

УДК 544.6 + 541.138.3: 539.216

БИОСЕНСОРЫ**Джелали В.В., Волянский А.Ю.****Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова АМН Украины****Введение**

Ещё в 1756 г. М.В. Ломоносов в работе “Теория электричества, составленная по математическому методу” указал на то, что путь к пониманию истинной причины электричества лежит через изучение химических законов. Гальвани в 1791 г. в “Трактате о силах электричества при мышечном движении” пришёл к заключению, что он открыл новый вид электричества, свойственный самому животному, и назвал его “животным электричеством”. В 1800 г. Вольта изобрёл генератор – “вольтов столб”, провозгласив тем самым электрохимическую эру в учении об электричестве, и этим, как-бы, завершил дискуссию о “животном электричестве”. В 1843 г. Дюбуа-Раймон подтвердил, что сокращение мышцы обусловлено генерацией в ней электрических токов, а, следовательно, и возникновением разности потенциалов между различными тканями живого организма. В конце 20 века наступил новый этап в развитии биоэлектрохимии – микробиосенсорной электроники. Использовать её достижения в микробиологии для обнаружения биологической и ферментативной активности бактерий, их идентификации и четкой прикладной дифференциации – весьма важная задача.

Ионный и электронный транспорт в электрохимически активных средах

Источниками генерации электрического потенциала являются межфазные границы Ме/раствор электролита, где под Ме подразумеваются любые металлы, сплавы, полупроводниковые плёнки, а так же синтетические и биологические мембраны [1]. Такие индифферентные к растворению границы раздела фаз могут быть использованы в качестве рабочего электрода в биосенсорах. В качестве иллюстрации на Рис.1 приведены данные для одной из таких исследованных нами межфазных границ [2].

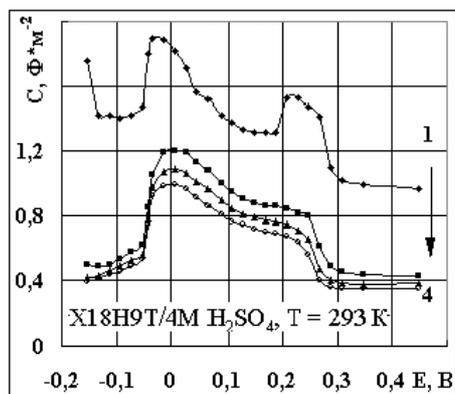


Рис.1. Вольтфарадные зависимости для межфазной границы сталь X18H9T/ H₂SO₄ – 4 М при различных частотах переменного тока f : 1 – 22; 2 – 220; 3 – 820; 4 – 2200 Гц.

Увеличение концентрации кислоты до 4 М сопровождается смещением стационарного потенциала в катодную область и снижением емкости в максимуме зависимостей $C = f(E)$, где C – емкость, E – потенциал рабочего электрода измеренный относительно электрода сравнения. По сравнению с X18H9T/ H₂SO₄ – 1 М появляется дополнительный максимум при $E = 0,00$ В; он регистрируется и при повышении температуры до 333 К. Вклады двух емкостных компонент в измеряемую емкость аддитивны.

В координатах $C^{-2} = f(E)$ [3] полученные зависимости имеют линейные участки, наличие которых указывает на то, что поверхностный слой представляет собой полупроводниковую фазу (Рис.2).

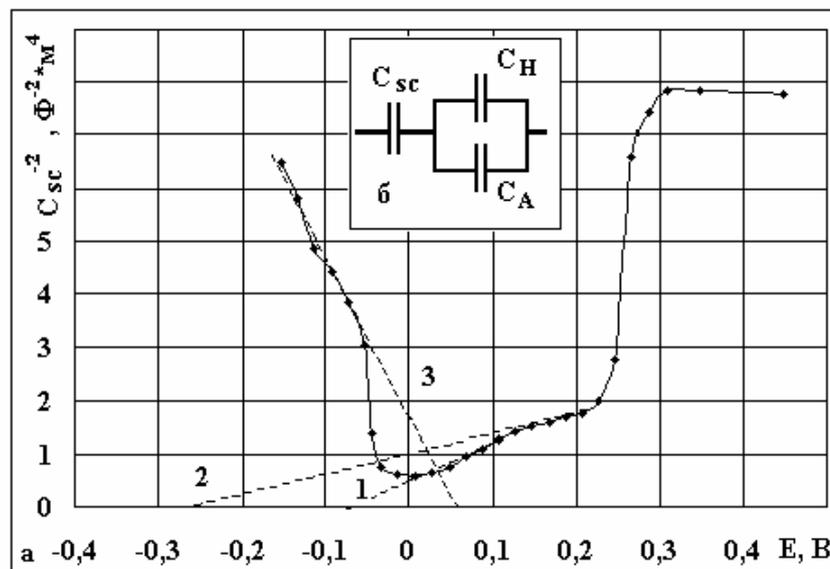


Рис. 2. Зависимость $C_{sc}^{-2} = f(E)$ для межфазной границы X18H9T/ 4M H₂SO₄ – а, ЭЭСЗ – б при $\omega \rightarrow \infty$. C_H – ёмкость Гельмгольца (0,36 Ф·м⁻²), C_A – адсорбционная ёмкость (2,88 Ф·м⁻²), C_{sc} – ёмкость пространственного заряда.

Аналогичные зависимости рассчитаны и для остальных исследованных концентраций и температур. Прямое использование этих данных для расчёта некорректно, и необходимо выделить ёмкость пространственного заряда – C_{sc} . С этой целью полученные спектры импеданса пересчитаны в спектры адмитанса. В пределе $\omega \rightarrow \infty$ электрическая эквивалентная схема замещения (ЭЭСЗ) имеет вид "б" (Рис.2). Из адмитансных спектров рассчитаны величины $C_{\omega \rightarrow \infty}$ и, затем, зависимости $C_{sc}^{-2} = f(E)$, представленные в виде кривых "а" на Рис.2. При анодных потенциалах измеряемая C выходит на плато и численно равна 0,36 Ф·м⁻², что соответствует ёмкости Гельмгольца C_H при формировании жидкой обкладки ДЭС однозарядными анионами (OH⁻, HSO₄⁻). В таблице 1 приведены параметры полупроводникового электрода, полученные с использованием теории Мотта-Шоттки для вырожденных полупроводников [3].

Таблица 1. Электрохимические параметры полупроводникового электрода в системе X18H9T/4 М H₂SO₄ при 293 К.

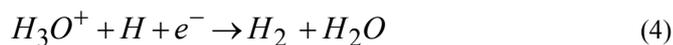
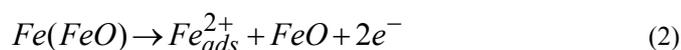
к	$\phi_{C^{-2}=0}, В$	$N \cdot 10^{-27}, М^{-3}$		n	$E_F, эВ$	$\phi_{FB}, В$	$\delta_{мин}, нМ$
		N_D	N_{An}				
1	-0,07	17,0	–	4	3,27	-0,234	1,44
2	-0,26	25,1	–	6	4,24	-0,622	1,36
3	0,06	–	4,05	1	1,25	-0,182	1,83

В отличие от работ других исследователей, наши данные иллюстрируют, что для полученной полупроводниковой наноплёнки, сформированной на межфазной границе X18H9T/4M H₂SO₄ (Рис. 2(а)), существуют три области линейной зависимости $C_{sc}^{-2} = f(E)$: – ближняя – 1, дальняя – 2, анодные и катодная – 3. В конденсированном полупроводниковом слое анодные – N_D и $N_{D'}$ и катодное – N_{Ak} числа Лошмидта кратны

друг другу и зависят от знака и величины перенапряжения. Полупроводниковый слой состоит из 1 мономолекулярного слоя. При катодных потенциалах ($k = 3$) его толщина увеличивается за счёт дополнительного экранирования поверхности электрода молекулами воды, входящими в диполи гидроксоний ионов и ориентированными атомами водорода к поверхности стали. Разность между толщиной первого и второго слоев ($k = 1$ и $k = 2$) составляет 0,08 нм (радиус атомов Ni 0,124 нм). Эта разность относится к адиону Ni^{2+}_{ads} , который при положительных потенциалах в силу электростатического отталкивания десорбируется с поверхности электрода (потенциал десорбции 0,13 В). При этом изменяется величина n . Для этого случая потенциал плоских зон описывается уравнением Грелихеса [3]:

$$E_{FD} = E_{C-2=0} + e\epsilon\epsilon_0 N_D / 2C_H^2 - (2/5)E_F/e. \quad (1)$$

При расчётах сделано допущение, что адсорбционная емкость C_A равна $8 \cdot 0.36 \text{ Ф} \cdot \text{м}^{-2}$. Это предположение эквивалентно тому, что C_A определяется всеми валентными электронами способными перейти в зону проводимости. Тогда последовательность электродных стадий в механизме, реализующем на полупроводниковом электроде, можно представить следующим образом:



Обращает на себя внимание тот факт, что энергия Ферми

$$E_F = h^2 (3\pi^2 N)^{2/3} / 4\pi m^*, \quad (7)$$

где h – постоянная Планка, m^* – масса электрона в зоне проводимости, N – число Лошмидта, квантована и зависит от знака и величины перенапряжения.

Изменение свободной энергии начального и конечного *Red* и *Ox* уровней при изменении потенциала, приложенного к межфазной границе, приводит к изменению механизма элементарного электродного акта и, следовательно, к изменению конфигурации потенциального барьера [4]. Поскольку для анодного или катодного процессов *Red* и *Ox* уровни различны, то при различных механизмах реакции происходит дискретное изменение энергии Ферми. Образование полупроводникового слоя FeO следует аналогичному механизму Кабанова, Бурштейн и Фрумкина [5]. Стадия (5) обусловлена термоэмиссией электронов (механизм Мотта–Шоттки). Стадия замедленной десорбции (6) изменяет электростатическую энергию межфазного перехода и, тем самым, количественно влияет на энергию Ферми. В определённом интервале потенциалов вольтамперная кривая характеризуется отрицательным дифференциальным сопротивлением.

На Рис.3. приведена нормированная величина тока электронного переноса от перенапряжения для межфазной границы X18H9T/4M H₂SO₄, пропорциональная току туннелирования одного электрона через потенциальный барьер.

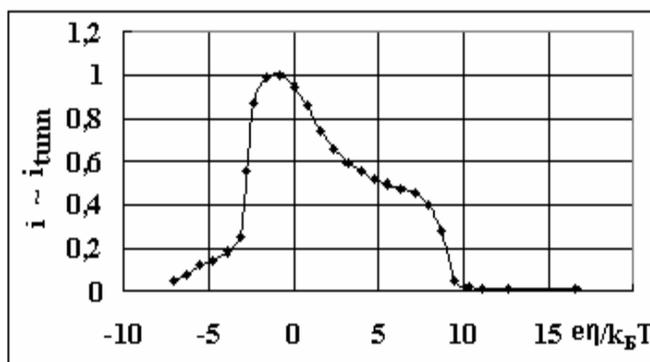


Рис.3. Экспериментальная нормированная величина тока неадиабатического туннелирования электрона через межфазную границу X18H9T/ 4M H₂SO₄.

Поскольку энергия электростатической туннельной емкости равна $e^2/2C \gg k_B T$, то возникает её квантованное заряджение. Этот механизм диктует последовательность одноэлектронных стадий туннелирования электрона через потенциальный барьер.

ФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РЕГИСТРАЦИИ СИГНАЛОВ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ АНСАМБЛЯХ

В биологии микроорганизмов аналогами рассмотренной выше границы являются различные межфазные границы “мембрана клетки / раствор электролита”, через которые осуществляется катионный, анионный и электронный транспорт. Указанные трёхмерные границы обладают уникальным свойством – по одной из координат они наноразмерны. Именно их электрофизическими и химическими свойствами, а также потенциалопределяющими ионами *Red-Ox* систем в растворе электролита определяется межфазный потенциал [6–8], а, следовательно, и кинетика электронного транспорта. Т.е., все уравнения электрохимической кинетики, описывающие замедленность электронного и ионного переноса [1], остаются в силе и для межфазной границы – мембрана клетки / раствор электролита. Поэтому измерение вольтамперных характеристик и спектров импеданса позволяет изучать энергетическое функционирование межфазной границы мембрана клетки / раствор электролита.

В качестве примера на Рис.4. представлена обычная вольтамперная зависимость $j = f(E)$, полученная нами для системы Fe(000)/0.5 Na₂SO₄, где (000) обозначает Fe особой чистоты (о.с.ч.), в тщательно очищенном растворе электролита, которая передаёт все основные черты циклической вольтамперной характеристики (ВАХ).

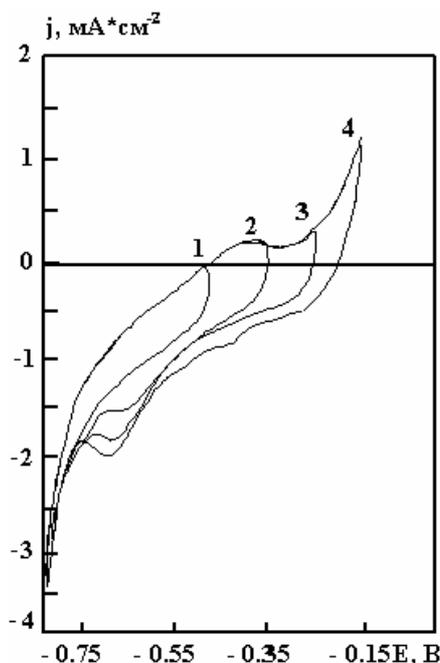


Рис. 4 Вольтамперные зависимости $j = F(E)$ – для системы Fe000/Na₂SO₄ – 0.5 М в шкале с.в.э. Режим работы программатора ПР – 8: $U_1 = 0.4$ В; $U_2 = 0$ В; $U_3 = 0.4$ В; $U_4 = 0$ В; $U_5 = 0.3; 0.4; 0.5; 0.6$ В; $U_6 = 0$ В; $U_7 = 0.3; 0.4; 0.5; 0.6$ В; $U_8 = -1.0$ (I); $t_s^1 = 10$; $t_s^2 = 10$; $t_s^3 = 10$; $t_s^4 = 10$ с; крутизна – $S(V/s) = 10^{-1}$ В·с⁻¹; 10 мА·В⁻¹, масштаб координат на самописце ЛКД – 02-004 $x = 50$ мВсм⁻¹; $y = 1$ мВсм⁻¹.

Максимумы разряда – ионизации окисленных и восстановленных форм позволяют по этим характеристикам достаточно легко определить стандартные потенциалы *Red–Ox* форм, наработанных в растворе при циклировании потенциала рабочего электрода в определённом диапазоне, а также их концентрации.

Описанная картина усложняется при попытке использовать подходы к биологическим объектам вообще и к микробиологическим в частности. Последнее обусловлено тем, что в биохимической среде находятся не только клетки определенного вида бактерий, но и продукты жизнедеятельности. Электростатическое взаимодействие производных бактериальных клеток с электродом приводит к сильному искажению регистрируемых сигналов и, в большинстве случаев, делает невозможным прямое определение бактерий, их идентификацию и концентрацию. Для того, чтобы исключить или уменьшить до минимума искажающий сигнал, следует использовать следующую “стандартную” процедуру. На рабочий электрод наносится тонкий равномерный слой ионселективной плёнки. Ионселективная мембрана выполняет роль сепаратора и концентратора, не пропуская к электроду посторонние ионы, и тем самым выделяя полезный сигнал, идущий на регистрацию. Для создания электрохимических сенсоров (амперметрических, потенциометрических, резистивных и кондуктометрических) одним из ключевых моментов является определение – какое ионселективное вещество необходимо выбрать для нанесения, какова его толщина, размер пор, по отношению к каким ионам (катионам или анионам) оно должно обладать ионселективными свойствами и каков коэффициент их диффузии.

Электрохимические механизмы, обеспечивающие генерацию потенциала в ионселективных плёнках

Одним из самых мощных и информативных методов, который используется для исследования и создания биосенсоров является метод импедансной спектроскопии. Проиллюстрируем возможности этого

Измерение ЭДС производили с помощью иономера ЭВ-74. Импеданс измеряли в частотном диапазоне $1 \cdot 10^{-3} - 1 \cdot 10^5$ Гц с помощью квазиуравновешенного моста [13]. Из фигур Лиссажу рассчитывали модуль импеданса – $|Z|$ и угол сдвига фаз – σ

Активную и реактивную составляющие импеданса

$$Z = Z \cdot \exp(j\sigma) \tag{9}$$

или

$$Z = \text{Re } Z + j \text{Im } Z \tag{10}$$

рассчитывали по уравнениям

$$\text{Re } Z = |Z| \cos \sigma \tag{11}$$

$$\text{Im } Z = |Z| \sin \sigma \tag{12}$$

где $j = \sqrt{-1}$, σ – угол сдвига фаз (градусы) между переменными током и напряжением, $|Z|$ – коэффициент пропорциональности между отношением фазовых напряжения и тока на объекте, f – частота переменного тока. Относительная погрешность измерений составляла 4%.

Для определения эквивалентной схемы замещения и её параметров экспериментальные данные обрабатывали по стандартной методике [13]. Измерения ЭДС гальванических цепей (8) показали, что у зависимости $\Delta U = f(\lg C)$ предлогарифмический коэффициент характерен для двухэлектронной электрохимической реакции (~ 29 мВ). На зависимости $\sigma = F(\lg f)$ (Рис.5, (♦)) для системы (8) с платиновыми электродами ((8)_{pt}) два максимума: высокочастотный и инфранизкочастотный.

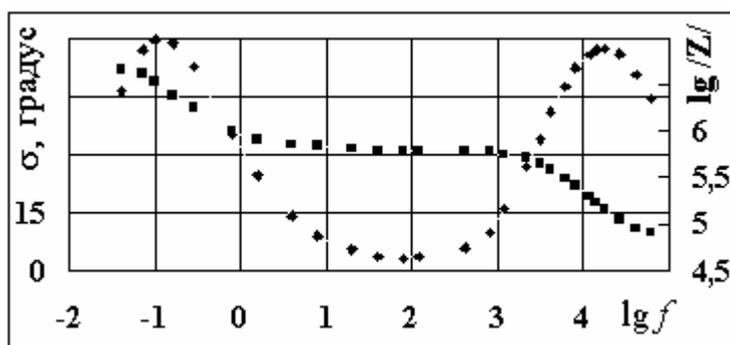


Рис.5. Диаграмма Бодэ (зависимость $\lg |Z| = F(\lg f)$ – ■) и изменение фазового угла ($\sigma = F(\lg f)$ – ♦) для гальванической цепи (8)_{pt} при $\text{Cu}^{+2} = 0,01$ М

Им соответствуют два релаксационных процесса, обусловленных электрохимическими характеристиками гальванической цепи. У соответствующей этому случаю зависимости $\lg |Z| = F(\lg f)$ (Рис. 5, (■)) две переходные области и линейный участок между ними, где $\lg |Z|$ слабо зависит от $\lg f$. Два таких же участка при инфранизких и высоких частотах не были полностью разрешены в силу конечного частотного диапазона импедансного спектрометра, но, тем не менее, вычислены. Пересчет этих данных по уравнениям (4) и (5) позволяет построить спектры импеданса в комплексной плоскости $-Im Z$; $Re Z$ (Рис. 6).

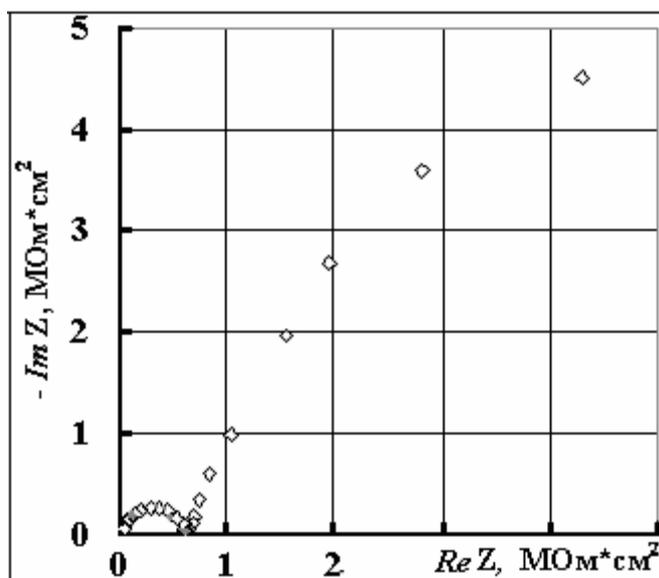


Рис. 6. Диаграмма Арганда для гальванической цепи (8)_{pt} при Cu²⁺ = 0.01 М.

Из Рис. 6 следует, что годограф импеданса для исследуемой границы раздела – две полуокружности, центры которых лежат ниже реальной оси. С ростом концентрации Cu²⁺ ионов в электролите диаметр высокочастотной полуокружности уменьшается. Из этих диаграмм находили экстраполяцией предельные значения сопротивлений $ReZ_{\omega \rightarrow \infty} = R_{p-p}$ и $ReZ_{\omega \rightarrow 0} = R_{p-p} + R_p$.

Анализом экспериментальных результатов, установлено, что эквивалентная схема замещения цепи (8)_{pt} имеет вид, представленный на Рис.7,

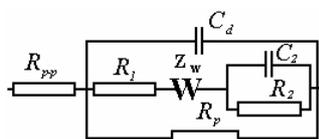


Рис. 7. Эквивалентная электрическая схема гальванической цепи (8)_{pt} с платиновыми электродами (см. уравнение (13)).

а её параметры иллюстрирует табл. 2.

Таблица 2.

Параметры эквивалентной электрической схемы замещения

для цепи (8)_{pt} при 20⁰С.

Cu ²⁺ , М	R _{p-p} , Ом см ²	C _d , Ф см ⁻² ·10 ¹²	R _p , Ом см ² ·10 ⁻⁷	R ₁ , Ом см ² ·10 ⁻³	W, Ом см ² ·с ^{-1/2} ·10 ⁻⁴	R ₂ , Ом см ² ·10 ⁻⁶	C ₂ , Ф см ⁻² ·10 ¹²
0.001	40000	40	1,1	140	47,6	0,50	3,5
0.025	40000	40	1,1	80	112	0,52	3,7
0.01	44000	40	1,1	130	45	0,44	3,5
0.025	44000	40	1,1	80	75	0,48	3,3

0.05	52000	40	1,1	50	50	0,50	3,2
0.1	52000	40	1,1	50	52	0,50	2,4

Полученная эквивалентная схема замещения описывается уравнением

$$Z = (R_{p-p} + (j\omega C_d + (R_p)^{-1} + (R_1 + Z_w + (j\omega C_2 + (R_2)^{-1})^{-1})^{-1})^{-1}) \quad (13)$$

Значения C_d и R_p в пределах погрешности эксперимента не меняются с ростом концентрации потенциалопределяющих ионов, а C_2 и R_1 уменьшаются. Расчетная величина суммарной площади активных пор к общей площади ионселективного электрода составляет $\sim 4\%$. Проводимость остальной поверхности эквивалентна проводимости пленки ПВХ. Для неё $R_{p-p} \approx 1 \text{ МОм}\cdot\text{см}^2$ и $R_p \sim 30 \text{ МОм}\cdot\text{см}^2$.

Из общего измеренного импеданса исследованных гальванических цепей выделен суммарный импеданс $Red-Ox$ реакций на электроактивных участках мембраны. Численные значения элементов электрической эквивалентной схемы замещения приведены к 1 см^2 площади активных пор (см. табл. 3). Анализ их свидетельствует, что величины по порядку эквивалентны значениям этих же параметров для обычных электрохимических $Red-Ox$ реакций на активных, не заблокированных медных электродах, соответствующих той же поверхности.

Таблица 3

Приведенные значения элементов эквивалентной схемы замещения, относящиеся к 1 см^2 истинной поверхности проводящих пор.

Cu^{2+} , М	R_{p-p} , $\text{Ом}\cdot\text{см}^2$	C_d , $\text{мкФ}\cdot\text{см}^{-2}$	R_1 , $\text{Ом}\cdot\text{см}^2$	W , $\text{Ом}\cdot\text{см}^2\cdot\text{с}^{-1/2}$	R_2 , $\text{Ом}\cdot\text{см}^2$	C_2 , $\text{мкФ}\cdot\text{см}^{-2}$
0,001	1,0	1,6	3,5	11,9	12,5	1,40
0,025	1,0	1,6	2,0	28,1	13,0	1,48
0,01	1,1	1,6	3,25	12,0	11,0	1,40
0,025	1,1	1,6	2,0	18,7	12,0	1,32
0,05	1,3	1,6	1,25	12,5	12,5	1,28
0,1	1,3	1,6	1,25	12,5	12,5	0,96

Потенциал Доннана (мембранный потенциал) возникает на полупроницаемой границе раздела двух фаз, содержащих ионы нескольких сортов, часть из которых может обратимо переходить через границу раздела. В то же время ион R с зарядовым числом z_R имеет столь большой коэффициент распределения $P_{AB}^{\alpha/\beta}$, что практически полностью содержится в фазе α .

Коэффициент распределения соли АВ между фазами α и β по определению

$$P_{AB}^{\alpha/\beta} = a_{AB}^{\alpha} / a_{AB}^{\beta} \quad (14)$$

Активности ионов связаны соотношением

$$a_{A^+}^{\alpha} a_{B^-}^{\alpha} = (P_{AB}^{\alpha/\beta})^2 a_{A^+}^{\beta} a_{B^-}^{\beta} \quad (15)$$

Используя это выражение и два условия электронейтральности фаз,

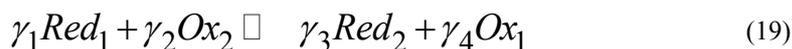
$$z_R c_R^{\alpha} + c_{A^+}^{\alpha} - c_{B^-}^{\alpha} = 0 \quad (16)$$

$$c_{A^+}^\beta - c_{B^-}^\beta = 0 \quad (17)$$

находим донанновский потенциал [15]:

$$\Delta\varphi^{\alpha/\beta} = \frac{RT}{zF} \ln \left(P_{A^+}^{\alpha/\beta} \gamma_{A^+}^\beta \cdot \gamma_{B^-}^\alpha / P_{B^-}^{\alpha/\beta} \gamma_{A^+}^\alpha \cdot \gamma_{B^-}^\beta \right) + \frac{RT}{2F} \ln \left(1 + z_R^\alpha \cdot c_R^\alpha / c_{A^+}^\alpha \right) \quad (18)$$

В отличие от доннановского, *Red-Ox* потенциал для двухфазной системы, содержащей в α и β фазах *Red-Ox* компоненты, в случае обмена n электронами через межфазную границу, описывается равновесием



При равновесии

$$\gamma_1 \bar{\mu}_{Red_1}^\alpha + \gamma_2 \bar{\mu}_{Ox_2}^\beta = \gamma_3 \bar{\mu}_{Red_2}^\beta + \gamma_4 \bar{\mu}_{Ox_1}^\alpha \quad (20)$$

межфазный *Red-Ox* потенциал равен

$$\Delta\varphi^{\alpha/\beta} = \Delta\varphi_{Red/Ox}^{0,\alpha/\beta} + \frac{RT}{nF} \ln \left[\left(a_{Red_1}^\alpha \right)^{\gamma_1} \cdot \left(a_{Ox_2}^\beta \right)^{\gamma_2} / \left(a_{Ox_1}^\alpha \right)^{\gamma_4} \cdot \left(a_{Red_2}^\beta \right)^{\gamma_3} \right] \quad (21)$$

Отличие потенциала Доннана (а, следовательно, и механизма его генерации) от *Red-Ox* потенциала заключается в том, что в первом случае через межфазную границу диффундирует какой либо ион, в то время как во втором – диффузия ионов запрещена или незначительна, а перенос заряда через эту границу раздела (проводящие поры мембраны) осуществляется элементарной частицей с минимальной массой и размером – электроном.

Таким образом, если исследуемую трехфазную систему – электролит₁/ мембрана / электролит₂ в термодинамическом смысле можно представить как двухфазную, где мембрана является только переносчиком электронов (границей раздела фаз с необычными свойствами), а транспорт ионов вглубь неё запрещен или незначителен, то тогда все вышесказанное относительно *Red-Ox* потенциала относится к рассматриваемому нами случаю. Становится очевидным, что потенциалопределяющими являются *Red-Ox* стадии, реализующиеся на внутренней и внешней активных поверхностях проводящих пор ионселективной мембраны. Генерация потенциала на межфазных границах исследованного нами типа осуществляется за счет *Red-Ox* механизма. Диффузионный и доннановский механизмы не исключены полностью, но их вклад в генерацию потенциала на исследованных ионселективных мембранах не является определяющим.

Необходимо отметить, что механизм передачи электронов через набухшую в электролите мембрану и ее проводящие поры требует дальнейшего тщательного изучения с целью применения метода для определения электрохимической активности биологических систем и распознавания микробиологических объектов. Однако уже сейчас можно констатировать, что изменение электронной плотности на внешней и внутренней поверхностях ионселективной биосенсорной мембраны под действием *Red-Ox* компонент раствора определяет её суммарный электростатический потенциал.

Таким образом, именно ионселективные мембраны являются биосенсорными мембранами. Наиболее полно получение и использование наноразмерных плёнок Лэнгмюра – Блоджет и их модифицирование, в частности, электрохимическими методами изложено в монографии [16].

Механизмы, обеспечивающие селективность и избирательность биосенсоров

Рассмотрим три типа биосенсоров – спектроэлектрохимический, ферментативный амперометрический и резистометрический (кондуктометрический).

Биосенсоры – разновидность химических сенсоров – часто обладают отличной селективностью благодаря специфичности биологических реакций, но у них есть недостаток – малый срок службы. Применение химически селективных мембран (подобных используемой в кислородном электроде Кларка) до некоторой степени снижает посторонние помехи.

Увеличение селективности к определённому анализируемому раствору или классу таких растворов достигается путем использования спектроэлектрохимии химически селективных плёнок [17], наносимых на поверхность электрода. В этом случае для определения агента последний должен: 1) распределяться в плёнке, обладающей химической избирательностью; 2) окисляться или восстанавливаться на поверхности электрода при заданном потенциале; 3) его окисленная или восстановленная форма должна поглощать свет с некоторой заданной длиной волны, используемой для определения.

На Рис. 8. показана схема, демонстрирующая работу спектроэлектрохимического биосенсора.



Рис.8. Схема оптоэлектрохимического биосенсора. Обозначения: ⊗ – вещества не проникающие в плёнку; ∅ – вещества проникающие в плёнку, но не подвергающиеся *Red-Ox* превращениям; о – вещества проникающие в плёнку, подвергающиеся *Red-Ox* превращениям и дающие сигнал, но не на “аналитической” длине волны; ⊕ – вещества проникающие в плёнку, подвергающиеся *Red-Ox* превращениям, продукты которых дают сигнал на “аналитической” длине волны.

На правую боковую стенку волновода нанесена тонкая пленка оксида индия (ИТО), представляющая собой оптически прозрачную поверхность. На неё наносится тонкий слой ионселективной плёнки, обладающий химической избирательностью. Свет, проходящий по оптическому волноводу в каждой точке, где происходит отражение, вызывает исчезающе слабое поле, проникающее в плёнку. Взаимодействие этого поля с анализируемым веществом в пленке приводит к затуханию света, проходящего по волноводу. Оно связано с концентрацией анализируемого вещества в плёнке. Плёнка выполняет две важные функции. 1. Она предварительно концентрирует определяемое вещество вблизи поверхности электрода, где оно может быть определено спектроэлектрохимически в режиме нарушенного полного внутреннего отражения. 2. Она

способствует устранению помех со стороны других веществ, поскольку слабое поле проникает на такую малую глубину, что оптический “пробник” затрагивает только то вещество, которое находится внутри пленки.

На практике определяемое вещество, распределённое в плёнке, можно зарегистрировать лишь в случае если оно вступает в *Red-Ox* реакцию на поверхности электрода, что приводит к поглощению света на “аналитической длине волны”. Его модулируют путём электрохимического циклирования между поглощающим и не поглощающим состояниями вещества.

Рассмотрим работу ферментативного биосенсора [18]. На Рис. 9. показана схема генерации сигнала при ферментативном катализе, использующаяся для регистрации микробиологического субстрата.

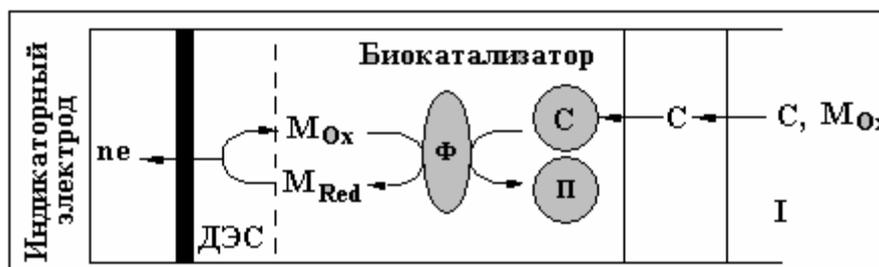
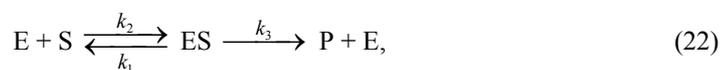


Рис. 9. Схема генерации сигнала в амперометрическом ферментативном электроде. Ф – фермент, М – медиатор, С – субстрат, П – продукт.

Фермент состоит из одной или более пептидных цепей, образующих третичную структуру, стабилизированную электростатическими взаимодействиями, водородной связью и дисульфидными мостиками. Его каталитическая активность связана с активным центром, где идёт реакция. Реакция специфична в силу уникальной пространственной конфигурации и заряда этого центра. Ферменты реагируют с субстратом по следующей схеме



где E – фермент, S – субстрат фермента и P – продукт ферментативной реакции. Кинетика этого процесса детально проанализирована Михаэлисом – Ментеи [19].

Скорость образования или исчезновения продукта описывается следующим уравнением:

$$-(dS/dP) = (dP/dt) = (k_3[E][S])/((k_2 + k_3)/k_1 + [S]) = (V_{\max}[S])/(K_m + [S]), \quad (23)$$

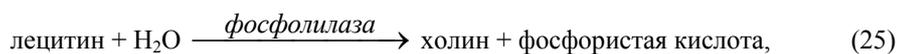
где V_{\max} – максимальная скорость ферментативной реакции, K_m – константа Михаэлиса. При инверсии уравнения (23) получается уравнение:

$$(1/V) = (K_m/V_{\max}[S]) + (1/V_{\max}) \quad (24)$$

Оно позволяет получить зависимость Ханеса. Эти уравнения позволяют определить концентрацию количества субстрата, либо количества фермента, участвующих в каталитической реакции.

Обычно в сенсорах используют ферменты: лактатоксидазу, лактатдегидрогеназу, пируватоксидазу, холестеролоксидазу, тринитротолуолоксидоредуктазу, глюкозооксидазу, глюкозодегидрогеназу, метанолдегидрогеназу, алкогольоксидазу, метанолдегидрогеназу, позволяющие определять лактат, пируват, холестерол, глюкозу, алкоголь, формальдегид.

В ферментативных амперометрических биосенсорах обычно измеряется скорость поглощения кислорода или разряда нарабатываемой в ходе ферментативной реакции перекиси водорода, например в ходе реакций:



где ChOx – фермент холиноксидаза.

Иммобилизация ферментов необходима для того, чтобы увеличить стабильность измерений, сделать более эффективной связь ферментативной реакции с преобразователем, локализовать реакцию в одном сенсоре, сделать возможными непрерывные измерения и доступным их математический анализ.

Иммобилизацию ферментов проводят ионообменным или ковалентным связыванием, поперечной сшивкой (сетка) или удерживанием в ловушках (молекулярные решётки, микроинкапсуляция). Ковалентное связывание наиболее эффективно из всех методов сохранения активности и увеличения долговечности ферментов. Весьма важным является и связывание фермента с мембраной через соответствующие функциональные группировки. Локализация ферментативной реакции – также один из наиболее важных моментов в технологии создания сенсоров. Появилась возможность локализовать ферментативную реакцию там, где это наиболее выгодно: на мембране или непосредственно на электроде, где прямая реакция протекает без диффузионных ограничений. Возможность непрерывных измерений обеспечивается отсутствием необходимости замены фермента, который можно регенерировать по окончании реакции. Удержание ферментов в гелях достаточно детально описано для ферментов, встроенных в агарозу. Ферменты специфическим образом опознают субстрат, ко-субстрат, кофактор, активатор и ингибитор. Ферменты способны осуществлять множество превращений с одинаковой эффективностью. Действие ферментов может приводить к мощному увеличению регистрируемого сигнала. Ферменты могут быть иммобилизованы.

К резистометрическим сенсорам относят биосенсоры, в которых информационный сигнал пропорционален активной составляющей электрохимического импеданса Z на высокой частоте f . При высоких f комплексная диаграмма Арганда вырождается в точку на действительной оси импеданса $Re Z$ и практически равна сопротивлению раствора R_p . На Рис.10. приведена схема тонкопленочного резистометрического биосенсора, использованного в работе [21] для определения глюкозы и мочевины путем измерения проводимости G в крови при частоте переменного тока $f = 10$ кГц.

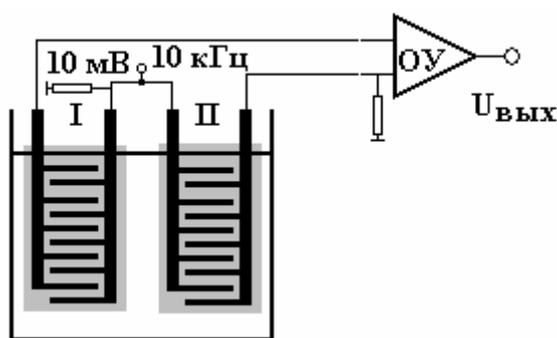


Рис.10. Схема измерения проводимости тонкопленочного биосенсора. I – рабочий датчик, II – датчик сравнения.

В ходе эксперимента авторы измеряли зависимость амплитуды выходного сигнала от концентрации субстрата. Для создания биоматрицы готовили растворы фермента и бычьей сыворотки альбумина (БСА) в 20 мМ калий- фосфатном буфере с рН 7.4 с конечными концентрациями 50–100 мг/мл и смешивали в соотношении 1:1, соответственно. Каплю смеси “фермент + БСА” наносили на поверхность одной пары

электродов. На поверхность второй пары наносили раствор чистого БСА (датчик сравнения). Для полимеризации датчики погружали в атмосферу насыщенных паров глутарового альдегида на 30 мин и затем подсушивали мембраны на воздухе. Сигнал от электрода с мембраной БСА, расположенного на том же кристалле, вычитался из сигнала на электроде с ферментативной мембраной. Разработанный биосенсор позволил определить глюкозу и мочевины в крови.

Во многих случаях для обнаружения биологической (прежде всего, ферментативной) активности бактерий можно использовать амперометрические системы проточного инъекционного анализа и миниатюрные электрохимические детекторы. В этих случаях необходимо использование перистальтического насоса. Повышение скорости омывающего рабочий электрод анализируемого потока раствора приводит к увеличению регистрируемого сигнала [22].

Биосенсоры – принципы конструирования

При конструировании тонкослойных биосенсоров следует учитывать четыре основных фактора: 1) химическую и физическую природу ионселективной пленки; 2) характеристики оптических материалов; 3) особенности конструирования электрохимической ячейки; 4) тип регистрирующей аппаратуры.

Ионселективная тонкая пленка должна обеспечивать предварительное концентрирование определяемого вещества, подавление помех со стороны сопутствующих веществ, быть оптически прозрачной на измерительной длине волны света и электрохимически не активной в определенном диапазоне потенциалов. При этом она не должна вступать в химическое взаимодействие с подложкой из ИТО, быть тонкой и однородной. Две из наиболее часто используемые подложки представляют собой оксид кремния (SiO_2), приготовленный методом “золь-гель”, и поливинилспирт. Используют также нафийные пленки или ядерные лавсановые фильтры без добавок [20]. В них вводятся иономеры, создающие ионообменные кластеры. В качестве иономеров используют поли(диметил диалиламмониевый хлорид) – ДД, поли(винилбензил триметиламмоний хлорид) – ВТХ, четвертичный поли(4-винилпиридин) 4В и полиакриловую кислоту – ПК. Оптимальная толщина наносимой пленки – 400 – 700 нм. Ранее (Рис. 8.) уже представлена схема, которую рационально использовать при конструировании такого биосенсора. В литературе описаны сенсоры для определения аммиака и хлора с калиевым ионообменным стеклом ВК7, используемым в качестве оптически прозрачного плоского волновода. Возможности биосенсорной характеристики биологических, физико-химических, биохимических, биометрических и фармако-клинических реакций поистине не ограничены.

Применение биосенсоров

Наряду с созданием новых поколений биосенсоров для определения токсичных газов [23], полиэлектролитов [24] разрабатываются полимерные платформы для энзимных, ДНК электродов [25]. В последнее десятилетие получили развитие работы, направленные на создание микробных биосенсоров с иммобилизованными бактериями [19]. Разрабатываются зонды для идентификации нуклеиновых кислот и других макромолекул [19, 26].

Дальнейшее развитие получили работы по созданию глюкометров [20]. Для анализа состава крови непосредственно в артериях и венах уже используется новое поколение иглообразных электродов из легированных сталей и индивидуальных индифферентных металлов (Au, Pt, Ti, Mo) специальной конструкции [27].

Одним из перспективных направлений развития биосенсорных технологий является использование в них высокопроводящих полимерных плёнок содержащих комплексы с переносом заряда на основе солей TCNQ [28].

Заключение

Проанализированы некоторые теоретические и экспериментальные данные, которые могут быть использованы в разработке и создании биосенсоров для характеристики микробиологических систем, распознавания микробиологических объектов, оценки состояния иммунной системы высших организмов. Рассмотрены основные тенденции в развитии биосенсорных технологий и определены перспективы расширения их применения в биологии, микробиологии, иммунологии и токсикологии.

Литература

1. Феттер К. // Электрохимическая кинетика. – М.: Химия. – 1967. – 856 с.
2. Джелали В.В., Нестеренко С.В. Импедансная спектроскопия межфазной границы полупроводник/электролит. //Труды IV съезда по электрохимии. Вестник ХПИ. 2005. – № 15. – С. 47–50.
3. Грилихес М.С., Сухотин А.М., Шик А.Я. О применимости уравнения Мотта – Шоттки в случае высоколегированных полупроводниковых электродов. //Электрохимия. 1987. – Т. 23. – В. 11. – С. 1529 – 1533.
4. Догондзе Р.Р., Кузнецов АМ. Современное состояние теории электродных процессов. В кн. Электрохимия 1967. Итоги науки и техники. М.: ВИНТИ. 1969. – 235 с.
5. Kabanov V., Burstein R., Frumkin A. //Disc. Faraday Soc. – 1947. – V.1. – P. 259.
6. Фрумкин А.Н., Дамаскин Б.Б. Реальная свободная энергия сольватации электрона при равновесии электрода с раствором. //ДАН СССР. 1975. Т. 221. № 2. С. 395 – 398.
7. Сато Н. Электронный и ионный электродный потенциал. //Электрохимия. 1995. – Т. 31. – В. 8. – С. 906 – 914.
8. Трасатти С. Поверхности и межфазные границы в электрохимии. //Электрохимия. 2005. – Т. 41. – В. 12. – С. 1411 – 1421.
9. Джелали В.В., Орлова Н.Н., Мирошник Л.В., Ларин В.И. Импеданс ионоселективных мембран на основе медьцеллюлозного комплекса. //Вестник Харьковского университета. 1997. – №395'97. – химические науки № 1. – С. 289 – 296.
10. Hara H., Okazaki S., Fujinaga T. Bull. Chem. Soc. Jap. – 1981. – V. 54. N 4.– P. 1257 – 1258.
11. Ebdon L., Ellis A.J., Confield C.C. Analyst. – 1982. – V. 107. N 1272. – P. 288 – 294.
12. Толмачев В.Н., Орлова Н.Н., Воловик А.М., Мирошник Л.В., Чиненко В.П. АС СССР N 1096556, кл. J01 N 27/30, 1982.
13. Джелали В.В., Ханин А.М., Ладыгин В.Н. Установка для импедансных исследований электрохимических систем. //Электрохимия. 1988. – Т. 24. – В. 8. – С. 987 – 990.
14. Мирошник Л.В., Александров А.В., Толмачёв В.Н. Украинский химический журнал. 1989. – Т. 55. – N 12. – С. 1250 — 1253.
15. Маркин В.С., Волков А.Г. Межфазные потенциалы на границе раздела двух несмешивающихся растворов электролитов. //Электрохимия. 1987. – Т. 23. – В. 10. – С. 1405 – 1413.

16. Ковальчук Є.П., Яцишин М.М., Ковалишин Я.С. Речовина в інтерфазі. Фізична хімія тонких плівок. ЛНУ. Львів. 2005. 225 с.
17. Хейнеман У.Р., Селискар К.Дж., Ричардсон Дж.Т. Разработка новых тонкослойных спектроэлектрохимических сенсоров, избирательность которых реализуется тремя способами, и их применение. //Электрохимия. 2003. – Т. 39. – В. 8. – С. 982 – 993.
18. Шеллер Ф., Кирштайн Д., Шуберт Ф., Пфайффер Д., МкНейл К. Ферменты в электрохимических биосенсорах. //Электрохимия. 1993. – Т. 29. – В. 12. – С. 1522 – 1527.
19. Сикейра Ц.А.К. Перспективы сенсоров для оценки биологически индуцируемой агрессивности среды. //Электрохимия. 1993. – Т. 29. – В. 12. – С. 1541 – 1553.
20. Тарасевич М.Р., Богдановская В.А., Жутаева Г.В. Электрохимические биосенсоры. //Электрохимия. 1993. – Т. 29. – В. 12. – С. 1554 – 1560.
21. Шульга А.А., Дзядевич С.В., Солдаткин А.П., Пацковский С.В., Стародуб Н.Ф., Стриха В.И., Ельская А.В. Тонкоплёночные кондуктометрические энзимобиосенсоры для определения глюкозы и мочевины в крови. //Электрохимия. 1993. – Т. 29. – В. 8. – С. 998 – 1002.
22. Хитченс Г.Д., Ходко Д., Миллер Д.Р., Мурфи О.Дж., Роджерс Т.Д. Измерение бактериальной активности методом медиаторной амперометрии в проточно-инжекционной системе. //Электрохимия. 1993. – Т. 29. – В. 12. – С. 1534 – 1540.
23. Чвірук В. Досягнення та перспективи розвитку у галузі електрохімічних сенсорів для моніторингу повітряного середовища. /Труды III съезда по электрохимии. Вестник Львівського університету. 2002. – В. 42. – Ч. 1. – С. 178 – 181.
24. Чмиленко Ф., Коробова І., Мікуленко О. Хімічні сенсори як засоби екологічного контролю вмісту поліелектролітів у водних розчинах. /Труды III съезда по электрохимии. Вестник Львівського університету. 2002. – В. 42. – Ч. 1. – С. 178 – 181.
25. Ковальчук Є.П., Остапович Б.Б., Турик З.Л., Блажейовський Є. Полімерні платформи для ензимних електродів. /Труды IV съезда по электрохимии. Вестник ХНУ. 2005. – № 648. – С. 68 – 71.
26. Курись Я., Нетяга Н., Походенко В. Матрична електрополімеризація – метод одержання поліаніліну та поліпіролу, які чутливі до амінокислот. /Труды III съезда по электрохимии. Вестник Львівського університету. 2002. – В. 42. – Ч. 1. – С. 138 – 141.
27. Масконе Д., Яманака Х., Масчини М. Иголообразные глюкозные биосенсоры для мониторинга IN VIVO. //Электрохимия. 1993. – Т.29. – № 12. – С. 1528 – 1533.
28. Александров Ю., Поспелов О., Шепеленко О., Кравченко А., Камарчук Г. Імпеданс синтетичних металів на основі солей TCNQ. /Труды III съезда по электрохимии. Вестник Львівського університету. 2002. – В. 42. – Ч. 1. – С. 124 – 126.

УДК 544.6 + 541.138.3: 539.216

БИОСЕНСОРЫ

Джелали В.В., Волянский А.Ю.

Институт микробиологии и иммунологии АМН Украины им. И.И. Мечникова

В обзоре представлены характеристики процессов электронного и ионного транспорта, анализ механизмов генерации электрического потенциала мембранами клеток и его трансформация в результате жизнедеятельности клеток. Рассмотрены основные принципы регистрации электрохимических сигналов

микробиологічних об'єктів. Проаналізовані основні напрями дослідження і конструювання біосенсорних систем.

Ключеві слова: біосенсор, імпедансна спектроскопія, енергія Фермі, мембрана, клітка.

УДК 544.6 + 541.138.3: 539.216

БІОСЕНСОРИ

Джелалі В.В., Волянський А.Ю.

Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України

В огляді представлені характеристики процесів електронного та іонного транспорту, аналіз механізмів генерації електричного потенціалу мембранами клітин та його трансформація в результаті життєдіяльності клітин. Розглянуті основні принципи реєстрації електрохімічних сигналів мікробіологічних об'єктів. Проаналізовані основні напрями дослідження і конструювання біосенсорних систем.

Ключові слова: біосенсор, імпедансна спектроскопія, енергія Фермі, мембрана, клітка.

UDC 544.6 + 541.138.3: 539.216

BIOSENSORS

Jelali V.V., Volyansky A.Y.

Mechnicov institute of microbiology and immunology

In the review, there are presented characteristics of processes of electronic and ionic transport, analysis of mechanisms of generation of electrical potential by cell membranes and its transformation as a result of as a result of cell activity. The basic principles of registration of electrochemical signals from microbiological objects are considered. The basic directions of research and designing of biosensoric systems have been analysed.

Key words: biosensor, impedance spectroscopy, energy Fermi , membrane, crate.