфатном буфере с рН 7.0 при $E_{dc} = 0.05$ В.

Однако для 2 и 5 циклов уменьшение сопротивление полимера приводит к низкой точности измерения R из данных импеданса. В то же время для 15 циклов наблюдается наименьший прирост проводимости при добавлении глюкозы. На основании приведенных диаграмм для дальнейших экспериментов было предложено использовать электроды, модифицированные в течение 10 циклов электрополимеризации 3-АФБК, что позволит регистрировать изменение сопротивления полимера в широком диапазоне концентраций с высокой чувствительностью.

7.4. Определение $K_{набл}$ для взаимодействия глюкозы с поли(3-АФБК)

Последовательно регистрируя спектры электрохимического импеданса полимера 3-АФБК на поверхности торцевого электрода в буферном растворе с известным рН при различных концентрациях диол-содержащего соединения в нем (Рисунок 45), можно затем определить сопротивление полимера (параметр в аналоге модели Рэндлса с диффузионным элементом) для каждого из спектров и построить соответствующие концентрационные зависимости для $R_{п}$ (Рисунок 46).

Рассмотрим равновесие между субстратом и лигандом (в нашем случае, между полимером 3-АФБК (B) и растворенным соединением (S), реагирующими в соотношении 1:1 и образующими комплекс BS (уравнение 19):



Наблюдаемая константа связывания или ассоциации для данной реакции (уравнение 20):

$$K_{\text{набл}} = \frac{[BS]}{[B][S]} \quad (20)$$

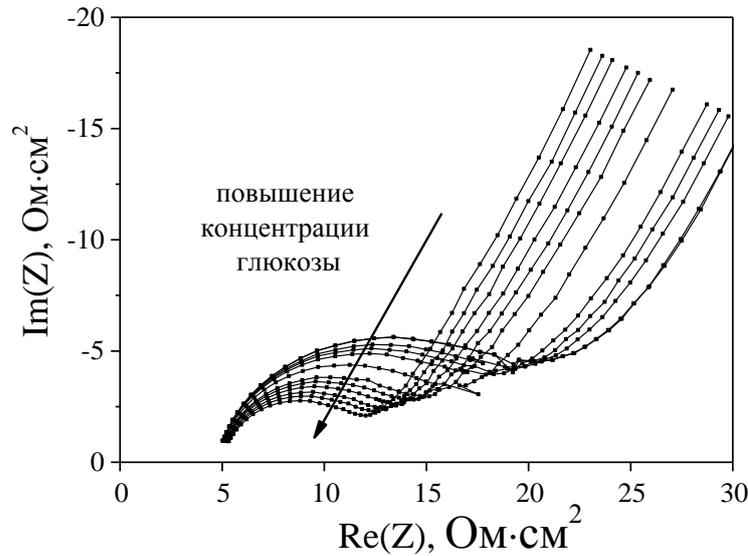


Рисунок 45. Изменение спектров электрохимического импеданса для пленки поли(3-АФБК) на поверхности торцевого стеклоуглеродного электрода при повышении концентрации глюкозы.

Наиболее распространенный метод определения констант равновесия реакций комплексообразования заключается в измерении тех или иных физических параметров при фиксации концентрации одного из компонентов и изменении концентрации другого. В общем случае, константа равновесия может быть определена из концентрационной зависимости любого физическо-химического свойства системы, пропорционального концентрации одного из ее компонентов [17]. Предположим, что параметр системы X линейно зависит от $[B]$ с коэффициентом пропорциональности x_B , являющимся удельной величиной (уравнение 21):

$$X = x_B[B] \quad (21)$$

Наблюдаемая величина X ($X_{\text{набл}}$) аддитивно учитывает вклады всех компонентов системы. Обозначим суммарные концентрации диола и полимера, как $[S]_{\Sigma}$ и $[B]_{\Sigma}$, соответственно. Для суммарных концентраций уравнения баланса масс получаем (уравнения 22 и 23):

$$[S]_{\Sigma} = [S] + [BS] \quad (22)$$

$$[B]_{\Sigma} = [B] + [BS] \quad (23)$$

Как было сказано выше, в качестве наблюдаемого физического параметра в настоящей системе предложено использовать сопротивление полимера $R_{\text{п}}$ пленки проводящего полимера на поверхности электрода. Соответственно, вклад в $X_{\text{набл}}$ ($R_{\text{п}}$) будут вносить компоненты системы $[B]$ и $[BS]$. Компонент S не влияет на общий параметр $X_{\text{набл}}$, поскольку в свободной форме не оказывает влияния на $R_{\text{п}}$ и потому $x_S = 0$. В итоге получим (уравнение 24):

$$R_{\pi} = x_B[B] + x_{BS}[BS] \quad (24)$$

Обычно концентрация вещества S значительно выше BS, т.е. $[BS] \ll [S]_{\Sigma}$, и можно считать $[S]_{\Sigma}=[S]$. Из уравнений 20 и 23 получим, что $[BS]=K_{\text{набл}}[S][B]_{\Sigma}/(1+K_{\text{набл}}[S])$ и $[B]=[B]_{\Sigma}/(1+K_{\text{набл}}[S])$ и после подстановки в уравнение 24 выразим R_{π} (уравнение 25):

$$R_{\pi} = \frac{(x_B + x_{BS}K_{\text{набл}}[S])[B]_{\Sigma}}{1 + K_{\text{набл}}[S]} \quad (25)$$

тогда применительно к изменению сопротивления получаем (уравнение 26):

$$R_{\pi}([S]) = \frac{R_{\pi,0} + R_{\pi,\infty}K_{\text{набл}}[S]}{1 + K_{\text{набл}}[S]} \quad (26)$$

где $R_{\pi,0}$ – сопротивление полимера при данных условиях в отсутствии растворенного соединения S, $R_{\pi,\infty}$ – сопротивление полимерной пленки, полностью перешедшей в связанное состояние при данных условиях, $K_{\text{набл}}$ – наблюдаемая константа связывания полимера с диолом. Подобная зависимость R_{π} от S имеет вид кривой с насыщением при высоких концентрациях [S] и линейна при низких.

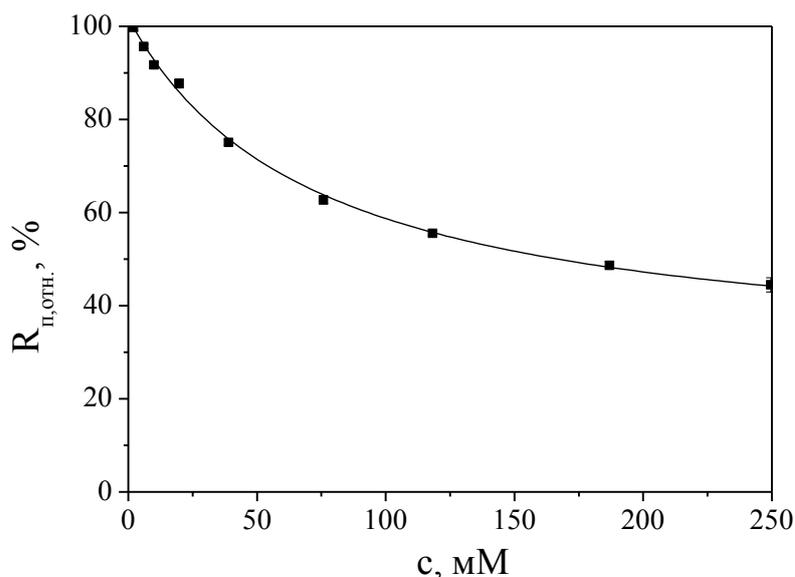


Рисунок 46. (■) Значения сопротивления полимера R_{π} , определенного из спектров электрохимического импеданса (Рисунок 45), от концентрации глюкозы в растворе; (—) аппроксимация градуировочной зависимости уравнением 26.

Аппроксимация зависимости экспериментально определенного сопротивления полимера от концентрации диола в растворе уравнением вида (26) приведена выше (Рисунок 46). Полученное значение (доверительный интервал рассчитан для $n=3$, $P=0.95$) $K_{\text{набл}} = 20 \pm 2 \text{ M}^{-1}$. Погрешности аппроксимации экспериментальных данных теоретической кривой не превышают нескольких процентов, что позволяет сделать вывод о целесообразности использования предложенной модели их описания.

Уравнение 26, как уже было отмечено, выполняется только в случае избытка лиганда (диола) по сравнению с количеством центров связывания полимера и не зависит от их числа. Таким образом, для корректного использования приведенного уравнения необходимо выполнение условия независимости эффективности связывания от количества полимера на поверхности электрода (Рисунок 47). Для этого были определены наблюдаемые константы связывания для полимера, выращенного в течение 7-13 циклов, и было показано, что константа связывания не зависит от числа циклов электрополимеризации.

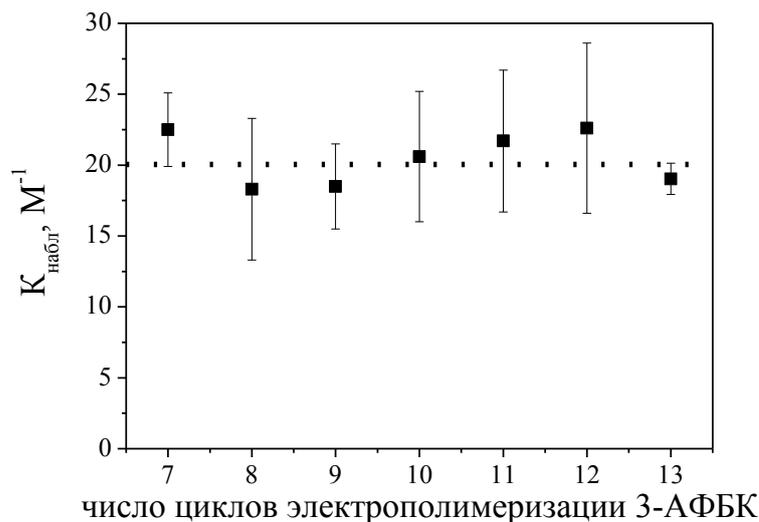


Рисунок 47. Зависимость наблюдаемой константы связывания поли(3-АФБК) с глюкозой от числа циклов электрополимеризации, фосфатный буфер с рН 7.0, $E_{\text{dc}} = 0.05 \text{ В}$, ($n=3$, $P=0.95$).

Обращаясь к зависимости величины отклика R_p от числа циклов электрополимеризации (Рисунок 44), можно предположить, что только поверхностный диффузионно доступный для аналита слой полимера эффективно задействован в комплексообразовании. Таким образом, эффективность связывания при данных условиях, определяемая наблюдаемой константой связывания, не зависит от числа циклов электрополимеризации поли(3-АФБК).

7.5. Влияние концентрации фторида в ростовом растворе на $K_{\text{набл}}$

Влияние содержания фторида на рост поли(3-АФБК) было рассмотрено выше и оптимальной признана концентрация 0.2 М. Однако связывание фторида борной кислотой может также служить аналогом получения молекулярных отпечатков. Как было показано выше, взаимодействие фенилборной кислоты и диольной группы приводит к образованию заряженного соединения, в котором атом бора находится в тетраэдрической конфигурации (Рисунок 1). В присутствии избытка фторид-иона атом бора также будет приобретать преимущественно тетраэдрическую конфигурацию (Рисунок 27). Таким образом, в итоговой

полимерной окружение атома бора будет фактически соответствовать его тетраэдрической конфигурации, близкой к тому состоянию, в котором бор связан с диольной группой.

В ходе данного раздела было проведено исследование влияния содержания фторид-иона в ростовом растворе на наблюдаемую константу связывания с глюкозой. Содержания фторид-иона были взяты в диапазоне 0.12 до 0.28 М с шагом 0.04 М – вблизи оптимального значения, полученного для ростового раствора ранее, а именно 0.2 М. Полученная зависимость $K_{\text{набл}}$ от концентрации фторида натрия в ростовом растворе представлена ниже (Рисунок 48).

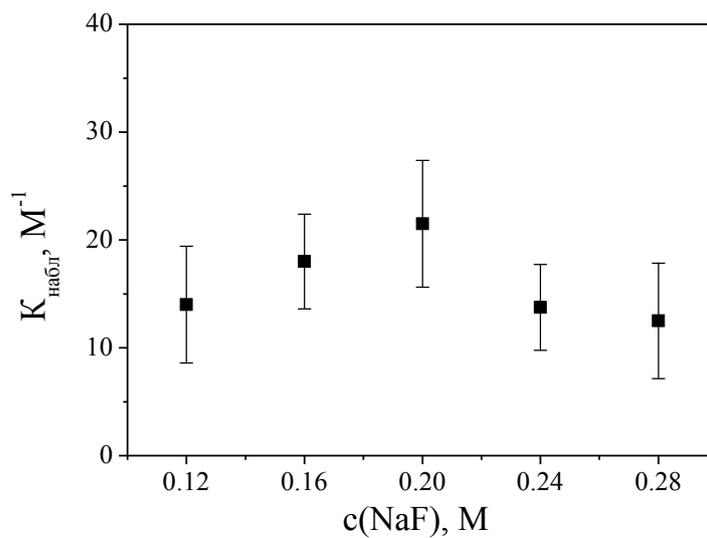


Рисунок 48. Зависимость наблюдаемой константы от содержания фторида в ростовом растворе, ($n=3$, $P=0.95$).

Зависимость имеет вид кривой с максимумом, совпадающим с оптимальным значением концентрации фторида, полученного в ходе подбора оптимальных условий для роста замещенного проводящего полианилина. Убывание величины $K_{\text{набл}}$ с уменьшением концентрации фторида может быть связано с уменьшением доли формы BF_3^- , таким образом, эффект темплатирования ослабевает, и для связывания глюкозы с полимером необходимо преодоление стерических затруднений окружения атома бора в связи с его переходом из плоской тригональной в тетраэдрическую конфигурацию. Убывание величины $K_{\text{набл}}$ при концентрациях выше 0.2 М предположительно обусловлено тем, что с ростом концентрации фторида растет также pH ростового раствора, что отрицательно сказывается на проводимости образующегося полимера. Уменьшение проводимости, в свою очередь, приводит к уменьшению отклика и к понижению кажущейся константы связывания $K_{\text{набл}}$.

7.6. Зависимость $K_{\text{набл}}$ от времени гальваностатического осаждения

Время гальваностатического осаждения позволяет регулировать толщину получаемого полимера. На основании зависимости наблюдаемой константы связывания было сделано предположение о независимости $K_{\text{набл}}$ от числа циклов электрополимеризации по причине

доступности только поверхностного слоя полимера для молекул, способных связываться с остатком борной кислоты. Однако зависимость от числа циклов была проверена для 7 циклов и более, что не позволяет утверждать о независимости $K_{\text{набл}}$ от числа циклов для более тонких пленок. Следуя приведенной выше логике, для гальваностатического метода осаждения было рассмотрено влияние толщины пленки на эффективность связывания с глюкозой. Для этого была построена зависимость константы связывания $K_{\text{набл}}$ глюкозы с полимером при pH 7.0 от времени осаждения (Рисунок 49).

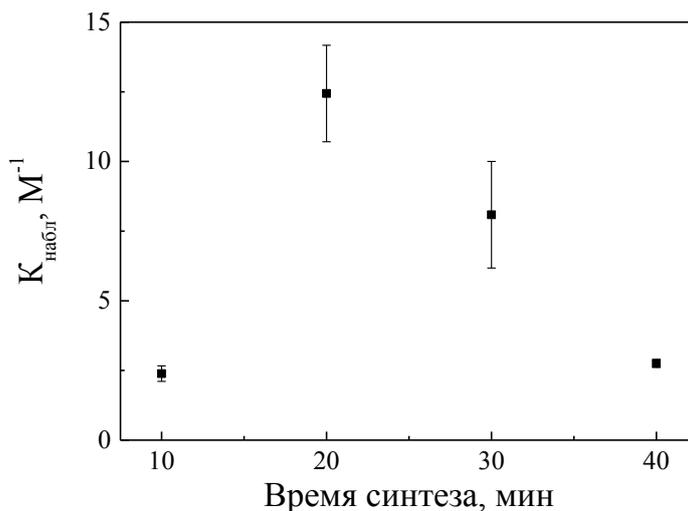


Рисунок 49. Зависимость наблюдаемой константы связывания поли(3-АФБК) с глюкозой от времени осаждения при плотности тока 0.2 mA/cm^2 .

Зависимость имеет вид кривой с максимумом значения $K_{\text{набл}} = 12.5 \text{ M}^{-1}$ при 20 минутах осаждения из раствора, оптимизированного для потенциодинамического и гальваностатического методов. При меньшем времени осаждения и более тонкой пленке полученного полимера сопротивление полимера изменяется не так значительно по относительной величине, как для более толстых пленок. Подобный же вывод можно сделать из данных об изменении $R_{\text{п}}$ с числом циклов потенциодинамического осаждения (Рисунок 44), где для малого числа циклов (т.е. тонких пленок) относительное изменение $R_{\text{п}}$ по сравнению с более толстыми пленками незначительно. Для времен осаждения больше 20 минут снова наблюдается ухудшение связывания. Это может быть связано с ухудшением проводящих свойств из-за переокисления полимера в процессе роста и увеличения сопротивления полимера с толщиной пленки.

Если учесть плотности тока и площади электрода, то для 20 минут осаждения получим итоговый протекший заряд $\approx 9 \text{ мКл}$. Вычисления для оптимального потенциодинамического осаждения в течение 10 циклов дают суммарный заряд, потраченный на окислительные процессы в условиях роста, также примерно равный 9 мКл . Однако, максимальное значение

$K_{\text{набл}}$ для гальваностатического метода 13 M^{-1} , в то время как в потенциодинамическом - 20 M^{-1} . При этом время осаждения в последнем случае составляет менее 10 минут против 20 минут в гальваностатическом. Таким образом, потенциодинамическое осаждение оказывается предпочтительнее.

7.7. Поведение $K_{\text{набл}}$ для взаимодействия различных веществ с поли(3-АФБК)

Равновесные концентрации диола и борной кислоты в свободном и связанном виде, как было показано выше, зависят от кислотности среды (см. параграф 1.1, уравнения 2-4). В результате связывания диола с борной кислотой образуется заряженный комплекс и протон (Рисунок 1), что указывает на рН-зависимость равновесий в системе. Для фенолборных кислот рН-зависимости связывания с различными молекулами, содержащими диольные группы, досконально изучены, тогда как для полимера таких данных нет. В настоящей работе была исследована рН-зависимость наблюдаемой константы связывания поли(3-АФБК) с соединениями, имеющими диольные группы, с различными pK_a^D . Расчет $K_{\text{набл}}$ проводился из значений сопротивления полимера при различных концентрациях диол-содержащего соединения (см. раздел 7.4). Для исследования рН-зависимостей был выбран диапазон рН от 5.4 до 7.4. Выбор диапазона рН буферных растворов объясняется, в том числе, следующими фактами. При высоких значениях рН (> 7.4) полимер склонен к дедопированию, что проявляется в нестабильности спектров электрохимического импеданса при фиксированном значении потенциала E_{dc} , сопровождающейся ростом сопротивления полимера. При слабых кислотных рН (< 5.4) проводимость полимера становится слишком высокой, что не позволяет достоверно рассчитывать сопротивление полимера и его изменения при связывании полимера с диолами. Итак, получены следующие зависимости наблюдаемых констант связывания поли(3-АФБК) с диолом в зависимости от рН (Рисунок 50).

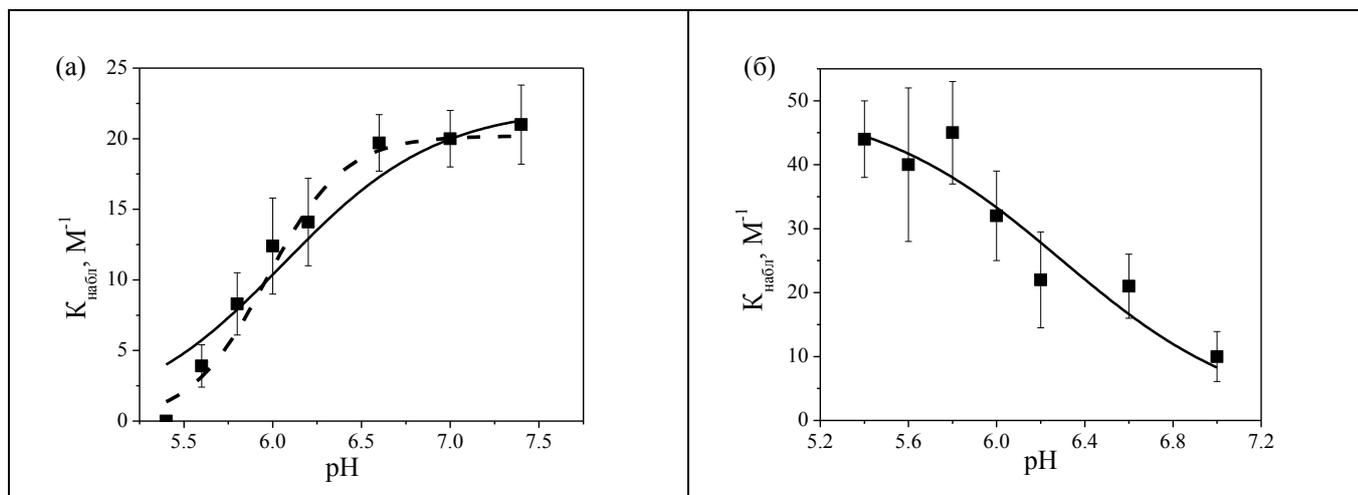


Рисунок 50. рН-зависимости наблюдаемых констант для (а) глюкозы, (б) лактата: (■) экспериментально полученные данные; (—, - -) аппроксимация теоретически предсказанными кривыми.

Зависимости $K_{\text{набл}}$ от рН раствора, как следует из уравнения 8, должны иметь вид кривых с максимумом, положение которого определяется константой кислотной диссоциации диольной группы K_a^D и борнокислого заместителя основной цепи полианилина K_a^B . В случае большой разницы между pK_a диол-содержащего соединения и pK_a^B поли(3-аминофенилборной кислоты) $K_{\text{набл}}$ практически не изменяется при рН, близких к таковому для $K_{\text{набл}}^{\text{max}}$, экстремум не выражен. Для соединений с pK_a выше 12, как, например, глюкозы, зависимость выглядит подобно кривой с насыщением. Из уравнения 8 следует, что при $K_a^D \ll [H^+]$ (для глюкозы – при $pH < 11$) зависимость $K_{\text{набл}}$ сводится к следующему (уравнения 27 и 28):

$$K_{\text{набл}} = \frac{\beta_{11-1}}{K_a^B + [H^+]} \quad (27)$$

$$\lim_{[H^+] \rightarrow 0} K_{\text{набл}} = \beta_{11-1} / K_a^B = K_{\text{тетр}} \quad (28)$$

Для соединений с pK_a выше 12 степень депротонирования при рН ниже 7.5 незначительна, поэтому рН-профиль приобретает форму возрастающей сигмоидной кривой с точкой перегиба при рН равном pK_a^B . В свою очередь, α -гидроксикислоты с pK_a ниже 4 полностью депротонированы во всем диапазоне рассматриваемых рН, а $K_{\text{набл}}$ должна уменьшаться с ростом рН согласно уравнению 8. Действительно, экспериментально полученные константы связывания, определенные из данных СЭХИ, демонстрируют тенденцию к увеличению $K_{\text{набл}}$ с ростом рН для сахаров с высокими K_a^D и понижению $K_{\text{набл}}$ с ростом рН для α -гидроксикислоты. Рассмотрим процесс комплексообразования более подробно для каждого из соединений.

Предположим, что остаток борной кислоты в полимерной пленке находится как в тригональном (в виде $-B(OH)_2$), так и в тетраэдрическом окружении (в виде $-B(OH)_3^-$). Комплексообразование полимера с диолом протекает как по пути образования тетраэдрического эфирного комплекса, так и тригонального (Рисунок 51). Для наблюдаемой константы получаем (уравнение 29):

$$K_{\text{набл}} = \frac{[ArB(O)_2D(OH)^-] + [ArB(O)_2D]}{[D]_{\Sigma}[B]_{\Sigma}} \quad (29)$$

С учетом вышесказанного, а также используя уравнения 2, 3 и 5 и условие нейтральности среды ($[D(OH)O^-] = 0$), получаем (уравнение 30):

$$K_{\text{набл}} = \frac{K_{\text{тетр}} + K_{\text{триг}}[H^+]/K_a^B}{1 + [H^+]/K_a^B} \quad (30)$$

Зависимость $K_{\text{набл}}(pH)$ для глюкозы имеет более выраженный рост константы с увеличением рН, чем это предсказывает уравнение 30 (Рисунок 50а).

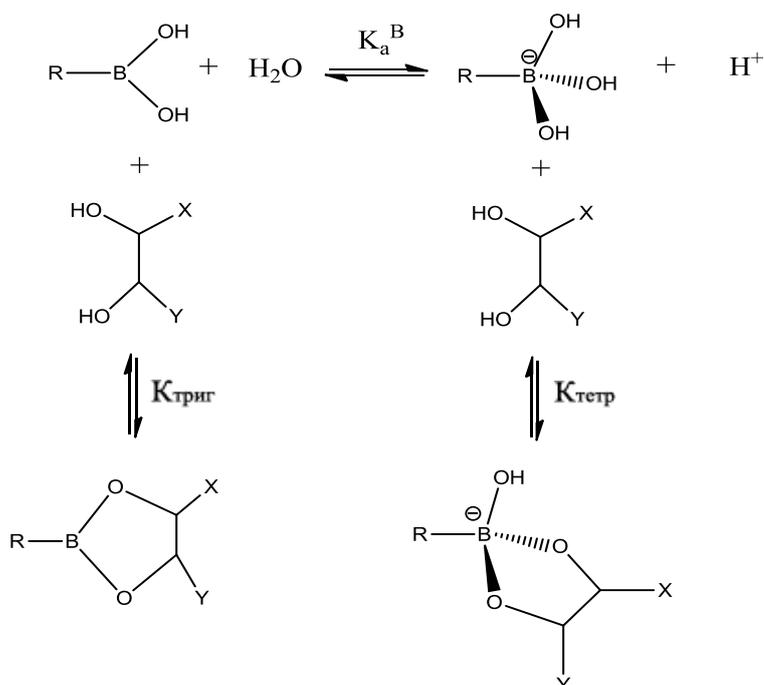


Рисунок 51. Схема протекания реакции между поли(3-АФБК) и 1,2-*цис*-дио́лом.

Намного лучше экспериментальные точки можно описать зависимостью согласно выражению, аналогичному уравнению 30 (уравнение 31, Рисунок 50а, --):

$$K_{\text{набл}} = \frac{K_{\text{тетр}} + K_{\text{триг}}[H^+]^2/K_a'^B}{1 + [H^+]^2/K_a'^B} \quad (31)$$

Пропорциональность квадрату $[H^+]$ может быть обусловлена образованием бис-боронатного комплекса (Рисунок 52)

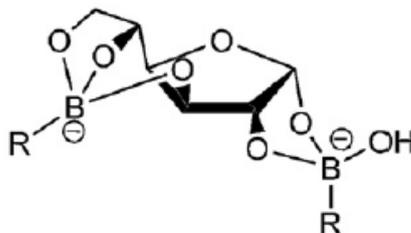


Рисунок 52. Бис-боронатный комплекс глюкозы.

который, возможно, реализуется для глюкозы в фуранозной форме. В таком случае, два остатка борной кислоты одновременно связываются с молекулой глюкозы, образуя дианионный комплекс (с выделением двух протонов). $pK_a'^B$ отражает депротонирование двух групп и должна превышать pK_a^B примерно в 2 раза, что и наблюдается при аппроксимации $K_{\text{набл}}(pH)$ для глюкозы уравнением 31: $pK_a'^B = 11.9 \pm 0.1$, $K_{\text{тетр}} = 20 \pm 2 \text{ M}^{-1}$ и $K_{\text{триг}} = 0$.

В случае молочной кислоты ($pK_a = 3.86$), при рассматриваемых значениях pH она полностью депротонирована и вступает во взаимодействие с остатком борной кислоты в виде аниона, образуя тетраэдрический анионный эфирный комплекс с константой равновесия $K_{\text{тетр}}'$ (Рисунок 53):

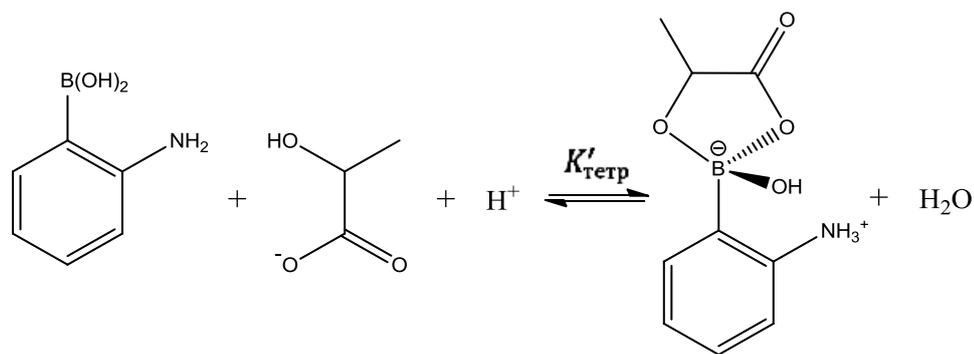


Рисунок 53. Схема реакции связывания аминофенилборной кислоты и лактата.

Наблюдаемая константа комплексообразования приобретает вид (уравнение 32):

$$K_{\text{набл}} = \frac{K'_{\text{тетр}} [H^+] / K_a^B}{1 + [H^+] / K_a^B} \quad (32)$$

Приведенная рН-зависимость $K_{\text{набл}}$ для лактата согласуется с уравнением 32, поскольку при понижении $[H^+]$ наблюдаемая константа связывания уменьшается (Рисунок 50б).

Зависимости $R_{\text{п}}$ полимера 3-АФБК от концентрации диол-содержащего соединения при оптимальном для связывания рН (7.4 – для глюкозы, галактозы и сорбитола, 5.8 – для лактата) приведены ниже (Рисунок 54).

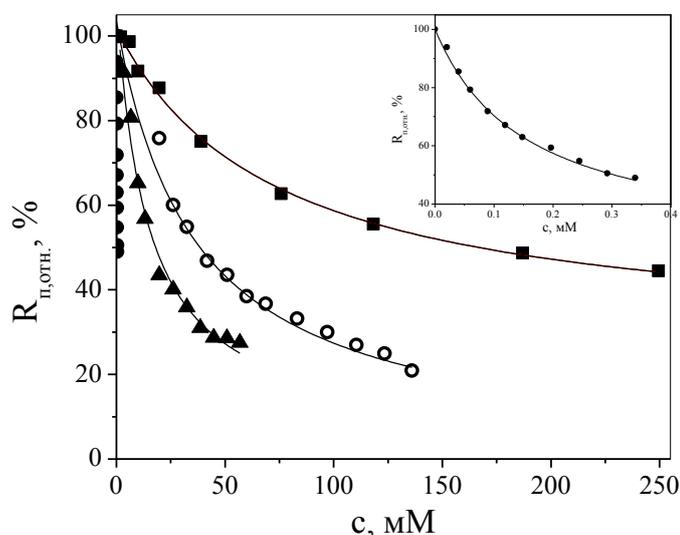


Рисунок 54. Зависимости сопротивления поли(3-АФБК) от концентрации диола, для глюкозы (■), лактата (○) галактозы (▲), сорбитола (●, на вставке); и (–) их аппроксимация теоретическими кривыми согласно уравнению 26.

Из данных аппроксимации спектров импеданса и градуировочных зависимостей были определены аналитические характеристики сенсорного материала поли(3-АФБК). Диапазоны определяемых содержаний составляют (в мМ): для глюкозы - от 6 до 250, для галактозы - от 2 до 50, для сорбитола – от 0.02 до 0.34, для лактата - от 2 до 100. Пределы обнаружения: глюкозы – 3 мМ, лактата – 1 мМ, галактозы – 1 мМ, сорбитола – 0.01 мМ.

Указанные в литературе значения наблюдаемых констант связывания различных соединений возрастают в ряду глюкоза < галактоза < сорбитол [20]. При сравнении $K_{\text{набл}}$ для лактата стоит ожидать большего значения, чем для глюкозы. Это связано с тем, что глюкоза в растворе находится в основном в циклической форме, конформационная и диффузионная подвижность которой значительно меньше, чем для лактата, что затрудняет образование циклического эфира глюкозы с борнокислой группой. И действительно, максимально возможная наблюдаемая константа связывания лактата с фенилборной кислотой выше таковой для глюкозы [18].

Величины $K_{\text{набл}}$, рассчитанные из данных СЭХИ для различных соединений с поли(3-аминофенилборной кислотой), таковы (в M^{-1} , доверительный интервал рассчитан для $n=3$, $P=0.95$): для глюкозы - 20 ± 2 , для лактата - 45 ± 3 , для галактозы - 100 ± 15 , для сорбитола - 6500 ± 500 . Как видно, $K_{\text{набл}}$ возрастают в ряду глюкоза < лактат < галактоза < сорбитол, что соответствует возрастанию наблюдаемых констант связывания данных соединений со свободной фенилборной кислотой.

Итак, изучено изменение сопротивления поли(3-АФБК) в присутствии различных соединений. В случае веществ, образующих с борнокислой группой полимера заряженный комплекс (глюкоза, галактоза, сорбитол, лактат), наблюдается понижение сопротивления полимера (Рисунок 54). В случае, если вещество не содержит 1,2- и или 1,3-*цис*-диольного фрагмента, как например, в молекуле ацетата, специфического связывания вещества в заряженный комплекс не происходит и наблюдается увеличение сопротивления полимера (Рисунок 42). Тот факт, что изменение сопротивления связано с борнокислым заместителем, подтверждает также то, что в случае с незамещенным полианилином сопротивление полимера также повышается (см. Рисунок 43), причем также необратимо, как и в случае неспецифического взаимодействия с ацетатом.

Определенные экспериментально значения pK_a^B для полимера принимают значения 6.1–6.6 – то есть, значительно ниже pK_a фенилборной кислоты (≈ 8.9), что делает возможным и эффективным использование системы на основе поли(3-АФБК) в нейтральных pH. Подобное понижение pK_a поли(3-АФБК) можно объяснить электроноакцепторными свойствами основной цепи полианилина [18], контролирующими процесс связывания диольного фрагмента с полимером.

Полученный результат имеет большую практическую значимость для аналитических приложений. Большинство кондукто- и импедиметрических сенсорных систем на основе фенилборной кислоты рассматривает в качестве аналитического сигнала повышение сопротивления сенсорного материала, которое наблюдается также и в случае, например, деградации чувствительного слоя. Тем самым, данные системы не способны различать

аналитический и фоновый сигнал, что значительно понижает их практическую ценность. Сенсорный материал, представленный в данной работе, позволяет дифференцировать специфические и неспецифические взаимодействия в отличие от указанных систем.

В итоге, поведение констант связывания различных соединений с поли(3-АФБК) сходно с физико-химическими закономерностями связывания фенилборной кислоты с соединениями, содержащими 1,2- или 1,3-*цис*-диольные фрагменты. Таким образом, увеличение проводимости поли(3-АФБК) действительно является результатом специфического взаимодействия сахаров, полиолов и гидроксикислот с борнокислыми группами полимера.

Глава 8. Обнаружение микроорганизмов с использованием поли(3-АФБК)

8.1. Влияние глюкозы на сопротивление микросенсоров в жидкости и аэрозоле

Для функционирования модифицированного торцевого электрода как электрохимического сенсора необходимо наличие внешнего электрода сравнения и вспомогательного электрода. Это ограничивает применение такой системы в аналитической практике и делает затруднительной миниатюризацию всей системы в целом и использование за пределами лабораторных помещений. Поэтому в ходе работы была предложена конструкция электродов, позволяющая устранить эти ограничения. Вместо торцевых стеклоуглеродных электродов были выбраны взаимопроникающие золотые микроэлектроды, характеристики и модификация которых чувствительным слоем поли(3-АФБК) были описаны выше (см. параграф 6.5).

Использование взаимопроникающих микроэлектродов обладает несколькими ключевыми преимуществами по сравнению с подобной системой на основе торцевых электродов. Во-первых, взаимопроникающие микроэлектроды состоят из двух независимых электродов и могут функционировать по двухэлектродной схеме без использования внешнего электрода сравнения [96]. После модификации чувствительным слоем такие микроструктуры становятся полноценными электрохимическими сенсорами, поскольку содержат в себе все необходимые для функционирования элементы. Во-вторых, микросенсоры заметно облегчают миниатюризацию прототипа сенсорной системы по сравнению с классическими электродами и открывают обширные возможности для встраивания системы в помещения или коммуникации.

Однако перед обнаружением микроорганизмов при помощи микросенсоров необходимо проверить, сохраняется ли эффект уменьшения сопротивления поли(3-АФБК) на микроэлектродах в присутствии диол-содержащих соединений аналогично тому, что наблюдалось на торцевых электродах. Для этого было исследовано поведение спектров электрохимического импеданса взаимопроникающих микроэлектродов, функционирующих по двухэлектродной схеме, в присутствии глюкозы. Модифицированные полимером микроэлектроды помещали в фосфатный буфер и регистрировали спектры импеданса примерно в течение 15 минут, пока последовательно полученные спектры не становились статистически неотличимы. После этого в раствор добавляли глюкозу в итоговой концентрации 50 мМ и снова регистрировали спектры. В случае с добавлением глюкозы получение статистически неотличимых спектров наступало через 5-7 минут после добавки. Затем заменяли раствор глюкозы чистым фосфатным буфером и снова повторяли процедуру регистрации спектров.

Полученные спектры до и после добавления глюкозы строили в координатах Найквиста (Рисунок 55). Как было показано выше на торцевых электродах, наибольшее изменение претерпевает сопротивление полимера R_p , которое в дальнейшем будет использовано в качестве отклика. Диаметр высокочастотной полуокружности, соответствующий сопротивлению полимера, в присутствии глюкозы уменьшается аналогично экспериментам с торцевыми электродами. Это свидетельствует о том, что эффект понижения сопротивления сохраняется и для взаимопроникающих электродов, модифицированных поли(3-АФБК). Согласно данным аппроксимации, сопротивление полимера R_p уменьшается примерно в 2 раза по сравнению с исходным значением (до добавления глюкозы примерно 65 кОм, после - 32 кОм). Присутствие такой же концентрации глюкозы вызывает понижение сопротивления модифицированных торцевых электродов только в 1.5 раза. Микросенсоры также как и сенсоры демонстрируют обратимость сигнала: спектры до добавки глюкозы и после замены раствора исходным фосфатным буфером отличаются незначительно.

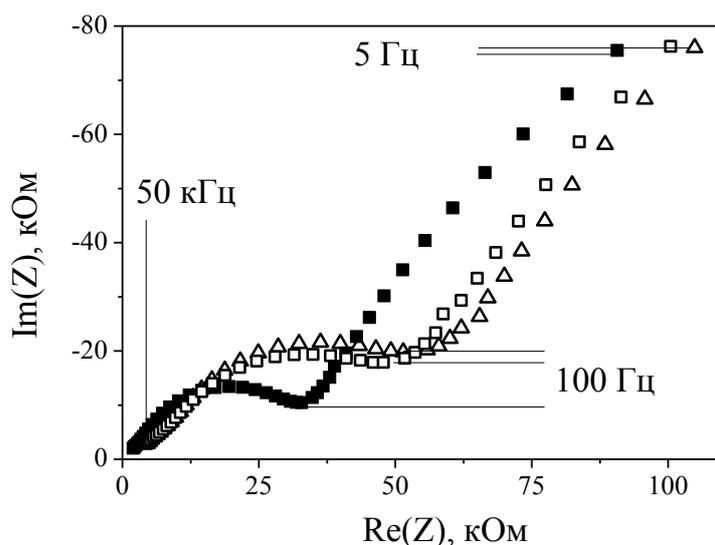


Рисунок 55. Спектры электрохимического импеданса микросенсоров в фосфатном буфере с pH 7.0 ($E_{dc} = 0.05 \text{ В}$): (\square) в отсутствие глюкозы, (\blacksquare) в присутствии 50 мМ глюкозы, (\triangle) после замены буфера на не содержащий глюкозу.

Тем самым, микросенсоры демонстрируют повышенную чувствительность по сравнению с торцевыми электродами и применимы для обнаружения глюкозы в водной среде на основе эффекта понижения сопротивления в результате специфического взаимодействия борнокислой группы с 1,2- или 1,3-*цис*-диольными фрагментами.

Наиболее перспективным практическим применением системы является анализ непосредственно аэрозоля. Обнаружение микроорганизмов, например, в жидкости, не применимо для долгосрочных и *in situ* экспериментов. С течением времени жидкость испаряется, что в свою очередь влияет на проводящие свойства полимера, и, таким образом,

становится невозможным соотнести изменение проводимости с присутствием или отсутствием микроорганизмов в системе. В общем случае, в электрохимических системах жидкая среда (чаще всего раствор фонового электролита) выполняет роль проводника, создавая электрический контакт между электродами, поэтому наличие жидкостного контакта часто является необходимым условием функционирования всей системы. Для системы взаимопроникающих микроэлектродов модификация проводящим полимером позволяет отказаться от использования раствора электролита в системе и обеспечивает необходимый электрический контакт даже на воздухе. Как видно из микрофотографии модифицированных микроэлектродов (Рисунок 38), в ходе роста полимер образует нити, соединяющие оба взаимопроникающих микроэлектрода и создающие электрический контакт, что позволяет проводить эксперименты без внесения сенсора в раствор электролита.

Пригодность микросенсоров для анализа аэрозоля было предложено проверить путем исследования изменений сопротивления полимера в потоке аэрозоля с глюкозой. Для создания аэрозоля, содержащего глюкозу, использовали стеклянную промывалку, заполненную раствором глюкозы в фосфатном буфере (pH 7.0). Через нее пропускали поток воздуха, который затем направляли на модифицированный микроэлектрод. Спектры электрохимического импеданса, как и в остальных случаях, регистрировали последовательно до получения статистически неотличимых последовательно полученных спектров. Серию спектров регистрировали для исходного фосфатного буфера и для содержания глюкозы в насыщающем аэрозоль растворе 200 мМ. Итоговые спектры импеданса представлены ниже (Рисунок 56).

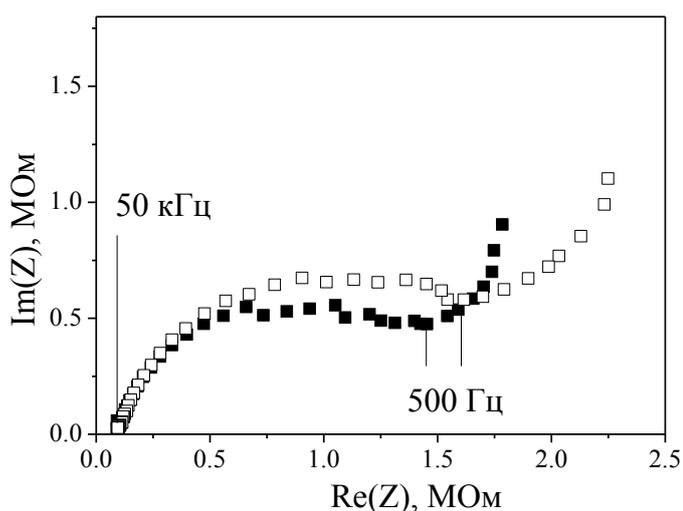


Рисунок 56. Спектры электрохимического импеданса микросенсоров в присутствии глюкозы в насыщающем аэрозоль растворе концентрации (мМ): (□) 0, (■) 200 мМ.

Успешная регистрация спектров импеданса означает, что полимер действительно обеспечивает электрический контакт микроэлектродов. Измерения до модификации показали сопротивление между микроэлектродами выше 40 МОм (предел измерений мультиметра).

Установление стационарного состояния системы в аэрозоле занимает большее время по сравнению с жидкостью – до 30-40 минут. Значения импеданса системы в аэрозоле выше, чем для случая в жидкости, что обусловлено отсутствием электролита. Из спектров видно, что в присутствии глюкозы в насыщающем растворе диаметр высокочастотной полуокружности уменьшается, что говорит об уменьшении сопротивления полимера. Из данных аппроксимации было найдено, что сопротивление полимера уменьшилось примерно на 20%. При этом установление стационарного состояния в присутствии глюкозы занимает меньшее время, чем в ее отсутствие – около 15-20 минут.

Эффект понижения сопротивления сенсорного материала в результате специфического взаимодействия наблюдается при использовании как классических торцевых электродов по трехэлектродной схеме, так и взаимопроникающих микроэлектродов по двухэлектродной схеме, что подтверждает универсальность эффекта. Понижение сопротивления наблюдается также в случае экспериментов с применением микросенсоров в аэрозоле – специфически взаимодействующая с полимером глюкоза приводит к понижению сопротивления полимера. Таким образом, микросенсоры на основе поли(3-АФБК) могут быть использованы для обнаружения в аэрозоле объектов, содержащих 1,2- или 1,3-*цис*-диольные фрагменты. В качестве таких объектов могут выступать, в том числе, микроорганизмы.

8.2. Исследование суспензии микромицетов *Penicillium chrysogenum*

Плесневые грибы *Penicillium chrysogenum* были выбраны в качестве объекта исследования из-за своей широкой распространенности в различных сферах деятельности человека.

Получение изображений клеток микромицетов в суспензии проводили методом сканирующей электронной микроскопии. Для этого готовую суспензию содержанием 50 000 КОЕ/мл наносили на проводящую подложку и затем загружали в рабочую камеру микроскопа. Как видно, споры плесневых грибов, называемые также конидиями или конидиоспорами, имеют размер 2-3 мкм (Рисунок 57), что совпадает с литературными данными [97].

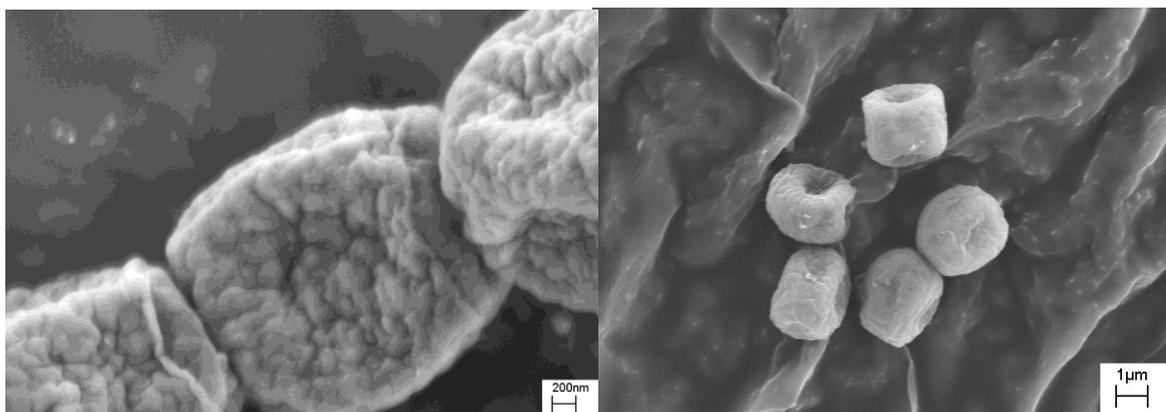


Рисунок 57. Электронные микрофотографии конидиоспор *Penicillium chrysogenum*.

При помощи автоматического лазерного дифракционного анализатора частиц было проведено исследование суспензии микроорганизмов в фосфатном буфере, которая в дальнейшем будет использоваться для электрохимических экспериментов. В суспензии плесневых грибов с содержанием 50 000 КОЕ/мл в основном присутствуют частицы размером порядка 3 мкм (Рисунок 58).

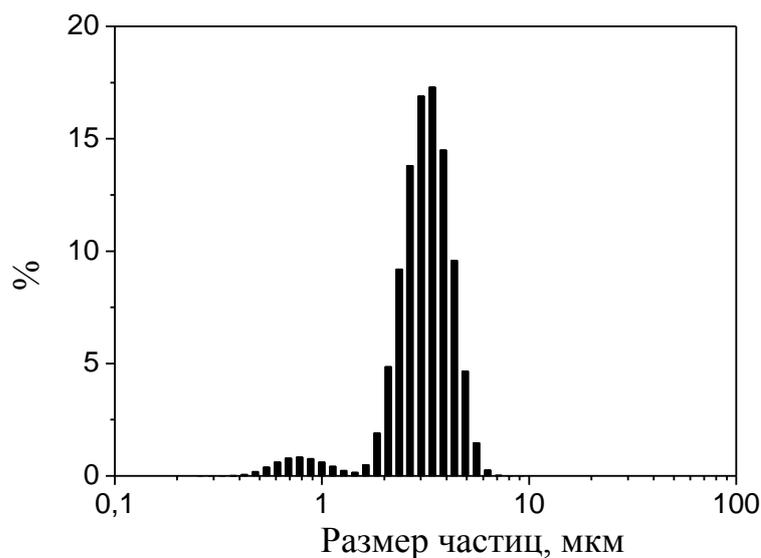


Рисунок 58. Распределение размеров частиц в водной суспензии микроорганизмов.

Частицы более крупных размеров обнаружены не были. За время проведения измерений в течение 3-5 минут распределение частиц по размерам оставалось неизменным. Таким образом, суспензия плесневых грибов в фосфатном буфере представляет собой взвесь частиц, узкое распределение размеров которых соответствует размеру единичной споры.

В общем случае содержание спор не равно количеству колониеобразующих единиц, поскольку в число спор могут входить нежизнеспособные клетки. В дальнейшем для величин концентраций микромицетов в единице объема суспензии или аэрозоля будет использоваться не количество спор, а колониеобразующие единицы.

8.3. Обнаружение микромицетов в жидкости с помощью (микро)сенсоров

Схема анализа с помощью разработанного сенсорного материала состоит в регистрации изменения сопротивления полимера методом спектроскопии электрохимического импеданса при связывании 1,2- или 1,3-*цис*-диольных фрагментов с борнокислым заместителем в цепи полианилина. Известно, что клеточная стенка большинства микроорганизмов, в том числе и спор *Penicillium chrysogenum*, более чем на 60% состоит из олиго- и полисахаридов [98, 99], содержащих 1,2- или 1,3-*цис*-диольные фрагменты (Рисунок 59). Использование боронат-замещенного полианилина или поли(3-АФБК) в качестве чувствительного элемента, обладающего сродством к составляющим поверхности клеточной стенки микроорганизмов, позволит создать безреагентный сенсор для обнаружения микроорганизмов. В настоящей работе разработанный сенсорный материал будет использован для электрохимического обнаружения *Penicillium chrysogenum*.

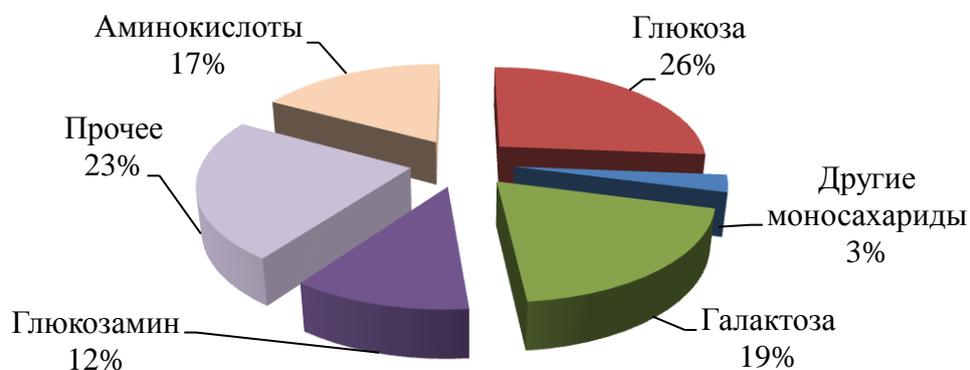


Рисунок 59. Состав клеточной стенки спор *Penicillium chrysogenum* [99].

Перед экспериментами с использованием сенсоров была проведена оценка нижней границы обнаружения микроорганизмов в суспензии путем культивации на чашках с твердой питательной средой. Для этого открытые чашки Петри со стерильной питательной средой погружали в суспензии плесневых грибов с концентрациями 100–10 000 КОЕ/мл на 10 минут, а затем извлекали так, чтобы на поверхности агара не оставалось жидкости. После чего чашки закрывали крышкой и инкубировали в течение 1-2 дней при 26°C – такая температура является оптимальной для роста плесневых грибов [72]. В случае суспензий с содержанием грибов 100-200 КОЕ/мл, на чашках вырастали 20-30 колоний. Принимая во внимание на порядки меньшую площадь микросенсора по сравнению с чашкой Петри, вероятность столкновения микроорганизмов с чувствительным слоем в растворе с низкой концентрацией будет крайне мала. Тем самым, концентрации порядка 100 КОЕ/мл не дадут аналитического отклика в течение небольшого времени. На чашках, погруженных в суспензию с содержанием грибов 1000 КОЕ/мл, насчитывалось около 200 колоний. Последующее увеличение содержания микромицетов до 10 000 КОЕ/мл приводит к образованию большого числа колоний на чашке

Петри, не поддающегося точному подсчету. Таким образом, оценочное значение нижней границы определяемого содержания составляет 1000 КОЕ/мл.

Первоначально обнаружение *Penicillium chrysogenum* в водной среде проводили методом спектроскопии импеданса с применением трехэлектродной схемы с рабочим торцевым электродом, модифицированным поли(3-АФБК). После погружения электрода в фосфатный буфер с рН 7.0 применяли синусоидальную развертку потенциала с постоянным значением 0.05 В относительно ХСЭ и амплитудой колебаний 5 мВ. Последовательную регистрацию спектров электрохимического импеданса сенсоров в буферном растворе проводили до тех пор, пока спектры не становились статистически неотличимы. Затем исходный раствор заменяли суспензией плесневых грибов с различными концентрациями, определенными методом посева перед обнаружением. После этого для каждой концентрации регистрировали спектры импеданса. В качестве аналитического сигнала было выбрано сопротивление полимерной пленки R_p , рассчитанное из диаметра полуокружности высокочастотной области спектра в координатах Найквиста (Рисунок 60а).

Ниже приведены спектры импеданса торцевого стеклоуглеродного электрода, модифицированного поли(3-АФБК), в присутствии различных концентраций *Penicillium chrysogenum* в фосфатном буфере (рН 7.0, $E_{dc} = 0.05$ В, Рисунок 60а).

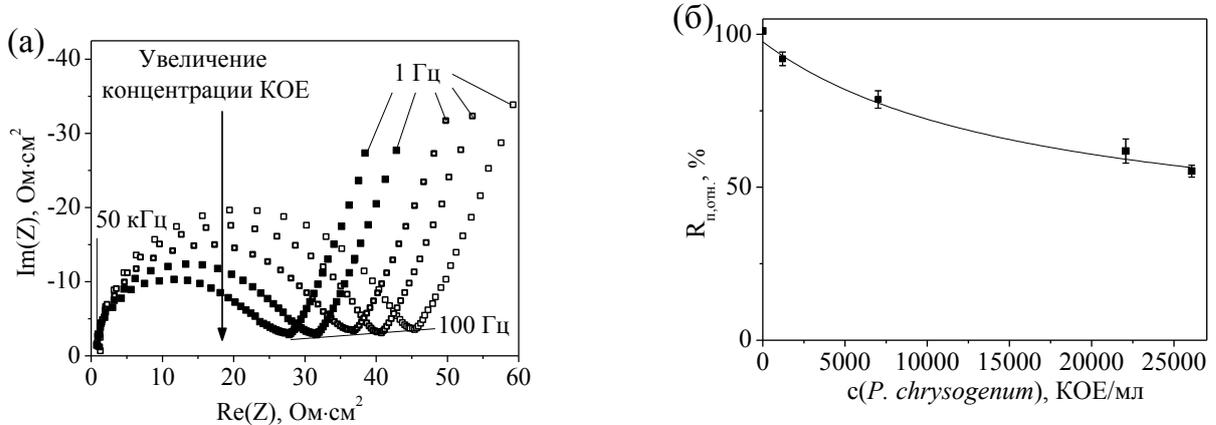


Рисунок 60. (а) Спектры импеданса полимера в суспензиях плесневых грибов с различным содержанием КОЕ/мл: (○) 0, (Δ) 1200, (□) 7000, (▲) 22000, (■) 26000; (б) градуировочная зависимость сопротивления полимера от содержания микроорганизмов, аппроксимированная по уравнению 26.

При продолжительной регистрации спектров в чистом фосфатном буфере наблюдается незначительный рост R_p – примерно 5% за 1 час. Тем самым, фоновые процессы приводят к увеличению сопротивления (или уменьшению проводимости). После замены исходного раствора на раствор, содержащий микроорганизмы, наблюдается уменьшение диаметра

высокочастотной полуокружности, что говорит об уменьшении сопротивления R_p (Рисунок 60а).

С увеличением содержания микроорганизмов в растворе сопротивление полимера уменьшается. Градуировочная зависимость, как и в случае с диол-содержащими соединениями, аппроксимируется уравнением 26 (Рисунок 60б). Диапазон определяемых с помощью модифицированных торцевых электродов концентраций *Penicillium chrysogenum* составляет 1200–26000 КОЕ/мл.

В отличие от неспецифических процессов во время продувки аэрозоля через чистый буфер, присутствие микроорганизмов вызывает увеличение проводимости полимера. Таким образом, сенсор способен дифференцировать полезный сигнал и фоновый сигнал, что крайне важно для практического использования. Немаловажной особенностью разработанного сенсора является безреагентность анализа, поскольку в связывании диольных групп определяемых объектов с полимером не участвуют дополнительные реагенты (Рисунок 1).

Классическая трехэлектродная схема имеет ряд недостатков для применения на практике, связанных с использованием дополнительных внешних электродов (вспомогательного электрода и электрода сравнения) и невозможностью миниатюризации. В связи с этим необходимо использовать другую конструкцию электродных структур.

Отказаться от применения дополнительных электродов трехэлектродной схемы возможно при помощи взаимопроникающих микроэлектродов, состоящих из двух встречно-штыревых частей. Они отличаются миниатюрностью (площадь микроструктур $\approx 0.1 \text{ мм}^2$) и функционируют по двухэлектродной схеме, которая не требует дополнительных электродов как в случае торцевых. Помимо этого, взаимопроникающая конструкция обеспечивает высокую чувствительность в ходе детектирования микроорганизмов [100, 101], а также по сравнению с макроэлектродами характеризуется быстрым откликом и обладает увеличенным по сравнению с макроэлектродами соотношением сигнал/шум.

Обнаружение микроорганизмов в водной среде с использованием микросенсоров проводили по двухэлектродной схеме – в роли вспомогательного электрода и электрода сравнения выступал второй микроэлектрод взаимопроникающей конструкции. Микросенсор погружали в раствор фосфатного буфера с pH 7.0 (Рисунок 61), после чего регистрировали спектры импеданса в присутствии различных концентраций микроорганизмов до тех пор, пока последовательно снятые спектры не становились статистически неотличимы.

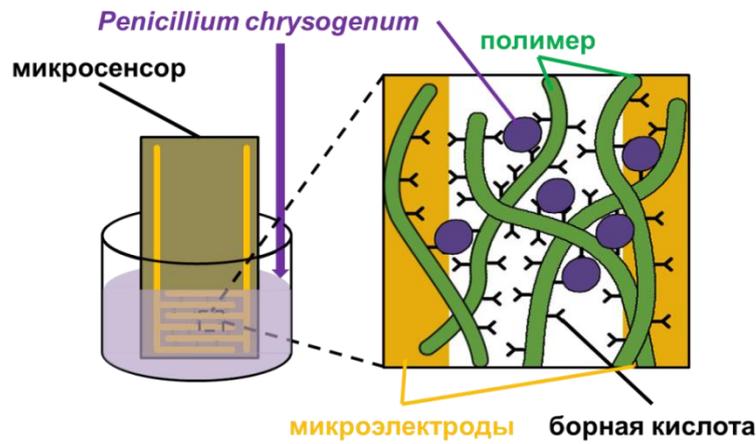


Рисунок 61. Схема обнаружения микроорганизмов в растворе.

По значениям приведенных на спектрах частот видно, что в отсутствие микроорганизмов и при концентрациях 300 и 600 КОЕ/мл наблюдается фрагмент высокочастотной полуокружности, которая полностью проявляется при более высоких концентрациях (Рисунок 62а). С увеличением концентрации плесневых грибов в суспензии происходит уменьшение диаметра высокочастотной полуокружности. Это говорит об уменьшении R_p в присутствии плесневых грибов для микросенсоров, функционирующих по двухэлектродной схеме, как и при обнаружении микроорганизмов по трехэлектродной схеме.

Сравнение градуировочных зависимостей сенсора и микросенсора показывает, что чувствительность обнаружения микроорганизмов для последнего значительно выше: содержание плесневых грибов в 1200 КОЕ/мл вызывает понижение сопротивления модифицированного микроэлектрода в 5 раз (Рисунок 62б), тогда как для торцевых электродов такая же суспензия вызывает понижение сопротивления на 5% (Рисунок 60б).

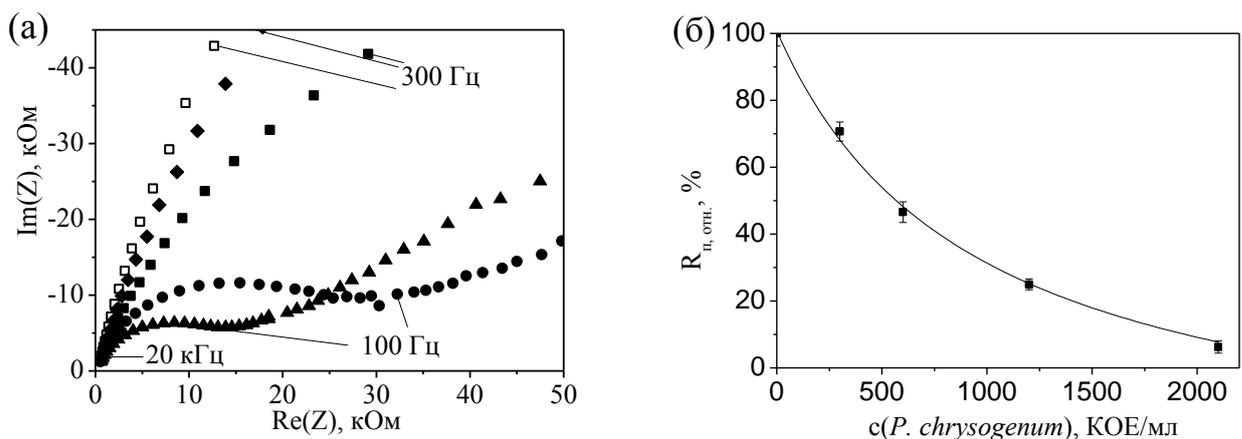


Рисунок 62. (а) Спектры импеданса в присутствии микроорганизмов с содержанием (в КОЕ/мл): (□) 0, (♦) 300 (■) 600, (●) 1200, (▲) 2100; (б) градуировочная зависимость сопротивления полимера от концентрации микроорганизмов, аппроксимированная по уравнению 26.

Чувствительность обнаружения для микросенсоров значительно выше, чем для модифицированных торцевых электродов: содержание плесневых грибов в 1200 КОЕ/мл вызывает понижение сопротивления микросенсора в 5 раз, тогда как для торцевых электродов такая же суспензия вызывает понижение сопротивления на 5%.

Как и в результате связывания сахаров, полиолов и гидроксикислот с поли(3-АФБК) при увеличении концентрации микроорганизмов проводимость разработанного материала повышается. При связывании группы борной кислоты в полимере с диолами на атоме бора возникает дополнительный отрицательный заряд, следствием чего является эффект самодопирования полимера, приводящий к увеличению проводимости. Размер клеток плесневых грибов не превышает 2-4 мкм [97], что значительно меньше межэлектродного расстояния в 10 мкм. Поэтому можно предположить, что увеличение проводимости в присутствии микроорганизмов обусловлено связыванием диольных групп на поверхности микроорганизмов с полимером. Следовательно, эффект повышения проводимости полимера при связывании с 1,2- и 1,3-диольными группами носит универсальный характер.

Минимальное определяемое содержание плесневых грибов в электрохимической ячейке составило 300 КОЕ/мл. С учетом объема ячейки в 5 мл, общее число минимально определяемых плесневых грибов составляет 1500 КОЕ. Для оценки время анализа в случае нормативов, нужно учесть, что для инъецирования в ячейку 1000-10000 КОЕ микроорганизмов путем пропускания воздуха через жидкостную ячейку потребуется от 11 до 110 минут в случае 500 КОЕ/м³ и от 1 до 11 минут в случае 5000 КОЕ/м³. Таким образом, с учетом времени регистрации спектров импеданса и трех повторов общее время анализа составит 1-3 часа, что позволяет рассматривать разрабатываемую систему как экспрессную.

8.4. Исследование биоаэрозоля, содержащего *Penicillium chrysogenum*

Обнаружение микроорганизмов в воздушной среде было предложено провести с использованием биоаэрозоля, содержащего *Penicillium chrysogenum*. Поскольку споры легко переносятся потоками воздуха [102], то возможно создать биоаэрозоль, содержащий клетки микроскопических грибов, путем пропускания воздуха через суспензию микроорганизмов.

Перед проведением обнаружения необходимо охарактеризовать получаемый биоаэрозоль. Биоаэрозоль получали пропусканием потока воздуха через промывалку с суспензией плесневых грибов с известной концентрацией. Были взяты суспензии с содержаниями от 500 до 30 000 КОЕ/мл. Через каждую суспензию пропускали поток воздуха на скорости 3 л/мин. На выходе из промывалки устанавливали на 10 минут чашку Петри с питательной средой, отдельную для каждой новой суспензии. Подсчеты после культивирования микробов показали, что с возрастанием содержанием микробов в суспензии число колоний, переносимых биоаэрозодем также возрастает (Рисунок 63). На основании фиксированного

объема аэрозоля для каждой концентрации насыщающего аэрозоль раствора можно вычислить концентрацию микроорганизмов в воздухе, что будет использовано в дальнейшем в ходе обнаружения микромицетов в потоке аэрозоля.

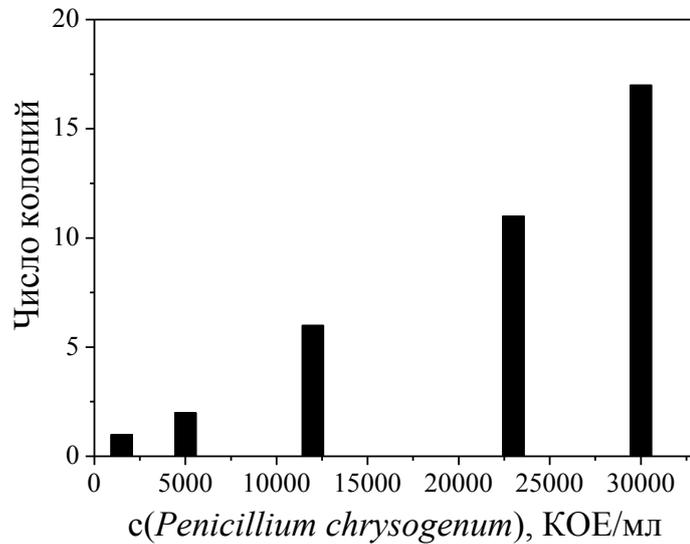


Рисунок 63. Число микроорганизмов, улавливаемых из биоаэрозоля поверхностью агара в течение 10 минут, для разных суспензий плесневых грибов.

Суспензия плесневых грибов с содержанием 30 000 КОЕ/мл далее была использована в качестве насыщающего раствора для получения биоаэрозоля. Для этого суспензию поместили в стеклянную промывалку и пропускали поток воздуха. На выходе из промывалки установили портативный анализатор аэрозольных частиц с лазерным оптическим детектором, с помощью которого провели серию экспериментов по подсчету частиц различных размеров.

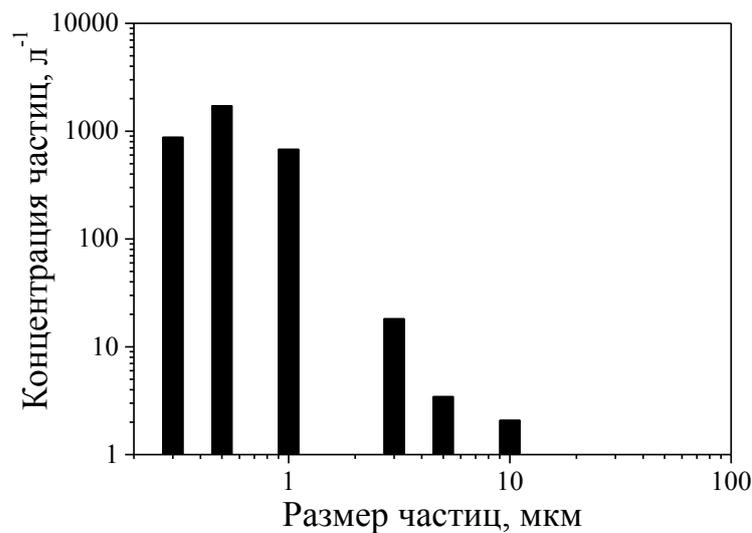


Рисунок 64. Концентрация частиц в аэрозоле

С учетом фиксированного объема пробы были рассчитаны концентрации частиц различных размеров (Рисунок 64). Из распределения видно, что получаемый аэрозоль в основном состоит из частиц размерами от 0.3 до 10 мкм.

8.5. Обнаружение микромицетов в аэрозоле при помощи микросенсоров

Как было указано выше (см. параграф 8.1), взаимопроникающие микроэлектроды, модифицированные поли(3-АФБК), позволяют проводить анализ непосредственно в потоке аэрозоля, и не нуждаются в электролите, поскольку проводящий боронат-замещенный полианилин осуществляет электрический контакт между электродами.

Для обнаружения микроорганизмов в потоке биоаэрозоля микросенсор был закреплен в специальной пластиковой ячейке, в крышку которой было встроено выходное сопло для системы подачи биоаэрозоля, наконечник которого находился на расстоянии примерно 1 мм от поверхности микросенсора (Рисунок 65). Биоаэрозоль создавали путем пропускания потока воздуха через промывалку с водной суспензией *Penicillium chrysogenum*, как описано в параграфе 8.2. Верхняя часть стеклянной промывалки с входной трубкой присоединялась на шлифе с тем, чтобы в процессе эксперимента можно было заменять суспензии грибов. В начале эксперимента в промывалке содержался чистый фосфатный буфер. После включения потока воздуха проводили измерения импеданса до тех пор, пока последовательно зарегистрированные спектры не становились статистически неотличимы.

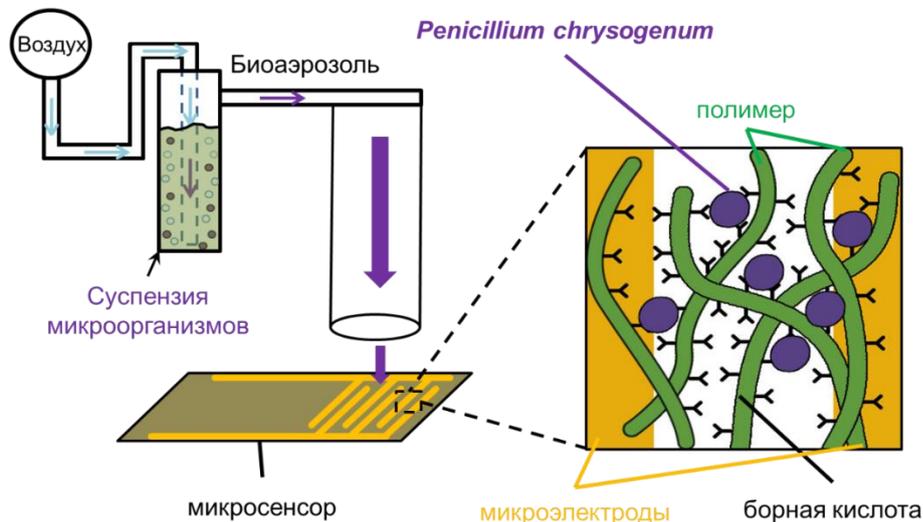


Рисунок 65. Схема обнаружения микроорганизмов в аэрозоле.

Чтобы проверить влияние процедуры добавления суспензии в промывалку, во время которой происходит кратковременное прекращение подачи потока биоаэрозоля, в промывалку с чистым буфером снова добавляли чистый буферный раствор, после чего регистрировали серию спектров импеданса. В процессе длительной регистрации спектров (около 2 часов) наблюдается незначительное увеличение сопротивления в пределах нескольких процентов. Таким образом, фоновые процессы приводят к увеличению сопротивления.

Как было показано выше (см. параграф 6.5), поли(3-АФБК) обладает развитой структурой в межэлектродном пространстве, создавая электрический контакт между микроэлектродами. Таким образом, при различных количествах осажденного полимера, в общем случае, возможно варьировать электрический контакт и относительное уменьшение сопротивления в присутствии микроорганизмов. Тем самым, необходимой стадией исследования является оптимизация количества получаемого полимера в ходе потенциодинамического осаждения, используемого для модификации микроэлектродов. Оптимизацию проводили по величине понижения сопротивления модифицированного микроэлектрода в суспензии плесневых грибов с содержанием 50 000 КОЕ/мл. Для сравнения были выбраны микроэлектроды, модифицированные поли(3-АФБК), в ходе 10, 15 и 20 циклов развертки потенциала. При полимеризации в ходе меньшего числа циклов итоговый полимер не создавал электрического контакта, и регистрация спектров импеданса в потоке аэрозоля была невозможна. Поэтому в оптимизации более тонкие пленки, чем выращенные в ходе 10, 15 и 20 циклов, не участвовали. В качестве оптимальных условий было выбрано число циклов, при котором выращенный полимер демонстрировал наибольшее относительно изменение сопротивления полимера $R_{п}$ в присутствии суспензии плесневых грибов содержанием 50 000 КОЕ/мл. Результаты измерений представлены на рисунке ниже (Рисунок 66).

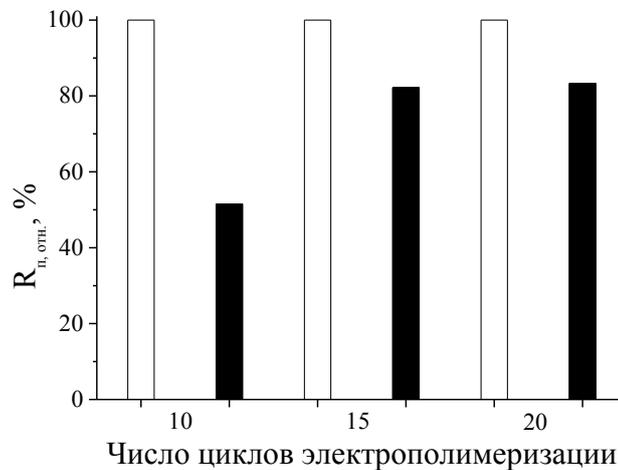


Рисунок 66. Относительное изменение сопротивления полимера в потоке аэрозоля с *Penicillium chrysogenum* (получен из суспензии с содержанием 50 000 КОЕ/мл) от числа циклов.

Наибольшее относительное понижение сопротивления демонстрировал полимер, выращенный в течение 10 циклов. Таким образом, среди микросенсоров для обнаружения плесневых грибов в аэрозоле оптимальными были признаны те, которые были получены после 10 циклов электрополимеризации.

После оптимизации числа циклов было исследовано изменение сопротивления микросенсора в присутствии плесневых грибов с различным содержанием от 14000 до 46000

КОЕ/мл в насыщающем аэрозоль растворе. Для каждого содержания была зарегистрирована серия спектров до тех пор, пока последовательно снятые спектры не становились статистически неотличимы. Как видно из спектров импеданса в присутствии плесневых грибов в насыщающем растворе для создания биоаэрозоля диаметры высокочастотных полуокружностей уменьшаются, что означает понижение сопротивления полимера аналогично случаям обнаружения микроорганизмов в жидкости (Рисунок 67). Таким образом, в ходе обнаружения *Penicillium chrysogenum* непосредственно в потоке биоаэрозоля также было выявлено, что поли(3-АФБК) при специфических взаимодействиях с определяемыми объектами понижает свое сопротивление, тогда как при фоновых процессах, связанных, например, с деградацией и дедопированием, сопротивление повышается.

Была проведена оценка содержания микроорганизмов в итоговом аэрозоле на основании данных об улавливании колоний из биоаэрозоля поверхностью агара (Рисунок 63). С учетом известного времени и объема продувки, для концентраций микроорганизмов в насыщающем растворе были рассчитаны соответствующие значения в аэрозоле. Диапазон определяемых концентраций – от 200 до 800 КОЕ/м³. Тем самым, разработанные микросенсоры пригодны для обнаружения микроорганизмов, в том числе, в концентрациях, соответствующих гигиеническому нормативу на предельные допустимые концентрации плесневых грибов в атмосферном воздухе населенных мест (500 КОЕ/м³).

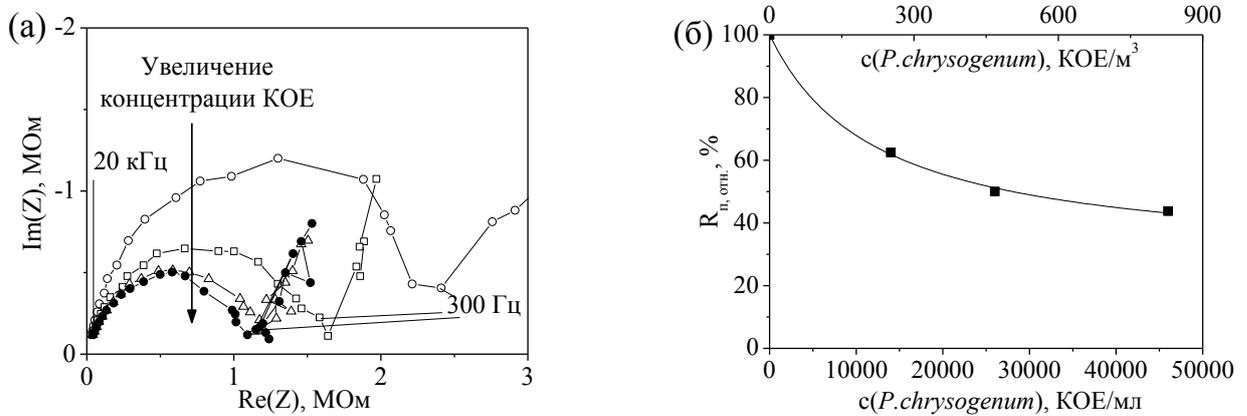


Рисунок 67. (а) Спектры импеданса микросенсора в потоке биоаэрозоля из насыщающих растворов с содержанием микроорганизмов (КОЕ/мл): (○) 0, (□) 14000, (Δ) 26000, (●) 46000; (б) градуировочная зависимость сопротивления полимера от концентрации микроорганизмов в насыщающем аэрозоль растворе, аппроксимированная уравнением 26.

Возможность обнаружения микроорганизмов с помощью разработанных микросенсоров непосредственно в аэрозоле важна для практического применения. Перед проведением обнаружения не требуется дополнительной пробоподготовки, связанной с разрушением клеточной стенки или мембраны или введением красителя. Проведение всей процедуры,

включая градуировочную зависимость, занимает около 3 часов. Таким образом, в результате работы был создан безреагентный электрохимический микросенсор, пригодный для простого и экспрессного обнаружения микроорганизмов (на примере *Penicillium chrysogenum*) непосредственно в воздушной среде. Надежность обнаружения микроорганизмов обеспечивается генерацией электрохимических сигналов – в случае специфических взаимодействий с компонентами клеточной стенки сопротивление полимера понижается, а в случае фоновых процессов наблюдается увеличение сопротивления. Для функционирования микросенсора не требуется дополнительных электродов или специальной ячейки, что позволит сконструировать электроаналитическую систему для применения *in situ*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе создан сенсорный проводящий полимерный материал, полученный методом электрополимеризации 3-аминофенилборной кислоты (3-АФБК). Проводящие свойства полученного полимера были исследованы методом спектроскопии электрохимического импеданса с использованием трехэлектродной схемы, включающей в себя безреагентный сенсор на основе торцевого электрода, модифицированного поли(3-АФБК). Сенсорный материал способен специфически связываться с молекулами и другими объектами, содержащими 1,2- или 1,3-*цис*-диольные фрагменты. В результате специфического связывания происходит уменьшение сопротивления полученного полимера. Тенденция уменьшения сопротивления была продемонстрирована в ходе определения глюкозы, галактозы, лактата и сорбитола, а также при обнаружении микроскопических плесневых грибов *Penicillium chrysogenum*. В то же время, неспецифические процессы, такие как деградация и дедопирование, а также взаимодействия с молекулами, не содержащими указанные диольные фрагменты, приводят к увеличению сопротивления сенсорного материала. Этот эффект позволяет дифференцировать специфический и неспецифический сигнал в ходе эксперимента. Таким образом, сенсор демонстрирует селективность отклика вне зависимости от природы определяемого объекта, проявляя эффект уменьшения сопротивления как в случае различных молекул с 1,2- или 1,3-*цис*-диольными фрагментами, так и микроорганизмов.

В ходе электроосаждения поли(3-аминофенилборной кислоты) на взаимопроникающих микроэлектродах были созданы микросенсоры. Они являются безреагентными и не требуют дополнительной пробоподготовки, что немаловажно для практического применения. Как в случае с модифицированными торцевыми электродами, микросенсоры демонстрируют понижение сопротивления при связывании 1,2- или 1,3-*цис*-диол-содержащего соединения в водном растворе (на примере глюкозы) с чувствительным слоем поли(3-АФБК). Сенсорный материал осуществляет электрический контакт взаимопроникающих микроэлектродов, благодаря чему микросенсоры функционируют по двухэлектродной схеме в воздушной среде и демонстрируют эффект понижения сопротивления в присутствии глюкозы в аэрозоле.

Микросенсоры пригодны для обнаружения микроорганизмов в растворе и в потоке аэрозоля. Продемонстрированная возможность полимерного сенсорного материала дифференцировать полезные и фоновые сигналы вкпе с возможностью проводить измерения в потоке аэрозоля открывает значительные перспективы для создания надежных и экспрессных тест-систем для обнаружения микроорганизмов *in situ* для решения биотехнологических задач.

ВЫВОДЫ

1. В результате электрополимеризации 3-аминофенилборной кислоты синтезирован боронат-замещенный проводящий полианилин или поли(3-аминофенилборная кислота). Методом спектроскопии электрохимического импеданса показано уменьшение сопротивления замещенного полианилина при взаимодействии с 1,2- или 1,3-*цис*-диольными фрагментами моносахаридов, полиола и гидроксикислоты. Уменьшение сопротивления проводящего полимера в результате связывания с диольными фрагментами позволяет дифференцировать специфические взаимодействия на фоне неспецифических процессов, приводящих к увеличению сопротивления. Специфическое связывание 1,2- или 1,3-*цис*-диольных фрагментов с борнокислой группой полимера является обратимым.
2. Наблюдаемые константы связывания соединений, содержащих 1,2- или 1,3-*цис*-диольные фрагменты, с поли(3-аминофенилборной кислотой), вычисленные из спектров электрохимического импеданса, возрастают в ряду: глюкоза < галактоза < сорбитол. Зависимости полученных констант связывания от рН для моносахарида глюкозы и гидроксикислоты лактата зеркально симметричны. Таким образом, поведение констант связывания указанных соединений с поли(3-аминофенилборной кислотой) сходно с физико-химическими закономерностями связывания фенилборной кислоты с соединениями, имеющими 1,2 и 1,3-*цис*-диольную функциональность. Это позволяет заключить, что наблюдаемое понижение сопротивления поли(3-аминофенилборной кислоты) действительно является результатом специфического взаимодействия его борнокислых заместителей с указанными соединениями.
3. Показана применимость сенсорного материала - поли(3-аминофенилборной кислоты) - для обнаружения микроорганизмов в водной среде. Сопротивление замещенного полианилина, вычисленное из спектров импеданса, уменьшается при добавлении клеток *Penicillium chrysogenum* аналогично случаю со специфическим взаимодействием 1,2- или 1,3-*цис*-диол-содержащих низкомолекулярных соединений с замещенным полианилином. Диапазон определяемых концентраций клеток микроорганизмов в трехэлектродной жидкостной ячейке составляет от 1200 до 26000 КОЕ/мл.
4. На основе взаимопроникающих микроэлектродов, модифицированных поли(3-аминофенилборной кислотой), созданы безреагентные микросенсоры для обнаружения соединений, обладающих 1,2- или 1,3-*цис*-диольной функциональностью. Микросенсоры, функционирующие по двухэлектродной схеме, демонстрируют уменьшение сопротивления проводящего полимера в присутствии соединения,

содержащего 1,2- или 1,3-*цис*-диольные фрагменты, на примере глюкозы в жидкой среде и в потоке аэрозоля.

5. Показана применимость микросенсоров для обнаружения микроорганизмов. В присутствии микроорганизмов *Penicillium chrysogenum* в жидкости или аэрозоле сопротивление микросенсоров уменьшается. Диапазон определяемых концентраций клеток микроорганизмов составляет от 300 до 2100 КОЕ/мл (для жидкости) и от 200 до 800 КОЕ/м³ (для аэрозоля). Прототип электроаналитической системы пригоден для экспрессного контроля микробного заражения воздуха на примере обнаружения *Penicillium chrysogenum* в соответствии с действующим санитарно-эпидемиологическим нормативом на предельно допустимые концентрации плесневых грибов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bar-Cohen Y. Introduction to Biomimetics in Biomimetics. 2005. – CRC Press. – P. 1-40.
2. Schmitt O.H. Some interesting and useful biomimetic transforms. in Third International Biophysics Congress. – 1969. Boston, Massachusetts, USA.
3. Gilbert Y., Veillette M., Duchaine C. Airborne bacteria and antibiotic resistance genes in hospital rooms. // *Aerobiologia*. – 2010. – V. 26. – № 3. – P. 185-194.
4. Wu X., Li Z., Chen X.-X., Fossey J.S., James T.D., Jiang Y.-B. Selective sensing of saccharides using simple boronic acids and their aggregates. // *Chemical Society Reviews*. – 2013. – V. 42. – № 20. – P. 8032-8048.
5. Kim J.-K., Jackson S.N., Murray K.K. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of collected bioaerosol particles. // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2005. – V. 19. – № 12. – P. 1725-1729.
6. Chi M.-C., Li C.-S. Fluorochrome and Fluorescent In Situ Hybridization to Monitor Bioaerosols in Swine Buildings. // *Aerosol Science and Technology*. – 2005. – V. 39. – № 11. – P. 1101-1110.
7. Schulze H., Rubtsova M., Bachmann T.T. DNA Microarrays for Pathogen Detection in Modern Techniques for Pathogen Detection. 2015. – Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. – P. 113-220.
8. Ke C., Destecroix H., Crump M.P., Davis A.P. A simple and accessible synthetic lectin for glucose recognition and sensing. // *Nat Chem*. – 2012. – V. 4. – № 9. – P. 718-723.
9. Burcu Bahadir E., Kemal Sezgin Turk M. Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics. // *Talanta*. – 2015. – V. 132. – P. 162-74.
10. Radhakrishnan R., Suni I.I., Bever C.S., Hammock B.D. Impedance Biosensors: Applications to Sustainability and Remaining Technical Challenges. // *Acs Sustainable Chemistry & Engineering*. – 2014. – V. 2. – № 7. – P. 1649-1655.
11. Liu H., Li Y., Sun K., Fan J., Zhang P., Meng J., Wang S., Jiang L. Dual-Responsive Surfaces Modified with Phenylboronic Acid-Containing Polymer Brush To Reversibly Capture and Release Cancer Cells. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2013. – V. 135. – № 20. – P. 7603-7609.
12. Wannapob R., Kanatharana P., Limbut W., Numnuam A., Asawatreratanakul P., Thammakhet C., Thavarungkul P. Affinity sensor using 3-aminophenylboronic acid for bacteria detection. // *Biosensors & Bioelectronics*. – 2010. – V. 26. – № 2. – P. 357-364.
13. Lomakina G.Y., Ugarova N.N. Abstracts of the 16th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence – (ISBC 2010). // *Luminescence*. – 2010. – V. 25. – № 2. – P. 192-193.

14. Batey R.A., Carboni B., Carreaux F., Chan D.M.T., Cho B.T., Gao X., Hayashi T., Ishihara K., Ishiyama T., James T., Kennedy J.W.J., Lam P.Y.S., Matteson D., Miyaura N., Suzuki A., Wang B., Yang W., Yoshida K. Boronic Acids: Preparation and Applications in Organic Synthesis and Medicine –2005: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. – 572 P.
15. Yang X., Cheng Y., Jin S., Wang B. Boronic Acid-Based Receptors and Chemosensors in Artificial Receptors for Chemical Sensors. V.M. Mirsky and A.K. Yatsimirsky. – 2010. – Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. – P. 169-189.
16. Bencini A., Lippolis V. Probing biologically and environmentally important metal ions with fluorescent chemosensors: Thermodynamic versus optical response selectivity in some study cases. // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2012. – V. 256. – № 1–2. – P. 149-169.
17. Schneider H.-J., Yatsimirsky A. Principles and Methods in Supramolecular Chemistry. – 1999: Wiley. – 362 P.
18. Martínez-Aguirre M.A., Villamil-Ramos R., Guerrero-Alvarez J.A., Yatsimirsky A.K. Substituent Effects and pH Profiles for Stability Constants of Arylboronic Acid Diol Esters. // *The Journal of Organic Chemistry*. – 2013. – V. 78. – № 10. – P. 4674-4684.
19. Bosch L.I., Fyles T.M., James T.D. Binary and ternary phenylboronic acid complexes with saccharides and Lewis bases. // *Tetrahedron*. – 2004. – V. 60. – № 49. – P. 11175-11190.
20. Springsteen G., Wang B.H. A detailed examination of boronic acid-diol complexation. // *Tetrahedron*. – 2002. – V. 58. – № 26. – P. 5291-5300.
21. Shoji E., Freund M.S. Potentiometric saccharide detection based on the pKa changes of poly(aniline boronic acid). // *Journal of the American Chemical Society*. – 2002. – V. 124. – № 42. – P. 12486-12493.
22. Tatara Y., Kakizaki I., Suto S., Ishioka H., Negishi M., Endo M. Chondroitin sulfate cluster of epiphygan from salmon nasal cartilage defines binding specificity to collagens. // *Glycobiology*. – 2014. – V. 25. – № 5. – P. 557-569.
23. Liu S., Miller B., Chen A. Phenylboronic acid self-assembled layer on glassy carbon electrode for recognition of glycoprotein peroxidase. // *Electrochemistry Communications*. – 2005. – V. 7. – № 12. – P. 1232-1236.
24. Zayats M., Katz E., Willner I. Electrical Contacting of Flavoenzymes and NAD(P)⁺-Dependent Enzymes by Reconstitution and Affinity Interactions on Phenylboronic Acid Monolayers Associated with Au-Electrodes. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2002. – V. 124. – № 49. – P. 14724-14735.
25. Morita K., Hirayama N., Imura H., Yamaguchi A., Teramae N. Grafting of phenylboronic acid on a glassy carbon electrode and its application as a reagentless glucose sensor. // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2011. – V. 656. – № 1–2. – P. 192-197.

26. Wang H.-C., Zhou H., Chen B., Mendes P.M., Fossey J.S., James T.D., Long Y.-T. A bis-boronic acid modified electrode for the sensitive and selective determination of glucose concentrations. // *Analyst*. – 2013. – V. 138. – № 23. – P. 7146-7151.
27. Shirakawa H., Louis E.J., MacDiarmid A.G., Chiang C.K., Heeger A.J. Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene, (CH). // *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. – 1977. – № 16. – P. 578-580.
28. MacDiarmid A.G., Epstein A.J. Polyanilines: a novel class of conducting polymers. // *Faraday Discussions*. – 1989. – V. 88. – P. 317-332.
29. Hagiwara T., Demura T., Iwata K. Synthesis and properties of electrically conducting polymers from aromatic amines. // *Synthetic Metals*. – 1987. – V. 18. – № 1. – P. 317-322.
30. McManus P.M., Yang S.C., Cushman R.J. Electrochemical doping of polyaniline: effects on conductivity and optical spectra. // *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. – 1985. – № 22. – P. 1556-1557.
31. Genies E.M., Lapkowski M. Electrochemical in situ epr evidence of two polaron-bipolaron states in polyaniline. // *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. – 1987. – V. 236. – № 1. – P. 199-208.
32. Wei Y., Jang G.W., Chan C.C., Hsueh K.F., Hariharan R., Patel S.A., Whitecar C.K. Polymerization of aniline and alkyl ring-substituted anilines in the presence of aromatic additives. // *The Journal of Physical Chemistry*. – 1990. – V. 94. – № 19. – P. 7716-7721.
33. Ding Y., Buyle Padias A., Hall H.K. Chemical trapping experiments support a cation-radical mechanism for the oxidative polymerization of aniline. // *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. – 1999. – V. 37. – № 14. – P. 2569-2579.
34. Wei Y., Tang X., Sun Y., Focke W.W. A study of the mechanism of aniline polymerization. // *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. – 1989. – V. 27. – № 7. – P. 2385-2396.
35. Wallace G.G., Teasdale P.R., Spinks G.M., Kane-Maguire L.A.P. *Synthesis of Polyanilines in Conductive Electroactive Polymers*. 2008. – CRC Press. – P. 137-178.
36. Leedy D.W., Adams R.N. Anodic oxidation pathways of aromatic amines. IV. Diphenylamine systems in aqueous acid solution. // *Journal of the American Chemical Society*. – 1970. – V. 92. – № 6. – P. 1646-1650.
37. Hand R.L., Nelson R.F. The Anodic Decomposition Pathways of Ortho- and Meta-substituted Anilines. // *Journal of The Electrochemical Society*. – 1978. – V. 125. – № 7. – P. 1059-1069.
38. Córdova R., del Valle M.A., Arratia A., Gómez H., Schrebler R. Effect of anions on the nucleation and growth mechanism of polyaniline. // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 1994. – V. 377. – № 1. – P. 75-83.

39. Łapkowski M. Electrochemical synthesis of linear polyaniline in aqueous solutions. // *Synthetic Metals*. – 1990. – V. 35. – № 1. – P. 169-182.
40. Focke W.W., Wnek G.E., Wei Y. Influence of oxidation state, pH, and counterion on the conductivity of polyaniline. // *Journal of Physical Chemistry*. – 1987. – V. 91. – № 22. – P. 5813-5818.
41. MacDiarmid A.G., Chiang J.C., Richter A.F., Epstein A.J. Polyaniline: a new concept in conducting polymers. // *Synthetic Metals*. – 1987. – V. 18. – № 1. – P. 285-290.
42. Yue J., Epstein A.J., Macdiarmid A.G. Sulfonic Acid Ring-Substituted Polyaniline, A Self-Doped Conducting Polymer. // *Molecular Crystals and Liquid Crystals Incorporating Nonlinear Optics*. – 1990. – V. 189. – № 1. – P. 255-261.
43. Karyakin A.A., Strakhova A.K., Yatsimirsky A.K. Self-doped polyanilines electrochemically active in neutral and basic aqueous solutions. Electropolymerisation of substituted anilines. // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 1994. – V. 371. – P. 259-265.
44. Pringsheim E., Terpetschnig E., Piletsky S.A., Wolfbeis O.S. A Polyaniline with Near-Infrared Optical Response to Saccharides. // *Advanced Materials*. – 1999. – V. 11. – № 10. – P. 865-868.
45. Nicolas M., Fabre B., Marchand G., Simonet J. New Boronic-Acid- and Boronate-Substituted Aromatic Compounds as Precursors of Fluoride-Responsive Conjugated Polymer Films. // *European Journal of Organic Chemistry*. – 2000. – V. 2000. – № 9. – P. 1703-1710.
46. Hong S., Lee L.Y.S., So M.-H., Wong K.-Y. A Dopamine Electrochemical Sensor Based on Molecularly Imprinted Poly(acrylamidophenylboronic acid) Film. // *Electroanalysis*. – 2013. – V. 25. – № 4. – P. 1085-1094.
47. Ma Y., Yang X. One saccharide sensor based on the complex of the boronic acid and the monosaccharide using electrochemical impedance spectroscopy. // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2005. – V. 580. – № 2. – P. 348-352.
48. Tlili C., Korri-Youssoufi H., Ponsonnet L., Martelet C., Jaffrezic-Renault N.J. Electrochemical impedance probing of DNA hybridisation on oligonucleotide-functionalised polypyrrole. // *Talanta*. – 2005. – V. 68. – № 1. – P. 131-137.
49. Inzelt G., Láng G.G. *Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) for Polymer Characterization in Electropolymerization*. 2010. – Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. – P. 51-76.
50. Gondran C., Orio M., Rigal D., Galland B., Bouffier L., Gulon T., Cosnier S. Electropolymerized biotinylated poly (pyrrole-viologen) film as platform for the development of reagentless impedimetric immunosensors. // *Electrochemistry Communications*. – 2010. – V. 12. – № 2. – P. 311-314.

51. Velusamy V., Arshak K., Korostynska O., Oliwa K., Adley C. An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. // *Biotechnology Advances*. – 2010. – V. 28. – № 2. – P. 232-254.
52. Wan Y., Zhang D., Wang Y., Qi P., Hou B. Direct immobilisation of antibodies on a bioinspired architecture as a sensing platform. // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2011. – V. 26. – № 5. – P. 2595-2600.
53. Shen Z., Huang M., Xiao C., Zhang Y., Zeng X., Wang P.G. Nonlabeled Quartz Crystal Microbalance Biosensor for Bacterial Detection Using Carbohydrate and Lectin Recognitions. // *Analytical Chemistry*. – 2007. – V. 79. – № 6. – P. 2312-2319.
54. Gu H., Ho P.-L., Tsang K.W.T., Wang L., Xu B. Using Biofunctional Magnetic Nanoparticles to Capture Vancomycin-Resistant Enterococci and Other Gram-Positive Bacteria at Ultralow Concentration. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2003. – V. 125. – № 51. – P. 15702-15703.
55. Torres-Chavolla E., Alocilja E.C. Aptasensors for detection of microbial and viral pathogens. // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2009. – V. 24. – № 11. – P. 3175-3182.
56. Labib M., Zamay A.S., Kolovskaya O.S., Reshetneva I.T., Zamay G.S., Kibbee R.J., Sattar S.A., Zamay T.N., Berezovski M.V. Aptamer-Based Viability Impedimetric Sensor for Bacteria. // *Analytical Chemistry*. – 2012. – V. 84. – № 21. – P. 8966-8969.
57. Viswanathan S., Rani C., Ho J.A.A. Electrochemical immunosensor for multiplexed detection of food-borne pathogens using nanocrystal bioconjugates and MWCNT screen-printed electrode. // *Talanta*. – 2012. – V. 94. – P. 315-319.
58. Afonso A.S., Perez-Lopez B., Faria R.C., Mattoso L.H.C., Hernandez-Herrero M., Roig-Sagues A.X., Maltez-da Costa M., Merkoci A. Electrochemical detection of Salmonella using gold nanoparticles. // *Biosensors & Bioelectronics*. – 2013. – V. 40. – № 1. – P. 121-126.
59. Yang L.J. Electrical impedance spectroscopy for detection of bacterial cells in suspensions using interdigitated microelectrodes. // *Talanta*. – 2008. – V. 74. – № 5. – P. 1621-1629.
60. Xi F.N., Gao J.Q., Wang J.N., Wang Z.X. Discrimination and detection of bacteria with a label-free impedimetric biosensor based on self-assembled lectin monolayer. // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2011. – V. 656. – № 1-2. – P. 252-257.
61. Lin H.L., Lu Q.Z., Ge S.T., Cai Q.Y., Grimes C.A. Detection of pathogen Escherichia coli O157:H7 with a wireless magnetoelastic-sensing device amplified by using chitosan-modified magnetic Fe₃O₄ nanoparticles. // *Sensors and Actuators B-Chemical*. – 2010. – V. 147. – № 1. – P. 343-349.
62. Pasparakis G., Alexander C. Synthetic polymers for capture and detection of microorganisms. // *Analyst*. – 2007. – V. 132. – № 11. – P. 1075-1082.

63. Bull S.D., Davidson M.G., van den Elsen J.M.H., Fossey J.S., Jenkins A.T.A., Jiang Y.-B., Kubo Y., Marken F., Sakurai K., Zhao J., James T.D. Exploiting the Reversible Covalent Bonding of Boronic Acids: Recognition, Sensing, and Assembly. // *Accounts of Chemical Research*. – 2012. – V. 46. – № 2. – P. 312-326.
64. Qi P., Wan Y., Zhang D. Impedimetric biosensor based on cell-mediated bioimprinted films for bacterial detection. // *Biosensors & Bioelectronics*. – 2013. – V. 39. – № 1. – P. 282-288.
65. Foster A.B., Stacey M. Ionophoresis of carbohydrates. Part II. Some pyranose and furanose derivatives of D-glucose. // *Journal of the Chemical Society (Resumed)*. – 1955. – № 0. – P. 1778-1781.
66. Beguin H., Nolard N. Mould biodiversity in homes I. Air and surface analysis of 130 dwellings. // *Aerobiologia*. – 1994. – V. 10. – № 2. – P. 157.
67. Adl S.M., Simpson A.G.B., Farmer M.A., Andersen R.A., Anderson O.R., Barta J.R., Bowser S.S., Brugerolle G.U.Y., Fensome R.A., Fredericq S., James T.Y., Karpov S., Kugrens P., Krug J., Lane C.E., Lewis L.A., Lodge J., Lynn D.H., Mann D.G., McCourt R.M., Mendoza L., Moestrup Ø., Mozley-Standridge S.E., Nerad T.A., Shearer C.A., Smirnov A.V., Spiegel F.W., Taylor M.F.J.R. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. // *Journal of Eukaryotic Microbiology*. – 2005. – V. 52. – № 5. – P. 399-451.
68. *Bioaerosols handbook*. – 1995. – Boca Raton: CRC Press Inc. – 656 P.
69. Burge H.A., Otten J.A. *Fungi in Bioaerosols: Assessment and Control*. J. Macher. – 1999: Cincinnati, USA. – P. 1-13.
70. Newson R., Strachan D., Corden J., Millington W. Fungal and other spore counts as predictors of admissions for asthma in the Trent region. // *Occupational and Environmental Medicine*. – 2000. – V. 57. – № 11. – P. 786-792.
71. Siersted H.C., Gravesen S. Extrinsic allergic alveolitis after exposure to the yeast *Rhodotorula rubra*. // *Allergy*. – 1993. – V. 48. – № 4. – P. 298-299.
72. Ren P., Jankun T.M., Belanger K., Bracken M.B., Leaderer B.P. The relation between fungal propagules in indoor air and home characteristics. // *Allergy*. – 2001. – V. 56. – № 5. – P. 419-424.
73. Dacarro C., Picco A.M., Grisoli P., Rodolfi M. Determination of aerial microbiological contamination in scholastic sports environments. // *Journal of Applied Microbiology*. – 2003. – V. 95. – № 5. – P. 904-912.
74. Raynor P.C., Leith D., Lee K.W., Mukund R.M. *Sampling and Analysis Using Filters in Aerosol Measurement: Principles, Techniques, and Applications*. P. Kulkarni, P.A. Baron, and K. Willeke. – 2011. – P. 107-128.

75. Zollinger M., Krebs W., Brandl H. Bioaerosol formation during grape stemming and crushing. // *Science of The Total Environment*. – 2006. – V. 363. – № 1–3. – P. 253-259.
76. *Aerosol Measurement: Principles, Techniques, and Applications*. 3rd ed. – 2011: John Wiley & Sons, Inc. – 904 P.
77. Han T., Mainelis G. Design and development of an electrostatic sampler for bioaerosols with high concentration rate. // *Journal of Aerosol Science*. – 2008. – V. 39. – № 12. – P. 1066-1078.
78. Hernlem B.J., Ravva S.V. Application of flow cytometry and cell sorting to the bacterial analysis of environmental aerosol samples. // *Journal of Environmental Monitoring*. – 2007. – V. 9. – № 12. – P. 1317-1322.
79. Министерство здравоохранения РФ. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы 2.1.3.1375-03. Москва – 2003.
80. Воробьев А.А., Кривошеин Ю.С., Ширококов В.П. Медицинская и санитарная микробиология. – 2003. – Москва: Академия. – 464 P.
81. Iwen P.C., Davis J.C., Reed E.C., Winfield B.A., Hinrichs S.H. Airborne Fungal Spore Monitoring in a Protective Environment During Hospital Construction, and Correlation with an Outbreak of Invasive Aspergillosis. // *Infection Control & Hospital Epidemiology*. – 1994. – V. 15. – № 5. – P. 303-306.
82. Омелянский В.Л. Практическое руководство по микробиологии. 2 ed. – 1940. – Москва, Ленинград. – 432 P.
83. Воробьев А.А., Кривошеин Ю.С., Быков А.С. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии – 2001. – Москва: Высшая школа. – 224 P.
84. Министерство здравоохранения РФ. Методические указания 4.2.734-99 «Микробиологический мониторинг производственной среды». Москва – 1999.
85. Mehta S.K., Mishra S.K., Pierson D.L. Evaluation of three portable samplers for monitoring airborne fungi. // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1996. – V. 62. – № 5. – P. 1835-8.
86. Sasaki K., Kaya M., Yano J., Kitani A., Kunai A. Growth mechanism in the electropolymerization of aniline and p-aminodiphenylamine. // *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. – 1986. – V. 215. – № 1. – P. 401-407.
87. Zotti G., Cattarin S., Comisso N. Cyclic potential sweep electropolymerization of aniline: The role of anions in the polymerization mechanism. // *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. – 1988. – V. 239. – № 1–2. – P. 387-396.

88. Heinze J., Rasche A., Pagels M., Geschke B. On the Origin of the So-Called Nucleation Loop during Electropolymerization of Conducting Polymers. // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2007. – V. 111. – № 5. – P. 989-997.
89. Berionni G., Morozova V., Heininger M., Mayer P., Knochel P., Mayr H. Electrophilic Aromatic Substitutions of Aryltrifluoroborates with Retention of the BF₃– Group: Quantification of the Activating and Directing Effects of the Trifluoroborate Group. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2013. – V. 135. – № 16. – P. 6317-6324.
90. Stilwell D.E., Park S.M. Electrochemistry of Conductive Polymers: II. Electrochemical Studies on Growth Properties of Polyaniline. // *Journal of The Electrochemical Society*. – 1988. – V. 135. – № 9. – P. 2254-2262.
91. Randles J.E.B. Kinetics of rapid electrode reactions. // *Discussions of the Faraday Society*. – 1947. – V. 1. – № 0. – P. 11-19.
92. Lasia A. Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications in Modern Aspects of Electrochemistry. B.E. Conway, J.O.M. Bockris, and R. White. – 2002. – Springer US. – P. 143-248.
93. Freund M.S., Deore B.A. Self-Doped Conducting Polymers. – 2007: Wiley. – 338 P.
94. Yuchi A., Sakurai J.k., Tatebe A., Hattori H., Wada H. Performance of arylboronic acids as ionophore for inorganic anions studied by fluorometry and potentiometry. // *Analytica Chimica Acta*. – 1999. – V. 387. – № 2. – P. 189-195.
95. Park J.-Y., Chang B.-Y., Nam H., Park S.-M. Selective Electrochemical Sensing of Glycated Hemoglobin (HbA1c) on Thiophene-3-Boronic Acid Self-Assembled Monolayer Covered Gold Electrodes. // *Analytical Chemistry*. – 2008. – V. 80. – № 21. – P. 8035-8044.
96. Liu D., Perdue R.K., Sun L., Crooks R.M. Immobilization of DNA onto Poly(dimethylsiloxane) Surfaces and Application to a Microelectrochemical Enzyme-Amplified DNA Hybridization Assay. // *Langmuir*. – 2004. – V. 20. – № 14. – P. 5905-5910.
97. Ramírez C., Martínez A.T. Manual and atlas of the Penicillia. – 1982. – Amsterdam ; New York : New York, N.Y.: Elsevier Biomedical Press. – 874 P.
98. Hamilton P.B., Knight S.G. An analysis of the cell walls of *Penicillium chrysogenum*. // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1962. – V. 99. – № 2. – P. 282-287.
99. Rizza V., Kornfeld J.M. Components of Conidial and Hyphal Walls of *Penicillium chrysogenum*. // *Microbiology*. – 1969. – V. 58. – № 3. – P. 307-315.
100. Varshney M., Li Y.B. Interdigitated array microelectrodes based impedance biosensors for detection of bacterial cells. // *Biosensors & Bioelectronics*. – 2009. – V. 24. – № 10. – P. 2951-2960.

101. Couniot N., Flandre D., Francis L.A., Afzalian A. Bacteria detection with interdigitated microelectrodes: noise consideration and design optimization. // 26th European Conference on Solid-State Transducers, Eurosensors 2012. – 2012. – V. 47. – P. 188-191.
102. Burnett J.H. Fundamentals of mycology. 2nd ed. – 1976. – London: Edward Arnold. – 688 P.