

Министерство образования Республики Беларусь

Учреждение образования  
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИНФОРМАТИКИ И РАДИОЭЛЕКТРОНИКИ  
(БГУИР)

УДК 543.9+57.083.1

№ госрегистрации 20142489

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе БГУИР  
д-р техн. наук, проф.

\_\_\_\_\_ А.П. Кузнецов

\_\_\_\_\_ . \_\_\_\_ . 2016

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ФОРМИРОВАНИЯ БИОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ СИСТЕМ  
ДЕТЕКТИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ОСНОВЕ  
НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ МАТЕРИАЛОВ  
ДЛЯ СЕНСОРОВ РЕЗИСТИВНО-ЕМКОСТНОГО ТИПА

(заключительный)

ГБЦ №14–3113

Руководитель темы  
зав. НИЛ «Нанотехнологии»,  
канд. техн. наук

\_\_\_\_\_ Г.Г. Горох

Отв. исполнитель  
науч. сотрудник  
НИЛ «Нанотехнологии»

\_\_\_\_\_ А.И. Захлебаева

Минск 2016

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы:

зав. НИЛ 4.10

«Нанотехнологии»,

канд. техн. наук

\_\_\_\_\_ Г.Г. Горох  
(введение, разделы 1, 2,  
заключение)

Отв. исполнитель:

науч. сотрудник НИЛ 4.10

«Нанотехнологии»

\_\_\_\_\_ А.И. Захлебаева  
(введение, разделы 1, 2)

Исполнители:

науч. сотрудник НИЛ 4.10

«Нанотехнологии»

\_\_\_\_\_ А.В. Сурганов  
(раздел 2, заключение)

науч. сотрудник НИЛ 4.10

«Нанотехнологии»

\_\_\_\_\_ Л.В. Семеняков  
(разделы 1, 3)

мл. науч. сотрудник НИЛ 4.10

«Нанотехнологии»

\_\_\_\_\_ А.А. Лозовенко  
(разделы 2, 3)

Нормоконтролер

\_\_\_\_\_ Л.А. Шичко

## РЕФЕРАТ

Отчет: 67 с., 1 ч., 27 рис., 11 табл., 51 ист.

### БИОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ МИКРОСИСТЕМЫ, ВСТРЕЧНО-ШТЫРЕВЫЕ ЭЛЕКТРОДЫ, АНОДНЫЙ ОКСИД АЛЮМИНИЯ, ВЕРТИКАЛЬНО-УПОРЯДОЧЕННЫЕ СТОЛБИКИ МЕТАЛЛОКСИДОВ

Объект исследования – биочувствительные микросистемы резистивного и емкостного типа со встречно-штыревыми электродами на основе наноструктурированных слоев анодного оксида алюминия (АОА) и вертикально-упорядоченных металлоксидных столбиков.

Цель работы – разработать конструкцию и методы формирования массивов встречно-штыревых электродов резистивного и емкостного типа на основе наноструктурированных материалов, исследовать характеристики разработанных микросистем.

Разработаны методики получения пористых слоев из АОА с различным структурированием пористой поверхности. Проведено модифицирование пористой поверхности АОА на основе иммобилизирующих слоев. Определены особенности регистрации сигнала на пористых иммобилизирующих слоях при детектировании микроорганизмов. Разработаны технологические маршруты создания биосенсоров на поверхности структурированных слоев из анодного оксида алюминия (АОА) и вертикально-упорядоченных столбиков оксида ниобия ( $Nb_2O_5$ ). Оптимизировано соотношение размеров проводников и зазоров между ними во встречно-штыревой измерительной системе. Исследованы электрофизические характеристики биочувствительных систем резистивного типа с иммобилизирующими элементами на основе пористого АОА и вертикально-упорядоченных  $Nb_2O_5$  наноструктур. Установлено, что при качественной и количественной регистрации бактерий, иммобилизованных на БЧС, оптимальным является резистивный метод, основанный на изменении сопротивления структуры при иммобилизации бактерий. Зарегистрировано уменьшение сопротивления микросистем с увеличением количества бактерий *Staphylococcus Saprophyticus* и *Salmonella Typhimurium*, иммобилизованных на встречно-штыревых электродах.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	7
1 Биологические сенсоры для детектирования микроорганизмов.....	9
1.1 Основные характеристики и принципы функционирования биосенсоров .....	9
1.1.1 Типы распознающих элементов.....	11
1.1.2 Способы иммобилизации биологических компонентов в структуру биосенсора.....	14
1.2 Детектирование микроорганизмов биосенсорами на основе встречно- штыревых электродов .....	17
1.2.1 Емкостной метод детектирования микроорганизмов.....	18
1.2.2 Резистивный метод детектирования микроорганизмов .....	21
2 Биосенсоры на встречно-штыревых электродах с наноструктурированными иммобилизующими слоями .....	26
2.1 Формирование иммобилизующих слоев на основе пористого анодного оксида алюминия и исследование их микроструктуры и свойств .....	26
2.1.1 Применение пористого анодного оксида алюминия в технологии создания биочувствительных микросистем.....	26
2.1.2 Формирование упорядоченных пленок анодного оксида алюминия.....	28
2.2 Исследование особенностей регистрации сигнала на пористых иммобилизующих слоях при измерении количества микроорганизмов резистивным методом .....	31
2.2.1 Особенности регистрации сигнала при детектировании микроорганизмов резистивным методом.....	31
2.2.2 Разработка технологического маршрута формирования резистивных биочувствительных микросистем с нанопористыми иммобилизующими слоями.....	32
2.2.3 Апробация и исследование характеристик тестовых резистивных биосенсорных структур с иммобилизующими слоями на основе пористого АОА .....	35

2.3	Регистрация сигнала на пористых иммобилизирующих слоях биочувствительных микросистем при измерении количества микроорганизмов емкостным методом .....	37
2.3.1	Разработка технологического маршрута формирования емкостных биочувствительных микросистем с нанопористыми иммобилизирующими слоями.....	37
2.3.2	Апробация и исследование характеристик тестовых емкостных биочувствительных структур иммобилизирующими слоями на основе пористого АОА .....	40
2.4	Методы модификации нанопористых иммобилизирующих слоев для стимулирования их биорегуляторных свойств .....	42
3	Биочувствительные сенсорные микросистемы на основе упорядоченных массивов вертикально-ориентированных наноструктур .....	44
3.1	Формирование иммобилизирующих слоев на основе упорядоченных массивов металлооксидных столбиков .....	44
3.2	Методы регистрации и контроля биологических объектов на столбиковых иммобилизирующих слоях встречно-штыревых резистивно-чувствительных микросистем.....	48
3.3	Модификация столбиковых иммобилизирующих слоев встречно-штыревых биочувствительных микросистем для регистрации количества микроорганизмов емкостным методом .....	53
3.4	Сравнение электрофизических характеристик биочувствительных микросистем резистивно-емкостного типа с иммобилизирующими элементами на основе пористого АОА и упорядоченных наностолбиков Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> .....	55
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	62
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	63

## ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АОА	анодный оксид алюминия
АОН	анодный оксид ниобия
АОП	анодная оксидная плёнка (то же мн. ч.)
БОП	барьерная оксидная плёнка
БОС	барьерный оксидный слой
ВАХ	вольт-амперная характеристика (то же мн. ч.)
ВК	винная кислота
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
МК	малоновая кислота
ОФК	ортофосфорная кислота
ОЯ	оксидная ячейка (то же мн. ч.)
ПХТ	плазмохимическое травление
ПЦР	полимеразноцепная реакция
СЭМ	сканирующий (-ая) электронный (-ая) микроскоп (-ия)
ХСЛ	химически стойкий лак
ЩК	щавелевая кислота

## ВВЕДЕНИЕ

Биосенсор – это контрольно-аналитическое устройство, состоящее из распознающего элемента, преобразователя и системы сбора и обработки данных, предназначенное для качественного и количественного определения биологических веществ и соединений [1,2].

Широкое применение биосенсоры нашли в медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве, ветеринарии, сфере обеспечения безопасности жизнедеятельности человека. Кроме стандартных требований, предъявляемых к производимым сенсорам, таких как простота эксплуатации, дешевизна, высокая точность и селективность, высокая скорость обработки данных, к биосенсорам также предъявляются требования миниатюризации, возможности работать в специальной среде, в непрерывном или в автономном режим. Поэтому в настоящее время большое внимание уделяется разработке портативных высокочувствительных быстродействующих биологических сенсоров, а также улучшению их рабочих характеристик [3]. Электрические, оптические и пьезорезисторные биосенсоры не всегда удовлетворяют требованиям быстродействия и высокочувствительности и обладают определенными трудностями при детектировании микроорганизмов. К существенным проблемам, возникающим при разработке сенсорных систем такого типа, относится долгое время инкубации бактерий, а также многочисленные стадии очистки и сушки, необходимые для обработки образца [4]. Поэтому широкое развитие при формировании биочувствительных микросистем в настоящее время получила конструкция со встречно-штыревыми электродами [5,6]. Преимуществами таких сенсоров являются их малые габариты, малое время отклика, высокая чувствительность и высокая скорость обработки сигналов. Массив встречно-штыревых электродов минимально подвержен воздействию со стороны окружающей среды, а детектирование микроорганизмов биосенсорами на его основе не требует инкубационной обработки проб [7]. Дополнительная модификация электродов позволяет улучшить рабочие характеристики таких структур и придать им специфические свойства. Одним из перспективных направлений является формирование биочувствительных микросистем на основе наноструктурированных

материалов, в частности, нанопористого анодного оксида алюминия (АОА) или вертикально-упорядоченных столбиков металлооксидов [8,9].

Поскольку фиксация микроорганизмов осуществляется за счет физико-химических взаимодействий между биологическими компонентами и сорбирующей поверхностью биосенсора [10,11], увеличение активной площади сорбирующей поверхности в результате наноструктурирования приведет к увеличению количества физико-химических связей и, соответственно, к увеличению чувствительности биосенсоров. В связи с этим особую важность имеет разработка методов создания и модификации пленок пористого оксида алюминия и вертикально-упорядоченных металлооксидных систем для стимулирования их биорегуляторных свойств.

Таким образом, создание биосенсорной платформы с максимально большим количеством свободных химических связей путем формирования на ее поверхности наноструктурированных слоев материалов из нанопористого анодного оксида алюминия или упорядоченных массивов металлооксидных столбиков, позволит обеспечить высокую избирательность и чувствительность измерительных систем для определения количества микроорганизмов при минимальных затратах времени.



# 1 Биологические сенсоры для детектирования микроорганизмов

## 1.1 Основные характеристики и принципы функционирования биосенсоров

Биосенсор – это тип контрольно-аналитического устройства, который служит для классового, качественного и количественного определения биологических веществ [12]. Простейший сенсор состоит из следующих частей [12–13]:

- распознающий элемент (он также может быть назван рецепторным, селективным или избирательным слоем), представляющий собой вещество, которое способно селективно взаимодействовать с аналитом (исследуемым “объектом”);
- трансдюсер (англ. transducer – преобразователь, датчик), преобразующий энергию химического или биологического взаимодействия в электрический сигнал;
- устройство (система) сбора и обработки данных, которое служит для усиления, анализа, преобразования сигнала и отображения результатов.

Схема работы медицинского биосенсора представлена на рисунке 1.

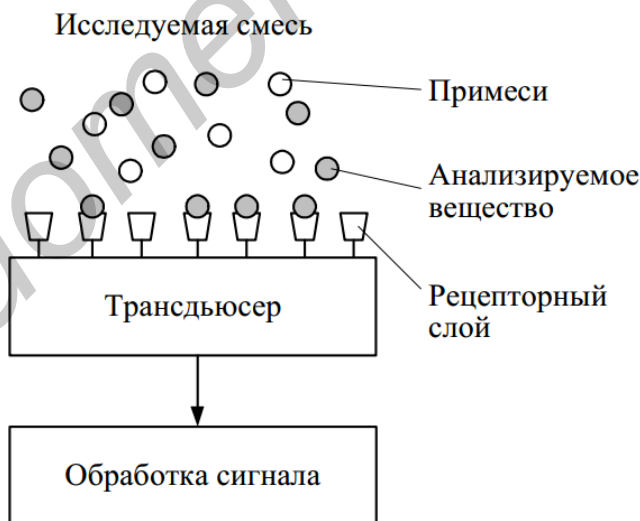


Рисунок 1 – Схема работы медицинского биосенсора

Используемые в биосенсорах трансдюсеры очень разнообразны и специфичны. Наиболее распространенными являются электрохимические преобразователи, в которых в качестве трансдюсера выступает электрод, помещенный в исследуемый раствор [14,15]. Оптические биосенсоры используют

явления полного внутреннего отражения и поверхностного плазмонного резонанса [16,17]. Гравиметрические сенсоры используют изменение массы при реакции аналита, чаще всего они основаны на акустических волнах или пьезокварцевых микровесах [14].

Биологические сенсоры направлены на детектирование органических молекул, важных для живых организмов: высокомолекулярных, таких как белки, ДНК, и низкомолекулярных, например глюкозы и мочевины [14]. Как и всякий измерительный прибор, биосенсор имеет допустимый диапазон рабочих температур, давлений и рН, а также характеризуется такими параметрами, как точность и воспроизводимость. Среди временных характеристик биосенсоров различают время отклика (время установления равновесия между анализируемым веществом и рецепторным слоем), время жизни (срок воспроизводимой работы сенсора до деградации рецепторного слоя) и время регенерации (время, необходимое для восстановления работоспособности распознающего элемента).

Одной из важнейших характеристик биосенсора является его чувствительность или отношение сенсорного сигнала к концентрации аналита, которая вызвала этот сигнал [2]. Другой важной характеристикой сенсоров является их предел обнаружения – минимальное количество (концентрация) аналита в пробе, которое может быть зарегистрировано. Для современных сенсоров это значение может составлять сотые доли процента [2].

Еще одной из важнейших характеристик биосенсора является его селективность или избирательность, т.е. способность регистрировать определенный аналит из смеси веществ [18]. Избирательность биосенсоров достигается принципами молекулярной и биомолекулярной «выборки». Например, закрепление на распознающем слое антитела, антигена, клеток (любые химикаты, бактерии, вирусы), пыльцы с определенным белком. Однако неопределенные взаимодействия, протекающие при анализе биологических проб, усложняют интерпретацию выходных сенсорных сигналов. Фоновые шумы и ложные реакции, присутствующие в сенсорном отклике, негативно влияют на результат анализа и пригодность системы сенсоров для специфических применений. Поэтому основным требованием при формировании чувствительно-распознающего слоя сенсора является обеспечение максимальной чувствительности сенсора к определенному реагенту.

### 1.1.1 Типы распознающих элементов

Чаще всего в качестве распознающих элементов биосенсоров используются биологические объекты, такие как ферменты, ткани, антитела, нуклеиновые кислоты и рецепторы [2]. В зависимости от типа распознающего элемента сенсор регистрирует определенный аналит, с которым вступает в реакцию биологический объект, находящийся на чувствительно-распознающем слое.

Ниже рассматриваются основные типы рецепторных слоев и их особенности.

*Ферменты.* Наиболее часто используемые в распознающих элементах биосенсоров биологические объекты. Ферменты – высокоспецифичные катализаторы биохимических реакций, в состав которых входит одна или несколько белковых молекул, иногда присутствует небелковая часть. В биосенсорах ферменты используют благодаря их высокой каталитической активности: ферменты увеличивают скорость реакции в  $10^3$ – $10^7$  раз. Наиболее широко используемые биосенсоры с ферментативным рецепторным слоем – это амперометрические сенсоры на глюкозу с глюкозооксидазой [19,20]. Иногда ферменты используются непосредственно в составе тканей организмов животных или растений. Примером такого использования может являться сенсор на дофамин (нейрогормон, биологический предшественник адреналина), где в качестве распознающего слоя были использованы ткани грибов, иммобилизованные на электродах при помощи углеродной пасты [2].

*Ткани.* В тканях растений и животных содержится множество ферментов, которые находятся в естественном для них окружении и меньше подвержены инактивации под действием pH и температуры, а также ингибированию посторонними веществами, что положительно влияет на срок эксплуатации тканесодержащих биосенсоров. К тому же ткани и микроорганизмы дешевле очищенных ферментов, что в некоторых случаях позволяет радикально снизить себестоимость биосенсоров [18]. Однако присутствие в тканях большого количества посторонних ферментов существенно снижает селективность сенсоров. Кроме того, поскольку субстрату приходится диффундировать через ткань, увеличивается время отклика подобных сенсоров [2].

Одним из примеров тканесодержащего биосенсора является сенсор на основе пульпы банана для определения дофамина – катехоламина мозга, разработанный в 1985 г. Сидвеллом и Райхницем и усовершенствованный в 1988 г. Вангом и Лином [2]. Впоследствии этот же сенсор успешно использовался для определения катехола и флаванолов. Таким образом, использование тканей в биосенсорах решает проблемы деактивации и деградации ферментов при их иммобилизации и увеличивает стабильность ферментов. Однако при этом существенно снижается селективность таких сенсоров.

*Антитела.* Антитела являются наиболее универсальными биологическими реагентами, которые могут обеспечить необходимую селективность [2]. Антитела – это сложные белковые молекулы, построенные из нескольких субъединиц, вырабатываемые в организмах позвоночных как реакция на проникновение чужеродных антигенов, например, токсинов, вирусов или чуждых организму макромолекул. Находящиеся в крови антитела связываются с антигенами, деактивируют их и выводятся из организма. Также связанные антитела служат так называемыми “метками” для микроорганизмов, подлежащих уничтожению. Взаимодействие антиген–антитело считается высокоселективным для применения в биосенсорах.

Схематичное изображение молекулы антитела приведено на рисунке 2.

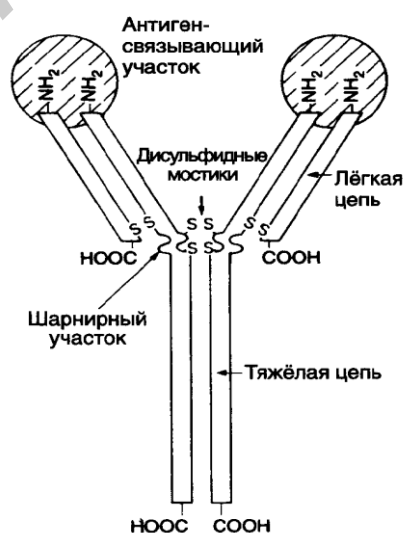


Рисунок 2 – Схематическое изображение молекулы антитела состоящей из двух тяжелых и двух легких цепей

Биосенсоры с антителами в качестве распознающего элемента обладают исключительной селективностью, высокой чувствительностью и прочной связью с антигеном. К недостаткам сенсоров данного типа можно отнести отсутствие каталитического действия. Кроме того, ввиду высокой селективности антител, такие биосенсоры в некоторых случаях могут давать разные отклики на два разных штамма одного и того же микроорганизма, что существенно усложняет анализ [2]. Не смотря на это, антитела давно применяются в иммуноанализе, причем их связывание с антигенами прочнее, чем связывание ферментов с субстратами.

Еще одним фактором, усложняющим применение антител в биосенсорах, является сложность регистрации акта связывания антигена. Для этого часто применяют специальные методы, например, использование меток. Кроме того, взаимодействия антиген–антитело часто имеют высокие значения константы ассоциации, т. е. слабо обратимы, и использующие их распознающие элементы часто являются одноразовыми или требуют специальных методов регенерации [18]. Примерами биосенсоров на основе антител могут служить сенсоры для определения эстрадиола и тринитротолуола [21,22].

*Нуклеиновые кислоты.* Как и антитела, нуклеиновые кислоты способны специфично связываться с лигандами. Спаривание цепей нуклеиновых кислот лежит в основе образования молекул дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) – носителя генетической информации. Для каждого белка и, следовательно, фермента, синтезируемого в клетках организма, существует специфическая последовательность нуклеотидов, кодирующая этот белок.

В ДНК-сенсорах рецепторный слой состоит из иммобилизованных одноцепочечных ДНК, которые улавливают из раствора комплементарные цепи. ДНК-зонды используют для выявления наследственных болезней, рака и вирусных инфекций [2]. Они могут представлять собой как короткие синтетические фрагменты нуклеиновых кислот (олигонуклеотиды), так и длинные фрагменты, получаемые клонированием ДНК. Как и в случае антител, при анализе ДНК в определяемый раствор добавляют метку: радиоактивные изотопы, ферменты, флуоресцентные или электроактивные молекулы.

Приготовление образцов ДНК для исследований является сложным и трудоемким процессом. Вначале проводится очистка пробы, после чего для

увеличения количества молекул ДНК определенного типа проводится процедура полимеразноцепной реакции (ПЦР). Развитие ДНК-биосенсоров позволит обходиться без специальных методов выделения ДНК, а некоторые современные ДНК-технологии, применяемые в геной и белковой инженерии, такие, как повышение выхода фермента и улучшение свойств фермента, могут успешно использоваться при разработке новых типов биосенсоров [2].

*Рецепторы.* Рецептор – это белковая молекула, расположенная в клеточной мембране, способная связывать определенные лиганды и вызывать физиологический отклик в ответ на акт связывания. Кроме того, в некоторых случаях рецепторы могут связываться не с одним лигандом, а с несколькими структурно родственными соединениями, что является привлекательным для использования в биосенсорах [2].

Рецептор-содержащие биосенсоры можно разделить на две группы по типу используемых рецепторов. В одном случае это интактные, то есть входящие в состав мембраны, рецепторы, а в другом – очищенные [2]. Биосенсоры на основе интактных рецепторов используются для регистрации местных анестетиков, эстрогенов и их миметиков, в то время как биосенсоры на основе очищенных рецепторов, в частности *N*-холинорецептора использовали для определения FITC-меченного  $\alpha$ -конотоксина [2]. Потенциал использования рецепторов в биосенсорах очень велик, но для полной его реализации необходимо провести множество научно-исследовательских работ.

#### 1.1.2 Способы иммобилизации биологических компонентов в структуру биосенсора

Прочное закрепление (иммобилизация) биологического материала на трансдьюсере позволяет обеспечить надежную работу биосенсора. Существуют пять основных методов иммобилизации биологических материалов:

- адсорбция;
- микрокапсулирование;
- включение;
- сшивка;
- ковалентное связывание.

*Адсорбция.* Наиболее простой метод, преимущество которого заключается в том, что он не требует большой подготовки компонентов сенсора. Адсорбция – это повышение концентрации компонента в поверхностном слое вещества (на границе раздела фаз) по сравнению с ее значением в каждой объемной фазе [23]. Различают физическую и химическую адсорбцию. Физическая адсорбция протекает с помощью ван-дер-ваальсовых взаимодействий, реже - с участием родных связей и взаимодействий с переносом заряда. В результате физической адсорбции между биоматериалом и носителем возникают относительно непрочные связи. Химическая адсорбция протекает с образованием ковалентных связей, что позволяет более прочно связывать биоматериал.

Ферменты могут адсорбироваться на поверхности материалов, в состав которых входит алюминий, уголь, глина, целлюлоза, каолин, силикагель, стекло, коллаген. При этом адсорбированный биоматериал очень чувствителен к изменению pH, температуры, ионной силы и концентрации субстрата.

Одним из преимуществ метода можно назвать отсутствие дополнительных реагентов и отдельной стадии очистки при иммобилизации биологического материала, таким образом, метод практически не нарушает исходное состояние фермента. Однако адсорбция не обеспечивает достаточного прикрепления ферментов к трансдьюсеру, поэтому метод пригоден, в основном, для стадии исследований, когда от сенсора не требуется длительной эксплуатации. Адсорбционная иммобилизация биологических компонентов применяется в электрохимических и калориметрических биосенсорах [11].

*Микрокапсулирование.* Данный метод позволяет заключить биоматериал с внутренней стороны инертной мембраны вблизи трансдьюсера. С применением этого метода был получен первый глюкозный биосенсор на кислородном электроде [22].

Среди достоинств метода выделяют:

- тесное взаимодействие между биоматериалом и трансдьюсером;
- высокую надежность, пригодность для разных типов сенсоров;
- высокую воспроизводимость работы биоматериала (фермента), его температурную стабильность, устойчивость к загрязнениям и биодеструкции;
- возможность связывания биологического компонента с проводящим полимером (например, с полипирролом).

При микрокапсулировании используют несколько типов мембран. Например, мембраны из ацетата целлюлозы (диализных), мембраны из поликарбоната (Nucleopore), природного белка коллагена и политетрафторэтилена (Teflon), мембраны из полимера Nation и полиуретанов. Тем не менее, некоторые молекулы и частицы способны проникать через мембрану, что относится к существенным недостаткам данного метода.

*Включение.* В этом методе биоматериал включают внутрь полимерного геля: биологический материал смешивают с раствором мономера, к которому добавляют инициатор полимеризации. Чаще всего используют полимерные гели из полиакриламида, также применение находят гели из крахмала, нейлона, кремнийорганических и проводящих полимеров [2].

Достоинствами метода являются простота и уникальность иммобилизации ферментов. Метод применим для иммобилизации не только индивидуальных ферментов, но даже отдельных клеток. Метод иммобилизации ферментов в гелях обеспечивает равномерное распределение энзима в объеме носителя. Все гели обладают высокой механической, химической, тепловой и биологической стойкостью и обеспечивают возможность многократного использования фермента, включенного в его структуру.

Однако данный метод обладает существенными недостатками, ограничивающими его широкое применение, такими как:

- плохая диффузия субстрата через гель, что приводит к снижению скорости ферментативной реакции, и, следовательно, времени отклика биосенсора;
- потеря (вытекание) фермента через поры в геле, что приводит к уменьшению биологической активности распознающего элемента.

*Сшивка.* В этом методе для иммобилизации биоматериала на твердой подложке или в геле используют так называемые бифункциональные реагенты. Метод является весьма полезным для стабилизации адсорбированных на поверхности носителя ферментов. Однако он имеет ряд недостатков, схожих с методом включения:

- потеря активности фермента в результате плохой диффузии субстратов в полученных распознающих элементах;
- низкая механическая прочность элементов.



*Ковалентное связывание.* Функциональные группы аминокислот, не имеющие значения для каталитической активности фермента, можно задействовать для конкретного связывания с подложкой (трансдьюсером или мембраной), для этого используют такие нуклеиновые группы, как NH<sub>2</sub>, COOH, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OH, SH, а также имидазольную группу.

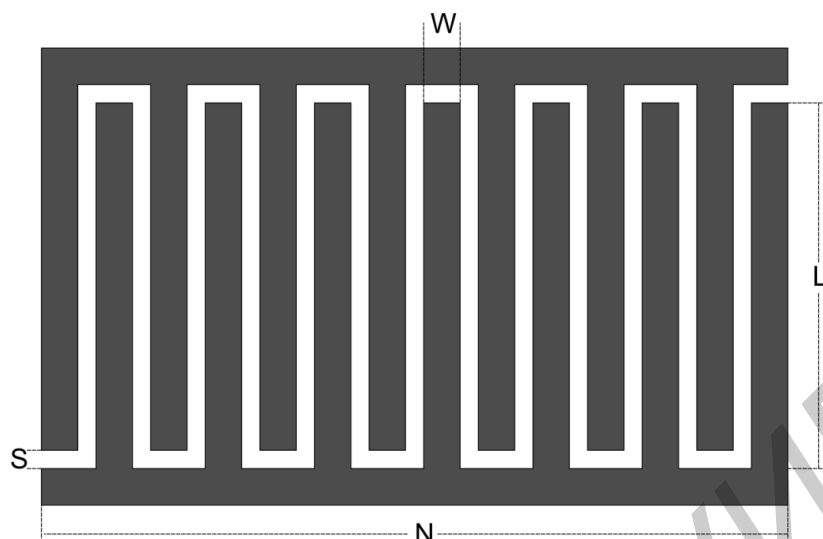
Главное достоинство метода состоит в том, что в получаемом биосенсоре фермент надежно закреплен на подложке и не высвобождается в процессе эксплуатации сенсора. Основные недостатки методов физической сорбции, такие как десорбция на последующих стадиях анализа, малая величина сорбционной емкости для некоторых белков, олигопептидов и гаптенных, могут быть устранены за счет ковалентного присоединения специфического реагента к твердой фазе.

## **1.2 Детектирование микроорганизмов биосенсорами на основе встречно-штыревых электродов**

В течение последних двух десятилетий возрос интерес к использованию системы со встречно-штыревыми электродами (Interdigitated Electrodes, IDEs) для конструирования биосенсоров. IDEs платформы изготавливают с применением технологии фотолитографии на кремниевых, кварцевых, стеклянных подложках. Расстояние между электродами встречно-штыревых платформ варьируется от десятых долей нанометров до десятых долей микрона, а сами электроды изготавливаются из алюминия, титана, платины, золота и прочих металлов [5,6,24]. Такие конструкции применяют для повышения чувствительности датчиков, снижения их стоимости и миниатюризации.

Конструкция системы со встречно-штыревыми электродами представлена на рисунке 3.

В зависимости от типа чувствительно-распознающего слоя различают два вида биочувствительных микросистем на основе встречно-штыревых электродов: емкостные и резистивные. В основе резистивного преобразования лежит принцип изменения сопротивления в системе встречно-штыревых электродов, связанного с соединением молекул с рецепторами, иммобилизованными на поверхности электродов [4,25]. Емкостное преобразование достигается путем изменения диэлектрической проницаемости материала.



W – ширина электрода; L – длина электрода; S – ширина зазора между электродами;  
N – количество электродов

Рисунок 3 – Конструкция сенсорной системы встречно-штыревых электродов

Чувствительный материал, как правило, осаждают на всю поверхность электродов, однако с аналитом реагирует только тот материал, который лежит в чувствительной области датчика. Материал, находящийся на поверхности штыревых электродов, не работает как диэлектрик, поэтому не может участвовать в определении аналита. Фактически определение аналита происходит в области зазоров между электродами.

#### 1.2.1 Емкостной метод детектирования микроорганизмов

Принцип обнаружения биологических объектов при детектировании микроорганизмов емкостным методом основан на изменении диэлектрической проницаемости встречно-штыревого конденсатора. Electroдами сенсоров емкостного типа, в простом представлении, являются две близко расположенные параллельные пластины, емкость между которыми можно выразить как:

$$C = \varepsilon_r \cdot \varepsilon_0 \cdot \frac{A}{d} \quad (1)$$

где  $\varepsilon_0$  – диэлектрическая постоянная;

$\varepsilon_r$  – относительная диэлектрическая проницаемость среды (материала) между обкладками конденсатора;

$A$  – площадь поверхности обкладок конденсатора (электродов);

$d$  – расстояние между обкладками.

Из формулы (1) видно, что изменение емкости может происходить при изменении диэлектрической проницаемости между обкладками  $\varepsilon_r$ , либо при изменении площади поверхности обкладок конденсатора  $A$  или расстояния между обкладками  $d$ .

Емкостные сенсоры, работа которых основана на изменении диэлектрической проницаемости биологического материала, разделяют на две категории: использование встречно-штыревых (гребенчатых) электродов и использование поверхности раздела электрод–раствор [26]. В биосенсорах, использующих взаимодействие «электрод–раствор», фиксируют изменение емкости между основным электродом и электродом, находящимся в биологическом растворе. В таких устройствах полезный сигнал зависит от изменения диэлектрической проницаемости биологического материала, а также от увеличения его толщины и смещения ионов и молекул воды с поверхности [26].

Гребенчатые или встречно-штыревые электроды изготавливают на диэлектрической подложке, а их функционирование осуществляется с помощью образца из биомолекул. Реакция между иммобилизованным на поверхность образцом биоматериала и «целевыми» молекулами определяется как изменение емкости устройства.

В тех случаях, когда электроды достаточно большой толщины и краевыми эффектами можно пренебречь, емкость IDEs-датчика определяется как:

$$C_{sens} = n \cdot \varepsilon \cdot \frac{l \cdot t}{d} \quad (2)$$

где  $\varepsilon$  – диэлектрическая проницаемость чувствительной пленки биоматериала, покрывающей электроды;

$n$  – количество электродов;

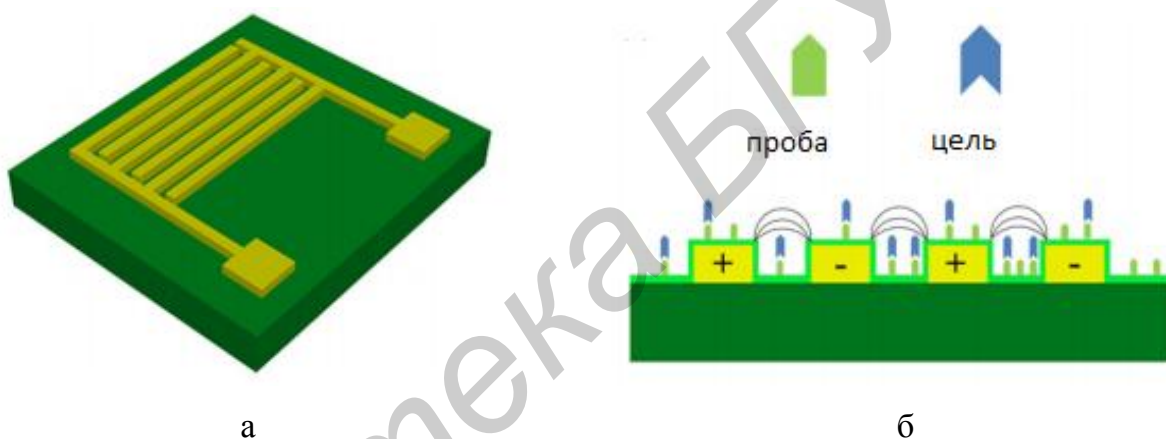
$l$  – длина электродов;

$t$  – толщина встречно-штыревых электродов;

$d$  – расстояние между ними.

В случае наноразмерных электродов, описанная выше модель не подходит для расчета емкости устройства, поэтому используют более сложные модели, например, Гервена (1998) [27] и Олтуса (1997) [28].

Простейшая конструкция емкостного встречно-штыревого биосенсора и его поперечное сечение в момент взаимодействия с аналитом приведены на рисунке 4 [29]. На рисунке 4, а представлена платформа встречно-штыревых электродов. На рисунке 4, б представлено поперечное сечение платформы встречно-штыревых электродов, показана полярность электродов и силовые линии электрического поля между электродами которые участвуют в процессе детектирования микроорганизмов.



а – 3-D изображение сенсора; б – поперечное сечение датчика в момент воздействия анализируемого вещества

Рисунок 4 – Схематическое изображение биосенсора на основе платформы со встречно-штыревыми электродами для детектирования микроорганизмов емкостным методом

Образец вещества, которое необходимо определить, наносится на поверхность сенсора. После взаимодействия молекулы вещества с молекулами-мишенями происходит изменение емкости между электродами. Для того, чтобы уменьшить токи между проводниками и обеспечить соответствующую поверхность для нанесения исследуемого аналита, поверхность сенсора покрывают тонким диэлектрическим слоем.

Большинство параметров биосенсоров на основе системы со встречно-штыревыми электродами напрямую зависят от конструкции и геометрии самого

сенсора. Опытным путем было доказано, что в случае соизмеримых размеров электродов и целевого анализа, отклик сенсора более оптимизирован и точен [26–28]. В целом, емкость конкретного сенсора является функцией диэлектрической проницаемости материалов и геометрических характеристик электродов. Некоторыми группами ученых были предложены аналитические модели для оценки емкости встречно-штыревых датчиков имеющих либо бесконечный верхний слой воздуха (Вэй и др., 1977 [30]), либо многослойную структуру над электродами (Геворгян и др., 1996 [31]; Игреи и Диас, 2004 [32]). Электрическое поле, создаваемое наноразмерными электродами, распространяется  $\sim 100$  нм над поверхностью биосенсора, вследствие чего наноразмерные электроды обладают повышенной чувствительностью по отношению к обычным электродам. В работе Гервена (1998) [27] определено, что для электродов с шириной и расстоянием 250 нм, 80% электрического поля сконцентрировано на расстоянии 250 нм от поверхности.

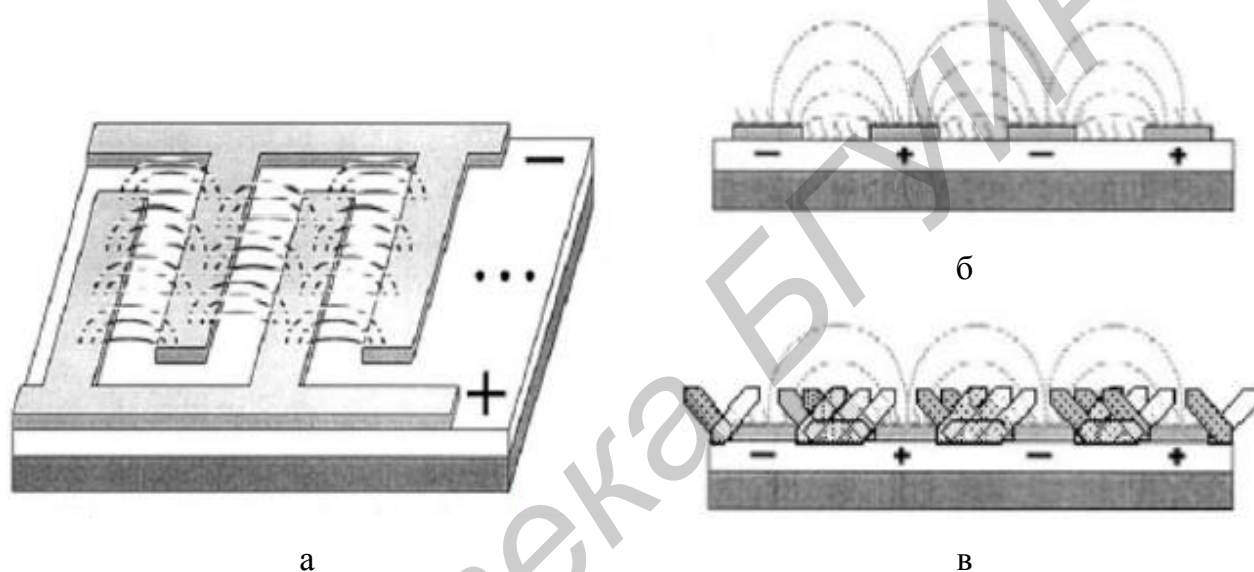
Емкостные биосенсоры на основе встречно-штыревых электродов широко используются в области обнаружения ДНК без применения меток и других анализируемых веществ. Так, Лию (2008) [33] использовал встречно-штыревые электроды из золота для изучения влияния на изменение длины и концентрации свободно плавающих двух цепочечных молекул ДНК. Результаты показывают, что емкость диэлектрического раствора возрастает по мере увеличения концентрации или когда длина молекул ДНК увеличивается. Гюль (2006) [34] сообщил об открытии емкостного биосенсора, не использующего «целевые» метки, для обнаружения С-реактивного белка (CRP), с помощью которого возможно выявление сердечно-сосудистых заболеваний на ранних стадиях. Электроды биосенсора изготавливались из золота и были пассивированы слоем  $\text{SiO}_2$  и силана. Ширина электродов составляла 25 мкм, расстояние между электродами - 25 мкм. Имобилизованные антитела CRP на сенсор были в состоянии обнаружить CRP-антиген в диапазоне нг/мл.

### 1.2.2 Резистивный метод детектирования микроорганизмов

Принцип обнаружения биологических объектов при детектировании микроорганизмов резистивным методом основан на изменении сопротивления (проводимости) или, чаще всего, электрохимического импеданса встречно-штыревых структур при соединении целевых молекул с рецепторами (антитела, ДНК, белки и

другие элементы) иммобилизованными на поверхности электродов. Электрохимический импеданс включает в себя анализ резистивных или емкостных (индуктивных) свойств материалов в ответ на возбуждение малой амплитуды синусоидального сигнала [15].

Конструкция резистивного встречно-штыревого биосенсора, а также его поперечное сечение в отсутствие и при наличии на поверхности чувствительного слоя исследуемого аналита, приведены на рисунке 5.

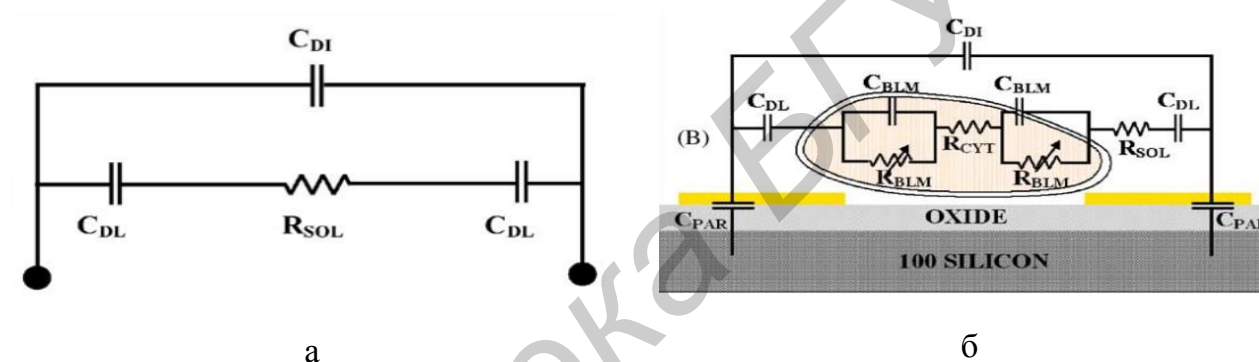


а – изображение электрического поля между электродами; б – поперечное сечение платформы без осаждения бактерий; в – поперечное сечение платформы после осаждения бактерий

Рисунок 5 – Схематическое изображение биосенсора на основе платформы со встречно-штыревыми электродами для детектирования микроорганизмов резистивным методом

При погружении встречно-штыревой микросистемы в раствор с исследуемым аналитом активная зона сенсора подвергается воздействию бактерий. Поверхностные антитела, иммобилизованные между электродами с помощью гетеробифункциональных агентов, выступают в качестве тросов, удерживающих антитела на поверхности электродов. При изменении количества бактерий, связанных с поверхностью сенсора, соответственно, будет изменяться величина электрического сопротивления между электродами структуры.

На рисунке 6, а представлена принципиальная электрическая схема измерения импеданса электродов в растворе аналита, где  $C_{DL}$  – емкость двойного слоя между электродом и электролитом,  $C_{DI}$  – диэлектрическая емкость электролита,  $R_{sol}$  – сопротивление раствора. На рисунке 6, б представлена эквивалентная схема измерения импеданса модель в момент иммобилизации бактерии на поверхности сенсора. Она включает в себя сопротивление бактерии, которое, в свою очередь, состоит из сопротивления цитоплазмы –  $R_{cyt}$  и сопротивления мембраны клетки  $R_{blm}$ . Также цепь включает в себя емкость клеточной мембраны –  $C_{blm}$ . Кроме того, в этой электрической цепи присутствует паразитная емкость  $C_{par}$ , возникающая вследствие границы раздела электродов и кремниевой подложки.



а – модель для электродов в жидкости; б – эквивалентная модель в момент иммобилизации бактерии на поверхность сенсора

Рисунок 6 – Электрические схемы измерения импеданса электродов в растворе аналита

Для лучшего понимания данной схемы на рисунке 7 показано строение бактериальной клетки.

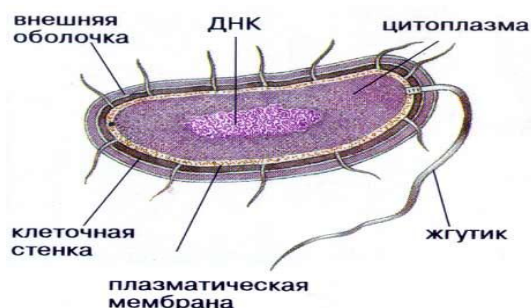


Рисунок 7 – Строение бактерии

В центральной части клетки находится ее наследственный материал (ДНК), который окружен цитоплазмой. Цитоплазма отделена от внешней среды цитоплазматической мембраной, с внешней стороны которой находятся проницаемая клеточная стенка, окруженная внешней оболочкой, защищающей бактерию от высыхания. На поверхности бактерии находятся жгутики, необходимые для ее передвижения. Удельное сопротивление цитоплазмы бактерии составляет  $10^6 \text{ Ом/см}^2$ , емкость двухслойной липидной мембраны –  $1 \text{ мкФ} \times \text{см}^2$ . Данные электрические характеристики вызывают изменение сопротивления между штыревыми электродами.

Эквивалентную схему можно интерпретировать в виде двух параллельных ветвей: диэлектрической ветви емкости и ветви импеданса. При частоте, превышающей 1 МГц, емкость среды доминирует над общим сопротивлением и вклад емкости двойного слоя и сопротивления в общий импеданс минимально. При частотах ниже 1 кГц ток не течет через емкостную ветвь, и клетки, связанные с антителами, иммобилизованными на поверхность биосенсора, добавляют различные элементы импеданса к сопротивлению ветви.

Электрические сигналы от встречно-штыревых электродов накапливаются в приэлектродной области, сопротивление среды изменяется с ростом бактерий и изменением ионной концентрации среды, вызванной активностью фермента, используемого в качестве меток для усиления сигнала. Из-за близости катодных и анодных электродов, незначительное количество ионных частиц может периодически ускоряться между электродами, что приводит к высокой эффективности их обнаружения, обуславливая тем самым преимущество резистивного метода детектирования при обнаружении веществ с малой концентрацией. Бердат (2006) показал, что нижний порог обнаружения синтетической одностречевой ДНК с штыревых микроэлектродов резистивным методом находится в микромолярном диапазоне. Та же группа ученых сообщила об обнаружении амплифицированного ДНК из *Salmonella Choleraesuis* (Сальмонелла Холерасуис) в нанометровом диапазоне с помощью микроэлектродов в жидкостной ячейке [35].

Впервые компанией Genetic International в Англии (затем переименованной в MediSense, сейчас входящей в состав Abbot Laboratories) был разработан портативный анализатор крови, принцип работы которого был основан на применении технологии изменения сопротивления микроэлектродов. Сенсор состоял из



одноразовой электродной полоски с иммобилизованной глюкозооксидазой. Для проведения анализа каплю крови, предварительно взятую из пальца, наносили на рабочую область сенсора [36].

На сегодняшний день методы резистивного и емкостного детектирования микроорганизмов используются в электрохимических чувствительных метках гибридизации [37], электрохимических биосенсорах для анализа ДНК [38], электрохимических биосенсорах для диагностики раковых заболеваний [39], биосенсорах для амбулаторного измерения слюнных альфа-амилазы [40]. Для улучшения рабочих характеристик резистивных и емкостных сенсоров разрабатываются методики модифицирования встречно-штыревых электродов и применяются различные наноматериалы [41].

## **2 Биосенсоры на встречно-штыревых электродах с наноструктурированными иммобилизующими слоями**

### **2.1 Формирование иммобилизующих слоев на основе пористого анодного оксида алюминия и исследование их микроструктуры и свойств**

#### **2.1.1 Применение пористого анодного оксида алюминия в технологии создания биочувствительных микросистем**

Увеличение активной площади сорбирующей поверхности биочувствительной микросистемы, т.е. площади взаимодействия рецептора и исследуемого аналита, достигается при формировании биосистем на структурированных нанопористых материалах [8]. Наиболее известным и широко применяемым материалом такого типа является пористый анодный оксид алюминия (АОА), обладающий системой регулярных высокоупорядоченных пор, размерами которых можно управлять в широких пределах. Достоинствами АОА, обуславливающими его широкое применение, являются простота и дешевизна его получения, возможность формирования массивов однородных пор в широком диапазоне размеров — от единиц до сотен нанометров, возможность контроля размеров пор посредством управления режимами анодного окисления. Кроме того, пористый анодный оксид алюминия имеет ряд уникальных химических, механических, электрических и оптических характеристик, важных для сенсорных применений, включая высокую твердость, термическую стабильность, химическую устойчивость в средах с биологической совместимостью, что особенно существенно для биосенсорики [8,42].

Структуру пористого анодного оксида алюминия можно представить в виде плотноупакованных гексагональных ячеек, каждая из которых имеет в центре пору [8]. Схематически структура АОА представлена на рисунке 8, там же обозначены его структурные элементы – диаметр пор  $d_n$ , диаметр оксидной ячейки  $d_{оя}$ , толщина барьерного слоя  $h_b$ , толщина стенки оксидной ячейки  $h_{оя}$ , длина поры  $L_n$ .

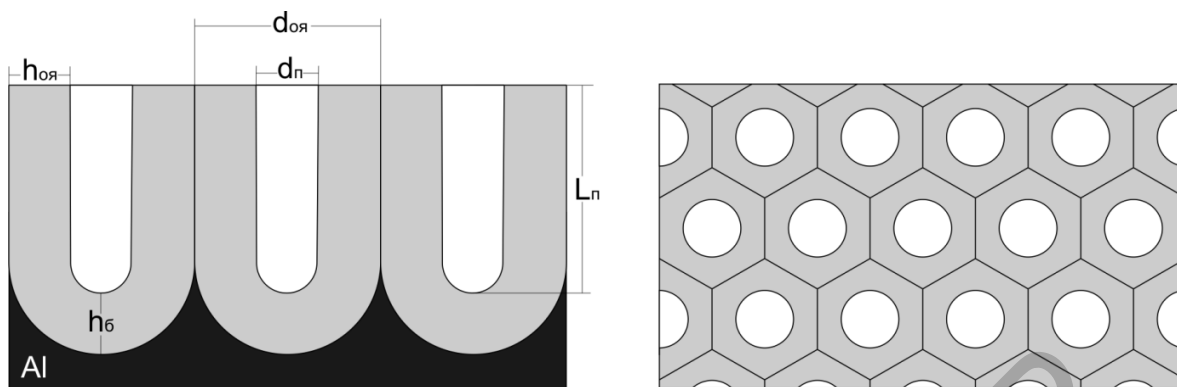


Рисунок 8 – Структура пористого анодного оксида алюминия

Методика формирования АОА основана на процессе электрохимического анодирования алюминия в кислотных электролитах [43]. Электрохимическое анодирование алюминия проводят в двухэлектродной электрохимической ячейке в водных растворах двух- или трехосновных кислот (серной, щавелевой, ортофосфорной, малоновой, винной, лимонной) в режиме постоянного тока или постоянного напряжения [8]. Для формирования упорядоченной структуры оксида обеспечивают стабильную температуру и непрерывное перемешивание электролита. В зависимости от выбранного режима анодирования и типа используемого электролита получают оксиды с определенными структурными параметрами [44]. Диаметр оксидных ячеек  $d_{оя}$ , расстояние между центрами соседних пор  $D_{int}$  и толщина барьерного оксидного слоя  $h_{б}$  линейно зависят от напряжения анодирования  $E_a$  [42,45–47]:

$$d_{оя} = 2m_w E_a, \quad (3)$$

где  $m_w$  – коэффициент, зависящий от состава электролита, в котором проводится окисление.

$$D_{int} = k E_a, \quad (4)$$

где  $k$  – коэффициент пропорциональности, принимающий значения от 2,5 нм/В до 2,8 нм/В.

$$h_{б} = \alpha E_a, \quad (5)$$

где  $h_{б}$  – толщина стенки оксидной ячейки.

Величина количества пор на единицу площади зависит от плотности тока анодирования и может быть выражена как

$$n = n_0 j^{-\alpha} \quad (6)$$

где  $n_0$  составляет  $5,79 \cdot 10^9$ ,  $112 \cdot 10^9$  и  $176 \cdot 10^9$  см<sup>-2</sup>, а  $\alpha$  составляет 0,68, 0,72 и 0,335 для электролитов на основе ортофосфорной, щавелевой и серной кислот соответственно [47].

Таким образом, сочетание упорядоченности и возможности управления параметрами структуры АОА характеризует его как перспективный материал для применения в биочувствительных микросистемах. Модификация поверхности АОА абсорбционными материалами обеспечит высокую чувствительность биосенсоров к биологическим соединениям и микроорганизмам.

### 2.1.2 Формирование упорядоченных пленок анодного оксида алюминия

В результате самоорганизованного роста пористого АОА возникает определенная разупорядоченность в структуре пор, обусловленная их преимущественным зарождением на дефектах поверхности и конкуренции на начальной стадии образования. Количество зародившихся пор на поверхности оксидной пленки оказывается больше количества пор в ее объеме в 1,5-2 раза в зависимости от электролита анодирования. Это приводит к тому, что приповерхностный слой оксида содержит дефекты и несовершенства структуры в виде углублений в местах неразвившихся пор и укороченные поры, прекратившие рост в результате «конкурентной борьбы». Выходы большинства пор искривлены и частично заужены. Не смотря на то, что в объеме пленки АОА имеют практически идентичную структуру с равными диаметрами пор и геометрическими размерами ячеек, у поверхности пленки анодный оксид остается разупорядоченным.

Для упорядочения ячеисто-пористой структуры формируемых оксидных пленок разработан и исследован метод двухстадийного анодирования алюминия. Суть данного метода заключается в выращивании на первой стадии анодирования слоя пористого оксида и его последующем селективном удалении, в результате чего поверхность алюминия наследует упорядоченный рельеф АОА, а образование пор на второй стадии анодирования происходит на «отпечатках» оксидных ячеек, что позволяет максимально приблизить число пор на поверхности и в объеме АОА. Процесс двухстадийного анодирования показан на рисунке 9.

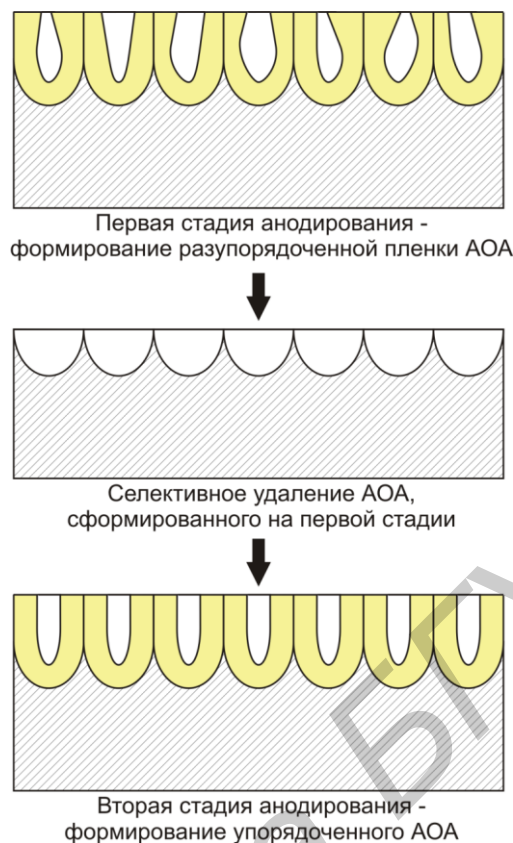


Рисунок 9 – Двухстадийное анодирование АОА

В качестве экспериментальных образцов использовали кремниевые пластины с напыленным в вакууме слоем алюминия 99,99% толщиной 1,5 мкм. Электрохимическое анодирование подготовленных подложек проводили в 0,4 М водном растворе винной (ВК) кислоты. Регистрацию и мониторинг *in situ* электрических параметров процесса проводили с помощью general purpose interface bus (GPIB, IEEE 488), соединенного с персональным компьютером с установленным программным обеспечением HP Vee 6. Анодирование проводили в гальваностатическом режиме при плотности тока анодирования 4 мА/см<sup>2</sup> при температуре электролита 12 ± 0,5°С при постоянном перемешивании. Величина анодного напряжения в период стационарного роста оксида составляла 185 В. Длительность первой стадии анодирования определялась глубиной анодирования. Для анодирования алюминия на глубину ~ 0,5 мкм длительность первой стадии анодирования составила ~ 7,5 мин. Удаление пористого оксида, сформированного на первой стадии анодирования, проводили в селективном водном растворе на основе оксида хрома и ортофосфорной кислоты, нагретом до 80°С. Вторая стадия

анодирования проводилась в электрохимических условиях, аналогичных первой стадии, но при стационарном напряжении 195 В.

Для выявления характерных особенностей морфологии поверхности исследуемых образцов их подвергали декапированию в водном растворе оксида хрома и ортофосфорной кислоты при температуре 60°C в течение 10 мин. Морфологические изменения поверхностей сформированных матриц АОА наблюдали в сканирующем электронном микроскопе «Hitachi S-806» при ускоряющем напряжении 30 кВ. Поверхность и скол сформированных матриц представлены на рисунке 10.

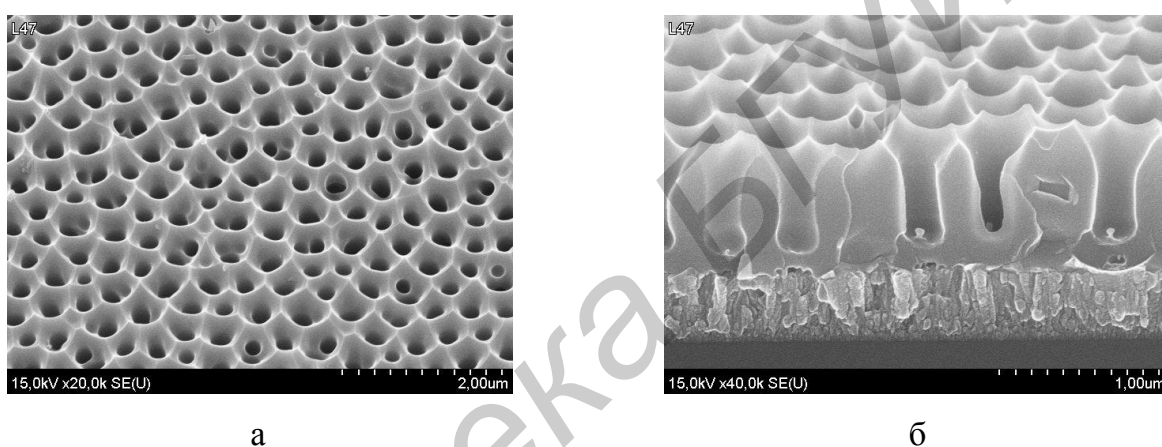


Рисунок 10 – СЭМ снимки поверхности (а) и скола (б) матрицы АОА

На рисунке 11 показана кинетическая зависимость формирования пористых матриц АОА на кремнии, полученная при двухстадийном анодировании.

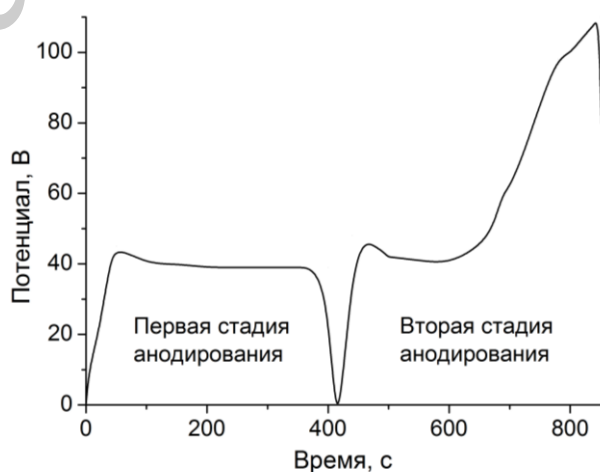


Рисунок 11 – Кинетика формирования упорядоченных матриц АОА на кремнии

Как видно из кинетики, на первой стадии процесс протекает в стационарном режиме. Напряжение анодирования сначала растет до своего максимального значения, а затем снижается до стационарного. Таким образом, оксидные ячейки зарождаются при напряжении, превышающем напряжение стационарного анодирования. Кроме этого, в гальваностатическом режиме электрохимическое растворение поверхности оксида в начальный период образования оксида идет с примерно постоянной скоростью, вследствие чего формируются расширенные горловины пор. Эти особенности процесса приводят к тому, что в гальваностатическом режиме на поверхности оксида образуется наименьшее количество мелких пор, при этом количество истинных пор, сохранившихся в процессе конкурентного роста в объеме внешнего неупорядоченного слоя, приближается к количеству пор внутри уже упорядоченного АОА. На второй стадии процесс анодирования повторяет кинетику первой стадии. Варьируя временем длительности первой и, соответственно, второй стадии, а также напряжением анодирования, можно получать пористые матрицы любой высоты и профиля.

## **2.2 Исследование особенностей регистрации сигнала на пористых иммобилизирующих слоях при измерении количества микроорганизмов резистивным методом**

### **2.2.1 Особенности регистрации сигнала при детектировании микроорганизмов резистивным методом**

Схематическое изображение встречно-штыревой платформы, параметры которой определяются длиной ( $L$ ) и шириной ( $W$ ) электродов, зазором ( $S$ ) между электродами и их количеством ( $N$ ), показано на рисунке 12. Важными факторами, определяющими чувствительность биосенсора на встречно-штыревых электродах, является соотношение сигнал-шум, а также величина зазора между электродами. Близость электродов друг к другу приводит к увеличению чувствительности и уменьшению времени отклика сенсора [48]. В биосенсорах резистивного типа чувствительный слой является резистором между двумя электродами, а откликом является изменение их сопротивления [49]. Ток протекает от одного электрода к другому через разрыв между ними, таким образом, эквивалентную схему измерения

импеданса электродов можно представить в виде двух параллельных ветвей: ветви емкости и ветви импеданса. При отсутствии на электродах бактерий, емкость среды доминирует над общим сопротивлением, тогда как клетки бактерий, иммобилизированные на поверхности биосенсора, добавляют различные элементы импеданса к сопротивлению ветви [50]. Эквивалентная схема измерения импеданса резистивного биосенсора при отсутствии бактерий и с иммобилизованными на поверхности бактериями представлена на рисунке 6 раздела 1.2.2.

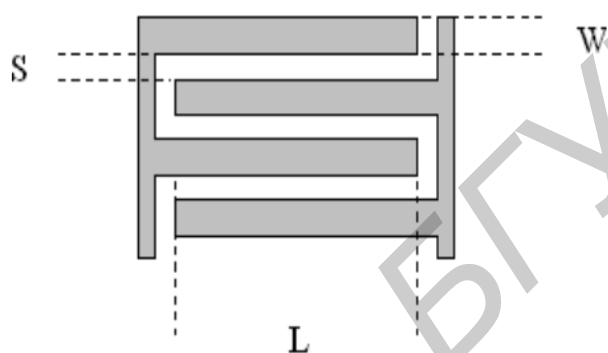


Рисунок 12 – Конструкция встречно-штыревых электродов биосенсора

### 2.2.2 Разработка технологического маршрута формирования резистивных биочувствительных микросистем с нанопористыми иммобилизирующими слоями

Были отработаны методики получения пористых слоев из АОА с различным структурированием поверхности и разработан технологический маршрут формирования наноструктурированных резистивных встречно-штыревых биочувствительных микросистем. На исходных кремниевых пластинах формировали слой  $\text{SiO}_2$ , необходимый для пассивации электродов, на который методом магнетронного распыления в вакууме напыляли пленку Al толщиной 1,5 мкм. Далее проводили двухстадийное анодирование Al на всю глубину до слоя  $\text{SiO}_2$ . Анодный оксид формировали в 0,2 М водном растворе ортофосфорной кислоты (ОФК) в гальваностатическом режиме при плотности анодного тока  $j_a = 4 \text{ mA/cm}^2$  и температуре электролита  $T = 12\text{-}13^\circ\text{C}$ . Первую стадию анодирования проводили на глубину 0,3 мкм, после чего анодный оксид удаляли в селективном травителе на основе водного раствора  $\text{CrO}_3$  и  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , нагретом до  $T = 80^\circ\text{C}$ . Вторую стадию



анодирования проводили в условиях, аналогичных первой стадии, на всю толщину оставшегося Al. Диаметр пор АОА увеличивали в селективном водном растворе CrO<sub>3</sub> и H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, нагретом до 60°C, в течение 5 минут. Затем на сформированный АОА методом магнетронного распыления в вакууме напыляли 0,3 мкм V и 1 мкм Al. Далее с планарной стороны подложек проводили фотолитографию для формирования рисунка встречно-штыревых электродов. На поверхность Al методом центрифугирования с частотой 3200 об/мин наносили позитивный фоторезист ФП-383 толщиной 1,2 мкм. Фоторезист сушили в термостате при температуре 100°C в течение 10 минут и экспонировали ультрафиолетовым излучением ( $\lambda = 200\text{--}300$  нм) на установке двухстороннего совмещения и экспонирования в течение 1 мин. Фоторезист проявляли в 0,5% растворе едкого кали в течение 20 секунд и задубливали при температуре 120°C в камере с ИК нагревом в течение 60 минут.

Для формирования электродов проводили плазмохимическое травление (ПХТ) Al в зазорах между электродами по всей толщине до поверхности V. ПХТ Al проводили во фторсодержащей плазме при давлении в рабочей камере 1,1 Па, удельной ВЧ мощности 0,7 Вт/см<sup>2</sup> и частоте плазменного разряда 13,56 МГц. Химическое растворение V до SiO<sub>2</sub> в зазорах между электродами проводили в 30% растворе H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> при T = 30°C. На завершающем этапе снимали фоторезистивную маску в растворе диметилформамида и моноэтаноламина (9:1) при T = 80°C.

Технологические операции формирования резистивных встречно-штыревых структур на основе АОА схематически изображены на рисунке 13.



Исходная Si подложка



Формирование слоя SiO<sub>2</sub>

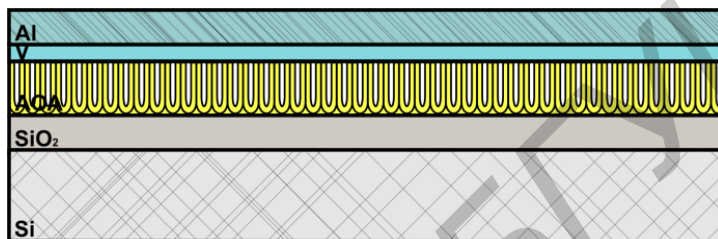
Рисунок 13 – Технологический маршрут формирования резистивных встречно-штыревых структур на основе АОА (продолжение с. 34)



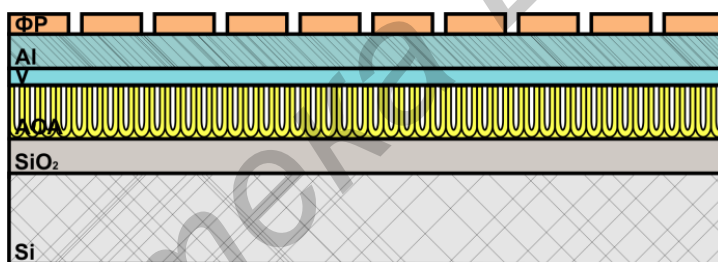
Напыление Al



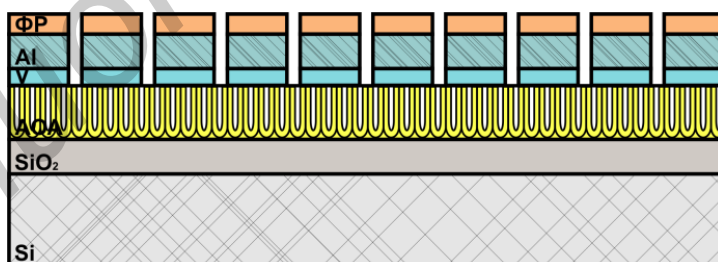
Двухстадийное анодирование Al



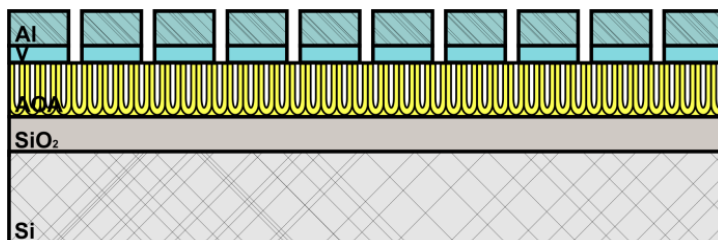
Напыление V и Al на AOA



Фотолитография по рисунку электродов



ПХТ Al и химическое травление V



Удаление фоторезистивной маски

Рисунок 13 – Продолжение (начало с. 33)

### 2.2.3 Аprobация и исследование характеристик тестовых резистивных биосенсорных структур с иммобилизирующими слоями на основе пористого АОА

По разработанному маршруту были изготовлены резистивные микросистемы, представляющие собой Si подложки размером 3×8 мм с Al контактами площадью 2,7×1,75 мм и массивом встречно-штыревых V/Al электродов. Оптимальные конструктивные размеры электродов, обеспечивающие максимальное соотношение сигнал-шум, были определены из соотношений, полученных в работе [20], связывающих ширину электрода (W), ширину зазора между электродами (S), их длину (L) и количество (N) и составили  $W = 50$  мкм,  $L = 4000$  мкм,  $N = 40$  шт. Было изготовлено два типа структур с зазорами  $S = 5$  мкм и  $S = 10$  мкм.

Схематически общий вид подложек показан на рисунке 14

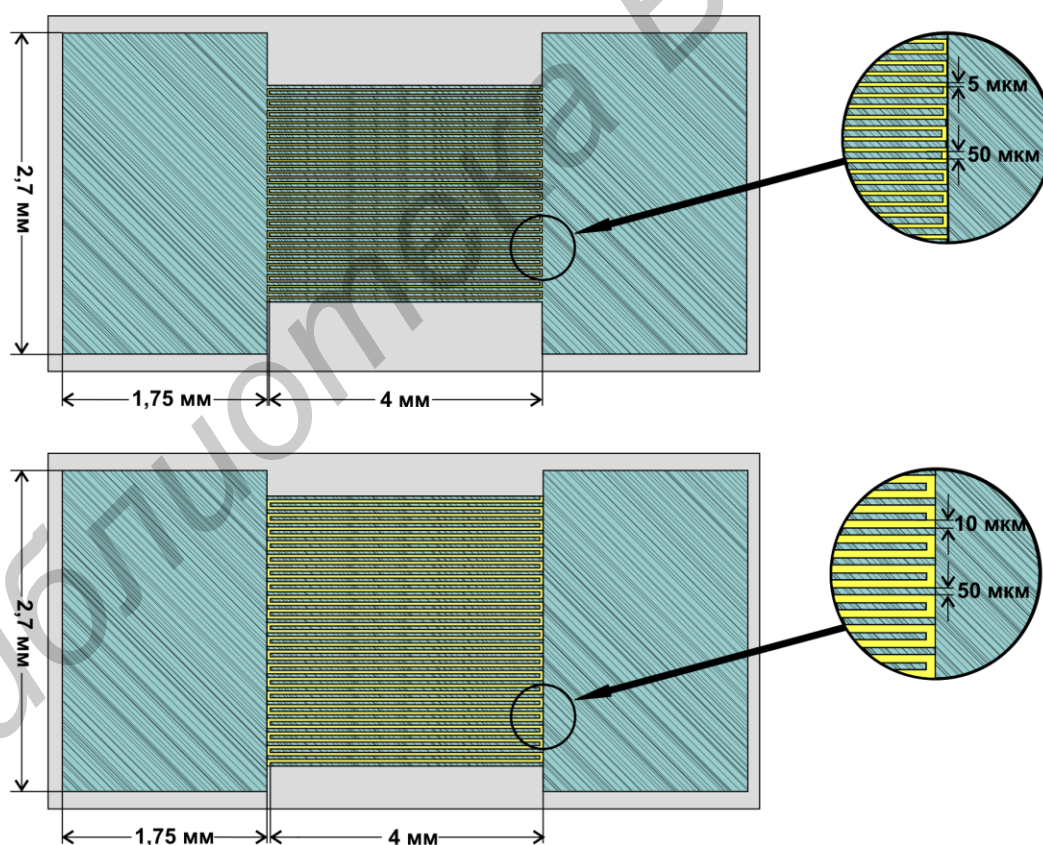


Рисунок 14 – Схематическое изображение общего вида резистивных биочувствительных микросистем с иммобилизирующим слоем на основе АОА

Фотографии массивов встречно-штыревых электродов изготовленных структур, полученные с помощью оптического микроскопа МКИ-2М с увеличением 250 и 500 крат, показаны на рисунке 15.

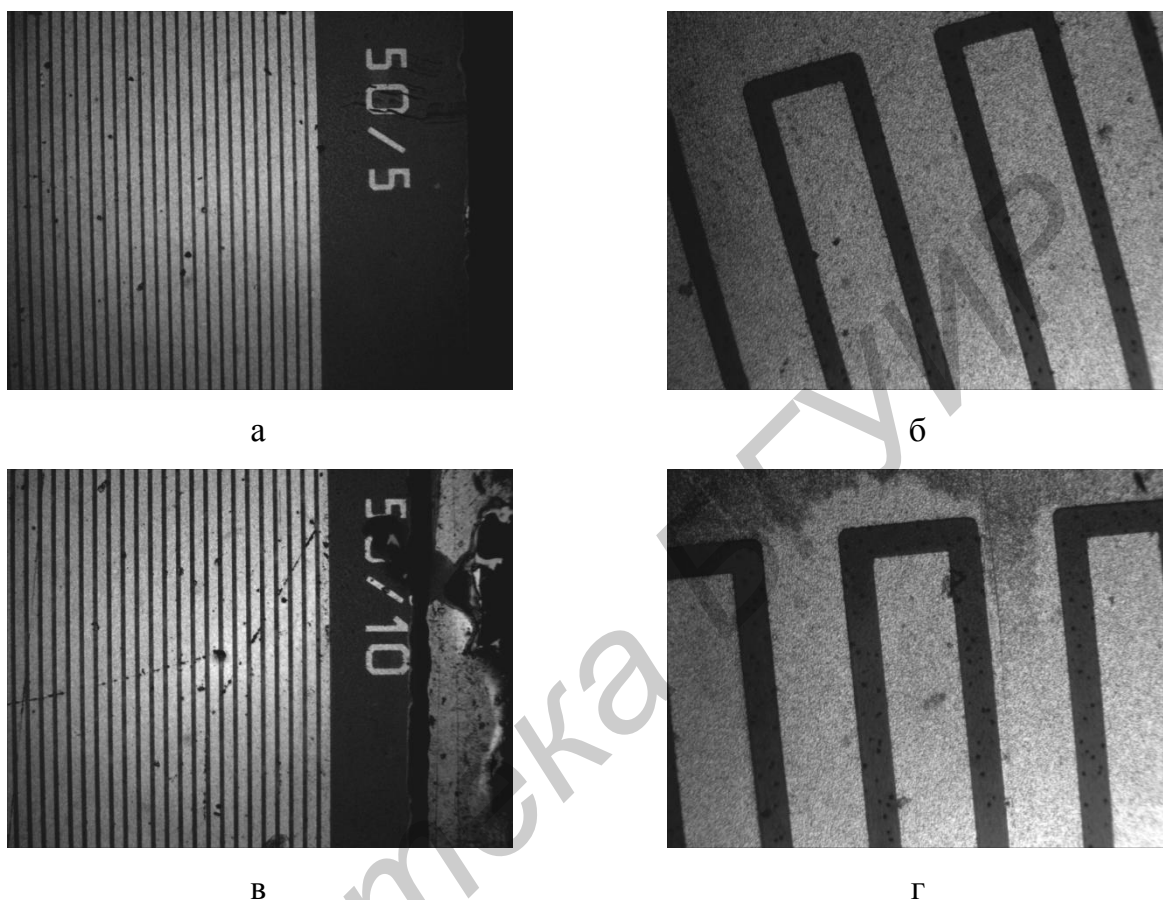


Рисунок 15 – Фотографии массивов встречно-штыревых электродов резистивных биочувствительных микросистем с зазорами 5 мм (а, б) и 10 мкм (в, г)

Были исследованы отклики изготовленных структур на бактерии *Salmonella Typhimurium* и *Staphylococcus Saprophyticus*. Для иммобилизации бактерий на поверхности структур образцы помещали в физиологические растворы, содержащие *Salmonella Typhimurium* в количестве от  $1,58 \times 10^3$  до  $1,58 \times 10^8$  КОЕ/мл и *Staphylococcus Saprophyticus* в количестве от  $1,72 \times 10^3$  до  $1,72 \times 10^8$  КОЕ/мл, и выдерживали в течение 30 мин. После извлечения образцов из растворов проводили измерение их сопротивлений ( $R_v$ ). Измерения сопротивлений повторяли спустя 15, 30, 60 минут, 3,5 часа и на следующие сутки (соответственно  $R_{15}$ ,  $R_{30}$ ,  $R_{60}$ ,  $R_{210}$ ,  $R_{1440}$ ). Величину отклика тестовых структур определяли как разность между сопротивлением структур с иммобилизованными на поверхности бактериями ( $R_b$ ) и

исходным (т.е. при отсутствии бактерий на поверхности) сопротивлением структур ( $R_0$ ):  $\Delta R = |R_b - R_0|$ . Относительное изменение сопротивления структур определяли как отношение  $\Delta R$  и  $R_0$ :  $|(R_b - R_0)/R_0| \times 100\%$ . Полученные отклики структур приведены на рисунке 16.

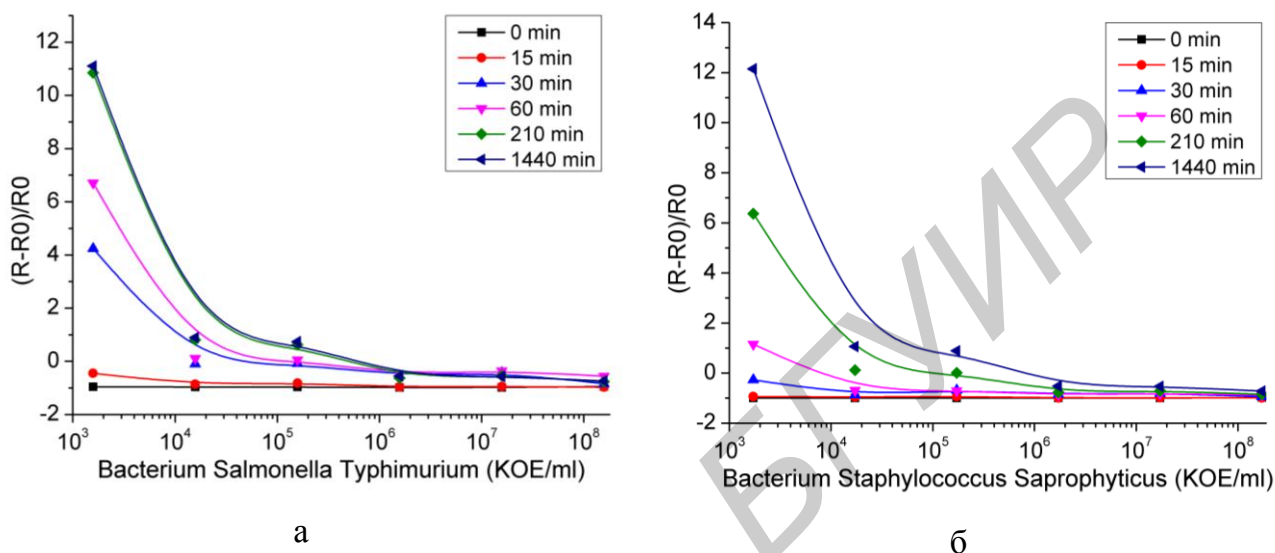


Рисунок 16 – Отклики встречно-штыревой резистивной микросистемы при иммобилизации на поверхности нанопористого слоя бактерий *Salmonella Typhimurium* (а) и *Staphylococcus Saprophyticus* (б)

Зарегистрировано уменьшение сопротивления на клеммах гребенок с ростом количества бактерий, иммобилизованных на их поверхности. Зависимость проявлялась по мере высыхания образцов, что связано с испарением влаги.

### 2.3 Регистрация сигнала на пористых иммобилизирующих слоях биочувствительных микросистем при измерении количества микроорганизмов емкостным методом

#### 2.3.1 Разработка технологического маршрута формирования емкостных биочувствительных микросистем с нанопористыми иммобилизирующими слоями

Исходные кремниевые подложки термически окисляли для получения слоя  $\text{SiO}_2$ . Далее на предварительно нагретые до  $T = 230 \pm 20^\circ\text{C}$  подложки при начальном вакууме не менее  $3 \times 10^{-4}$  Па в среде Ar методом магнетронного распыления напыляли

тонкую пленку Al толщиной 1,5 мкм при напряжении на магнетроне  $550 \pm 50$  В и токе разряда  $9 \pm 1$  А. После чего с планарной стороны подложек проводили фотолитографию для формирования рисунка встречно-штыревых электродов.

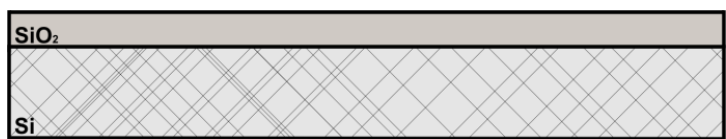
Затем на поверхность Al методом центрифугирования с частотой 3000 об/мин наносили негативный фоторезист ФН-14ТК. Время формирования пленки фоторезиста толщиной 1,2 мкм составляло 40 секунд. Сушку фоторезиста осуществляли при температуре  $100^{\circ}\text{C}$  в термостате в течение 10 минут, после чего проводили его экспонирование ультрафиолетовым излучением ( $\lambda = 200\text{--}300$  нм) на установке двухстороннего совмещения и экспонирования в течение 1 мин. Далее фоторезист проявляли в 0,5% растворе едкого натрия в течение 20 секунд и проводили его задубливание при температуре  $120^{\circ}\text{C}$  в камере с ИК нагревом в течение 60 минут.

На незащищенной фоторезистом поверхности Al (т.е. по поверхности электродов) формировали слой плотного оксида толщиной 0,5 мкм методом электрохимического анодирования в 1% водном электролите лимонной кислоты ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ) при температуре  $T = 14\text{--}15^{\circ}\text{C}$ . Анодирование проводили в потенциостатическом режиме при напряжении  $U = 150$  В со скоростью развертки  $V_p = 0,2$  В/с, величина анодного тока не превышала 7 мА, длительность анодирования составила 5 минут. После формирования слоя плотного оксида фоторезистивную маску удаляли в растворе диметилформамида и моноэтаноламина (9:1). Далее в зазорах между электродами встречно-штыревых структур формировали пористый АОА методом электрохимического анодирования. Анодирование Al проводили на всю глубину до слоя  $\text{SiO}_2$ . Анодный оксид формировали в 0,4 М водном растворе щавелевой кислоты (ЩК) в потенциостатическом режиме при потенциале анодирования  $U = 40$  В со скоростью развертки  $V_p = 0,1$  В/с при температуре электролита  $T = 12\text{--}13^{\circ}\text{C}$ . Для увеличения диаметра пор проводили химическое травление сформированных подложек в 2 М растворе серной кислоты при  $50^{\circ}\text{C}$  в течение 10 минут.

Технологические операции, проводимые при формировании емкостных встречно-штыревых структур на основе АОА, схематически изображены на рисунке 17.



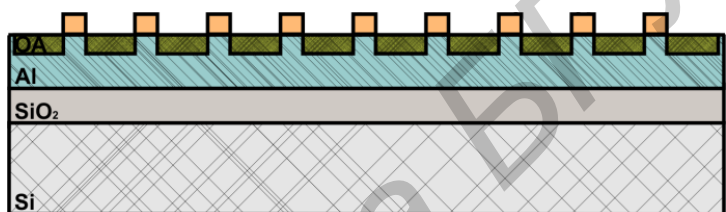
Исходная Si подложка



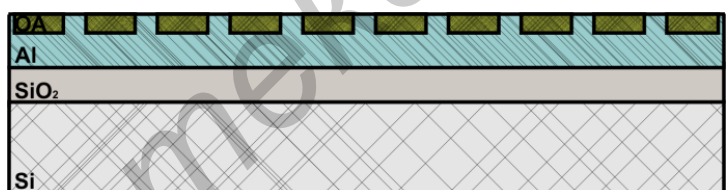
Окисление Si подложки



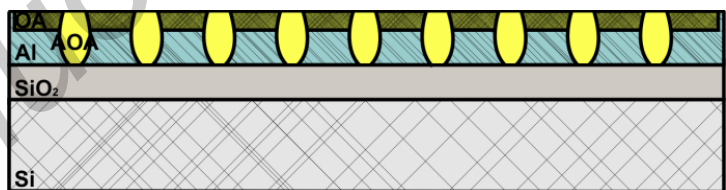
Напыление Al



Фотолитография, плотное анодирование по рисунку электродов



Удаление фоторезиста



Формирование АОА в зазорах

Рисунок 17 – Технологический маршрут формирования емкостных встречно-штыревых структур на основе АОА

### 2.3.2 Апробация и исследование характеристик тестовых емкостных биочувствительных структур иммобилизирующими слоями на основе пористого АОА

По разработанному технологическому маршруту были изготовлены емкостные микросистемы, представляющие собой Si подложки размером 3×8 мм с Al контактами размером 2,7×1,75 мм и массивом встречно-штыревых Al электродов, длиной  $L = 4000$  мкм и шириной  $W = 50$  мкм, покрытых тонким слоем плотного оксида алюминия. Количество электродов составило  $N = 40$  шт. Было изготовлено два типа структур с зазорами  $S = 5$  мкм и  $S = 10$  мкм.

Для иммобилизации бактерий на поверхности структуры образцы помещали на 30 минут в физиологические растворы, содержащие, в одном случае, бактерии *Salmonella Typhimurium*, а в другом – *Staphylococcus Saprophyticus*. Для каждого типа бактерий использовали 6 растворов с различной концентрацией бактерий:  $1,58 \times 10^3 \div 1,58 \times 10^8$  КОЕ/мл для *Salmonella Typhimurium* и  $1,72 \times 10^3 \div 1,72 \times 10^8$  КОЕ/мл для *Staphylococcus Saprophyticus*. После извлечения структур из растворов проводили измерения их емкостей. Регистрировали изменение относительной емкости структур с иммобилизованными на поверхности бактериями  $\Delta C$  и без них  $C_0$ , а также зависимость этой величины от концентрации бактерий. Величину сенсорного отклика определяли как разность между емкостью структур с иммобилизованными на поверхности бактериями и емкостью структур, измеренной при отсутствии бактерий на поверхности:  $\Delta C = C - C_0$ . Относительное изменение емкости сенсора определяли как отношение  $\Delta C$  и  $C_0$ :  $(C - C_0)/C_0$ .

На рисунке 18 приведена экспериментальная зависимость изменения относительной емкости встречно-штыревой емкостной микросистемы при иммобилизации на поверхности бактерий *Salmonella Typhimurium* и *Staphylococcus Saprophyticus* из растворов с различными концентрациями.



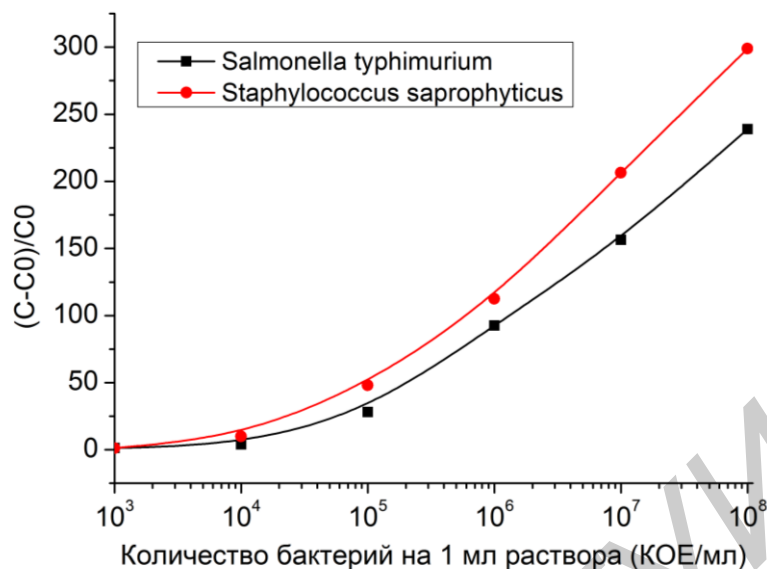


Рисунок 18 –Изменение относительной емкости встречно-штыревой микросистемы при иммобилизации на поверхности активного слоя бактерий *Salmonella Typhimurium* и *Staphylococcus Saprophyticus*

Как следует из приведенных зависимостей, с увеличением количества бактерий на 1 мл в растворах во всех случаях относительная емкость структур непрерывно возрастает. Это можно объяснить тем, что с повышением количества бактерий в растворе преобладающий вклад в суммарную емкость структуры начинает вносить составляющая, связанная с влагой (или жидкой составляющей) бактерий, иммобилизованных на рабочей поверхности микроструктуры. С увеличением количества бактерий в растворе растет количество бактерий, иммобилизованных на пористом оксиде алюминия. Из-за жидкой составляющей бактерий увеличивается количество влаги внутри пор АОА. Это приводит к появлению дополнительной емкости, которая подключается параллельно емкости, обусловленной оксидом алюминия, поэтому суммарная емкость структуры увеличивается.

Тем не менее, емкостные методы измерения не дают такой точности, как резистивные, поэтому при качественной и количественной регистрации бактерий, иммобилизованных на биочувствительных структурах, оптимальным является использование резистивного метода.

## 2.4 Методы модификации нанопористых иммобилизирующих слоев для стимулирования их биорегуляторных свойств

В зависимости от типа регистрируемых бактерий, их размеры могут различаться в несколько раз (например, размер *Staphylococcus Saprophyticus* – 0,905 мкм, а *Bacillus Subtilis* – 4,693 мкм). Управляемо варьируя структурными параметрами АОА пленок, в частности, диаметрами их пор, можно формировать иммобилизирующие слои, обладающие наилучшими адсорбционными свойствами и чувствительностью к определенному типу бактерий.

Для изменения ячеисто-пористой структуры АОА матриц проводят их **химическую модификацию** в селективных водных растворах на основе серной кислоты и на основе ортофосфорной кислоты и хромового ангидрида. Выдерживая матрицы в нагретых селективных растворах (80°C для хромового и 50°C для серного), можно управляемо растворять стенки оксидных ячеек АОА, а, следовательно, увеличивать диаметр пор. Раствор на основе ортофосфорной кислоты и хромового ангидрида характеризуется высокой скоростью растворения стенок АОА (~7,8 нм/мин), поэтому его целесообразно применять для травления матриц, имеющих большие размеры микроструктуры. В то время как раствор на основе серной кислоты имеет низкую скорость растворения стенок АОА (~1 нм/мин), поэтому позволяет провести более точную модификацию и используется для модификации матриц с малыми размерами микроструктуры.

Таким образом, с помощью разработанной методики двухстадийного анодирования и последующей модификации ячеисто-пористой структуры АОА можно формировать пористые матрицы с широким диапазоном структурных параметров, как указано в таблице 1.

Таблица 1 – Структурные размеры модифицированных матриц АОА

Тип электролита	Диаметр пор, нм	Расстояние между центрами пор, нм	Диаметр ОЯ, нм
ЩК	30 – 80	40 – 80	70 – 120
МК	70 – 150	50 – 170	170 – 230
ВК	90 – 350	250 – 450	400 – 600

На рисунке 19 приведены микрофотографии модифицированных матриц АОА, сформированных в ЩК, МК и ВК электролитах.

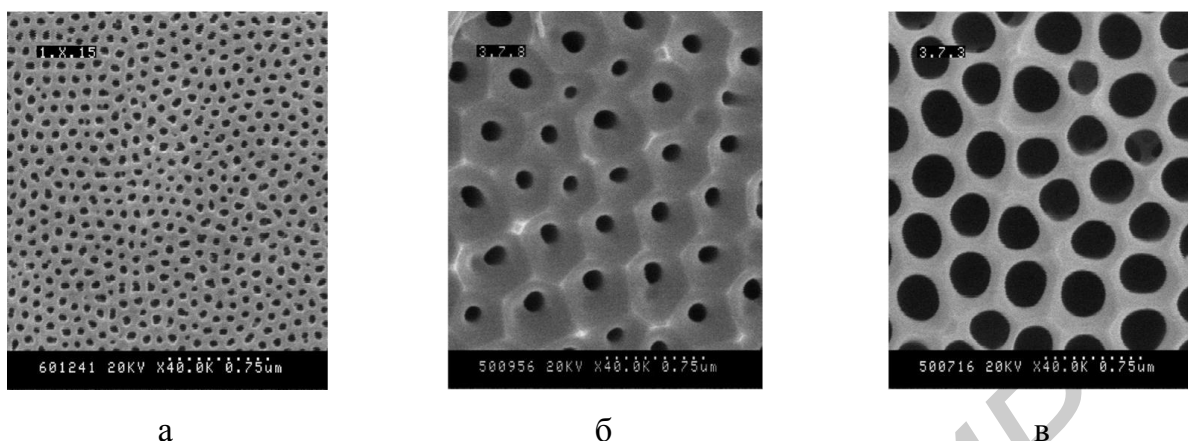


Рисунок 19 – Микрофотографии модифицированных матриц АОА с диаметрами пор 80 нм (а), 120 нм (б), 300 нм (в)

Еще одним из вариантов модификации наноструктурированных слоев АОА является их *ферментивная модификация*, т.е. физическая адсорбция ферментов на поверхности анодного оксида и микрокапсулирование ферментов в поры АОА. Установлено, что адсорбируемые пленки с течением времени десорбируют, причем этот процесс зависит от рН и ионной силы раствора, концентрации субстрата, температуры, удельной поверхности и пористости АОА. Предотвратить десорбцию можно при иммобилизации ферментов в поры геля. Фермент, заключенный в геле, не может выйти наружу, а объем пор АОА регулирует дозирование фермента в поре. В результате ферментирования можно получить слои АОА, имеющие различное структурирование, как показано на рисунке 20.

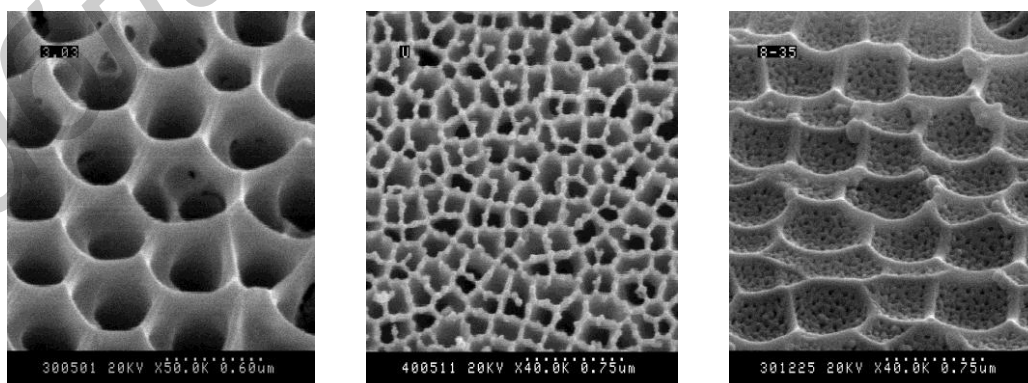


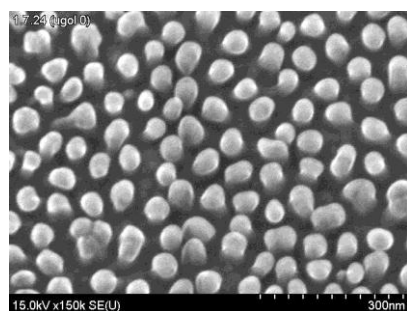
Рисунок 20 – Пленки АОА с различным структурированием пористой поверхности

### **3 Биочувствительные сенсорные микросистемы на основе упорядоченных массивов вертикально-ориентированных наноструктур**

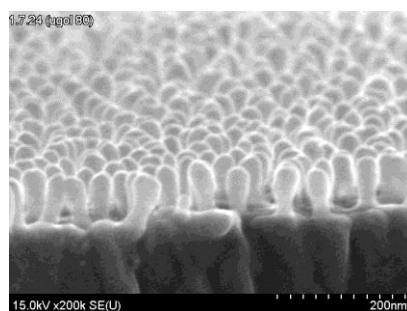
#### **3.1 Формирование иммобилизирующих слоев на основе упорядоченных массивов металлооксидных столбиков**

Исходные образцы представляли собой кремниевые подложки *n*-типа проводимости (4,5 Ом·см), с нанесенной методом магнетронного распыления в вакууме тонкопленочной двухслойной системы Nb (0,2 мкм) / Al (1,5 мкм). Электрохимическое анодирование образцов проводили в 0,2 М водном растворе щавелевой кислоты (ЩК) в соответствии с типовой кинетикой анодирования двухслойной системы Al/Nb [51] при строго контролируемых температуре, концентрации электролита и напряжениях. Анодирование Al проводили при плотности анодного тока 6 мА/см<sup>2</sup> и напряжении анодирования 40 В, анодирование подслоя Nb через поры сформированного анодного оксида алюминия (АОА) – при формовочном напряжении 37 В и экспоненциальном снижении тока до 50 мкА/см<sup>2</sup>. Реанодирование подслоя Nb через поры АОА для формирования упорядоченных столбиков анодного оксида ниобия (АОН) проводили в 0,1 М растворе лимонной кислоты (ЛК) при развертке напряжения со скоростью 0,5 В/до 100–450 В и с последующей 25-минутной выдержкой.

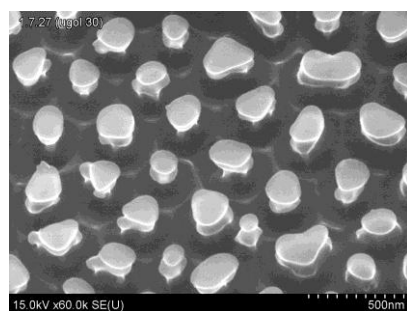
Особенности зарождения и роста столбиковых наноструктур Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> в матрицах АОА изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) в электронном микроскопе Hitachi S-806 при ускоряющем напряжении 20 кВ. Анализ СЭМ изображений наноструктур АОН, сформированных в различных по своей природе электролитах (рисунок 21), показал, что форма и размер пор и ячеек АОА оказывает непосредственное влияние на процесс зарождения, форму и размер металлооксидных структур.



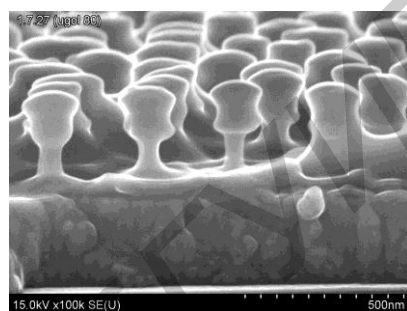
а



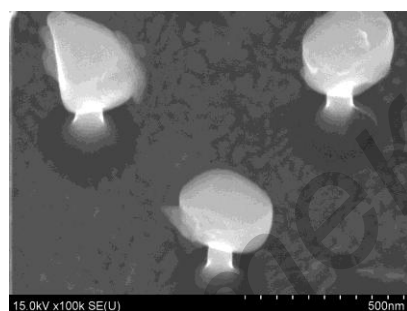
б



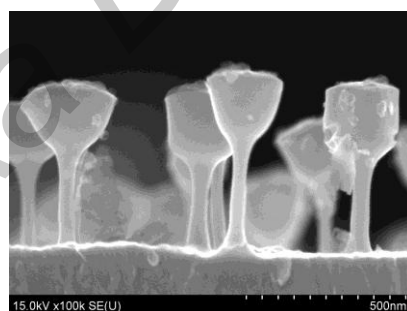
в



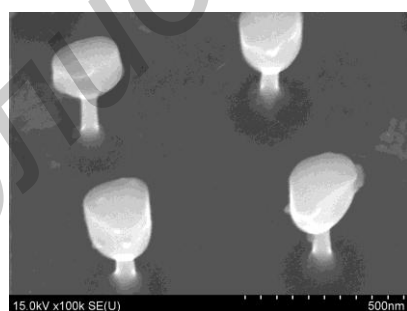
г



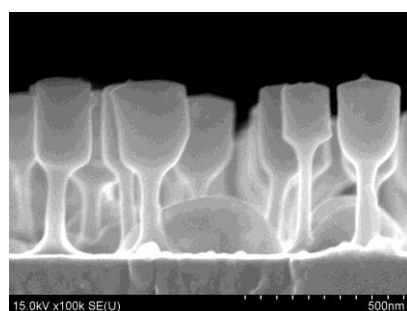
д



е



ж



и

Рисунок 21 – Поверхность и скол столбиков АОН, сформированных в 0,4 М  $C_2H_2O_4$  при формовочном напряжении 37 В (а, б); 0,4 М  $H_3PO_4$  при формовочном напряжении 150 В (в, г); 0,4 М  $C_4H_4O_6$  при формовочном напряжении 250 В (д, е); 0,2 М  $C_6H_8O_7$  при формовочном напряжении 300 В (ж, и)

При достижении барьерного слоя АОА подслоя ниобия начинается локальное окисление ниобия благодаря встречной миграции катионов  $Nb^{5+}$ ,  $Al^{3+}$  и анионов  $O^{2-}$  по пути подложка–барьерный слой–электролит–электрод и обратно. При этом локальное окисление подслоя ниобия начинается в нескольких точках, образуя наноканалы в барьерном слое, через которые окисляемый ниобий проникает в основание поры, а там сливается в цельное металлооксидное образование, по форме напоминающее бокал. Через наноканалы начинается локальное окисление ниобия, при этом окисление оставшегося у основания пор алюминия замедляется из-за высокой ионной проводимости барьерного слоя. Слияние оксида, проходящего через наноканалы в барьерном слое, можно объяснить низким ионным сопротивлением внутреннего барьерного оксида и более высоким сопротивлением внешнего слоя стенок пор АОА вследствие присутствия в нем катионных вакансий, связанной водой и других структурных дефектов. Благодаря взаимной миграции ионов ниобия и кислорода высокопроводящий АОН продолжает расти, заполняя поры АОА, что способствует образованию новых наноканалов в барьерном слое и слиянию уже существующих. В процессе окисления подслоя ниобия через поры АОА происходит постепенное доокисление алюминия между ниобием и АОА.

Столбики АОН имеют больший диаметр, чем поры, в которых они вырастают. Рост столбиков вдоль поры АОА конкурирует с расширением оснований столбиков, расстояние между которыми уменьшается до тех пор, пока они не сольются в сплошной оксидный слой. Отношения между этими конкурирующими явлениями, влияющими на развитие верхней и нижней частей пленки, определяет коэффициент объемного роста, числа переноса разных степеней окисления ниобия, значения которых могут быть комплексными, и отношение ионных сопротивлений оксида ниобия и АОА, окружающего столбики.

Для определения чисел переноса для АОН, полученного анодированием ниобия через поры АОА, были приняты следующие допущения [51]. Во-первых, электролит для анодирования ниобия через поры АОА (1 % водный раствор  $H_2C_2O_4$ , и 0,5 М водный раствор  $H_3BO_3$ ) не растворяет ни АОА, ни АОН. Во-вторых, присутствие в АОН анионных примесей электролитов отсутствует или незначительно. В-третьих, формирование АОН на границе раздела электролит/столбик ведет к заполнению поры АОА за счет прироста оксидного столбика; формирование АОН на границе раздела

основание столбика/металлическая пленка ведет к расширению и слиянию оснований в непрерывный анодно-оксидный слой под пористым АОА. Это значит, что граница между верхней и нижней частью пленки может быть использована как метка, разделяющая оксиды, сформированные благодаря миграции катионов и анионов. Предполагая, что коэффициенты переноса ниобия и оксида неизменны в верхней (оксидные столбики) и нижней (сплошной слой АОН) частях пленки, число переноса ионов кислорода,  $t_O$ , может быть вычислено как

$$t_O = \frac{V_{low}}{V_{tot}} = \frac{V_{low}}{V_{low} + V_{up}} = \frac{h}{h + N \cdot l \cdot \pi \cdot r^2} \quad (6)$$

где  $V_{low}$  – удельный объем на единицу площади сплошного слоя АОН, сформированного под порами АОА, т.е. ниже метки (нижняя часть пленки);

$V_{up}$  – удельный объем на единицу площади столбикового АОН, сформированного в порах АОА, т.е. выше метки (верхняя часть пленки);

$V_{tot}$  – весь объем, сформированного АОН на единицу площади (нижняя и верхняя части пленки);

$h$  – толщина нижней части пленки;

$N$  – количество оксидных столбиков на единицу площади;

$l$  – высота оксидных столбиков;

$r$  – радиус оксидных столбиков.

На основании измеренных на разных этапах формирования морфологических параметров ниобиевых наноструктур были проведены расчеты чисел переноса, результаты которых представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Морфологические параметры оксидных ниобиевых структур

Напряжение, В	$h$ , нм	$N$ , шт/нм <sup>2</sup>	$l$ , нм	$r$ , нм	$t_O$	$t_N$
37	20	$1,39 \cdot 10^{-4}$	80	21	0,56	0,44
100	40	$1,4 \cdot 10^{-4}$	191	21,5	0,50	0,5
200	65	$1,38 \cdot 10^{-4}$	348	20,8	0,49	0,51
250	91	$1,35 \cdot 10^{-4}$	440	20,5	0,52	0,48
300	110	$1,42 \cdot 10^{-4}$	548	21,4	0,5	0,5
450	185	$1,4 \cdot 10^{-4}$	750	21	0,56	0,44

Как видно из таблицы 2, числа переноса кислорода  $t_O$  и ниобия  $t_N$  не зависят от напряжения анодирования и составляют для кислорода и ниобия 0,5. Некоторое отклонение от 0,5 может быть связано с погрешностью измерений и степенью воспроизводимости условий формирования наноструктур. Количество столбиков на единицу площади не зависит от напряжения анодирования через поры АОА, и является величиной, определяемой режимом анодирования верхнего алюминия, в частности напряжением формовки, которое в то же время определяет диаметр пор, а в результате и радиус столбиков. В свою очередь, высота столбиков и толщина нижнего сплошного оксидного слоя линейно зависят от напряжения реанодирования, как показано на рисунке 22.

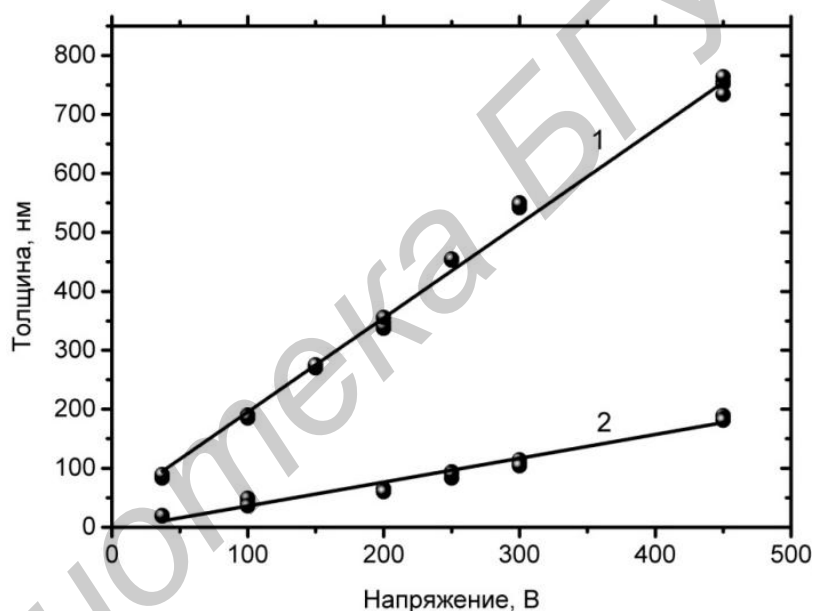


Рисунок 22 –Зависимости изменения толщины верхнего столбикового слоя (1) и нижнего сплошного слоя (2) от напряжения анодирования ниобия через поры АОА

### **3.2 Методы регистрации и контроля биологических объектов на столбиковых иммобилизирующих слоях встречно-штыревых резистивно-чувствительных микросистем**

Разработан технологический маршрут формирования встречно-штыревых резистивно-чувствительных микросистем с иммобилизующими элементами на основе вертикально-упорядоченных столбиков оксида ниобия. Структуры изготавливали на кремниевых подложках по следующей технологии. На окисленную Si подложку



напыляли слои Nb (200 нм) и Al (1,5 мкм), после чего проводили анодирование Al в 0,4 М растворе щавелевой кислоты при напряжении 37 В и реанодирование Nb в 1% растворе щавелевой кислоты при напряжении 300 В. В результате данной операции в порах АОА были сформированы столбики Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> высотой ~550 нм. Далее на АОА напыляли подслой V и слой Al (~1 мкм), по поверхности напыленного Al проводили фотолитографию для формирования рисунка встречно-штыревых электродов, после чего проводили плазмохимическое травление (ПХТ) Al в зазорах между электродами встречно-штыревых структур во фторсодержащей плазме и химическое травление подслоя V в 50% растворе H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Далее селективно удаляли АОА в зазорах между электродами в 50% растворе H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Затем снимали фоторезистивную маску в растворе диметилформамида с моноэтаноламином (9:1) при T = 80°C.

Технологические операции формирования резистивных встречно-штыревых структур на основе металлооксидных столбиков, схематически изображены на рисунке 23.

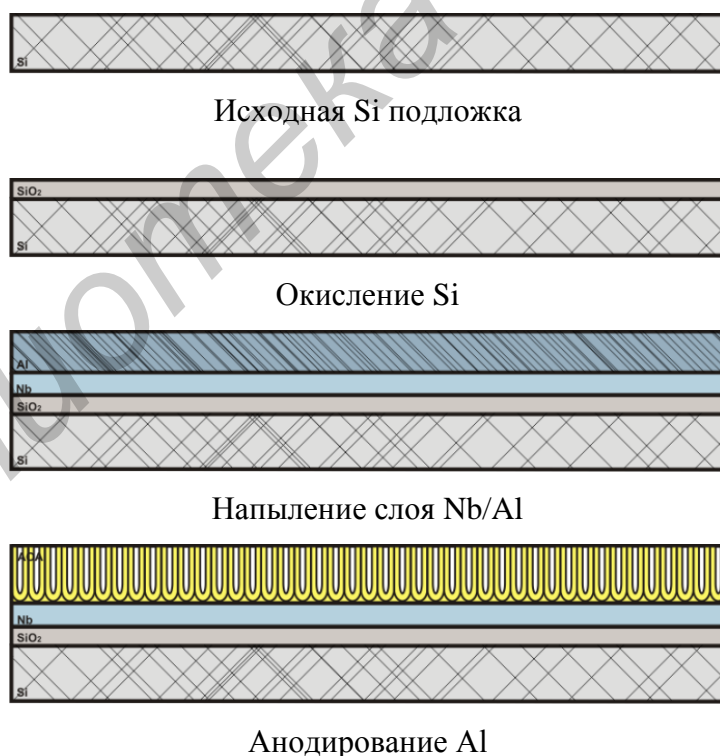
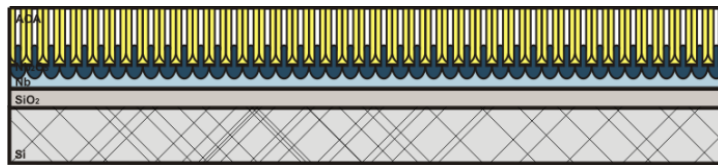
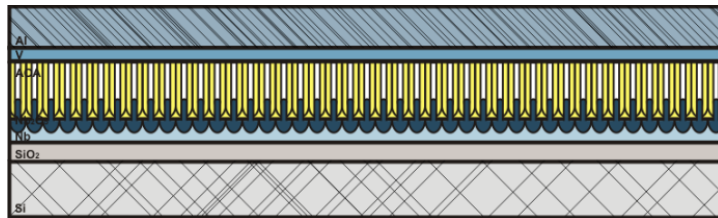


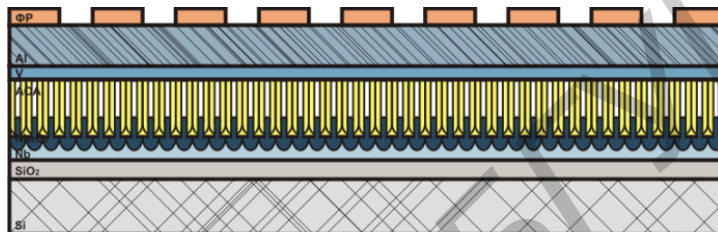
Рисунок 23 – Технологический маршрут формирования резистивных биочувствительных встречно-штыревых структур с иммобилизующими элементами на основе вертикально-упорядоченных столбиков оксида ниобия (продолжение с. 50)



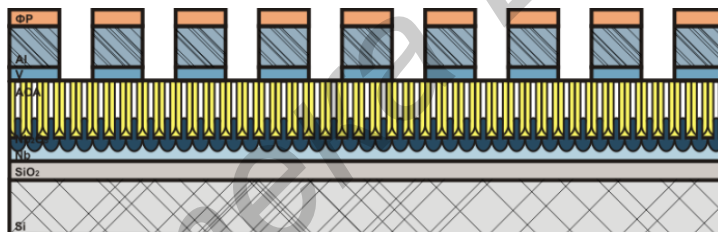
Реанодирование Nb



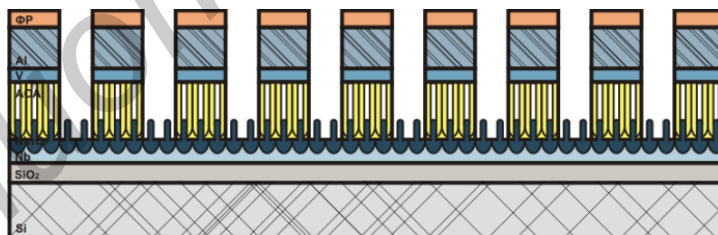
Напыление V/Al



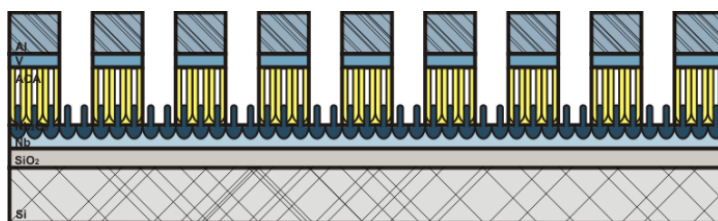
Фотолитография по рисунку электродов



ПХТ Al и растворение V в зазорах



Селективное удаление АОА в зазорах



Удаление фоторезиста

Рисунок 23 – Продолжение (начало с. 49)

По разработанному технологическому маршруту изготовлены сенсорные резистивные структуры, представляющие собой кремниевые подложки размером 3×8 мм с Al контактными площадками размером 2,7×1,75 мм и массивом 40 встречно-штыревых электродов длиной 4 мм, шириной 50 мкм, и зазорами между электродами 5 и 10 мкм.

Сколы и поверхности сформированных структур наблюдали в сканирующем электронном микроскопе Hitachi S-806 при ускоряющем напряжении 20 кВ, фотографии сколов и поверхностей приведены на рисунке 24.

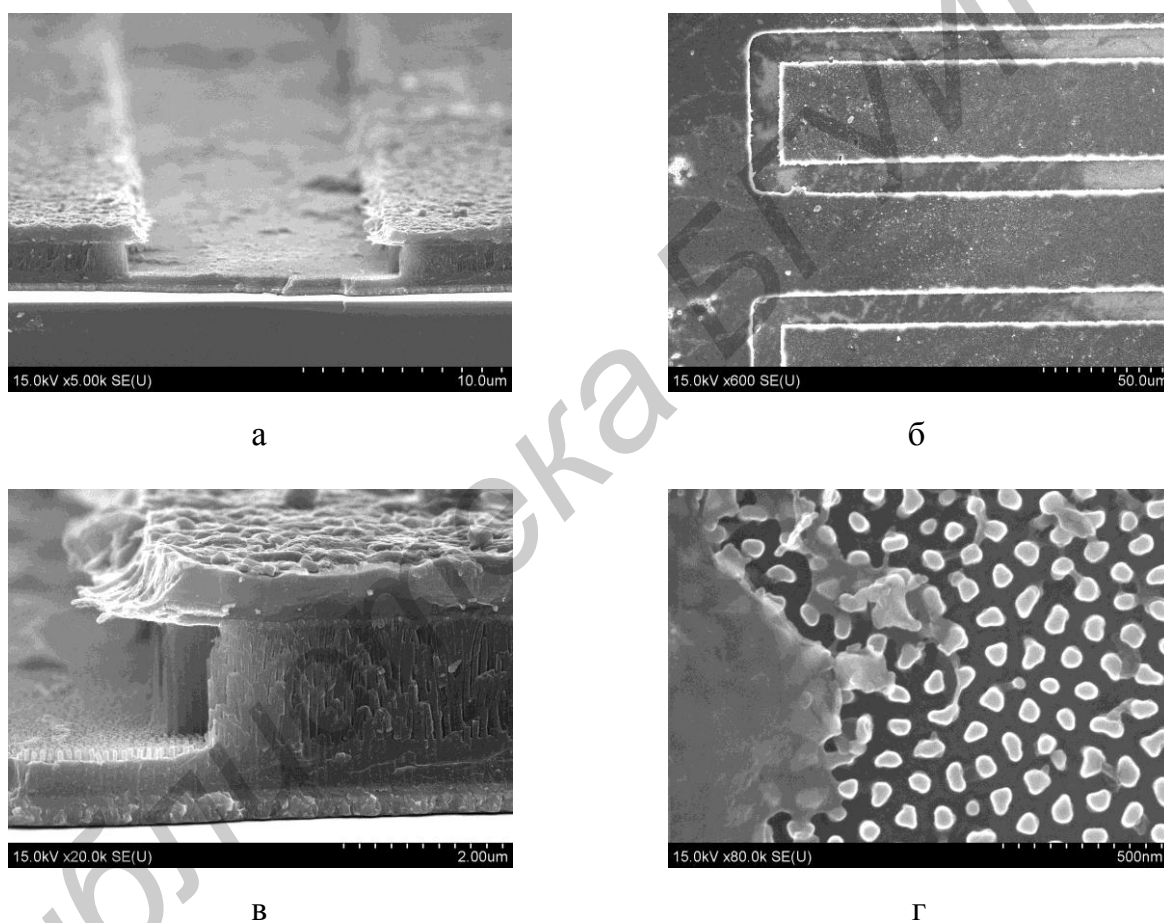


Рисунок 24 – Фотографии скола (а) и поверхности (б) электродов с зазором, скола электрода и зазора (в) и поверхности металлооксидных столбиков в зазоре (г) сенсорных биочувствительных структур с иммобилизующими элементами на основе вертикально-упорядоченных столбиков  $Nb_2O_5$

Изготовленные структуры были апробированы в качестве биочувствительных микросистем на бактерии *Staphylococcus Saprophyticus*. Для иммобилизации бактерий на поверхности структур образцы помещали в физиологические растворы,

содержащие *Staphylococcus Saprophyticus* в количестве от  $1,72 \times 10^3$  до  $1,72 \times 10^8$  КОЕ/мл. Образцы выдерживали в растворах 30 мин, после чего извлекали их из растворов и проводили измерение сопротивления структур ( $R_v$ ). Измерения повторяли спустя 15 минут (R15), 30 минут (R30), 60 минут (R60), 3,5 часа (R210) и на следующие сутки (R1440). Величину отклика тестовых структур определяли как разность между сопротивлением структур с иммобилизованными на поверхности бактериями и исходным сопротивлением структур (при отсутствии бактерий на поверхности):  $\Delta R = |R - R_0|$ . Относительное изменение сопротивления структур определяли как отношение  $\Delta R$  и  $R_0$ :  $|(R - R_0)/R_0|$ .

Аналогично структурам с иммобилизирующим слоем на основе АОА наблюдалось уменьшение сопротивления на встречно-штыревых электродах с увеличением количества бактерий в 1 мл исследуемого раствора и, соответственно, с увеличением количества бактерий, иммобилизованных на поверхности структур. Причем зависимость проявлялась по мере высыхания образцов, что связано с наличием большого количества влаги, вызывающей короткое замыкание между электродами сразу после извлечения структуры из раствора. Полученная зависимость изменения сопротивления структур от количества бактерий *Staphylococcus Saprophyticus* приведена на рисунке 25.

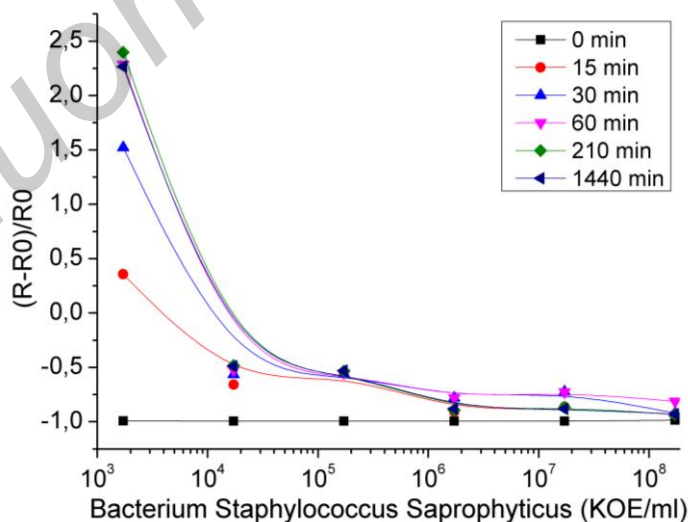


Рисунок 25 – Изменение сопротивления биочувствительных структур с иммобилизующими элементами на основе вертикально-упорядоченных столбиков  $Nb_2O_5$  от количества бактерий *Staphylococcus Saprophyticus*

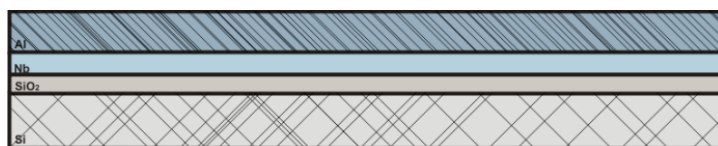
### 3.3 Модификация столбиковых иммобилизирующих слоев встречно-штыревых биочувствительных микросистем для регистрации количества микроорганизмов емкостным методом

Емкостные встречно-штыревые структуры с иммобилизирующими слоями на основе вертикально-упорядоченных столбиков  $Nb_2O_5$  изготавливали на кремниевых подложках. На предварительно окисленную кремниевую подложку методом магнетронного распыления в вакууме напыляли биметаллический слой Nb (200 нм)/Al (1,5 мкм). Затем анодировали Al в 0,4 М растворе щавелевой кислоты при напряжении 37 В и реанодировали Nb в 1% растворе щавелевой кислоты при напряжении 300 В для формирования столбиков  $Nb_2O_5$  высотой ~550 нм. Далее на АОА напыляли слои подслоя V (~0,3 мкм) и Al (~1 мкм), после чего проводили фотолитографию для формирования рисунка встречно-штыревых электродов. Затем удаляли Al в зазорах между электродами плазмохимическим травлением во фторсодержащей плазме и растворяли подслоя V в 50% растворе  $H_2O_2$ . После чего снимали фоторезистивную маску в растворе диметилформамида с моноэтаноламином в соотношении 9:1 при  $T = 80^\circ C$ .

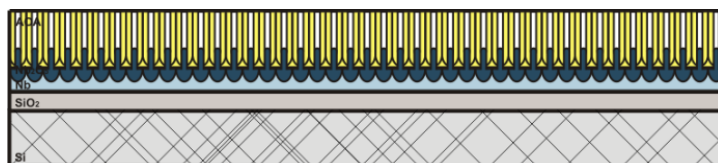
Технологический маршрут формирования емкостных биочувствительных встречно-штыревых структур с иммобилизирующими элементами на основе вертикально-упорядоченных столбиков  $Nb_2O_5$  схематично представлен на рисунке 26.



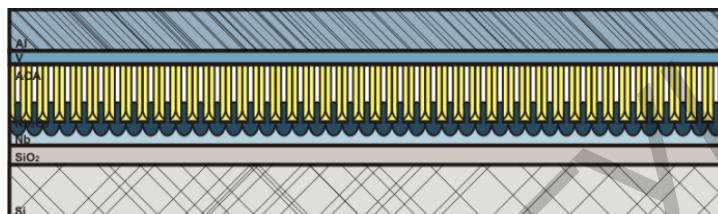
Рисунок 26 – Технологический маршрут формирования емкостных биочувствительных встречно-штыревых структур с иммобилизирующими элементами на основе вертикально-упорядоченных столбиков оксида ниобия (продолжение с. 54)



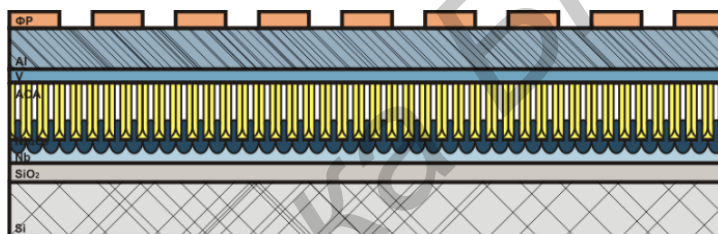
Напыление слоя Nb/Al



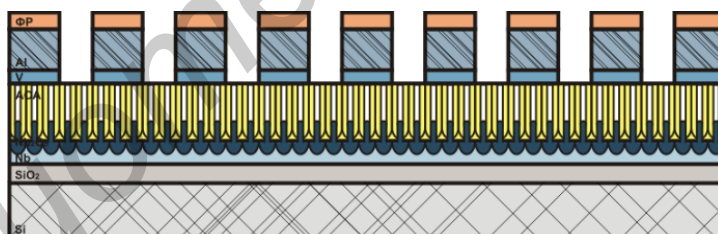
Анодирование Al, реанодирование Nb



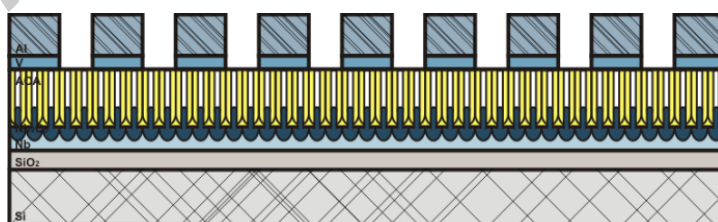
Напыление V/Al



Фотолитография по рисунку электродов



ПХТ Al и растворение V в зазорах



Удаление фоторезиста

Рисунок 26 – Продолжение (начало с. 53)

Изготовленные структуры помещали в физиологические растворы, содержащие *Salmonella Typhimurium* в количестве от  $1,58 \times 10^3$  до  $1,58 \times 10^8$  КОЕ/мл. Фотографии изготовленных структур с нанесенным физраствором, содержащим бактерии

*Salmonella Typhimurium*, сделанные с помощью оптического микроскопа МКИ-2М с увеличением 250 и 500 крат, приведены на рисунке 27.

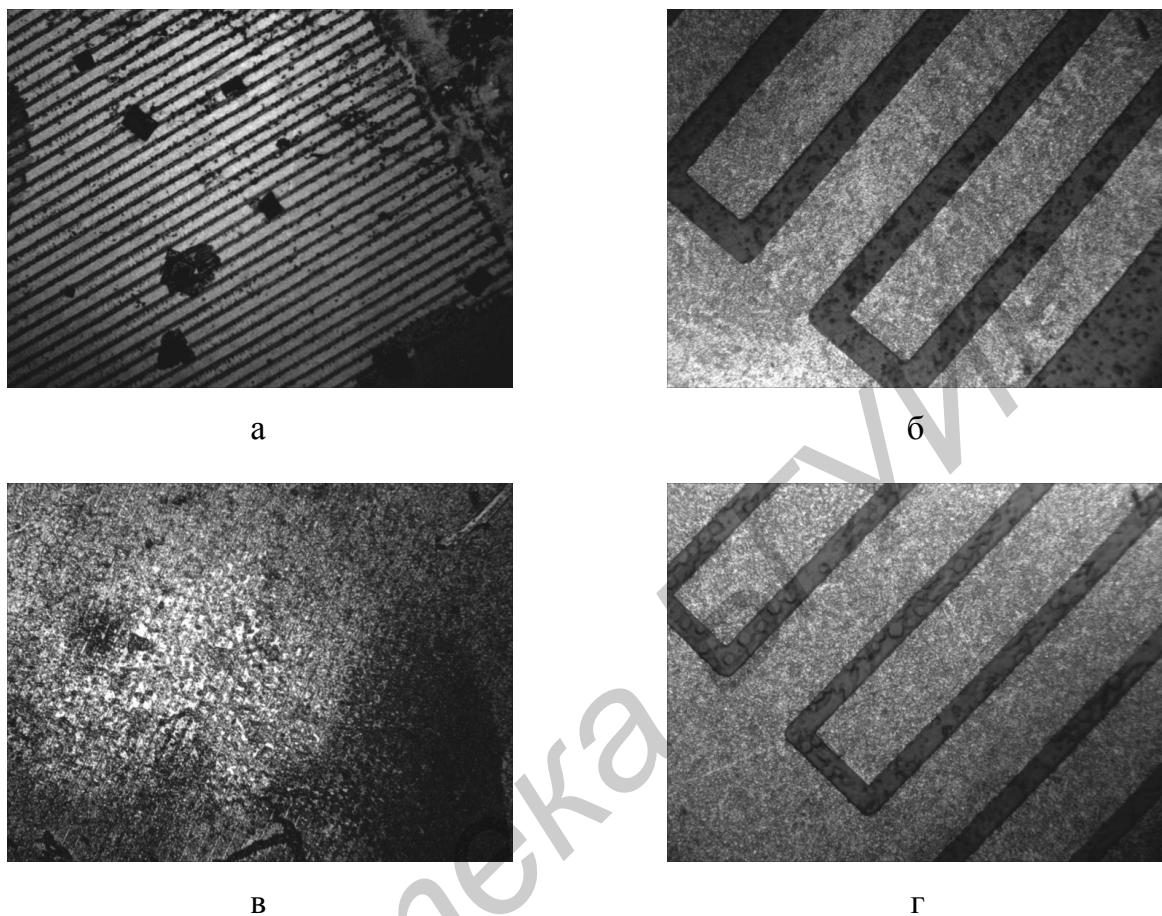


Рисунок 27 – Фотографии емкостных биочувствительных структур с иммобилизующими элементами на основе вертикально-упорядоченных столбиков  $Nb_2O_5$  с зазором между электродами 10 мкм (а, б) и 5 мкм (в, г) с нанесенным физраствором, содержащим *Salmonella Typhimurium*

### **3.4 Сравнение электрофизических характеристик биочувствительных микросистем резистивно-емкостного типа с иммобилизующими элементами на основе пористого АОА и упорядоченных наностолбиков $Nb_2O_5$**

Проведенные исследования показали, что резистивные методы регистрации биологических микроорганизмов обладают наибольшей точностью и достоверностью, в то время как определить точный вклад жидкой составляющей бактерий в общую емкость микросистемы достаточно затруднительно.

Были исследованы особенности электрофизических характеристик биочувствительных систем с иммобилизирующими элементами на основе АОА и столбиковых металлооксидов при иммобилизации бактерий *Salmonella Typhimurium* и *Staphylococcus Saprophyticus*.

По разработанным технологическим маршрутам были изготовлены микросистемы четырех типов: с иммобилизирующим слоем на основе АОА с зазорами между электродами встречно-штыревой структуры (S) 10 мкм и 5 мкм и с иммобилизирующим слоем на основе вертикально-упорядоченных столбиков Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> с зазорами 10 мкм и 5 мкм. Измеряли начальные сопротивления изготовленных структур (R<sub>0</sub>) до иммобилизации на их поверхности бактерий. После чего образцы помещали в физиологические растворы, содержащие от 1,58×10<sup>3</sup> до 1,58×10<sup>8</sup> КОЕ/мл *Salmonella Typhimurium* и от 1,72×10<sup>3</sup> до 1,72×10<sup>8</sup> КОЕ/мл *Staphylococcus Saprophyticus*, и выдерживали 30 минут. После извлечения образцов из растворов проводили измерение их сопротивлений (R<sub>v</sub>). Измерения повторяли спустя 15 минут (R<sub>15</sub>), 30 минут (R<sub>30</sub>), 60 минут (R<sub>60</sub>), 2 часа (R<sub>120</sub>) и на следующие сутки (R<sub>1440</sub>). Величину отклика структур определяли как относительную разность между сопротивлением структур с иммобилизованными на поверхности бактериями и исходным сопротивлением структур:  $\Delta R = |(R - R_0)|/R_0$ .

Полученные отклики структур приведены в таблицах 3 – 11.

Таблица 3 – Отклики биочувствительных структур (S = 10 мкм) с иммобилизирующим слоем на основе АОА на бактерии *Salmonella Typhimurium*

Концентрации бактерий, КОЕ/мл	$\Delta R =  (R - R_0) /R_0$					
	R <sub>v</sub>	R <sub>15</sub>	R <sub>30</sub>	R <sub>60</sub>	R <sub>120</sub>	R <sub>1440</sub>
1,58×10 <sup>3</sup>	0,98895567	0,99027602	0,99999751	0,99999734	0,99999742	0,99999624
1,58×10 <sup>4</sup>	0,99978684	0,99972864	0,99990766	0,99154356	0,99282247	0,93266169
1,58×10 <sup>5</sup>	0,99353957	0,98997587	0,98845559	0,37258687	0,64864865	5,23359073
1,58×10 <sup>6</sup>	0,99852574	0,99758494	0,98668741	0,53513332	0,85225558	0,01509307
1,58×10 <sup>7</sup>	0,99526173	0,98263169	0,99818056	0,16289343	0,71397018	1,55328548
1,58×10 <sup>8</sup>	0,95883669	0,91476510	0,43736018	0,55682327	0,36554809	0,86174497

Анализ откликов биочувствительных структур с иммобилизирующим слоем на основе АОА и зазором между электродами 10 мкм на бактерии *Salmonella*



*Typhimurium* показал, что существенные изменения сопротивлений структур наблюдаются примерно через час после извлечения образцов из растворов, что связано с высыханием физиологического раствора, оставшегося на поверхности электродов. Структуры показали хорошие отклики на концентрации *Salmonella Typhimurium* от  $1,58 \times 10^5$  КОЕ/мл и выше. Отсутствие откликов на низкие концентрации бактерий, по всей вероятности, связано с несоизмеримостью зазоров между электродами (10 мкм) и самих бактерий *Salmonella* (3,125 мкм). Количества бактерий, иммобилизованных из растворов с концентрациями  $1,58 \times 10^3$  и  $1,58 \times 10^4$  КОЕ/мл, недостаточно, чтобы обеспечить существенное изменение проводимости структуры.

Таблица 4 – Отклики биочувствительных структур ( $S = 5$  мкм) с иммобилизирующим слоем на основе АОА на бактерии *Salmonella Typhimurium*

Концентрации бактерий, КОЕ/мл	$\Delta R =  (R-R_0) /R_0$					
	Rv	R15	R30	R60	R120	R1440
$1,58 \times 10^3$	0,99933132	0,99959135	0,99940730	0,86316695	0,95291369	0,53884927
$1,58 \times 10^4$	0,99966147	0,99953764	0,99863163	0,97566309	0,87722211	0,61125734
$1,58 \times 10^5$	0,998063228	0,99959201	0,95757071	0,88036606	0,563394343	0,44276206
$1,58 \times 10^6$	0,998051524	0,99797467	0,99809832	0,99446329	0,224130528	2,53284671
$1,58 \times 10^7$	0,998815849	0,99848041	0,99794755	0,91828005	0,575866727	0,06213417
$1,58 \times 10^8$	0,97838785	0,98642801	0,98977804	1,58221378	0,738609813	0,52088201

Изменения сопротивлений структур с иммобилизирующим слоем на основе АОА с зазором 5 мкм между электродами при иммобилизации бактерий *Salmonella Typhimurium* также наблюдаются примерно через час после извлечения образцов из растворов. Зарегистрированы хорошие отклики структур на минимальные концентрации бактерий ( $1,58 \times 10^3$  и  $1,58 \times 10^4$  КОЕ/мл), т.к. в данном случае размер зазора между электродами (5 мкм) соизмерим с размером детектируемых бактерий (3,125 мкм).

Таблица 6 – Отклики биочувствительных структур ( $S = 10$  мкм) с иммобилизирующим слоем на основе АОА на бактерии *Staphylococcus Saprophyticus*

Концентрации бактерий, КОЕ/мл	$\Delta R =  (R-R_0) /R_0$					
	Rv	R15	R30	R60	R120	R1440
$1,72 \times 10^3$	0,99249882	0,98855993	0,38013214	0,32137801	0,554270882	0,09957527
$1,72 \times 10^4$	0,999545037	0,99953113	0,99911011	0,82572084	0,768308242	0,62362848
$1,72 \times 10^5$	0,998621692	0,99913377	0,99797325	0,68498274	0,351265823	0,25719217
$1,72 \times 10^6$	0,99999208	0,99961287	0,99719073	0,99999219	0,999978031	0,99997703
$1,72 \times 10^7$	0,9999995	0,99939295	0,99877035	0,99874546	0,998729393	0,99564541
$1,72 \times 10^8$	0,999994733	0,99999512	0,99999521	0,99999524	0,999480834	0,999994985

Биочувствительные структуры с иммобилизирующим слоем на основе АОА и зазорами между электродами 10 мкм показали хорошие отклики преимущественно на минимальные концентрации *Staphylococcus Saprophyticus* ( $1,72 \times 10^3 - 1,72 \times 10^5$ ), что может быть связано с меньшим размером бактерий (0,905 мкм) по сравнению с бактериями сальмонеллы, и, следовательно, их большей плотностью в зазорах и возможностью объединения в цепочки.

Таблица 7 – Отклики биочувствительных структур ( $S = 5$  мкм) с иммобилизирующим слоем на основе АОА на бактерии *Staphylococcus Saprophyticus*

Концентрации бактерий, КОЕ/мл	$\Delta R =  (R-R_0) /R_0$					
	Rv	R15	R30	R60	R120	R1440
$1,72 \times 10^3$	0,999939649	0,99993739	0,99870956	0,99304348	0,999936232	0,99993507
$1,72 \times 10^4$	0,998630882	0,99853309	0,99575993	0,85257353	0,485294118	0,45955882
$1,72 \times 10^5$	0,999798146	0,99895252	0,99915614	0,85903619	0,649238871	0,89226923
$1,72 \times 10^6$	0,999495185	0,99889127	0,99806308	0,85619140	0,857633734	0,82356934
$1,72 \times 10^7$	0,997090355	0,99238304	0,99590410	0,72838137	0,108093126	0,18154102
$1,72 \times 10^8$	0,998507723	0,98437810	0,96184131	0,77347062	0,551786796	0,707752877

Из всей серии измерений сопротивлений структур с иммобилизирующим слоем на основе АОА наилучшие отклики были зарегистрированы для структур с 5 мкм зазором на бактерии *Staphylococcus Saprophyticus*, что может быть связано с их наибольшей плотностью в зазорах структуры.

Таблица 8 – Отклики биочувствительных структур ( $S = 10$  мкм) с иммобилизирующим слоем на основе вертикально-упорядоченных столбиков  $Nb_2O_5$  на бактерии *Salmonella Typhimurium*

Концентрации бактерий, КОЕ/мл	$\Delta R =  (R-R_0) /R_0$					
	Rv	R15	R30	R60	R120	R1440
$1,58 \times 10^3$	0,99329895	0,99999943	0,20766773	0,99999834	0,999999048	0,949946752
$1,58 \times 10^4$	0,998101102	0,99982073	0,03531009	0,96876415	0,964237211	0,039535235
$1,58 \times 10^5$	0,997216057	0,99963283	0,18537859	0,88805483	0,877937337	0,638707572
$1,58 \times 10^6$	0,999998016	0,99873832	0,48936170	0,67119982	0,033779338	0,706514587
$1,58 \times 10^7$	0,986855856	0,81887988	24,4834835	0,34834835	0,24024024	0,861861862
$1,58 \times 10^8$	0,827773468	0,91068115	5,15981381	14,0566331	0,47090768	0,548487199

Изменения сопротивлений структур с иммобилизирующим слоем на основе вертикально-упорядоченных столбиков  $Nb_2O_5$  и зазором между электродами 10 мкм при адсорбции бактерий *Salmonella Typhimurium* наблюдали примерно через полчаса после извлечения образцов из растворов, что можно объяснить особенностями структуры металлоксидных столбиков и меньшим удерживанием влаги в ней по сравнению с пористым АОА. Также по сравнению с аналогичными структурами с иммобилизирующим слоем на основе АОА, структуры со столбиками  $Nb_2O_5$  показали неплохие отклики не только на высокие, но и на низкие концентрации бактерий сальмонеллы.

Таблица 9 – Отклики биочувствительных структур ( $S = 5$  мкм) с иммобилизирующим слоем на основе вертикально-упорядоченных столбиков  $Nb_2O_5$  на бактерии *Salmonella Typhimurium*

Концентрации бактерий, КОЕ/мл	$\Delta R =  (R-R_0) /R_0$					
	Rv	R15	R30	R60	R120	R1440
$1,58 \times 10^3$	0,999949702	0,99993804	0,99986560	0,91861089	0,932741117	0,93388813
$1,58 \times 10^4$	0,997140589	0,99640402	0,97645026	0,02055114	0,024287716	0,02568893
$1,58 \times 10^5$	0,992763738	0,97658805	0,9592142	0,44925792	0,173285199	2,01524268
$1,58 \times 10^6$	0,999910452	0,99966439	0,99966381	0,66032195	0,594427633	0,765430551
$1,58 \times 10^7$	0,999647986	0,99878410	0,99882258	0,79901693	0,754736798	0,774104105
$1,58 \times 10^8$	0,96842203	0,94294121	0,71844059	0,27042079	0,08539604	0,081683168

Изменения сопротивлений структур с иммобилизирующим слоем на основе вертикально-упорядоченных столбиков  $Nb_2O_5$  и зазором между электродами 5 мкм

при адсорбции бактерий *Salmonella Typhimurium* также наблюдали спустя полчаса после извлечения образцов из растворов. Отклики на малые концентрации бактерий сальмонеллы выше, чем у аналогичных структур с зазорами 10 мкм.

Таблица 10 – Отклики биочувствительных структур ( $S = 10$  мкм) с иммобилизирующим слоем на основе вертикально-упорядоченных столбиков  $Nb_2O_5$  на бактерии *Staphylococcus Saprophyticus*

Концентрации бактерий, КОЕ/мл	$\Delta R =  (R-R_0) /R_0$					
	Rv	R15	R30	R60	R120	R1440
$1,72 \times 10^3$	0,99999946	0,99933341	0,99999921	0,81832615	0,100476298	0,639714221
$1,72 \times 10^4$	0,999666844	0,99440254	0,99162283	3,69903016	0,224874774	0,169561974
$1,72 \times 10^5$	0,996171574	0,98822283	0,98113449	349,418029	0,519810978	2,963649582
$1,72 \times 10^6$	0,998380936	0,99723919	0,98151350	0,72497793	0,463724625	0,339629303
$1,72 \times 10^7$	0,982163039	0,98527491	0,90301642	0,12332951	0,273004964	0,269186712
$1,72 \times 10^8$	0,982475229	0,98195764	0,92308869	7,25688073	0,62293578	0,537767584

Структуры с иммобилизирующим слоем на основе вертикально-упорядоченных столбиков  $Nb_2O_5$  и зазором между электродами 10 мкм показали хорошие отклики на бактерии *Staphylococcus Saprophyticus*, однако изменения сопротивлений структур наблюдались примерно через час после извлечения из растворов, что уступает аналогичным показателям при детектировании бактерий сальмонеллы.

Таблица 11 – Отклики биочувствительных структур ( $S = 10$  мкм) с иммобилизирующим слоем на основе вертикально-упорядоченных столбиков  $Nb_2O_5$  на бактерии *Staphylococcus Saprophyticus*

Концентрации бактерий, КОЕ/мл	$\Delta R =  (R-R_0) /R_0$					
	Rv	R15	R30	R60	R120	R1440
$1,72 \times 10^3$	0,999753992	0,99914017	0,98252816	0,91649562	0,915244055	0,90538172
$1,72 \times 10^4$	0,999635632	0,99942392	0,99946276	368,041437	0,819503583	0,81784193
$1,72 \times 10^5$	0,999960792	0,9999665	0,99992437	0,96944802	0,983246753	0,96265584
$1,72 \times 10^6$	0,999938107	0,99993233	0,99989135	0,94261040	0,714367867	0,68732029
$1,72 \times 10^7$	0,999779844	0,99978027	0,99877388	0,47101793	0,938177091	0,93576277
$1,72 \times 10^8$	0,991794372	0,98335389	0,91038636	0,54545454	0,730519481	5,85822510

Как и аналогичные структуры с 10 мкм зазором, структуры с иммобилизирующим слоем на основе столбиков  $Nb_2O_5$  и зазором между электродами

5 мкм показали хорошие отклики на бактерии *Staphylococcus Saprophyticus*. Изменения сопротивлений структур также наблюдались примерно через час после извлечения из растворов.

Таким образом, проведенные исследования показали, что создание биосенсорной платформы с наноструктурированными иммобилизирующими слоями на основе нанопористого АОА и упорядоченных массивов металлооксидных столбиков позволяет обеспечить высокую избирательность и чувствительность измерительных систем для детектирования микроорганизмов при минимальных затратах времени. Кроме того, изменяя ширину зазоров между электродами встречно-штыревой структуры и тип материала иммобилизирующего слоя, можно управляемо влиять на избирательность биочувствительных структур по отношению к различным видам и концентрациям бактерий. Полученные результаты могут быть использованы при создании перспективных биосенсоров, имеющих значительный потенциал на рынках высоких технологий.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполнения задания получены следующие результаты.

Установлены данные о взаимосвязи структурных параметров пористого анодного оксида алюминия и вертикально ориентированных металлооксидных столбиков с режимами их формирования и модифицирования.

Разработаны методики формирования и модификации наноструктурированных иммобилизирующих слоев на основе анодного оксида алюминия с различным структурированием пористой поверхности и упорядоченных массивов вертикально ориентированных металлооксидных наноструктур. Исследованы особенности регистрации сигнала на наноструктурированных пористых и вертикально-упорядоченных иммобилизирующих слоях при измерении количества микроорганизмов резистивным и емкостным методами. Установлено, что наибольшей точностью обладает резистивный метод детектирования микроорганизмов.

Разработаны технологические маршруты создания тестовых резистивных биосенсорных структур с иммобилизирующими слоями на основе пористого анодного оксида алюминия и на основе упорядоченных массивов вертикально ориентированных металлооксидных наноструктур. Проведена апробация разработанных биосенсорных микроструктур с иммобилизирующими слоями на основе пористого анодного оксида алюминия и на основе упорядоченных массивов вертикально ориентированных металлооксидных наноструктур; получены хорошие отклики на бактерии рода *Salmonella Typhimurium* и *Staphylococcus Saprophyticus*.

По результатам работы опубликовано 16 научных работ, из них 6 научных статей, и 10 статей в рецензируемых сборниках материалов докладов международных конференций.

Разработанные методы формирования биочувствительных микросистем с наноструктурированными иммобилизирующими слоями могут быть успешно использованы в технологии перспективных высокочувствительных быстродействующих биосенсоров и могут получить свое развитие в рамках договоров по ГПНИ и программам межгосударственного научно-технического сотрудничества.

Задание выполнено в срок и в полном объеме в соответствии с техническим заданием и календарным планом.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- [1] Карубе, И. Биосенсоры / И. Карубе, Э. Тёрнер, Дж. Уилсон. – М.: Мир, 1992. – 614 с.
- [2] Эггинс, Б. Химические и биологические сенсоры / Пер. с англ. М.А. Слинкин, Т.М. Зими́на / Б. Эггинс. – М. : Техносфера, 2005. – 366 с.
- [3] Власов, А.И. Бионаноинженерия / А.И. Власов, А.А. Денисов, К.А. Елсуков. – М. : МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2011. – 215 с.
- [4] Electrochemical biosensors - sensor principles and architectures / D. Grieshaber [et al.] // Sensors. – 2008. – Vol. 8. – P. 1400–1458.
- [5] Interdigitated electrode-less high-performance macroporous silicon structure as impedance biosensor for bacteria detection / R.D. Das [et al.] // IEEE Sensors Journal. – 2011. – Vol. 11. – No. 5. – P. 1242–1252.
- [6] Electrochemical biosensor based on interdigitated electrodes for determination of thyroid stimulating hormone / W. Haoxu [et al.] // International Journal of Electrochemical Science. – 2014. – Vol. 9. – Iss. 1. – P. 12–21.
- [7] Impedance biosensor based on interdigitated electrode arrays for detection of low levels of E.Coli / S.G. Dastider [et al.] // MEMS 2013. – Taipei, January 20– 24. – P. 955–958.
- [8] Покрyтия из нанопористого анодного оксида алюминия для сенсорных применений / И.Д. Войтович [и др.] // Наносистемы, наноматериалы, нанотехнологии. – 2014. – Т. 12. – № 1. – С. 169–180.
- [9] Anandan, V. Nanostructure integrated microfluidic based biosensors : dis.... doctor of philosophy / V. Anandan. – Athens, 2008. – 114 p.
- [10] Биосенсоры: устройство, классификация и функциональные характеристики / А.А. Карякин [и др.]. – Сенсор. – 2002. - № 1. – С. 16-24.
- [11] Курочкин, И.Н. Физико-химические и физические принципы функционирования биосенсоров / И.Н. Курочкин, Б.Н. Попов, С.Ф. Чернов // Биологические мембраны. – 1990. – Т. 7. – № 10. – С. 1068–1108.
- [12] Каттралл, Р.В. Химические сенсоры / Р.В. Каттралл – М. : Научный мир, 2000. – 57 с.

- [13] Enderle, J. Introduction to biomedical engineering, second ed. / J. Enderle, S.M. Blachard, J. Bronzino. – Elsevier Academic Press, 2005. – 1141 p.
- [14] Saliterman, S.S. Fundamentals of bioMEMS and medical microdevices / S.S. Salitermann. – Wiley-Interscience, 2006. – 610 p.
- [15] Bard, A.J. Electromechanical methods and applications, second ed. / A.J Bard, L.R. Faulker. – New York : L.R., 2001. – 156 p.
- [16] Ohk, S.H. Multiplex fiber optic biosensor for detection of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteric* from ready-to-eat meat samples / S.H. Ohk, A.K. Bhunia // *Food Microbiology*. – 2013. – Vol. 33. – P. 166-171.
- [17] Development of a surface plasmon resonance biosensor for the identification of *Campylobacter jejuni* / D. Wei [et al.] // *Journal of Microbiological Methods*. – 2007. – Vol. 69. – P. 78-85.
- [18] Micromechanical mass sensors for biomolecular detection in physiological environment / T. Braun [et al.] // *Physical Review E*. – 2005. – Vol. 72. – Iss. 3. – 34 p.
- [19] Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. / R.S Yalow, S.A. Berson [et al.] // *Journal of Clinical Investigation*. – 1960. – Vol. 39. – P. 1157-1175.
- [20] Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. / R.S. Yalow [et al.] // *Nature (London)*. – 1959. – Vol. 184. – P. 1648–1649.
- [21] French, C.E. Aerobic degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Enterobacter cloacae* PB2 and by pentaerythritol tetranitrate reductase / C.E. French, S. Nicklin, N.C. Bruce. // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1998. – Vol. 64. – P. 2864–2868.
- [22] A novel approach to improve specificity of algal biosensors using wild-type and resistant mutants: an application to detect TNT / M. Altamirano [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2004. – Vol. 19. – P. 1319–1323.
- [23] Карнаухов, А.П. Адсорбция. Текстура дисперсных и пористых материалов. / А.П. Карнаухов. – Новосибирск: Наука, 1999. – 470 с.
- [24] Interdigitated microelectrode based impedance biosensor for detection of *Salmonella enteritidis* in food samples / G. Kim [et al.] // *Journal of Physics: Conference Series*. – 2008. – Vol. 100. – P. 1–4.
- [25] Баника, Ф.-Г. Химические и биологические сенсоры / Ф.-Г. Баника. – М. : Техносфера, 2014. – 880 с.



- [26] Алейников, А.Ф. О классификации датчиков /А.Ф. Алейников, М.П. Цапенко // Датчики и системы. – 2000. – № 5. – С. 2–3.
- [27] Nanoscaled interdigitated electrode arrays for biochemical sensors / P.V. Gerwen [et al.] // Sensors and Actuators B. – 1998. – Vol. 49. – P. 73–80.
- [28] Planar interdigitated electrolyte-conductivity sensors on an insulating substrate covered with Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> / W. Olthuis [et al.] // Sensors and Actuators B. – 1997. – Vol. 43. – P. 211–216.,
- [29] Capacitive microsystems for biological sensing / V. Tsouti [et al.]. // Biosensors and Bioelectronics. – 2011. – Vol. 27. – Iss. 1. – P. 1–11.
- [30] Wei, J.S. Distributed capacitance of planar electrodes in optic and acoustic surface wave devices / J.S. Wei // IEEE Journal of Quantum Electron. – 1977. – Vol. 13. – P. 152-158.
- [31] CAD models for multilayered substrate interdigital capacitors / S.S. Gevorgian [et al.]. // IEEE Microwave Theory and Techniques Society. – 1996. – Vol. 44. – P. 896–904.
- [32] Analytical evaluation of the interdigital electrodes capacitance for a multi-layered structure / R. Igreja [et al.] // Sensors and Actuators A. – 2004. – Vol. 112. – P. 291–301.
- [33] Electrical characterization of DNA molecules in solution using impedance measurements / S. Liu [et al.] // Applied Physics Letters. – 2008. – Vol. 92. – 3 p.
- [34] Label-Free capacitive immunosensor for protein detection / O. Gul [et al.] // IEEE Sensors Conference. – 2006. –Vol. 1–3. – P. 600–603.
- [35] DNA biosensor using fluorescence microscopy and impedance spectroscopy / D. Berdat [et al.] // Sensors and Actuators B. – 2006. – Vol. 118. – P. 53–59.
- [36] Luks, I.R. Microfabricated biosensors and microanalytical systems for blood analysis / I.R. Luks // Accounts of Chemical Research. – 1998. – Vol. 31 – P. 317–324
- [37] Karadeniz, C.Z. Electrochemical sensing of label free DNA hybridization. Related to breast cancer 1 gene at disposable sensor platforms modified with single walled carbon nanotubes / C.Z. Karadeniz, H. Canavar, E. Erdem // Electrochimica Acta. – 2001. – Vol. 82. – P. 137–142.
- [38] An electrochemical biosensor for assay of DNA methyltransferase activity and screening of inhibitor / H. Yin [et al.] // Electrochimica Acta. – 2011. – Vol. 89. – P. 530–536.

- [39] In situ chemo-synthesized multi-wall carbon nanotube-conductive polyaniline nanocomposites: characterization and application for a glucose amperometric biosensor / H. Zhong [et al.] // *Talanta*. – 2011. – Vol. 85. – Iss. 1. – P. 104–111.
- [40] The feasibility of ambulatory biosensor measurement of salivary alpha amylase: relationships with self-reported and naturalistic psychological / T.F. Robles [et al.] // *Biological Psychology*. – 2011. – Vol. 86. – P. 50–56.
- [41] Biosensor applications of MAPLE deposited lipase / V. Califano [et al.] // *Biosensors*. – 2014. – Vol. 4. – P. 329–339.
- [42] Лукашук, Т.С. Формирование наноструктурированных анодных оксидов алюминия в щавелевой кислоте:/ Т.С. Лукашук, В.И. Ларин, С.В. Пшеничная // *Вестник Харьковского национального университета*. – 2010. – № 932. – С. 112–118.
- [43] Батенков, В.А. Электрохимия полупроводников : учеб. пособие / В.А. Батенков. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2002. – 162 с.
- [44] Аверьянов, Е.Е. Справочник по анодированию / Е. Е. Аверьянов. – М.: Машиностроение, 1988. – 224 с.
- [45] Напольский, К.С. Синтез пространственно упорядоченных металлоксидных нанокомпозитов на основе пористого  $Al_2O_3$  / К.С. Напольский. – М.: МГУ, 2011. – 31 с.
- [46] Францевич, И.Н. Анодные оксидные покрытия на металлах и анодная защита / И.Н. Францевич. – Киев: Наукова думка, 1985. – 280 с.
- [47] Белов, А.Н. Особенности получения наноструктурированного анодного оксида алюминия / А.Н. Белов, С.А. Гаврилов, В.И. Шевяков // *Российские нанотехнологии*. – 2006. – №1-2. - С. 223-227.
- [48] Ederle, J. Introduction to biomedical engineering / J. Ederle, S.M. Blachard, J. Bronzino – Elsevier Academic Press, 2005. – 1141 p.
- [49] Electrochemical biosensor based on interdigitated electrodes for determination of thyroid stimulin hormone / H. Wang [et al.] // *Int. J. Electrochem. Sci.* –2014. –Vol. 9. –P. 12–21.
- [50] Биосенсор на основе платформы со встречно-штыревыми электродами / Т.В. Змитрович [и др.] // *Наноструктуры в конденсированных средах: сборник*

научных статей – Ин-т тепло- и массообмена им. А.В. Лыкова НАН Беларуси : редкол. : П.А. Витязь [и др.]. – Минск, 2014. – С. 320–327.

- [51] Плиговка, А.Н. Особенности ионопереноса при анодировании ниобия через поры анодного оксида алюминия / А.Н. Плиговка, Г.Г. Горох // Наноструктуры в конденсированных средах : сб. науч. ст. / Ин-т тепло- и массообмена им. А.В. Лыкова НАН Беларуси ; редкол. : П.А. Витязь [и др.]. – Минск, 2014. – С. 310–319.

Библиотека БГУИР