

¹А.И. Драпеза

³Г.А. Скороход

²С.К. Лазарук

¹В.А. Сысов

¹Н.В. Плешко

³Е.И. Гудкова

¹В.А. Лобан

²Т.И.Ореховская

Повышение информативности обнаружения и дифференциации микроорганизмов при использовании планарно-емкостных чип-форматов фарадеевского и нефарадеевского типа

¹Белорусский государственный университет,

²Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники,

³Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск, Республика Беларусь

*В данной работе предложен метод повышения информативности обнаружения и дифференциации вида микроорганизмов при использовании планарно-емкостных чип-форматов. Показаны существенные различия в зарядовых свойствах пленочных биоструктур, сформированных на планарно-емкостных чип-форматах нефарадеевского типа при температуре 37 °С и напряжении формирования $U=0,5$ мВ из суспензии микроорганизмов *E.coli*, *S.aureus*, *P.aeruginosa* и *C.albicans*, за вычетом заряда пленочных структур их фильтратов.*

*In this work a method for increasing the information content of the detection and differentiation of species of microorganisms using a planar capacitor chip formats was proposed. Showing significant differences in the charge properties of biological structures of film formed on the planar capacitive non-faradaic type chip formats at 37 °C and a voltage of the $U = 0,5$ mV from a suspension of microorganisms *E.coli*, *S.aureus*, *P.aeruginosa* and *C.albicans*, minus charge film structures of their filtrates.*

Введение

Планарно-емкостные чип-форматы (биочипы) фарадеевского и нефарадеевского типа находят все более широкое применение в прикладной микробиологии для ускоренного обнаружения и дифференциации вида микроорганизмов. Однако при работе с жидкими средами им присущ целый ряд недостатков. В жидкой среде планарные конструкции микроэлектродов фарадеевского типа подвержены электролизу. По этой причине их изготавливают из золота или платины, чтобы исключить электролиз, что экономически не выгодно в условиях их массового применения, особенно в качестве расходных одноразовых конструкций. Для повышения информативности прямых измерений требуется увеличение количества измерительных преобразователей для однотипных измерений, встраивание которых в измерительные ячейки представляет определенные трудности в изготовлении автономного загрузочного модуля для измерительной системы, что повышает себестоимость измерений. Переход к нефарадеевскому

принципу измерений, который предусматривает применение изолирующих покрытий для микроэлектродов, уменьшает как чувствительность, так и значение коэффициента отношения сигнал/шум емкостных измерителей в чип-формате. Кроме того, в жидких средах информационные сигналы от емкостных датчиков фарадеевского и нефарадеевского типа сильно зашумлены сопряженными биохимическими процессами, происходящими в среде, имеющей высокие значения диэлектрической проницаемости ($\epsilon \approx 80$). В таких средах оказывается малоэффективным применение только дифференциальных методов выделения информационных сигналов для характеристики наличия в исследуемых образцах среды микроорганизмов [1,2].

Поэтому, с учетом вышесказанного, для повышения эффективности использования планарно-емкостных чип-форматов, необходим поиск таких условий предварительной подготовки исследуемых тестовых образцов и выбор таких объективных информативных параметров, подлежащих измерению, которые в совокупности позволят как уменьшить количество датчиков в массиве, так и повысить информативность обнаружения и дифференциации тестовых культур, содержащих различные микроорганизмы [3].

В настоящей работе представлены результаты исследований по повышению информативности обнаружения и дифференциации вида микроорганизмов при использовании планарно-емкостных чип-форматов фарадеевского и нефарадеевского типа.

Предлагаемый подход

Для повышения информативности обнаружения и дифференциации вида микроорганизмов предлагается формировать пленочные биоструктуры из растворов тестовых образцов исследуемых культур, как показано на рисунке 1.

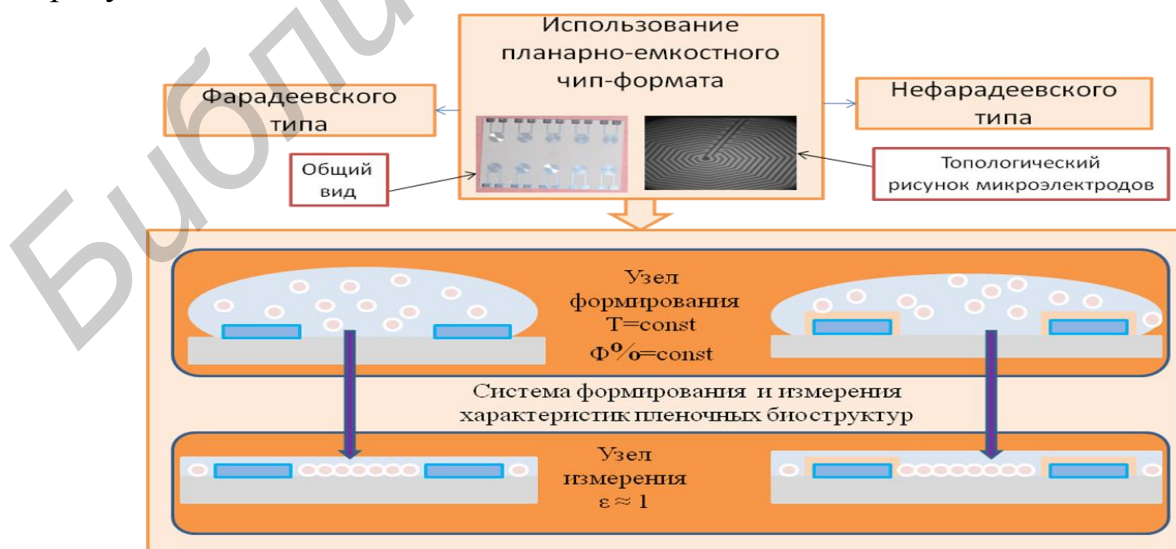


Рисунок 1- Схематичное представление предлагаемого подхода

Для этих целей могут быть использованы чип-форматы планарно-емкостного типа, имеющие различную конфигурацию топологического рисунка и фарадеевский или нефарадеевский тип конструктивного исполнения микроэлектродов. Топологический рисунок емкостного датчика, который представлен на рис. 1, выполнен в виде эквидистантной спирали Архимеда октагональной конфигурации.

Пленочные биоструктуры могут быть получены из микрокапли раствора тест-культуры путем сушки. Для датчиков фарадеевского типа микрокаплю наносят непосредственно на поверхность микроэлектродов. Нефарадеевский тип датчиков требует использования изолирующих покрытий наноразмерной толщины, диэлектрическая проницаемость которых меньше или соизмерима с диэлектрической проницаемостью мембраны исследуемых микроорганизмов, чтобы повысить чувствительность и избирательность датчика.

Заданные условия сушки (температура, относительная влажность) должны быть выбраны такими, чтобы не нарушить целостность структуры мембраны у исследуемых микроорганизмов при формировании пленочной биоструктуры, при которых еще сохраняется жизнеспособность микроорганизмов.

Для повышения информативности обнаружения и дифференциации вида микроорганизмов условия формирования пленочной биоструктуры на поверхности чувствительной области емкостного датчика фарадеевского или нефарадеевского типа должны быть такими, чтобы обеспечивать электрокинетический принцип перемещения микроорганизмов в зону измерительного преобразователя с одинаковой чувствительностью. Например, такой зоной может являться пространство зазора между электродами, как схематично показано на рис. 1. Это позволяет уменьшить статистический разброс в изменениях параметров емкостных датчиков, используемых для измерения однотипных тестовых образцов. Кроме того, измерение высушенных пленок следует проводить в воздушной среде ($\epsilon \approx 1,0$), чтобы исключить указанные выше недостатки, связанные с измерениями в жидких питательных средах.

Материалы и методы

Для проведения исследований были использованы суспензии бактерий *S.aureus*, *E.coli*, *P.aeruginosa* и *C.albicans*, питательная среда – 5% раствор глюкозы при температуре 37 °С, 0,9 % раствор NaCl (физраствор – ФР). Суспензии бактериальных популяций *S.aureus*, *E.coli*, *P.aeruginosa* и *C.albicans* готовили на физрастворе путем смыва суточной культуры, выращенной на скошенном агаре. Первоначальные концентрации бактерий в суспензии определяли на спектрофотометре серии РВ2201 («Солар ЛС», Республика Беларусь) по методу МакФарланда. Бактериальные суспензии до нужной концентрации разводили с использованием физраствора.

Пленочные биоструктуры *E.coli*, *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *C.albicans* и пленочные биоструктуры из их фильтратов формировали в течение 40 минут в термокамере из микрокапли объемом 10 мкл путем сушки в стандартных условиях температуры (37°C) и относительной влажности воздуха ($\varphi \approx 5\%$) из разведений микроорганизмов 10^5 КОЕ/мл. Формирование пленочных биоструктур проводили без воздействия и при воздействии постоянного электрического напряжения амплитудой $U=0,5$ мВ.

Изучение зарядовых свойств созданных пленочных биоструктур проводили сразу же после их формирования путем измерения вольтамперных характеристик (ВАХ). ВАХ измеряли в диапазоне напряжений от -2000 мВ до $+2000$ мВ. Время развертки напряжения в диапазоне от нулевого значения до конечного значения диапазона составляло 20 секунд. Время преобразования АЦП было выбрано 10 мс. Изменения тока регистрировали в диапазоне от $-3,0$ нА до $+3,0$ нА. Величины зарядов пленочных биоструктур оценивали по площади под кривой тока от времени, которую аппроксимировали полиномом третьей степени. В исследованиях использовали планарно-емкостные чип-форматы как фарадеевского типа, микроэлектроды которых были изготовлены из меди, напыленной под слой ванадия, так и нефарадеевского типа, с алюминиевыми микроэлектродами, пассивированными плотной композитной пленкой, состоящей из Al_2O_3 (200 нм) + SiO_2 (100 нм).

Статистическую обработку результатов исследований осуществляли с помощью программного обеспечения Excel 2007.

Для формирования и измерения электрических характеристик пленочных биоструктур использовали систему, общий вид которой показан на рис. 2.



Рисунок 2- Общий вид системы формирования и измерения характеристик пленочных биоструктур

Результаты исследований и обсуждение

Фарадеевский тип датчиков

Использование планарно-емкостных чип-форматов фарадеевского типа, микроэлектроды которых состоят из меди, напыленной под слой ванадия, показывает, что пленочные тестовые образцы, сформированные из микрокапель объемом 10 мкл 5% раствора глюкозы, в которых содержится различное количество микроорганизмов, имеют большую макроскопическую проводимость при их меньших количествах в объеме микрокапли, как показано на рис.3. Это связано, скорее всего, с тем, что при формировании пленочной структуры свободные заряды в объеме капли в большей степени

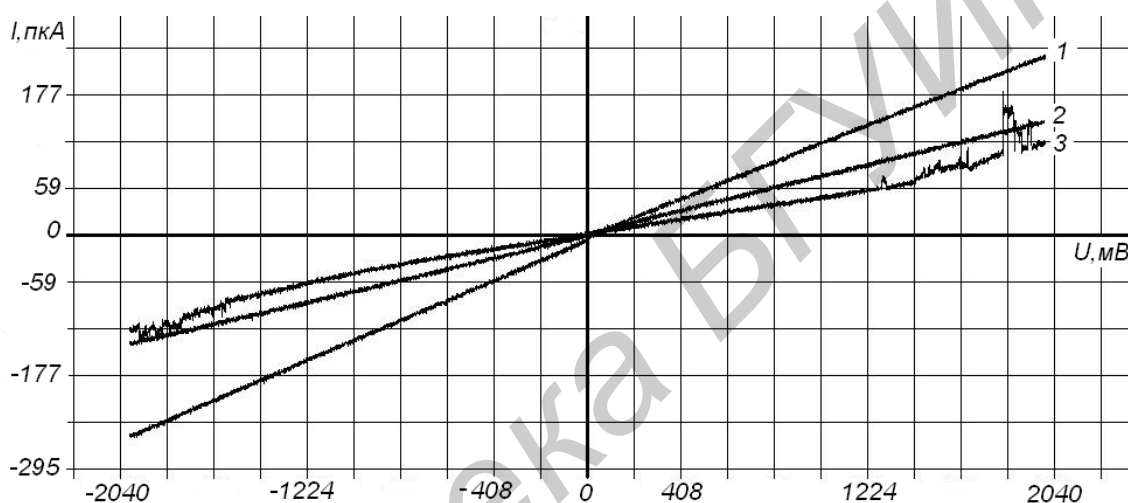


Рис. 3. Типичные ВАХ пленочных структур *E.coli* на фарадеевском датчике в зависимости от концентрации: 1- 10^4 ; 2- 10^5 ; 3- 10^6 КОЕ/мл

компенсируются при наличии большего количества бактерий *E.coli*, имеющих и большее количество зарядовых сайтов для их компенсации.

Из зависимостей рис. 3 можно также видеть, что при большей концентрации бактерий *E.coli* и напряжении на микроэлектродах датчика более 1224 мВ в ее пленочной структуре наблюдаются также кратковременные изменения проводимости, которые происходят в сторону увеличения общей электрической проводимости и не превышают изменения значений тока более чем на 70 пкА. Такие изменения могут быть обусловлены высокими значениями скорости изменения напряженности электрического поля, которые могут вызывать кратковременные пробои в биоструктуре пленки при развертке напряжения на микроэлектродах датчика.

Однако эти результаты исследований получены в условиях отсутствия внешнего электрического воздействия при формировании пленочной структуры из жидкой фазы. При наличии данного типа воздействия на фарадеевский тип микроэлектродов в условиях жидкой фазы возможен процесс электролиза поверхности микроэлектродов, влияющего на

изменение электрофизических свойств формируемых пленочных биоструктур.

Нефарадеевский тип датчиков

По этой причине изучение вопроса повышения информативности обнаружения и дифференциации вида микроорганизмов проводилось при использовании планарно-емкостных чип-форматов нефарадеевского типа, содержащих алюминиевые микроэлектроды, пассивированные плотной композитной пленкой, состоящей из Al_2O_3 (200 нм) + SiO_2 (100 нм).

Результаты исследований зарядовых свойств пленочных биоструктур микроорганизмов *E.coli*, *S.aureus*, *P.aeruginosa* и *C.albicans* от условий формирования представлены в табл.1. Для каждого типа микроорганизма и условий формирования использовался массив из трех датчиков. Статистическую обработку проводили для количества измерений $n=3$ и надежности $\alpha=90\%$.

Из табл.1 видно, что величина заряда пленочных структур, сформированных из суспензии микроорганизмов в условиях отсутствия внешнего напряжения ($U=0$ мВ), уменьшается в зависимости от типа микроорганизмов соответственно следующему порядку: *E.coli*, *S.aureus*, *P.aeruginosa* и *C.albicans*. Однако процентное отношение величин изменения заряда доверительных интервалов к их усредненным значениям соответственно составляют 17%, 11%, 13% и 16%. Усредненные значения зарядов пленочных биоструктур для различных видов микроорганизмов, согласно результатам табл.1, статистически различимы.

Табл.1

Зарядовые свойства пленочных биоструктур, сформированных из суспензии микроорганизмов *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *C. albicans* в 5% растворе глюкозы при температуре 37 °С и при $U=0$ мВ; $U=0,5$ мВ

$\bar{Q} \cdot 10^{-9}, \text{ Кл}$			
<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>C.albicans</i>
Суспензия, 37 °С, (n=3, $\alpha=90\%$), $U=0$ мВ			
14094±2374 17%	18745±2051 11%	7540±1017 13%	5393 ± 878 16%
Суспензия, 37 °С, (n=3, $\alpha=90\%$), $U=0,5$ мВ			
11696±585 5%	13112±815 6%	6009±421 7%	2391 ± 167 7%

Формирование пленочных биоструктур при напряжении $U=0,5$ мВ приводит к снижению среднего значения заряда *E.coli* на 30%, *S.aureus*- на 17%, *P.aeruginosa*- на 20%, *C.albicans*- на 56%. При этом величины указанных выше процентных отношений соответственно равны 6%, 5%, 7%, 7%, т.е. практически в два раза снизилась величина процентного отношения в условиях формирования пленочных биоструктур при $U=0,5$ мВ. Формирование пленочных биоструктур из фильтрата рассматриваемых микроорганизмов, как видно из табл.2, практически не изменяет зарядовые свойства данных пленок.

Полученный результат указывает на степень упорядоченности пленочных биоструктур, формируемых только из суспензии микроорганизмов.

Табл.2

Зарядовые свойства пленочных биоструктур, сформированных из фильтрата микроорганизмов *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *C. albicans* в 5% растворе глюкозы при температуре 37 °С и при $U=0$ мВ; $U=0,5$ мВ

$\bar{Q} \cdot 10^{-9}$, Кл			
<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>C.albicans</i>
Фильтрат, 37 °С, (n=3, $\alpha=90\%$), $U=0$ мВ			
12947±2374 11%	16027±3205 20%	7748±852 11%	5341 ± 694 13%
Фильтрат, 37 °С, (n=3, $\alpha=90\%$), $U=0,5$ мВ			
12408±1489 12%	15712±2985 19%	7702±847 11%	5031 ± 604 13%

При выполнении математических операций вычитания зарядов пленочных биоструктур фильтратов (табл.2) из соответствующих зарядов пленочных биоструктур суспензий микроорганизмов (табл.1), информативность которых представлена в виде математического ожидания и доверительных интервалов, было принято, что абсолютная ошибка разности равна сумме ошибок прямых измерений.

Результаты косвенных измерений заряда пленочных биоструктур, сформированных при температуре 37 °С и напряжении формирования $U=0,5$ мВ, из суспензии микроорганизмов *E.coli*, *S.aureus*, *P.aeruginosa* и *C.albicans* за вычетом зарядов пленочных структур их фильтратов, представлены в табл.3.

Табл. 3

Заряд пленочных биоструктур, сформированных из суспензии микроорганизмов *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *C. Albicans* за вычетом зарядов их фильтрата

$\bar{Q} \cdot 10^{-9}$, Кл			
<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>C.albicans</i>
37 °C , (n=3, α=90%), U=0,5мВ			
1147±424	133±32	-208±64	52± 15

Из результатов табл.3 следует, что статистическое различие между зарядовыми свойствами пленочных биоструктур, сформированных из суспензий различных микроорганизмов, за вычетом зарядов пленочных структур их фильтратов, является достаточно значительным, что существенно позволяет повысить информативность ускоренного обнаружения и дифференциацию вида указанных микроорганизмов на основе использования планарно-емкостных чип-форматов.

Предложенный метод может найти широкое применение в прикладных микробиологических исследованиях.

Список использованных источников

1. Дραπεза А.И. Разработка биосенсоров на основе емкостных нефарадеевских датчиков с нанокompозитными биочувствительными структурами /А.И. Дραπεза, В.А. Лабунов, В.А. Лобан, Ю.М. Судник, Т.И. Ореховская // Материалы междунар. конф. «Нанотехнологии – 2010», 2010. - С. 257-260.

2. Дραπεза А.И. Перспективные материалы и конструкции датчиков для реализации информационных технологий экспрессной оценки жизнеспособности микробных популяций/ А.И. Дραπεза, В.А.Лобан, Н.В.Плешко, С.К.Лазарук // Современные методы и технологии создания и обработки материалов: Сб. научных трудов. В 3 кн. Кн.1 Материаловедение / редколлегия: С.А. Астапчик (гл.ред.) [и др.] – Минск: ФТИ НАН Беларуси, 2014.– С.185-195.

3. A. Menachery A. Controlling cell destruction using dielectrophoretic forces /A. Menachery and R. Pethig, // IEE Proceedings Nanobiotechnology, 2005.-Vol. 152.- N0.4.-P. 145–149.