

УДК 579.6:53.087.4

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ СЕНСОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ПРИСУТСТВИЯ БАКТЕРИЙ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

© 2023 г. А. Н. Лачинов¹, А. А. Лачинов¹, Д. Д. Карамов¹, А. Ф. Галиев¹,
Е. В. Кузина², Т. Ю. Коршунова², *

¹Институт физики молекул и кристаллов УФИЦ РАН, Уфа, 450075 Россия

²Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, Уфа, 450054 Россия

*e-mail: korshunovaty@mail.ru

Поступила в редакцию 06.12.2022 г.

После доработки 09.01.2023 г.

Принята к публикации 10.01.2023 г.

Проведено исследование отклика сенсорного элемента на основе полидифениленфталида на изменение состава воздушной среды при культивировании бактерий *Enterobacter asburiae* UOM 3 в жидкой питательной среде. Регистрацию изменения сопротивления сенсорного элемента в ответ на выделяемые бактериальными клетками летучие органические соединения проводили путем измерения вольт-амперных характеристик через заданные промежутки времени. Результаты показали взаимосвязь между количеством бактерий и изменением сопротивления сенсорного элемента, обусловленное выделением продуктов жизнедеятельности микроорганизмов. При увеличении титра бактерий на 3 порядка сопротивление сенсора под воздействием накопленных в среде летучих органических соединений уменьшилось на 2 порядка. Предполагается, что сенсоры на основе полидифениленфталида могут использоваться для установления наличия микроорганизмов в различных материалах и средах.

Ключевые слова: летучие органические соединения, сенсорный элемент, полидифениленфталид, вольт-амперные характеристики, *Enterobacter*

DOI: 10.31857/S0555109923030121, **EDN:** BEFAWD

Микроорганизмы являются наиболее распространенными в биосфере и ключевыми участниками углеродного цикла, а также связанных с ним биологических реакций. Они способны синтезировать большое количество различных летучих неорганических и органических веществ. Летучие органические соединения (ЛОС), выделяемые бактериями, относятся к широкому кругу химических классов соединений, таких как спирты, углеводороды, карбонильные, ароматические, серо- и азотсодержащие соединения и др. [1, 2]. ЛОС обладают уникальными физико-структурными особенностями. Это небольшие молекулы (<300 Да) с высоким давлением паров при комнатной температуре окружающей среды, имеющие одну или несколько функциональных групп. Способность микроорганизмов выделять ЛОС долго игнорировалась, но в настоящее время уделяется большое внимание изучению их влияния как на организм человека, так и на экосистему, на которую они могут оказывать как благотворное, так и пагубное воздействие [3, 4].

В последнее десятилетие ведутся научные исследования по разработке эффективных диагностических инструментов, направленных на выявление бактерий по продуктам их жизнедеятельности в условиях, приближенных к реальному времени. Так, обнаружение ЛОС, выделяемых микроорганизмами, позволило бы проводить не инвазивное тестирование на присутствие бактерий при токсикологическом анализе среды, диагностике заболеваний или исследовании биологических процессов.

Самыми точными системами распознавания ЛОС считаются газовая хроматография и масс-спектрометрия [5, 6]. Однако для мониторинга в режиме реального времени актуальны потенциально недорогие интеллектуальные системы газовых сенсоров, состоящих из матриц на основе оксидов металлов, органо-неорганических нанокомпозитов и органических материалов, принцип действия которых заключается в измерении сопротивления чувствительного элемента в газовой среде, состав которой меняется в процессе метаболизма бактерий [7–9].

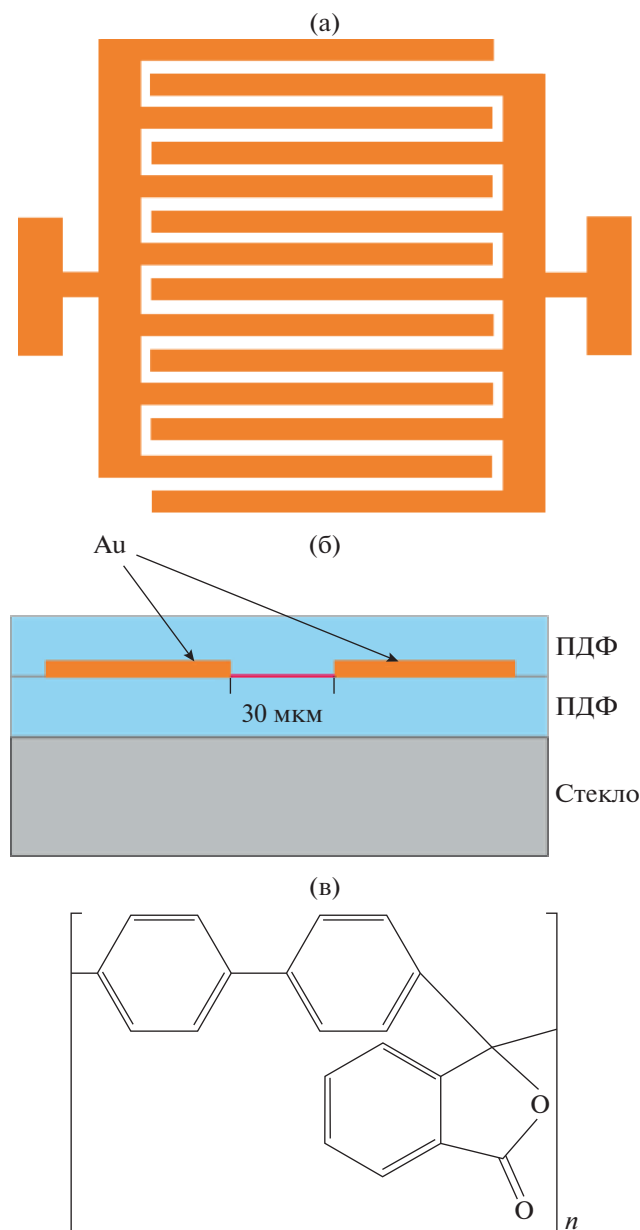


Рис. 1. Схематическое изображение встречно-штырьковой системы электродов СЭ (а), поперечная проекция СЭ (б) и структурная формула ПДФ (в). Красной линией выделена квантоворазмерная структура, сформированная вдоль границы раздела двух полимерных пленок.

Одним из перспективных направлений создания чувствительных элементов для подобных сенсоров является разработка многослойных гетероструктур, содержащих квантоворазмерные структуры с квазидвумерным электронным газом. Аномальная подвижность электронов в таких структурах способна обеспечивать высокую чувствительность электропроводности к изменению состава окружающей газовой среды. Относитель-

но недавно такие гетероструктуры были созданы на основе полимерных диэлектриков [10, 11].

Цель работы — исследование изменения электрофизических свойств многослойной гетероструктуры на основе полимерных материалов при выделении ЛОС бактериальными клетками в процессе их культивирования в жидкой питательной среде.

МЕТОДИКА

Устройство сенсорного элемента. Сенсорный элемент (СЭ) представлял собою многослойную структуру, состоящую из двух полимерных слоев со встроенной в границу раздела систему встречно-штырьковых металлических электродов (рис. 1). Площадь СЭ составляла 20×20 мм. Выбор структуры обусловлен уникальными электропроводящими свойствами границы раздела двух полимерных диэлектриков [11].

В качестве функционального материала для СЭ использовали полимер из класса полигетероариленов (рис. 1в) — полидифенилфталид (ПДФ) [12]. ПДФ является химически стойким полимером с высокой газопроницаемостью углекислого газа и кислорода [13].

Изготовление экспериментального образца происходило в следующей последовательности. На поверхность очищенной и обезжиренной стеклянной подложки методом центрифугирования (СМ-50, “ELMI”, Латвия, при 2000 g) наносили тонкий слой ПДФ (10 вес. %), растворенного в циклогексаноне, время формирования пленки 30 с, толщина слоя ~ 1 мкм. Сушка полимерной пленки для удаления остатков растворителя проходила в 2 стадии: 30 мин на открытом воздухе и 45 мин в вакуумном сушильном шкафу при температуре 150°C . Далее поверх первого полимера формировали золотые электроды толщиной ~ 130 нм с зазором между электродами ~ 30 мкм через теневую маску методом вакуумного термодиффузионного испарения [12]. Аналогично наносили второй слой полимера. Толщину функциональных слоев и морфологию поверхности контролировали методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) с помощью сканирующего зондового микроскопа СММ-2000 (“Завод ПРОТОН”, Россия). Типичное АСМ-изображение участка поверхности СЭ представлено на рис. 2.

Штамм микроорганизмов. В работе использовали штамм *Enterobacter asburiae* UOM 3 из коллекции микроорганизмов Уфимского Института биологии УФИЦ РАН. Выбор микроорганизма обусловлен тем, что энтеробактерии распространены повсеместно, они могут обитать как в свободном состоянии (в реках, сточных водах, на поверхности растений), так и внутри организма человека и животных. Это подвижные грамотрицательные неспорообразующие палочковидные бактерии, факульт-

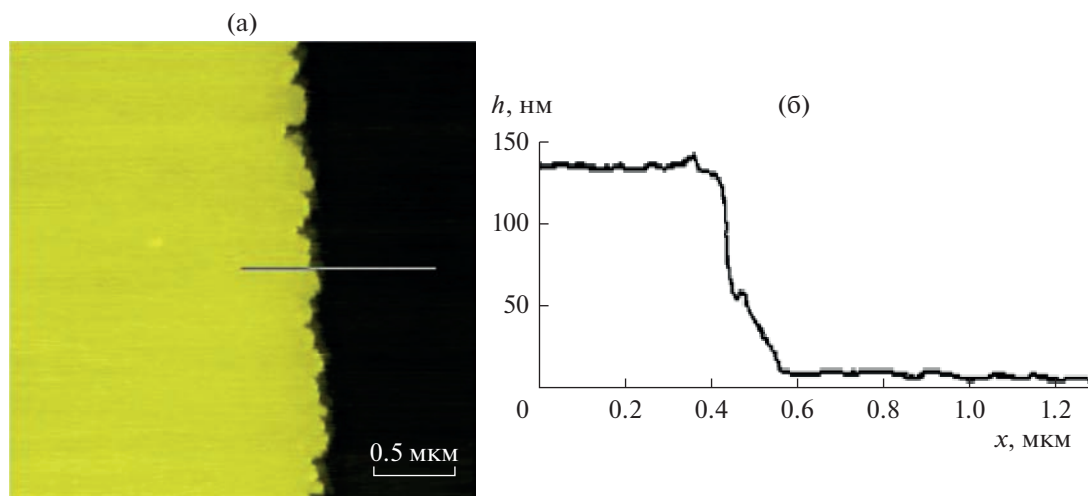


Рис. 2. АСМ-изображение границы раздела электрод-полимерная пленка без верхнего слоя полимера: морфология поверхности, где светлый участок — электрод, темный — поверхность полимерной пленки (а), профиль поверхности вдоль измерительной линии, приведенной на (а), где h — высота, x — длина профиля (б).

тативные анаэробы, ферментирующие D-глюкозу и другие углеводы с образованием кислоты и газа, что служит одним из их диагностических признаков [14]. Представители рода *Enterobacter*, относящиеся к группе кишечной палочки, являются основными санитарно-показательными микроорганизмами, превышение численности которых в организме человека или в пищевых продуктах свидетельствует о биологическом загрязнении [15].

Детекция бактериальных ЛОС. Для выращивания *E. asburiae* UOM 3 использовали среду, следующего состава (г/л): NH_4Cl — 1.0; KH_2PO_4 — 2.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.5; NaCl — 2.0; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — следы; CaCO_3 — 4.0; глюкоза — 10.0. Среду разливали по 100 мл в одинаковые колбы ($V = 250$ мл), которые в дальнейшем герметично закрывали резиновыми пробками. Бактериальную суспензию готовили путем смыва клеток стерильной водопроводной водой со свежего косяка культуры. Среду в серии под номером 1 и 2 инокулировали суспензией штамма *E. asburiae* UOM 3 в количестве 1 об. %. К пробкам колб серии № 2 и 3 прикрепляли СЭ (на расстоянии 3 см от поверхности питательной среды) для регистрации изменения состава воздушной среды. Культивирование проводили при температуре 27–29°C, естественном освещении в стационарных условиях в течение 96 ч. Общая схема эксперимента представлена на рис. 3.

Колбы серии № 1 использовали для контроля жизнедеятельности микроорганизмов путем учета их численности микробиологическим методом, а колбы серии № 2 — электронным методом за счет измерения показаний СЭ. Для оценки вклада ЛОС в измеряемый сигнал СЭ на фоне высокой влажности внутри колб проводили сравнение показаний СЭ в колбах серий № 2 и 3.

В начале эксперимента и далее через 6, 24, 30, 48, 72 и 96 ч отбирали по 1 мл жидкости из колб серии № 1 (без СЭ) и делали ряд последовательных разведений жидкой культуры бактерий. Далее проводили посев на твердую питательную среду следующего состава (г/л): пептон — 10.0; дрожжевой экстракт — 3.0; NaCl — 5.0; глюкоза — 1.0; агар-агар — 15.0. Чашки Петри помещали в термостат при температуре 28°C на 72 ч, после чего подсчитывали количество колоний бактерий.

Регистрацию показаний СЭ проводили путем измерения вольт-амперных характеристик (ВАХ) через заданные промежутки времени с помощью двухканального источника-измерителя Keysight B2902A (“Keysight Technologies”, Малайзия). Для интерпретации полученных ВАХ и оценки изменения потенциального барьера на границе ме-

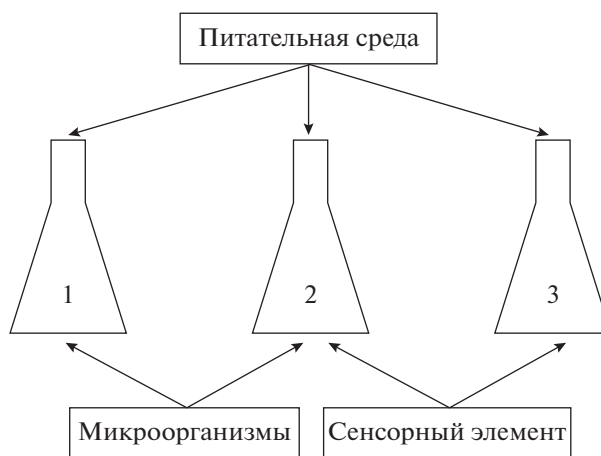


Рис. 3. Общая схема эксперимента.

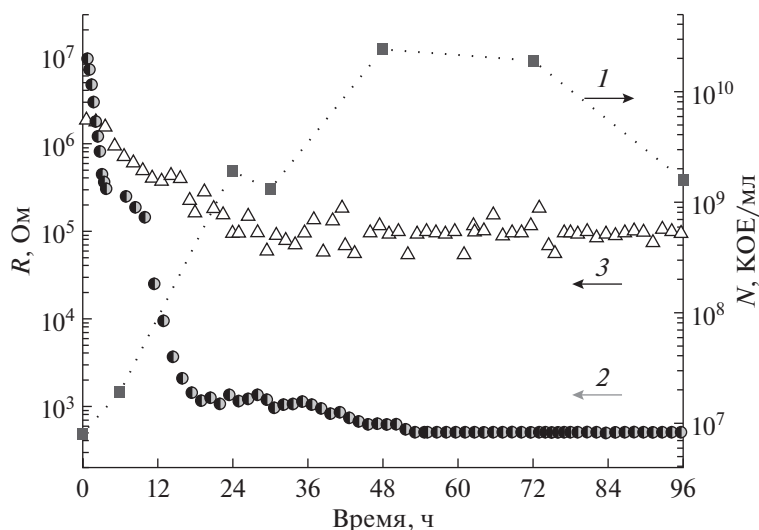


Рис. 4. Зависимость сопротивления СЭ (R) и численности микроорганизмов (N) от времени экспозиции при напряжении 5В: 1 — титр клеток, 2 — показания СЭ, находящихся в колбах, засеянных микроорганизмами, 3 — показания СЭ в колбах без внесения микроорганизмов.

талл/полимер использовали модель инъекционных токов, ограниченных объемным зарядом [16]. В рамках данной модели ток I характеризовался степенной зависимостью от напряжения $I \sim kU^n$, где U — разность потенциалов, k — коэффициент пропорциональности, n — показатель степени [10]. Высоту потенциального барьера на границе металл/полимер определяли, исходя из уравнения Дэшмана [11]:

$$e\phi_B = kT \ln(SA^*T^2/I_S),$$

где T — температура, k — постоянная Больцмана, e — заряд электрона, S — площадь контакта, A^* — постоянная Ричардсона, I_S — ток насыщения.

Первое измерение осуществляли через 1 ч после помещения СЭ в колбы. Эксперимент повторяли трижды. Относительная погрешность измерений величины сопротивления составляла $\pm 2\%$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На вторые сутки эксперимента было отмечено помутнение питательной среды в колбах, инокулированных штаммом *E. asburiae* UOM 3. Рост культуры сопровождался выделением газа, о чем свидетельствовало появление пузырьков на поверхности питательной среды.

Стадия экспоненциального роста бактерий проходила в течение двух суток культивирования (рис. 4, кривая 1). В данной фазе удельная скорость роста биомассы максимальна, развитие популяции не лимитируется питательными веществами и не тормозится ингибирующими продуктами жизнедеятельности. Максимальный титр клеток был за-

фиксирован через 48 ч инкубации и составил 2.4×10^{10} КОЕ/мл. В течение последующих 24 ч численность микроорганизмов постепенно снижалась и через 96 ч составила 1.6×10^9 КОЕ/мл.

На рис. 4 представлены результаты измерения сопротивления СЭ в зависимости от времени нахождения в колбах, в которых культивировали бактерии (рис. 4, кривая 2). Наибольшее изменение сопротивления зафиксировано в первые 18 ч — оно уменьшилось от 10^7 до 10^3 Ом и достигло минимального значения 10^2 Ом через 48 ч.

В колбах без микроорганизмов также выявлено изменение сопротивления СЭ (рис. 4, кривая 3). Оно уменьшалось близко к линейному закону в течение первых 30 ч от 10^6 до 10^4 Ом, в дальнейшем изменение сопротивления практически отсутствовало. По-видимому, такое поведение полимерных СЭ связано с изменением влажности в пространстве над поверхностью жидкости, а также и с диффузионными процессами в полимерной пленке [10]. Сравнение кривых 1 и 2 на рис. 4 свидетельствовало о том, что существовала зависимость между численностью микроорганизмов, находящихся в активной фазе своего развития и показаниями СЭ, реагирующего на увеличение концентрации продуктов жизнедеятельности бактерий.

Особенностью функционирования полимерных СЭ является то, что чувствительность их ВАХ в разных диапазонах напряжений разная. ВАХ являются нелинейными, типичными для структур [10, 11], содержащих контакты металл/полимер (рис. 5). При малых напряжениях, при которых ВАХ имеет линейный вид ($n = 1$), реакция СЭ на перемены в окружающей среде минимальна.

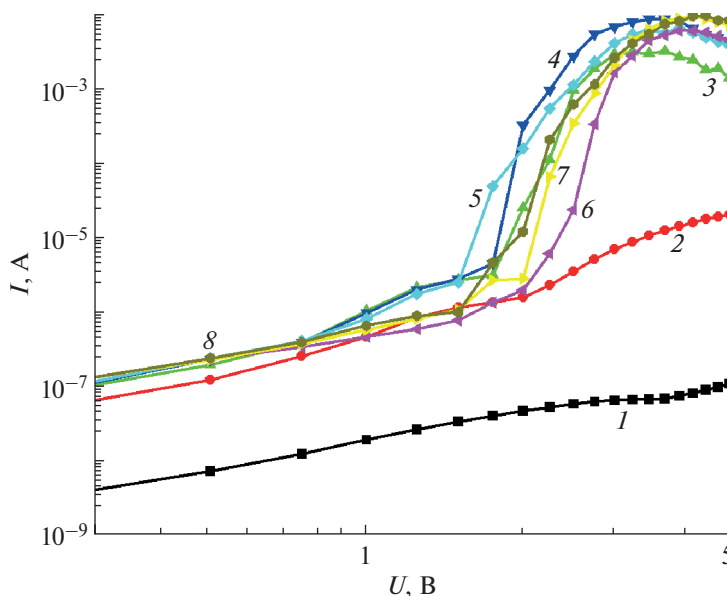


Рис. 5. ВАХ СЭ, находящихся в колбах, засеянных микроорганизмами, измеренные в разные временные интервалы (ч): 1 – 1; 2 – 7; 3 – 14; 4 – 21; 5 – 28; 6 – 35; 7 – 42; 8 – 49.

Наиболее заметные изменения его сопротивления наблюдались после перехода ВАХ в сверхлинейный режим ($n > 1$).

Согласно модели инжекционных токов [16], в области линейной зависимости перенос носителей заряда осуществляется за счет собственных равновесных носителей заряда. Переход в сверхлинейную область соответствует преобладанию в токе инжектированных носителей заряда. Таким образом, чувствительность СЭ зависит от изменения условий инжекции носителей заряда из металлического электрода в полимерный слой. Это может быть связано с влиянием состава атмосферы окружающей среды (ЛОС, в частности) на высоту потенциального барьера на контакте металл/полимер. В настоящем эксперименте высоты потенциального барьера ϕ_B имели следующие значения: $\phi_{B1ч} \sim 0.44$ эВ, $\phi_{B7ч} \sim 0.33$ эВ, $\phi_{B14ч} \sim 0.16$ эВ, $\phi_{B21ч} \sim 0.13$ эВ, $\phi_{B28ч} \sim 0.18$ эВ, $\phi_{B35ч} \sim 0.15$ эВ, $\phi_{B42ч} \sim 0.13$ эВ, $\phi_{B49ч} \sim 0.13$ эВ. Проведенные расчеты показывают, что ЛОС, накапливающиеся в среде в результате жизнедеятельности микроорганизмов и взаимодействующие с поверхностью сенсорного элемента, оказывают значительное влияние на высоту потенциального барьера на контакте металл/полимер и, следовательно, на сопротивление СЭ. Большой диапазон изменения сопротивления СЭ может быть хорошим аргументом для использования полимерных структур, содержащих границу раздела полимер/полимер, для дальнейшей разработки на их основе датчиков присутствия микроорганизмов путем детектирования образуемых ими ЛОС.

Таким образом, в условиях модельного опыта выявлена зависимость между численностью клеток штамма *E. asburiae* UOM 3 в жидкой питательной среде и сопротивлением СЭ в воздушной среде, содержащей микробные ЛОС. Установлено, что при увеличении титра бактерий на 3 порядка сопротивление СЭ уменьшилось на 2 порядка. Полученные результаты позволяют предположить, что СЭ на основе многослойных структур тонких пленок ПДФ могут быть использованы в биодетекторах для проведения анализа различных материалов и сред на предмет присутствия в них бактерий, в том числе группы кишечной палочки.

Исследование выполнено в рамках Государственного задания по теме № 122031100163-4 с использованием оборудования РЦКП “Агидель”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Веселова М.А., Плюта В.А., Хмель И.А. // Микробиология. 2019. Т. 88. № 3. С. 272–287.
2. Schulz S., Dickschat J.S. // Nat. Prod. Rep. 2007. V. 24. № 4. P. 814–842.
3. Weisskopf L., Schulz S., Garbeva P. // Nat. Rev. Microbiol. 2021. V. 19. № 6. P. 391–404.
4. Elmassry M.M., Piechulla B. // Front. Neurosci. 2020. V. 14. Article 257. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00257>
5. Lough F., Perry J.D., Stanforth S.P., Dean J.R. // TrAC Trends Anal. Chem. 2017. V. 87. P. 71–81.

6. *Ratiu I.A., Bocos-Bintintan V., Monedeiro F., Milanowski M., Ligor T., Buszewski B.* // Crit. Rev. Anal. Chem. 2020. V. 50. № 6. P. 501–512.
7. *Bonah E., Huang X., Aheto J.H., Osae R.* // J. Food Sci. Technol. 2020. V. 57. № 6. P. 1977–1990.
8. *Seesaard T., Thippakorn C., Kerdcharoen T., Kladsoomboon S.* // Anal. Methods. 2020. V. 12. № 47. P. 5671–5683.
9. *Shauloff N., Morag A., Yaniv K., Singh S., Malishev R., Paz-Tal O., Rokach L., Jelinek R.* // Nanomicro Lett. 2021. V. 13. № 1. Article 112. doi.org/https://doi.org/10.1007/s40820-021-00610-w
10. *Gadiev R.M., Lachinov A.N., Salikhov R.B., Rakhmееv R.G., Kornilov V.M., Yusupov A.R.* // Appl. Phys. Lett. 2011. V.98. P. 173305. https://doi.org/10.1063/1.3584135
11. *Yusupov A.R., Gadiev R.M., Lachinov A.N., Kornilov V.M., Kalimullina L.R., Galiev A.F., Kian M., Salazkin S.N.* // Synth. Met. 2021. V. 274. Article 116733. https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2021.116733
12. *Lachinov A.N., Gadiev R.M., Salikhov R.B., Zhdanov E.R.* // Nanotechnology in the Security Systems. NATO Science for Peace and Security. Series C: Environmental Security. /Ed. J. Bonča, S. Kruchinin. Dordrecht: Springer, 2015. P. 243–256.
13. *García C., Lozano A.E., de la Campa J.G., Vygoskii Y., Zolotukhin M., de Abajo J., Garrido L., Guzmán J.* // Macromolecules. 2015. V. 48. № 8. P. 2585–2592.
14. *Определитель бактерий.* /Ред. Дж. Х. Берджи. М.: Мир, 1997. Т. 1. 429 с.
15. *Лабинская А.С., Быков А.С., Бондаренко В.М., Березкина Н.Е.* Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Книга I. / Ред. А.С. Лабинская, Е.Г. Волина. Изд-во Бином, 2020. 1080 с.
16. *Ламнерт М., Марк П.* Инжекционные токи в твердых телах. М.: Мир, 1973. 416 с.

Prospects for the Application of Sensor Elements for Detecting the Presence of Bacteria in Real Time

A. N. Lachinov^a, A. A. Lachinov^a, D. D. Karamov^a, A. F. Galiev^a, E. V. Kuzina^b, and T. Yu. Korshunova^{b,*}

^a *Institute of Physics of Molecules and Crystals, Ufa Federal Research Centre, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450075 Russia*

^b *Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Centre, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

*e-mail: korshunovaty@mail.ru

A study was made of the response of a sensor element based on polydiphenylenephthalide to a change in the composition of the air medium during the cultivation of *Enterobacter asburiae* UOM 3 bacteria in a liquid nutrient medium. Registration of changes in the resistance of the sensor element in response to volatile organic compounds released by bacterial cells was carried out by measuring the current-voltage characteristics at specified time intervals. The results showed the relationship between the number of bacteria and the change in the resistance of the sensor element, due to the release of waste products of microorganisms. With an increase in the titer of bacteria by 3 orders of magnitude, the resistance of the sensor under the influence of volatile organic compounds accumulated in the medium decreased by 2 orders of magnitude. It is assumed that sensors based on polydiphenylenephthalide can be used to determine the presence of bacteria in various materials and media.

Keywords: volatile organic compounds, sensor element, polydiphenylenephthalide, current-voltage characteristics, *Enterobacter*