

На правах рукописи



Андреев Егор Андреевич

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

03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва - 2017

Работа выполнена на химическом факультете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова во время обучения в очной аспирантуре кафедры химической энзимологии.

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор

Карякин Аркадий Аркадьевич

Официальные оппоненты: доктор химических наук, заведующий лабораторией электронных и фотонных процессов в полимерных наноматериалах Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук

Некрасов Александр Александрович

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Института биохимии имени А.Н. Баха, Федеральное государственное учреждение Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

Жердев Анатолий Виталиевич

Ведущая организация: Институт химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Защита состоится «06» июня 2017 года в 15 ч 00 мин на заседании диссертационного совета Д 501.001.59 по защите докторских и кандидатских диссертаций по химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 11, МГУ, Химический факультет, кафедра химической энзимологии, аудитория 202.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова по адресу: г.Москва, Ломоносовский проспект, 27, и на сайте химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова <http://www.chem.msu.su>.

Автореферат диссертации размещен на сайте ВАК Министерства образования и науки РФ: <http://vak.ed.gov.ru>.

Автореферат разослан « » апреля 2017 года

Ученый секретарь диссертационного совета Д 501.001.59,
кандидат химических наук



Сакодынская И. К.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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

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

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

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

преимущества электрохимических методов: экспрессность, простота применения и дешевое оборудование.

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

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

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

Задачи исследования:

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

- выявление изменений проводящих свойств микросенсоров в водной и воздушной среде в присутствии микроорганизмов (на примере *P. chrysogenum*), проведение обнаружения микроорганизмов.

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

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

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

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

Практическая и теоретическая значимость. В отличие от большинства кондукто- и импедиметрических систем, разработанный сенсор позволяет

дифференцировать аналитический сигнал при специфических и неспецифических процессах.

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

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

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

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

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

Положения, выносимые на защиту:

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

Реализация работы в научных проектах. Автор являлся исполнителем проекта МГУ имени М.В. Ломоносова по тематике данной работы в рамках совместной лаборатории МГУ-LG Electronics Inc. «Electrochemical mold detection in air». Под руководством автора выполнен проект МГУ совместно с компанией «Иннопрактика» по программе «Новые материалы с уникальными свойствами» (грант № 013-05/16), часть работы выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 16-13-00010).

Личный вклад диссертанта. Автором были проведены анализ литературы по теме работы, постановка задач исследования, планирование, подготовка и проведение

экспериментов, обработка и интерпретация полученных результатов, формулировка защищаемых научных положений и выводов. Результаты работы опубликованы автором в российских и зарубежных научных журналах, представлены на российских и международных конференциях, подготовлены заявки на патент по теме диссертации.

Апробация работы. Основные положения и результаты работы были представлены на научных конференциях: 6^{ая} Всероссийская Каргинская Конференция «Полимеры — 2014», Москва; 65^{ый} ежегодный съезд Международного электрохимического общества, 2014 г., Лозанна, Швейцария; Международная конференция «Биокатализ-2015», Московская область; 10^{ый} Международный Фрумкинский симпозиум по электрохимии, 2015 г., Москва; XXIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016», Москва; IX Всероссийская конференция по электрохимическим методам анализа с международным участием и молодежной научной школой "ЭМА 2016", Екатеринбург; 67^{ый} ежегодный съезд Международного электрохимического общества, 2016 г., Гаага, Нидерланды; V Съезд физиологов СНГ, V Съезд Биохимиков России, Конференция ADFLIM, 2016 г., Сочи, IX Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». 2017 г., Москва,. По материалам работы подано 2 заявки на патент РФ.

Публикации. Основные результаты диссертационной работы были опубликованы в 12 работах, в том числе в 3 статьях в российских и зарубежных реферируемых научных журналах, входящих в список ВАК РФ и библиографические базы данных Web of Science и Scopus; и тезисах 9 докладов всероссийских и международных научных конференций.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, трех основных разделов (обзор литературы, экспериментальная часть, результаты и их обсуждение), выводов и списка литературы (102 ссылки). Работа изложена на 118 страницах машинописного текста, включая 67 рисунков и 2 таблицы.

Сокращения, принятые в тексте. 3-АФБК – 3-аминофенилборная кислота; ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; КОЕ – колониеобразующие единицы; ПДК – предельно допустимая концентрация; ПЦР – полимеразная цепная реакция; СЭХИ – спектроскопия электрохимического импеданса; ХСЭ – хлоридсеребряный электрод; ЦВА – циклическая вольтамперограмма; K_a^B – константа кислотной диссоциации монозамещенной борной кислоты; K_a^D – константа кислотной диссоциации диол-содержащего соединения; $K_{набл}$ – наблюдаемая константа связывания вещества с монозамещенной борной кислотой; $R_{п}$ – сопротивление полимера.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение

Во введении обоснована актуальность выбранной темы, сформулирована цель исследований, представлена научная новизна, показана теоретическая и практическая значимость работы, приведены методы и методология исследования, достоверность и апробация результатов, личный вклад автора, положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы

В *Главе 1* рассмотрено применение борных кислот в качестве синтетических рецепторов для задач биомиметики. Приведены физико-химические основы взаимодействия фенилборных кислот с 1,2- или 1,3-*цис*-диолами. Указаны преимущества включения борных кислот в состав полимера с точки зрения создания сенсорных материалов.

Глава 2 посвящена электрохимическим аспектам синтеза проводящего полианилина и электроактивным свойствам в ключе сенсорных приложений. На основании актуального состояния сенсорных систем, использующих боронат-замещенный полианилин, указаны недостатки и возможные перспективы развития в данной области.

В *Главе 3* обосновано применение спектроскопии электрохимического импеданса для исследования проводящих полимеров. Приведены основные элементы эквивалентных схем, используемые для описания физико-химических процессов в исследуемых системах. Рассмотрена простейшая эквивалентная схема для случая проводящих полимеров.

Глава 4 посвящена обнаружению микроорганизмов. Выявлены основные чувствительные элементы для преконцентрирования микроорганизмов в электрохимических системах: заряженные поверхности, биораспознающие элементы, синтетические рецепторы. Рассмотрены одни из самых распространенных представителей микроорганизмов - микроскопические плесневые грибы (микробицеты) – и методы их обнаружения. Выявлены недостатки стандартных методов: использование дополнительных реагентов и высокотехнологичного оборудования, необходимость пробоподготовки, невозможность определения в воздухе. Для определения микробицетов в воздухе приведены гигиенические нормативы и применяемые подходы. На основании перечисленных недостатков и ограничений сделан вывод об актуальности разработки новых методов обнаружения микроорганизмов в водной и воздушной среде.

Экспериментальная часть

В экспериментальной части описаны методы модификации торцевых стеклоуглеродных электродов проводящими полимерами анилина, 3-аминофенилборной кислоты (3-АФБК) с целью получения сенсоров; используемое оборудование

(электрохимические анализаторы, микробиологический ламинар, анализаторы размеров частиц, оптический и сканирующий электронный микроскопы). Приведены микробиологические методики посева образцов, подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ), получения суспензий и аэрозоля, содержащих микроскопические плесневые грибы *Penicillium chrysogenum*. Приведен способ получения микросенсоров на основе взаимопроникающих микроэлектродов, модифицированных поли(3-АФБК). Взаимопроникающие микроэлектроды предоставлены лабораторией «Криоэлектроника» физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Для определения различных веществ и обнаружения микроорганизмов с помощью сенсоров и микросенсоров описаны соответствующие методики на основе данных спектроскопии электрохимического импеданса (СЭХИ).

Результаты и их обсуждение

Глава 6 «Электрохимическое осаждение проводящих полимеров» посвящена созданию сенсорных полимерных материалов на основе анилина и 3-АФБК. Включение остатков борной кислоты в цепь проводящего полимера позволяет создать безреагентный сенсорный материал, способный специфически взаимодействовать с 1,2- или 1,3-*цис*-диольными фрагментами – структурными компонентами гидроксикислот, моносахаридов, а также олиго- и полисахаридов в составе клеточных стенок микроорганизмов. Для получения перечисленных полимеров на поверхности электродов применяли метод электрополимеризации, что обусловлено его простотой и возможностью селективной модификации только той поверхности, через которую протекает электрический ток.

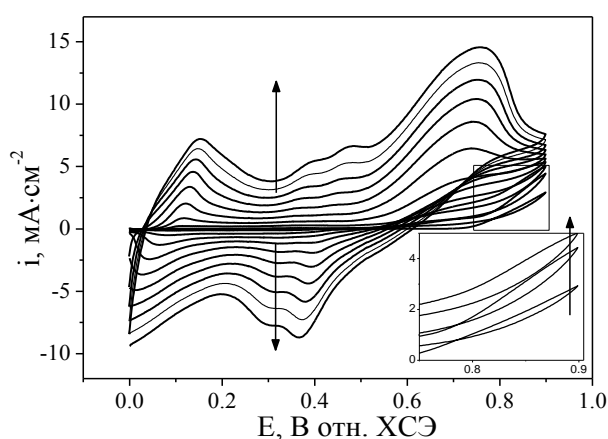


Рис. 1. ЦВА торцевого электрода в процессе синтеза поли(3-АФБК).

В работе оптимизированы методики синтеза проводящего полианилина и поли(3-АФБК) на стеклоуглеродных торцевых электродах в потенциодинамическом режиме. Потенциодинамическое осаждение проводящего незамещенного полианилина проводили в следующих условиях: диапазон потенциалов от 0 до 0.85 В относительно хлоридсеребряного электрода сравнения (ХСЭ), состав ростовой смеси – 0.1 М мономера в 0.1 М серной кислоте.

Для потенциодинамического осаждения боронат-замещенного проводящего полианилина оптимальными с точки зрения времени синтеза, расхода мономера и проводящих свойств получаемого полимера были признаны условия: состав ростового раствора, включающего в себя 0.04 М 3-АФБК, 0.2 М фторида натрия и 0.1 М серной

кислоты, диапазон развертки потенциалов от 0 до 0.9 В относительно ХСЭ. Циклические вольтамперограммы (ЦВА) осаждения поли(3-АФБК) в оптимальных условиях приведены на *Рис. 1*, скорость развертки потенциала здесь и далее по тексту составляет 40 мВ/с. При этих условиях происходит осаждение проводящего полимера: на первых циклах ЦВА наблюдаются «нуклеационные петли» и рост тока с числом циклов при максимальном анодном потенциале (*Рис. 1*).

В данной работе для получения полианилина и поли(3-АФБК) помимо потенциодинамического режима был применен гальваностатический режим осаждения. Он позволяет поддерживать постоянную скорость окисления и осуществлять более точный контроль толщины получаемого покрытия по сравнению с потенциодинамическим. В результате проведения электрополимеризации из раствора оптимального состава, указанного выше, при различных плотностях тока (0.1–0.6 мА/см²) была выбрана оптимальная плотность тока 0.2 мА/см². Плотности тока выше этого значения приводят к переокислению полимеров анилина и 3-АФБК, в то время как меньшие плотности снижают скорость окисления мономера.

Итак, в режимах гальваностатического и потенциодинамического осаждения в оптимальных условиях на торцевых электродах был получен проводящий полимер на основе 3-АФБК.

Исследование электроактивности полианилина и поли(3-АФБК)

Полианилин существует в трех основных формах (*Рис. 2*): лейкоэмеральдин (полностью восстановленная), эмеральдин (частично окисленная) и пернигранилин (полностью окисленная). Эмеральдин используется в сенсорных приложениях, так как обладает электронной и ионной проводимостью, зависящей от свойств или состава среды. Другие две формы являются изоляторами.

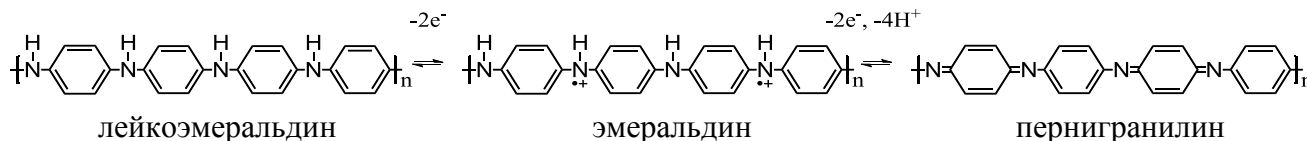


Рис. 2. Основные формы полианилина.

Одно из основных ограничений незамещенного полианилина для применения в качестве сенсорного материала – быстрая потеря электроактивных свойств при pH > 4. Однако введение отрицательно заряженных ионогенных заместителей, таких как сульфони- или карбоксильная группа, может расширить область существования электроактивности полианилина вплоть до нейтральных и слабощелочных pH. Введение в структуру полимера дополнительного отрицательного заряда приводит к образованию новых энергетических уровней в запрещенной зоне и, тем самым, к повышению проводимости и получению так называемого самодопированного полианилина. В настоящей работе аналогичный эффект был получен для борнокислого заместителя.

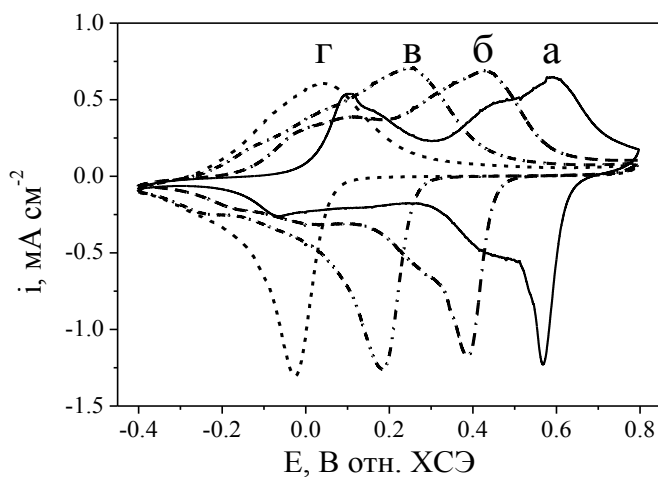


Рис. 3. ЦВА поли(3-АФБК) в различных рН: а) 1.2, б) 3.0, в) 5.0, г) 7.0.

электроактивностью, сохраняющейся, в отличие от последнего, при рН 7.0. Этот результат важен с практической точки зрения, так как позволяет применять разрабатываемый сенсорный материал в нейтральных средах.

Модификация взаимопроникающих микроэлектродов поли(3-АФБК)

Использование трехэлектродной схемы с торцевым рабочим электродом требует

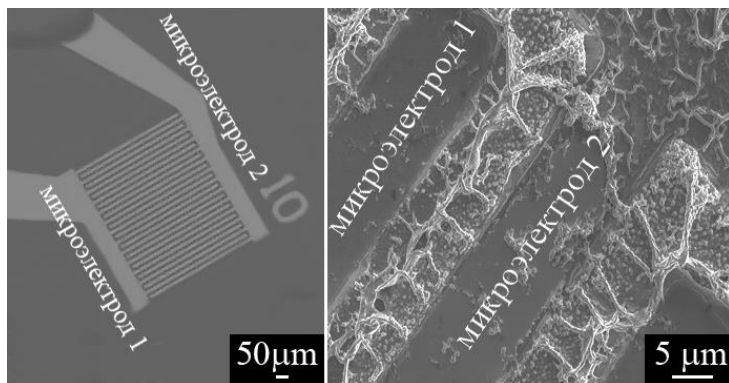


Рис. 4. Микроэлектроды: а) немодифицированные, б) модифицированные поли(3-АФБК).

внешнего электрода сравнения для контроля потенциала и ограничивает возможности миниатюризации всей системы. Поэтому для создания сенсорной структуры, не требующей внешних электродов, использовали взаимопроникающие золотые микроэлектроды, способные функционировать в растворе по двухэлектродной схеме (Рис. 4).

Модификацию микроэлектродов проводили в потенциодинамическом режиме из ростового раствора, оптимального для модификации торцевых электродов.

На микрофотографиях модифицированных микроэлектродов видна развитая структура полимера, образующегося в межэлектродном пространстве. Проводящий полимер способен создавать электрический контакт между взаимопроникающими электродами, что в дальнейшем позволит функционировать двухэлектродной схеме непосредственно в потоке аэрозоля.

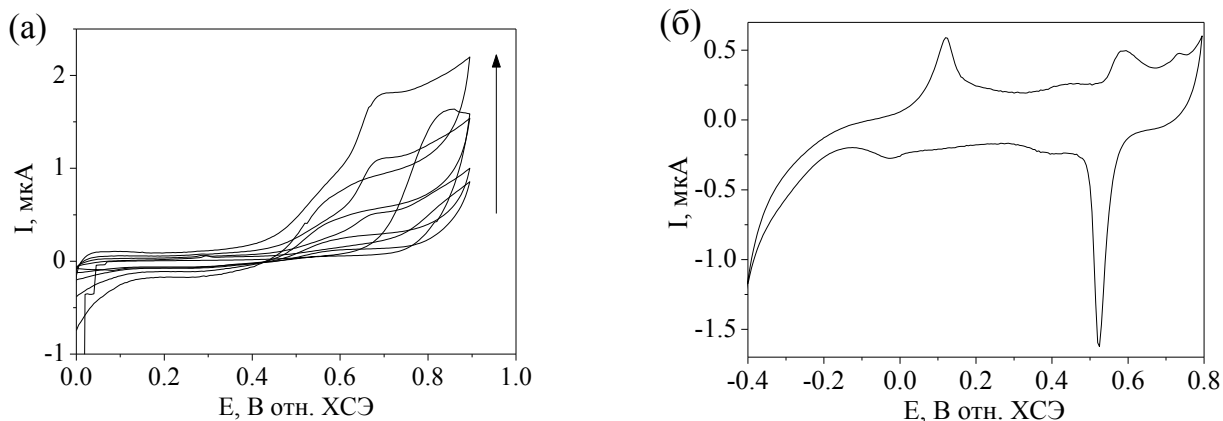


Рис. 5. ЦВА микроэлектродов в: а) ростовом растворе; б) 0.1 М КСl в 0.1 М НСl после электрополимеризации.

На ЦВА микроэлектродов в ростовой смеси (Рис. 5а) наблюдаются те же особенности, что и для торцевых электродов – «нуклеационные петли» и рост тока при максимальном потенциале с числом циклов. В отсутствие мономера модифицированные микроэлектроды демонстрируют пары пиков окисления-восстановления при потенциалах около 0 В и 0.6 В, соответствующие переходам лейкоэмеральдин/эмеральдин и эмеральдин/пернигранилин, соответственно (Рис. 5б). Следовательно, в ходе электрополимеризации на взаимопроникающих микроэлектродах образуется проводящая поли(3-АФБК), обладающая электроактивностью, характерной для полианилина.

Путем модификации взаимопроникающих микроэлектродов проводящим полимером 3-АФБК получены микросенсоры, которые далее будут использованы для анализа водной и воздушной среды.

Глава 7 «Физико-химические основы взаимодействия соединений, содержащих 1,2- или 1,3-цис-диольные фрагменты, с поли(3-АФБК)» посвящена исследованию изменений проводящих свойств поли(3-АФБК) при взаимодействии с различными веществами, содержащими и не содержащими 1,2- или 1,3-цис-диольные фрагменты. Для этих целей применена спектроскопия электрохимического импеданса как один из наиболее информативных, чувствительных и малодеструктивных методов исследования. На основании физико-химических закономерностей взаимодействия различных соединений с поли(3-АФБК) показано, что увеличение проводимости синтезированного полимера действительно обусловлено специфическим связыванием борнокислой группы с 1,2- или 1,3-цис-диольными фрагментами.

Изменение проводящих свойств поли(3-АФБК) при специфических и неспецифических взаимодействиях

В основу функционирования сенсора на основе поли(3-АФБК) положено специфическое взаимодействие 1,2- или 1,3-цис-диольных фрагментов с фенилборной кислотой. В результате этого взаимодействия образуется отрицательно заряженный

тетраэдрический комплекс. Остаток борной кислоты при включении в полимерную цепь сохраняет способность к образованию заряженных комплексов с 1,2- или 1,3-цис-диолами, в том числе с сахарами, полиолами или гидроксикислотами. Влияние образования данных комплексов на проводящие свойства разработанного сенсорного материала поли(3-АФБК) исследовали методом СЭХИ.

В настоящей работе полученные спектры импеданса аппроксимировали эквивалентной схемой Рэндлса с диффузионным элементом для случая проводящих полимеров (Рис. 6). Теоретическая модель соответствует экспериментальным данным (Рис. 7а), а рассчитанные параметры схемы характеризуются относительным стандартным отклонением в пределах нескольких процентов. Это свидетельствует о корректности модели и подтверждает возможность количественного описания проводящих свойств поли(3-АФБК).

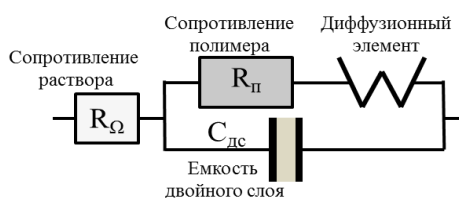


Рис. 6. Эквивалентная схема Рэндлса с диффузионным элементом

В качестве соединения, содержащего диольные фрагменты, использовали глюкозу. В присутствии 50 мМ глюкозы наблюдается уменьшение диаметра полуокружности в высокочастотной области спектров импеданса (Рис. 7а). Это свидетельствует об изменении сопротивления полимера R_p . Результаты аппроксимации данных СЭХИ эквивалентной схемой указывают на уменьшение сопротивления R_p в 1.5 раза.

Таким образом, взаимодействие с веществом, содержащим диольные фрагменты, приводит к уменьшению сопротивления. При замене раствора на буфер, не содержащий глюкозу, наблюдается возвращение спектра к первоначальному виду. Следовательно, отклик сенсора на основе поли(3-АФБК) обратим.

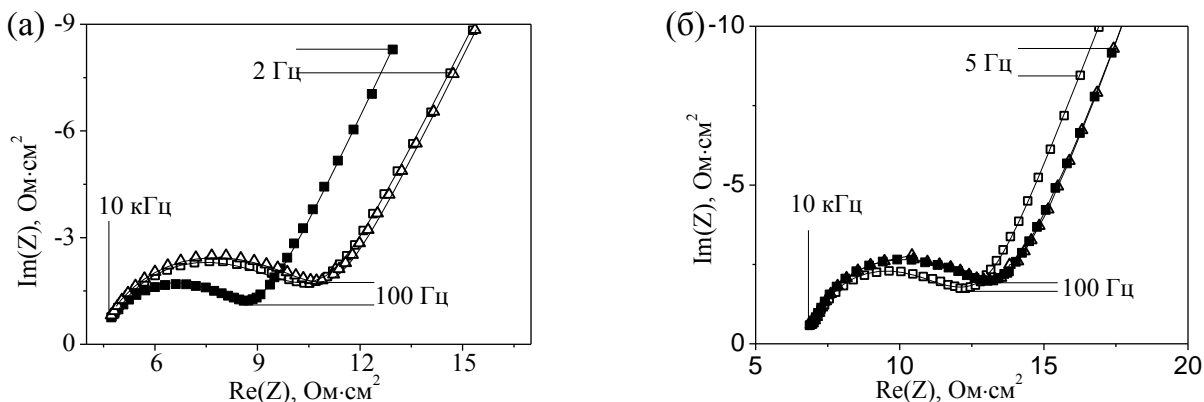


Рис. 7. Спектры импеданса поли(3-АФБК) в фосфатном буфере с рН 7.0: (□) в отсутствие (а) глюкозы или (б) ацетата натрия, (■) в присутствии (а) 50 мМ глюкозы или (б) 15 мМ ацетата натрия; (Δ) при замене раствора на не содержащий (а) глюкозу или (б) ацетат натрия; (—) аппроксимация спектров эквивалентной схемой Рэндлса (Рис. 6)

В качестве соединения, не содержащего диольные фрагменты, выбрали ацетат натрия. В случае взаимодействия 15 мМ ацетата натрия с поли(3-АФБК) на спектрах наблюдается увеличение диаметра полуокружности в высокочастотной области (Рис. 7б). Результаты расчетов показывают, что сопротивление полимера $R_{п}$ увеличивается в 1.2 раза. Тем самым, взаимодействия синтезированного полимера с соединением, не содержащим диольные фрагменты, приводят к увеличению сопротивления.

В настоящей работе впервые показано увеличение проводимости полимера, происходящее в результате специфического взаимодействия соединений, содержащих 1,2- и 1,3-*цис*-диольные фрагменты, с борнокислой группой поли(3-АФБК). Предложенный механизм состоит в том, что образование отрицательно заряженного комплекса в результате специфического связывания глюкозы с поли(3-АФБК) (Рис. 8), приводит к эффекту самодопирования и повышению проводимости полимера.

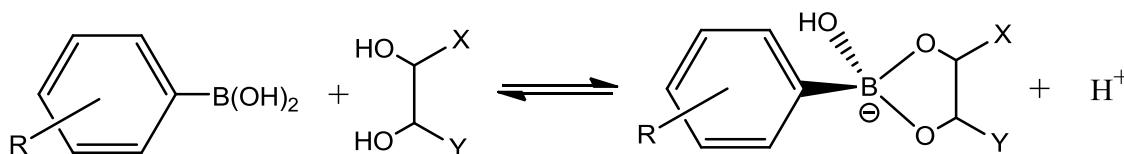


Рис. 8. Схема специфического взаимодействия фенолборной кислоты с 1,2-*цис*-диолом.

В случае неспецифических взаимодействий, не приводящих к образованию заряженного комплекса, происходит понижение проводимости (или увеличение сопротивления полимера). Таким образом, сенсор позволяет дифференцировать специфические и неспецифические процессы. Это отличает его от известных кондукто- и импедиметрических сенсорных систем на основе фенолборной кислоты, использующих уменьшение проводимости в качестве отклика.

Исследование поведения наблюдаемых констант связывания ($K_{набл}$) различных соединений с поли(3-АФБК)

Количественной характеристикой сродства поли(3-АФБК) к соединениям, содержащим 1,2- или 1,3-*цис*-диольные фрагменты, была выбрана наблюдаемая константа связывания, или ассоциации, $K_{набл}$ вещества S с борнокислой группой полимера B в комплекс BS, определяемая уравнением (1):

$$K_{набл} = \frac{[BS]}{[B][S]} \quad (1)$$

В качестве аналитического отклика системы, зависящего от концентраций веществ, использовали обратимое изменение сопротивления полимера $R_{п}$. Для зависимости сопротивления полимера от вещества S, способного образовывать комплекс BS с борнокислой группой, справедливо уравнение (2):

$$R_{п}([S]) = \frac{R_{п,0} + R_{п,\infty}K_{набл}[S]}{1 + K_{набл}[S]} \quad (2)$$

где $R_{п,0}$ – сопротивление полимера в отсутствие диол-содержащего соединения, $R_{п,\infty}$ – сопротивление полимера с полностью связанными в комплекс борнокислыми группами.

Итак, на основании зависимости сопротивления полимера $R_{п}$ от концентрации диол-содержащего соединения можно рассчитать наблюдаемую константу связывания $K_{набл}$.

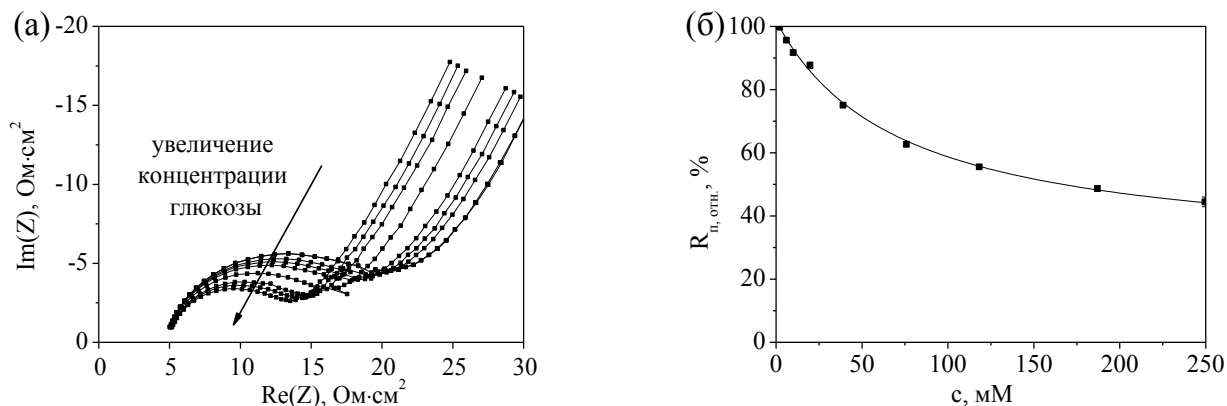


Рис. 9. (а) Спектры импеданса при различных концентрациях глюкозы; (б) градуировочная зависимость сопротивления полимера от концентрации глюкозы, аппроксимированная уравнением (2).

Как видно из спектров импеданса, по мере увеличения концентрации диол-содержащего соединения (на примере глюкозы) сопротивление полимера уменьшается (Рис. 9а). Градуировочная зависимость (Рис. 9б), построенная на основании аппроксимации спектров эквивалентной схемой, описывается уравнением (2). Вычисленная наблюдаемая константа связывания глюкозы с поли(3-АФБК) составляет 20 M^{-1} . Аналогичные расчеты были проведены для различных веществ, содержащих 1,2-

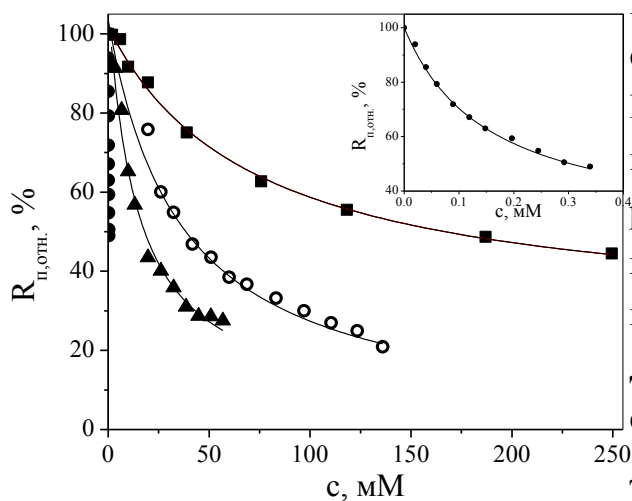


Рис. 10. Зависимости $R_{п}$ поли(3-АФБК) от концентрации: (■) глюкозы, (○) лактата, (▲) галактозы, (●, на вставке) сорбитола; (—) их аппроксимация уравнением (2).

или 1,3-цис-диольные фрагменты: галактоза, сорбитол и лактат калия (Рис. 10). Наблюдаемые константы связывания $K_{набл}$ с поли(3-АФБК) (в M^{-1} , доверительный интервал рассчитан для $n=3$, $P=0.95$): для глюкозы - 20 ± 2 , для лактата - 45 ± 3 , для галактозы - 100 ± 15 , для сорбитола - 6500 ± 500 . Диапазоны определяемых содержаний составляют (в мМ): для глюкозы - от 6 до 250, для галактозы - от 2 до 50, для сорбитола - от 0.02 до 0.34, для лактата - от 2 до 100. Пределы обнаружения: глюкозы - 3 мМ, лактата - 1 мМ, галактозы - 1 мМ, сорбитола - 0.01 мМ.

$K_{набл}$ для поли(3-АФБК) возрастают в ряду глюкоза < лактат < галактоза < сорбитол,

что соответствует поведению наблюдаемых констант связывания данных соединений с фенолборной кислотой.

Как следует из *Рис. 8*, связывание диола с борной кислотой зависит от pH. В общем случае pH-зависимость для наблюдаемой константы связывания двух соединений с константами кислотной диссоциации K_a^D (для диола) и K_a^B (для борной кислоты) имеет вид колоколообразной зависимости, положение которой на оси pH зависит от значений констант диссоциации согласно уравнению (3):

$$K_{\text{набл}} = \frac{\beta_{11-1}[H^+]}{(K_a^D + [H^+])(K_a^B + [H^+])} \quad (3)$$

Для исследования pH-зависимости связывания веществ, имеющих заметно различающиеся pK_a диольного фрагмента, с синтезированным полимером были взяты глюкоза (pK_a 12.3) и лактат (pK_a 3.9). Из данных о сопротивлении полимера при различных pH, полученных методом спектроскопии импеданса были рассчитаны $K_{\text{набл}}$. Как видно из *Рис. 11*, pH-зависимости имеют зеркальную симметрию монотонности аналогично тому, что наблюдается для связывания этих соединений с фенилборной кислотой.

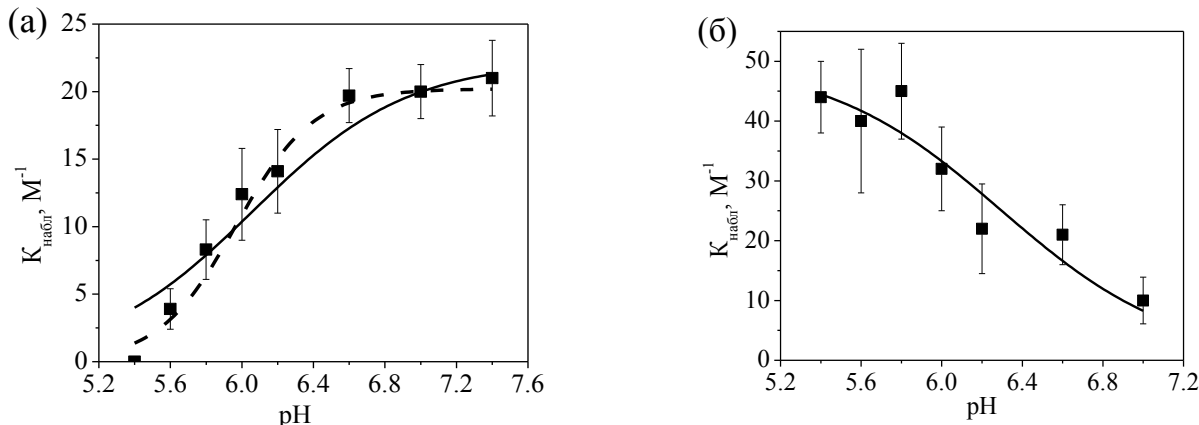


Рис. 11. pH-зависимости $K_{\text{набл}}$ для: (а) глюкозы, (б) лактата; аппроксимация для глюкозы: (—) уравнением (4) и (— —) уравнением (5); для лактата: (—) уравнением (6).

Теоретическое описание pH-зависимостей проведено на основе предельных случаев уравнения (3). Для глюкозы при $K_a^D \ll [H^+]$ pH-зависимость описывается уравнением (4) или (5). Последнее получено на основе предположения об образовании комплекса глюкозы с борной кислотой в соотношении 2:1 и более точно описывает полученные результаты, чем уравнение для соотношения 1:1. Зависимость $K_{\text{набл}}$ от pH для лактата получена при условии $K_a^D \gg [H^+]$ и подчиняется уравнению (6).

$$K_{\text{набл}} = \frac{K_{\text{тетр}}}{1 + [H^+]/K_a^B} \quad (4)$$

$$K_{\text{набл}} = \frac{K_{\text{тетр}}}{1 + [H^+]^2/K_a^{B'}} \quad (5)$$

$$K_{\text{набл}} = \frac{K'_{\text{тетр}}[H^+]/K_a^B}{1 + [H^+]/K_a^B} \quad (6)$$

где $K_{тетр}$ и $K_{тетр}'$ – константы связывания глюкозы и лактата, соответственно, с анионной формой борной кислоты (получается при кислотно-основном равновесии нейтральной борной кислоты с молекулой воды, в котором образуется анионная форма и протон).

Определенные из рН-зависимостей значения pK_a^B для полимера принимают значения 6.1–6.6, то есть, значительно ниже pK_a фенолборной кислоты (≈ 8.9), что делает возможным и эффективным использование системы на основе поли(3-АФБК) в нейтральных рН. Подобное понижение pK_a поли(3-АФБК) можно объяснить электроноакцепторными свойствами основной цепи полианилина.

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

Глава 8 «Обнаружение микроорганизмов с помощью поли(3-АФБК)» посвящена применению сенсоров и микросенсоров на основе разработанного сенсорного материала для обнаружения микроорганизмов (на примере *Penicillium chrysogenum*) в водной среде и аэрозоле.

Для функционирования модифицированного торцевого электрода как электрохимического сенсора необходимо наличие внешнего электрода сравнения и вспомогательного электрода. Это ограничивает применение такой системы в аналитической практике и делает затруднительной миниатюризацию сенсора и использование за пределами лабораторных помещений. Поэтому вместо торцевых стеклоуглеродных электродов были использованы взаимопроникающие золотые микроэлектроды. После модификации в межэлектродном пространстве появляется развитая структура полимера 3-АФБК (Рис. 4), которая создает электрический контакт между микроэлектродами, что позволяет применять двухэлектродную схему даже в отсутствие жидкого электролита.

Перед обнаружением микроорганизмов было проверено проявление эффекта уменьшения сопротивления поли(3-АФБК) на микроэлектродах в присутствии диол-содержащих соединений аналогично тому, что наблюдалось на классических торцевых электродах. Для этого было исследовано влияние глюкозы на спектры электрохимического импеданса модифицированных поли(3-АФБК) взаимопроникающих микроэлектродов (микросенсоров), функционирующих по двухэлектродной схеме в жидкости и аэрозоле.

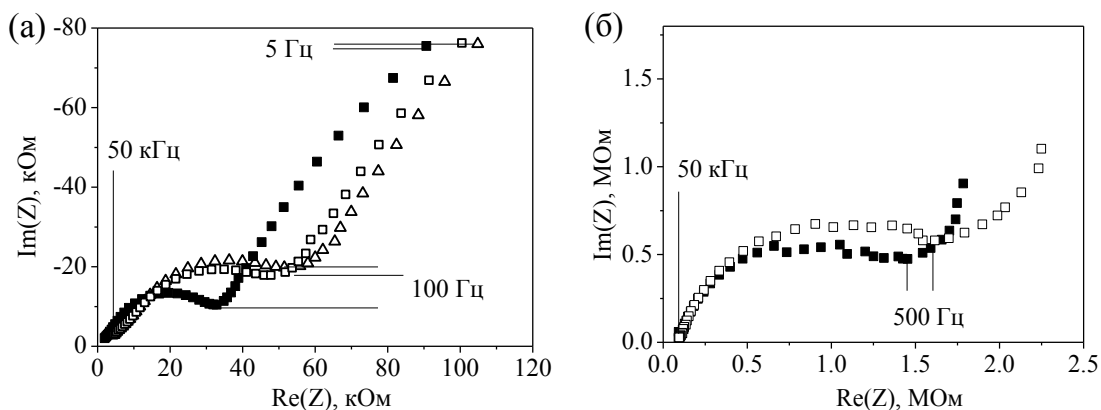


Рис. 12. Влияние глюкозы на спектры импеданса микросенсоров: а) в жидкости, б) в аэрозоле.

При введении глюкозы в жидкостную ячейку (в концентрации 40 мМ) и в насыщающий раствор (в концентрации 200 мМ) для получения аэрозоля наблюдается понижение сопротивления полимера R_p (Рис. 12). Величину R_p рассчитывали из диаметра полуокружности в высокочастотной области спектров. Относительное понижение сопротивления поли(3-АФБК) в присутствии глюкозы в жидкости и аэрозоле составило 2 и 1.2 раза, соответственно. Эффект понижения сопротивления сенсорного материала в результате специфического взаимодействия наблюдается как для модифицированных торцевых электродов, так и модифицированных взаимопроникающих микроэлектродов (микросенсоров). Таким образом, микросенсоры на основе поли(3-АФБК) в аэрозоле могут быть использованы для обнаружения объектов, содержащих 1,2- или 1,3-цис-диольные фрагменты; и в том числе, для обнаружения микроорганизмов.

Распределение размеров частиц в суспензии микроорганизмов

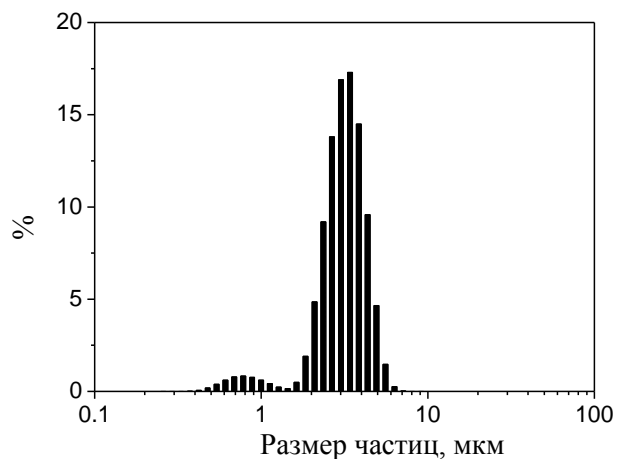


Рис. 13. Распределение размеров частиц в суспензии микроорганизмов.

В настоящей работе в ходе обнаружения микроорганизмов применяли водные суспензии *Penicillium chrysogenum* (фосфатный буфер с рН 7.0). Исследование суспензии проводили при помощи автоматического лазерного дифракционного анализатора частиц. В суспензии плесневых грибов с содержанием 50 000 КОЕ/мл в основном присутствуют частицы размером порядка 3 мкм (Рис. 13), что соответствует размеру единичной споры *Penicillium chrysogenum*. Частицы крупных размеров (10-100 мкм) обнаружены не были, распределение частиц по размерам при инкубации в ходе анализа оставалось неизменным. Этот факт позволяет утверждать, что основная составляющая суспензии (95%) – споры микромицетов.

Обнаружение микроорганизмов в водной среде при помощи (микро)сенсоров

Клеточная стенка плесневых грибов, в том числе и спор *Penicillium chrysogenum*, более чем на 60% состоит из олиго- и полисахаридов, содержащих 1,2- или 1,3-циодиольные фрагменты. Использование боронат-замещенного полианилина или поли(3-АФБК) в качестве чувствительного элемента, обладающего сродством к составляющим поверхности клеточной стенки, позволит создать безреагентный сенсор для обнаружения микроорганизмов.

Первоначально обнаружение *Penicillium chrysogenum* в водной среде проводили методом спектроскопии импеданса с применением трехэлектродной схемы с рабочим торцевым электродом, модифицированным поли(3-АФБК). После погружения электрода в фосфатный буфер с рН 7.0 применяли синусоидальную развертку потенциала с постоянным значением 0.05 В относительно ХСЭ и амплитудой колебаний 5 мВ. Последовательную регистрацию спектров электрохимического импеданса сенсоров в буферном растворе проводили до тех пор, пока спектры не становились статистически неотличимы. Затем исходный раствор заменяли суспензией плесневых грибов с различными концентрациями, определенными методом посева. После этого для каждой концентрации микроорганизмов регистрировали спектры импеданса.

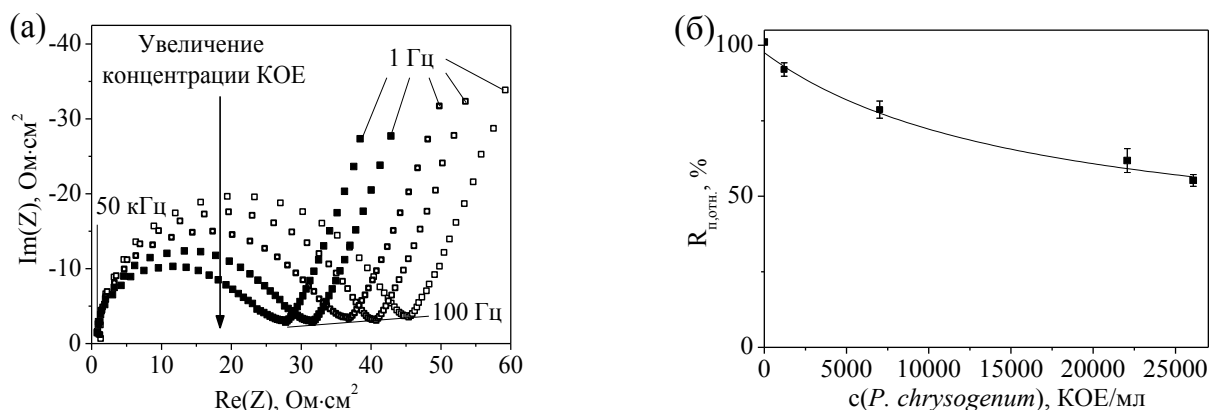
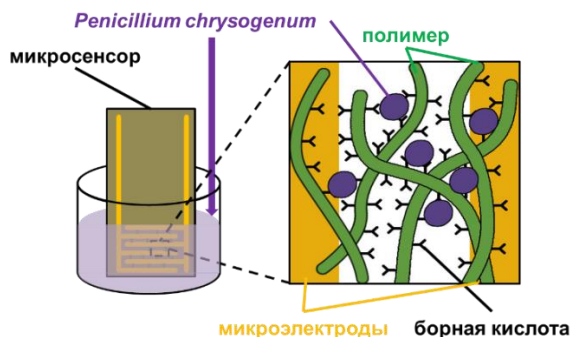


Рис. 14. Спектры импеданса сенсора в суспензиях с различными концентрациями плесневых грибов (КОЕ/мл): (○) 0, (Δ) 1200, (□) 7000, (▲) 22000, (■) 26000; (б) градуировочная зависимость сопротивления полимера от концентрации микроорганизмов, аппроксимированная уравнением (2).

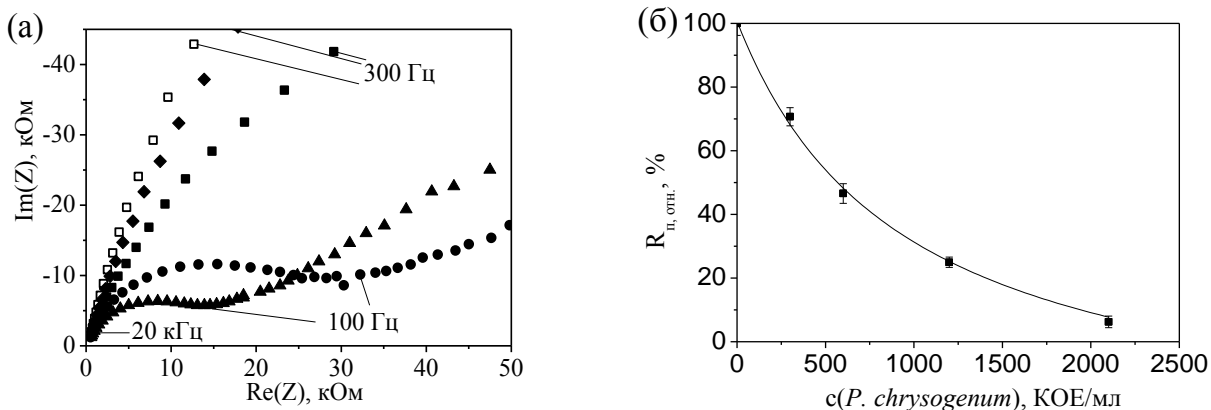
В качестве аналитического сигнала было выбрано сопротивление полимера R_p , рассчитанное из диаметра полуокружности высокочастотной области спектра (Рис. 14а). При продолжительной регистрации спектров в чистом фосфатном буфере наблюдается незначительный рост R_p – примерно 5% за 1 час. Тем самым, фоновые процессы приводят к увеличению сопротивления (или уменьшению проводимости). В отличие от неспецифических процессов, присутствие микроорганизмов вызывает увеличение проводимости полимера. Таким образом, сенсор способен дифференцировать полезный сигнал от фонового в экспериментах с микроорганизмами, что крайне важно для практического использования.

С увеличением концентрации микроорганизмов в суспензии сопротивление полимера $R_{п}$ уменьшается. Вычислив сопротивление полимера, можно построить градуировочную зависимость $R_{п}$ от концентрации микромицетов. Как и в случае с соединениями, содержащими 1,2- или 1,3-*цис*-диольные фрагменты, зависимость аппроксимирована уравнением (2), как показано на *Рис. 14б*.



Обнаружение микроорганизмов в водной среде с использованием микро сенсоров проводили по двухэлектродной схеме – в роли вспомогательного электрода и электрода сравнения выступал второй микроэлектрод взаимопроникающей конструкции.

Микро сенсор погружали в раствор фосфатного буфера с рН 7.0 (Рис. 15), после чего регистрировали спектры импеданса в присутствии различных концентраций микроорганизмов до тех пор, пока последовательно снятые спектры не становились статистически неотличимы.



По значениям приведенных на спектрах частот видно, что в отсутствие микроорганизмов и при концентрациях 300 и 600 КОЕ/мл наблюдается фрагмент высокочастотной полуокружности, которая полностью проявляется при более высоких концентрациях (Рис. 16а).

С увеличением концентрации плесневых грибов в суспензии уменьшается диаметр высокочастотной полуокружности. Это говорит об уменьшении $R_{п}$ в присутствии плесневых грибов для микро сенсоров, функционирующих по двухэлектродной схеме, как и при обнаружении микроорганизмов по трехэлектродной схеме.

Сравнение градуировочных зависимостей сенсора и микросенсора показывает, что чувствительность обнаружения микроорганизмов для последнего значительно выше: содержание плесневых грибов в 1200 КОЕ/мл вызывает понижение сопротивления модифицированного микроэлектрода в 5 раз (Рис. 16б), тогда как для торцевых электродов такая же суспензия вызывает понижение сопротивления на 5% (Рис. 14б).

Увеличение проводимости в присутствии микроорганизмов предположительно обусловлено связыванием борнокислых групп полимера с диольными группами клеточных стенок микроорганизмов. Данный эффект проявляется для различных типов электродов и определяемых объектов (моносахаридов, полиолов, гидроксикислот, микроорганизмов), следовательно, явление повышения проводимости полимера при связывании с 1,2- или 1,3-*цис*-диольными группами носит универсальный характер.

Обнаружение микроорганизмов в аэрозоле при помощи микросенсоров

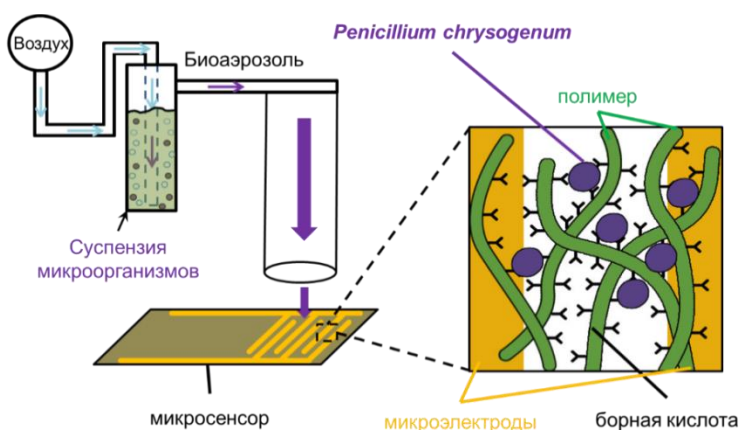


Рис. 17. Схема обнаружения микроорганизмов в аэрозоле.

Аэрозоль, содержащий микроорганизмы, (или биоаэрозоль) создавали путем пропускания потока воздуха через стеклянную промывную склянку с водной суспензией *Penicillium chrysogenum*. Для обнаружения микроорганизмов в потоке аэрозоля микросенсор закрепляли на пути воздушного потока (Рис. 17). В начале эксперимента в склянке содержался

чистый фосфатный буфер. Для каждой концентрации микроорганизмов (в том числе, для чистого фосфатного буфера) проводили измерения импеданса до тех пор, пока последовательно зарегистрированные спектры не становились статистически неотличимы. В качестве аналитического отклика использовали, как и в других экспериментах, сопротивление полимера R_p .

Было проведено сравнение откликов микросенсоров, полученных в течение 5–20 циклов электрополимеризации, на присутствие микроорганизмов в аэрозоле, создаваемом пропусканием потока воздуха через суспензию с концентрацией 50 000 КОЕ/мл. С точки зрения максимального относительного понижения сопротивления, оптимальными для модификации были признаны 10 циклов электрополимеризации.

В ходе обнаружения микроорганизмов регистрировали спектры импеданса в потоке аэрозоля, создаваемого из суспензий с концентрациями от 14000 до 46000 КОЕ/мл (Рис. 18а). С увеличением концентрации плесневых грибов в насыщающем растворе для создания аэрозоля диаметр высокочастотной полуокружности уменьшается (Рис. 18б). Это свидетельствует о понижении сопротивления поли(3-АФБК) в

присутствии микроорганизмов в аэрозоле аналогично экспериментам по обнаружению микроорганизмов в жидкости (Рис. 14б, Рис. 16б).

Итак, в ходе обнаружения *Penicillium chrysogenum* непосредственно в потоке биоаэрозоля подтверждено, что поли(3-АФБК) при специфических взаимодействиях с определяемыми объектами понижает свое сопротивление, тогда как при фоновых процессах, связанных, например, с деградацией и дедопированием, сопротивление повышается.

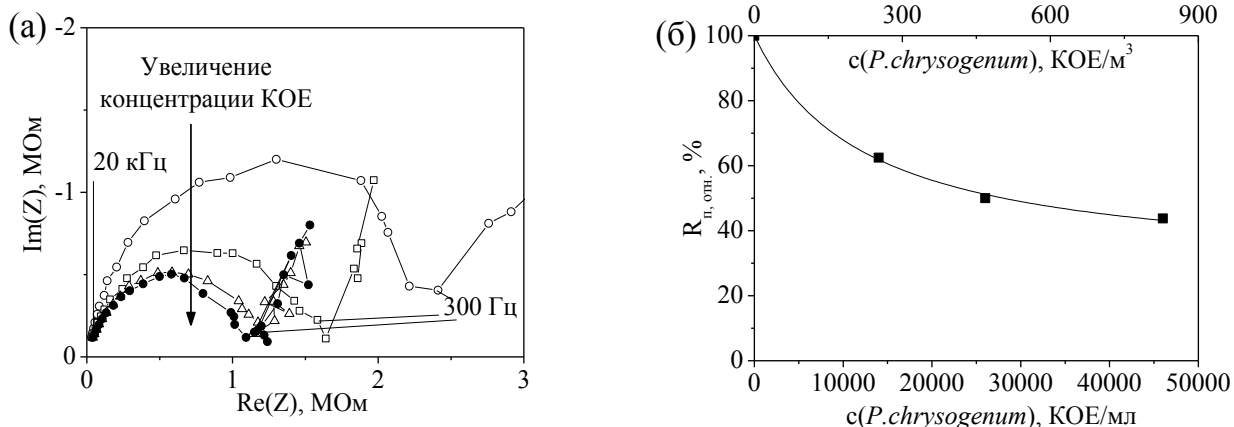


Рис. 18. (а) Спектры импеданса микросенсора в аэрозоле из насыщающих растворов с концентрациями (в КОЕ/мл): (○) 0, (□) 14000, (Δ) 26000, (●) 46000; (б) градуировочная зависимость сопротивления полимера от концентрации микроорганизмов в насыщающем аэрозоле растворе, аппроксимированная уравнением (2).

На основании посева проб аэрозоля с различными концентрациями микроорганизмов были рассчитаны объемные концентрации микромицетов в аэрозоле. Диапазон определяемых в воздушной среде концентраций составляет от 200 до 800 КОЕ/м³. Это делает микросенсор пригодным для обнаружения микроорганизмов в концентрациях, соответствующих гигиеническому нормативу для атмосферного воздуха населенных мест (500 КОЕ/м³).

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

ВЫВОДЫ

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

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

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Andreyev E.A., Komkova M.A., Nikitina V.N., Zaryanov N.V., Voronin O.G., Karyakina E.E., Yatsimirsky A.K., Karyakin A.A. Reagentless polyol detection by conductivity increase in course of self-doping of boronate-substituted polyaniline // Anal. Chem. — 2014. — V. 86, № 23. — P. 11690–11695
2. Komkova M.A., Andreyev E.A., Nikitina V.N., Krupenin V.A., Presnov D.E., Karyakina E.E., Yatsimirsky A.K., Karyakin A.A. Novel reagentless label-free detection principle for affinity interactions resulted in conductivity increase of conducting polymer // Electroanalysis. — 2015. — V. 27, № 9. — P. 2055–2062
3. Андреев Е.А., Комкова М.А., Крупенин В.А., Преснов Д.Е., Карякин А.А. Электрохимическое детектирование *Penicillium chrysogenum* на основе повышения проводимости полиаминофенилборной кислоты // Электрохимия. — 2017. — Т. 53, № 1. — С. 103–107 [Andreev E.A., Komkova M.A., Krupenin V.A., Presnov D.E., Karyakin A.A. Electrochemical Detection of *Penicillium chrysogenum* Based on Increasing Conductivity of Polyaminophenylboronic Acid // Russ. J. Electrochem. — 2017. — V. 53, № 1. — P. 92–96]
4. Андреев Е.А., Комкова М.А., Воронин О.Г., Карякин А.А. Повышение проводимости поли-3-аминофенилбороновой кислоты как результат комплексообразования с сахарами // Шестая Всероссийская Каргинская Конференция «Полимеры — 2014». Сборник тезисов. Москва, Россия — 2014. — Т. 2, Ч. 2 — С. 504
5. Andreev E.A., Komkova M.A., Nikitina V.N., Kotchetkov I.R., Voronin O.G., Karyakin A.A., Yatsimirsky A.K. Increase of Conductivity of Boronic Acid Substituted Polyaniline-Based Sensor upon Complexation with Polyols // 65th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry. Lausanne, Switzerland — 2014. — V. 1 — P. 1861
6. Egor Andreyev, Maria Komkova, Vita Nikitina, Arkady Karyakin. Electroanalytical system for microorganism detection in aerosol based on boronate-substituted polyaniline-

- modified interdigitated microelectrodes // International Conference "Biocatalysis-2015: Fundamentals and Applications", Moscow region, Avantel Club Istra. — 2015. — P. 71
7. Andreev E.A., Komkova M.A., Nikitina V.N., Karyakin A.A. Reagentless microorganism detection principle based on substituted polyaniline conductivity increase upon specific binding // 10th International Frumkin Symposium on Electrochemistry. Abstracts. Moscow, Russia — 2015. — P. 241
 8. Чухнина А.Б., Андреев Е.А., Комкова М.А. Создание новых сенсорных материалов на основе 3-аминофенил- и 3-тиенилборных кислот // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2016». Секция «Инновации в химии: достижения и перспективы». / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов. [Электронный ресурс] — М.: МАКС Пресс, 2016. — С. 43
 9. Андреев Е.А., Комкова М.А., Карякин А.А. Увеличение проводимости боронат-замещенного полианилина в присутствии *Penicillium chrysogenum* как основа создания безреагентного сенсора для детекции микроорганизмов // IX Всероссийская конференция по электрохимическим методам анализа с международным участием и молодежной научной школой "ЭМА 2016". Тезисы докладов. Ленева – Екатеринбург, Россия. — 2016. — С. 77
 10. Andreev E.A., Komkova M.A., Karyakin A.A. Electrochemical Detection of *Penicillium chrysogenum* by Conductivity Increase of Boronate-Substituted Polyaniline // 67th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry. Abstracts. The Hague, The Netherlands. — 2016. — P. 652
 11. Андреев Е.А., Комкова М.А., Карякин А.А. Новый принцип безреагентной регистрации аффинных взаимодействий на основе повышения проводимости проводящего полимера // Научные труды V Съезда физиологов СНГ, V Съезда Биохимиков России, Конференции ADFLIM. Спецвыпуск Acta naturae. Сочи – Дагомыс, Россия — 2016. — Т. 2. — С. 130
 12. Андреев Е.А., Комкова М.А., Карякин А.А. Детектирование микроорганизмов с использованием имитации биологической аффинности на основе боронат-замещенного проводящего полианилина // Материалы IX Международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва, Россия — 2017. — Т. 2. — С. 368