

На правах рукописи



СВАЛОВА Татьяна Сергеевна

РАЗРАБОТКА ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ ИММУНОСЕНСОРОВ ДЛЯ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* И *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОЧАСТИЦ Fe_3O_4 В КАЧЕСТВЕ ПРЯМОЙ
СИГНАЛООБРАЗУЮЩЕЙ МЕТКИ

02.00.02 – Аналитическая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Екатеринбург – 2016

Работа выполнена на кафедре аналитической химии химико-технологического института федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина»

Научный руководитель: кандидат химических наук, доцент
Козицина Алиса Николаевна

Официальные оппоненты: **Евтюгин Геннадий Артурович**,
доктор химических наук, профессор,
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет», заведующий
кафедрой аналитической химии Химического
института имени А. М. Бутлерова

Еремин Сергей Александрович,
доктор химических наук, профессор,
ФГБОУ ВО «Московский государственный
университет имени М.В.Ломоносова»,
ведущий научный сотрудник кафедры
Химической энзимологии Химического
факультета

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Башкирский государственный
университет», г. Уфа

Защита состоится 14 июня 2016 г. в 15-00 часов на заседании диссертационного совета Д **212.285.09** на базе ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» по адресу: 620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19, зал Ученого совета (ауд. И-420)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» <http://lib.urfu.ru/mod/data/view.php?id=51&rid=255948>

Автореферат разослан « » _____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Семенищев Владимир Сергеевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

В настоящее время в связи с повсеместным загрязнением объектов окружающей среды, ослаблением производственного контроля качества питьевой воды и продуктов питания, а также снижением иммунитета у населения, имеет место стремительное распространение возбудителей инфекционных заболеваний бактериальной этиологии. Наиболее распространенным возбудителем инфекционных заболеваний бактериальной этиологии являются бактерии группы кишечной палочки *Escherichia coli*. Являясь грамотрицательным патогеном, бактерии *E. coli* в норме населяют нижнюю часть кишечника теплокровных животных и человека. Однако, некоторые штаммы *E. coli* способны вызывать самые различные заболевания, включая тяжелые пищевые отравления, перитонит, кольпит и сепсис. Грамположительные бактерии *Staphylococcus aureus* относятся к возбудителям множества кожных и инфекционно-токсических заболеваний. Ключевыми факторами в борьбе с бактериальными патогенами являются быстрое и точное обнаружение источника инфицирования и контроль распространения бактериальных агентов в окружающей среде.

В современной клинической и лабораторной диагностике используют методы бактериального посева с подсчетом колоний, иммуноферментного анализа и ДНК-анализа для идентификации патогена и определения степени обсемененности анализируемой пробы. Несмотря на широкое распространение, данные методы имеют ряд существенных недостатков. В частности, метод бактериального посева требует значительных временных затрат (2-3 дня) и позволяет определить содержание бактерий в пробе с точностью одного порядка (10 или 100 КОЕ/мл). Методы иммуноферментного анализа и ПЦР являются более экспрессными и точными, однако проведение процедуры определения патогенов требует поддержания специализированных (стерильных) условий, наличия сложного и дорогого оборудования, а также специалистов высокой квалификации. Кроме того, велика вероятность получения ложноположительных или ложноотрицательных результатов, поскольку данные методы не позволяют оценить жизнеспособность определяемых патогенов.

Таким образом, актуальной задачей является разработка новых экспрессных, чувствительных, точных, недорогих и удобных в использовании методов, сенсоров и приборов для определения возбудителей инфекционных заболеваний в объектах окружающей среды, пищевых продуктах и биологических жидкостях пациентов.

Степень разработанности темы исследования

Разработка высокочувствительных, точных и недорогих биосенсоров, позволяющих быстро обнаружить инфекционные агенты в различных объектах, является актуальным научным направлением. Сочетание простоты, экспрессности и точности обнаружения патогенов с невысокой стоимостью сенсора представляет сложную задачу, одним из путей решения которой является применение сигналообразующей метки, способной быстро и точно генерировать аналитический сигнал в зависимости от количества аналита в исследуемой пробе. Применение в качестве сигналообразующих меток наноматериалов различной природы, в том числе обладающих магнитными свойствами, также является перспективным направлением развития иммуносенсоров, поскольку позволяет избежать использования дорогих и нестабильных при хранении ферментов.

Одним из наиболее перспективных направлений является разработка электрохимических иммуносенсоров с использованием в качестве сигналообразующей метки наноматериалов на основе магнетита. Уникальное сочетание специфичности иммунореакции, магнитных свойств наночастиц и детектирования отклика от метки электрохимическими методами анализа позволит существенно снизить предел обнаружения, увеличить точность определения патогенов, а также снизить себестоимость и временные затраты на проведение анализа.

Цель работы: разработка бесферментных электрохимических иммуносенсоров для количественного определения бактерий *Escherichia coli* ATCC 25992 и *Staphylococcus aureus* В-1266 с использованием в качестве метки наночастиц магнетита.

Достижение поставленной цели требует решения ряда **задач:**

- Исследовать строение, состав и морфологические особенности синтезированных методом соосаждения наночастиц состава « Fe_3O_4 -хитозан» и « Fe_3O_4 -3-аминопропилтриэтоксисилан».
- Изучить характер электропревращений наночастиц Fe_3O_4 в апротонной среде.
- Изучить влияние модифицирующего покрытия на седиментационную устойчивость и электрохимические свойства наночастиц Fe_3O_4 .
- Осуществить выбор оптимальных условий формирования аналитического сигнала от наночастиц магнетита в апротонной среде.

- Исследовать кинетические особенности взаимодействия наночастиц « Fe_3O_4 -хитозан» и « Fe_3O_4 -3-аминопропилтриэтоксисилан» с клетками *Escherichia coli* ATCC 25992 и *Staphylococcus aureus* В-1266

- Осуществить выбор рабочего электрода и оптимального способа модифицирования его поверхности антителами

- Осуществить выбор оптимальных условий формирования иммунокомплекса «антитело-меченая наночастицами бактерия» на поверхности рабочего электрода

- Осуществить разработку алгоритмов проведения процедуры анализа для количественного определения бактерий *Escherichia coli* ATCC 25992 и *Staphylococcus aureus* В-1266

- Провести анализ бактерий *Escherichia coli* ATCC 25992 и *Staphylococcus aureus* В-1266 в модельных суспензиях и реальных пробах с использованием разработанного электрохимического иммуносенсора и референсных лабораторных методов (бактериального посева и ИФА).

Научная новизна работы:

1. Впервые исследованы особенности электрохимических превращений наночастиц Fe_3O_4 в растворе ацетонитрила, используемых в качестве прямой сигналообразующей метки в разработанных электрохимических иммуносенсорах для количественного определения бактерий *Escherichia coli* ATCC 25992 и *Staphylococcus aureus* В-1266. Установлено, что характер окислительно-восстановительных превращений наночастиц магнетита на поверхности рабочего электрода в апротонной среде зависит от потенциала предварительного электролиза. Предложены схемы протекания электрохимических превращений наночастиц Fe_3O_4 на поверхности рабочего электрода в апротонной среде после предварительного электролиза при потенциалах -2,5 В и -1,3 В. Выбраны условия формирования прямого электрохимического отклика от Fe_3O_4 в апротонной среде для дальнейшего использования наночастиц в качестве метки в электрохимическом иммуноанализе.

2. Впервые установлено, что покрытие хитозаном и 3-аминопропилтриэтоксисиланом не влияет на электрохимическую активность наночастиц магнетита в апротонной среде. Обоснована возможность использования наночастиц « Fe_3O_4 -хитозан» и « Fe_3O_4 -3-аминопропилтриэтоксисилан» в качестве прямой сигналообразующей метки для количественного определения бактерий.

3. Показано, что наночастицы Fe_3O_4 , модифицированные хитозаном и 3-аминопропилтриэтоксисиланом, проявляют большую седиментационную устойчивость по сравнению с немодифицированными наночастицами. Изучена кинетика процессов взаимодействия наночастиц « Fe_3O_4 -хитозан» и « Fe_3O_4 -3-аминопропилтриэтоксисилан» с бактериальными клетками *Escherichia coli* ATCC 25992 и *Staphylococcus aureus* B-1266.

4. Установлена линейная зависимость величины прямого аналитического сигнала наночастиц магнетита, включенных в иммунокомплекс на поверхности рабочего электрода, от количества бактерий *Escherichia coli* ATCC 25992 и *Staphylococcus aureus* B-1266 в модельных суспензиях.

5. Впервые определены чувствительность, точность и селективность разработанных электрохимических иммуносенсоров для детектирования бактерий *Escherichia coli* ATCC 25992 и *Staphylococcus aureus* B-1266 в сравнении с методами бактериального посева и ИФА на модельных суспензиях, смесях бактерий и реальных пробах.

Практическая значимость работы:

1. Синтезированы наночастицы « Fe_3O_4 -хитозан» и « Fe_3O_4 -3-аминопропилтриэтоксисилан», проявляющие выраженную электрохимическую активность в апротонной среде, для количественного определения бактерий *Escherichia coli* ATCC 25992 и *Staphylococcus aureus* B-1266. Определены размеры, форма и состав синтезированного материала.

2. Разработаны простые, экспрессные и точные бесферментные электрохимические иммуносенсоры для определения бактерий *Escherichia coli* ATCC 25992 и *Staphylococcus aureus* B-1266 с использованием в качестве метки наночастиц « Fe_3O_4 -хитозан» и « Fe_3O_4 -3-аминопропилтриэтоксисилан» и детектированием прямого аналитического сигнала в апротонной среде.

3. Показана и обоснована возможность практического применения разработанных электрохимических иммуносенсоров с прямой детекцией аналитического сигнала от наночастиц Fe_3O_4 для селективного определения бактерий *Escherichia coli* ATCC 25992 и *Staphylococcus aureus* B-1266 в модельных суспензиях и реальных объектах.

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты исследований размеров, формы, состава и морфологии наночастиц «Fe₃O₄-хитозан» и «Fe₃O₄-3-аминопропилтриэтоксисилан», полученные методами электронной микроскопии и ИК-спектроскопии.
2. Результаты исследования характера электрохимических превращений наночастиц магнетита в апротонной среде.
3. Результаты исследования кинетики взаимодействия наночастиц «Fe₃O₄-хитозан» и «Fe₃O₄-3-аминопропилтриэтоксисилан» с бактериальными клетками *Escherichia coli* ATCC 25992 и *Staphylococcus aureus* B-1266.
4. Бесферментные электрохимические иммуносенсоры для определения содержания бактерий *Escherichia coli* ATCC 25992 и *Staphylococcus aureus* B-1266.
5. Результаты количественного определения бактерий *Escherichia coli* ATCC 25992 и *Staphylococcus aureus* B-1266 в модельных смесях и реальных пробах, полученные с использованием разработанных электрохимических иммуносенсоров и подтвержденные в независимой лаборатории методами бактериального посева и ИФА (исследования проведены на базе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», г. Новосибирск).

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность полученных данных определяется использованием в работе современных физико-химических методов исследования и высокотехнологичного оборудования, а также статистической обработкой полученных результатов. Правильность определения бактерий подтверждена путем сравнения результатов детектирования *Escherichia coli* ATCC 25992 и *Staphylococcus aureus* B-1266 в модельных смесях и реальных пробах, полученных с использованием разработанных электрохимических иммуносенсоров и методами ИФА и бактериального посева (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», г. Новосибирск).

Результаты исследований, выполненных в рамках данной диссертационной работы, были представлены на всероссийских и международных конференциях: VIII Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа «ЭМА-2012» (Уфа-Абзаково, 2012), всероссийской конференции «Химия и медицина» с молодежной научной школой (Уфа-Абзаково, 2013, 2015), втором съезде аналитиков России (Москва, 2013), конференции «Drug Analysis 2014» (Льеж, Бельгия, 2014), Уральском научном форуме «Современные проблемы органической химии» (Екатеринбург, 2014), конференции «Euroanalysis 2015» (Бордо, Франция, 2015), конференции «Химический

анализ и медицина» (Москва, 2015), международной конференции «Recent advances in food analysis» (Прага, Чехия, 2015).

Диссертационная работа является частью исследований, проводимых на кафедре аналитической химии Химико-технологического института УрФУ имени Б. Н. Ельцина в рамках госбюджетной темы Н687.42Г.002/12, грантов РФФИ: 09-03-12242-офи_м, 14-03-01017, гранта для молодых ученых У.М.Н.И.К (тема №6 проект 0011038 2015 года).

Публикации. По результатам проведенных исследований опубликованы: 2 статьи в журналах, входящих в базы данных Scopus и Web of Science; получен 1 патент на изобретение; опубликовано 10 тезисов докладов на всероссийских и международных научных конференциях.

Личный вклад автора заключался постановке и проведении научных экспериментов, анализе и систематизации полученных результатов, а также в подготовке научных статей, опубликованных в соавторстве.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, четырех глав, заключения, и списка литературных источников (246 источников). Текст диссертационной работы изложен на 150 страницах компьютерной верстки, содержит 32 рисунка и 11 таблиц.

Во введении изложены основные положения об актуальности и степени разработанности темы диссертационной работы, определены цели и задачи исследования, сформулирована научная новизна и практическая значимость, а также положения, выносимые на защиту диссертации.

В первой главе приведены основные достижения в области разработки биосенсоров для определения бактериальных агентов. Особое внимание уделено иммуносенсорам, в которых в качестве метки использованы наноматериалы.

Во второй главе представлены сведения о реактивах, материалах, методологической и инструментальной базе диссертационного исследования.

Третья глава посвящена исследованию характера электропревращений наночастиц магнетита в апротонном растворе, оценке влияния факторов внешней среды на процессы формирования прямого электрохимического отклика от наночастиц и получению аналитического сигнала для дальнейшего использования в электрохимическом иммуноанализе. Обоснована возможность использования наночастиц магнетита в качестве прямой сигналообразующей метки в электрохимическом иммуноанализе.

Четвертая глава включает в себя результаты исследований процессов взаимодействия наночастиц магнетита с бактериальными клетками. Приведены результаты сравнительных испытаний чувствительности планарных платиновых электродов, модифицированных антителами тремя различными способами. Описаны результаты определения целевых бактерий в модельных суспензиях и реальных образцах.

МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Синтез наночастиц осуществляли методом соосаждения. Размеры, морфологию наночастиц, кинетику их взаимодействия с бактериальными клетками исследовали методом просвечивающей электронной микроскопии. Состав модифицированных наночастиц изучали методом ИК-спектроскопии.

Электрохимические исследования проводили с использованием потенциостата/гальваностата μ Autolab Type III («Metrohm», Швейцария) в комплекте с трехэлектродной ячейкой. В качестве электрода сравнения использовали Ag/AgCl с двумя мембранами («Metrohm»). Вспомогательным электродом служил стержень из стеклоуглерода. В качестве рабочего электрода использовали платиновый дисковый электрод («Metrohm») и несколько типов планарных электродов: планарный платиновый электрод; толсто пленочный графитсодержащий электрод с алюминиевым токоподводом; толсто пленочный графитсодержащий электрод токоподводом из серебросодержащей пасты; толсто пленочный графитсодержащий электрод.

Инкубирование наночастиц с микробными клетками, а также образование иммунокомплекса на поверхности рабочего электрода проводили в мини-инкубаторе GFL type 1010 (Германия). Контроль кислотности растворов осуществляли с использованием мивольтметра «Эксперт-рН» («Эконикс-Эксперт», г. Москва). Для проведения фотометрических измерений использовали спектрофотометр ПЭ 5400 (ООО «Экохим», Россия). Морфологию клеток бактериальных штаммов исследовали методом фазово-контрастной микроскопии с помощью микроскопа Axioskop 40 (Carl Zeiss, Германия). Микроскопические исследования проводили с использованием электронного микроскопа JEM 1400 (Jeol, Япония). Фотосъемку, анализ и обработку снимков осуществляли с помощью цифровой камеры бокового вывода Veleta (SIS, Германия) и программного пакета iTEM (SIS, Германия). Магнитную сепарацию и

концентрирование осуществляли на магнитном штативе "MagneSphere[®]" для 12 микропробирок «EppendorfT» («Promega», США).

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Определение состава, размера и морфологии наночастиц Fe₃O₄

С целью получения сигналообразующей метки в электрохимическом иммуноанализе были синтезированы наночастицы магнетита. Размеры и морфология наночастиц исследованы методом электронной микроскопии (рисунок 1).

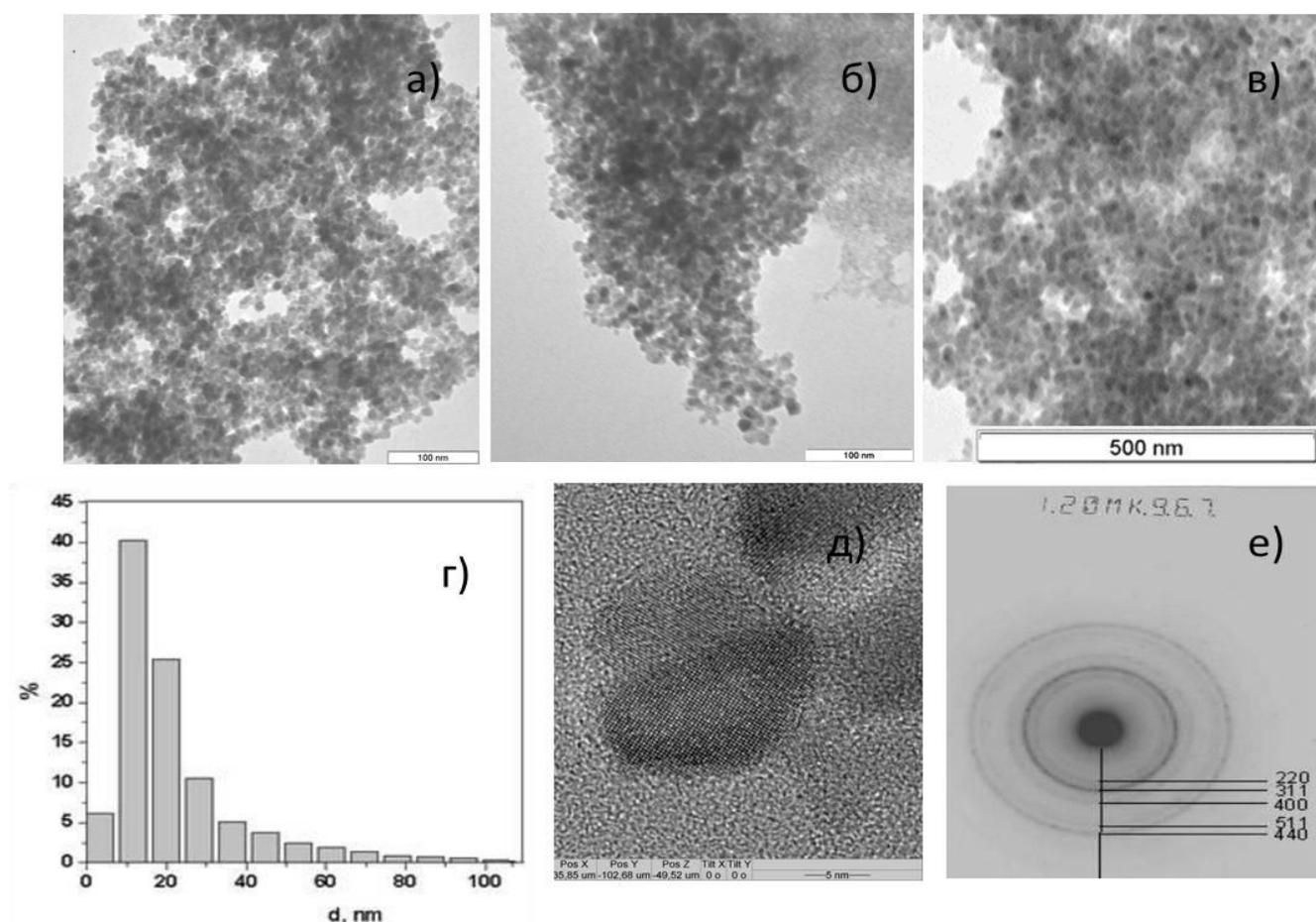


Рисунок 1 – Электронные микрофотографии наночастиц Fe₃O₄ (а), «Fe₃O₄-хитозан» (б), «Fe₃O₄-SiO₂-NH₂» (в), гистограмма распределения по размерам (г), дифракционная картина кристаллической решетки (д), и электронограмма (е) наночастиц Fe₃O₄

На микрофотографиях видны отдельные сферические образования нанометровых размеров (рисунок 1а-в), агрегированные в более крупные структуры. Массивные аморфные, менее плотные включения, окружающие наночастицы (рисунок 1б)

соответствуют полимерному покрытию хитозаном. На рисунке 1 (в) более светлые «галло» вокруг наночастиц представляют собой равномерное полимерное покрытие. При большем увеличении (рисунок 1 д) видна дифракционная решетка, характерная для кристаллической структуры Fe_3O_4 . Согласно гистограмме в суспензии наблюдается полидисперсность, однако максимум распределения по размерам приходится на величину 10 нм.

2. Получение прямого электрохимического отклика от наночастиц магнетита в апротонной среде. Выбор аналитического сигнала

Проведение исследований в ацетонитриле позволило расширить рабочий диапазон потенциалов и получить прямой электрохимический отклик от наночастиц Fe_3O_4 . На рисунке 2 приведены анодно-катодные вольтамперограммы, полученные на платиновом электроде, модифицированном наночастицами магнетита и предварительно восстановленном при потенциалах -2,5 В и -1,3 В соответственно.

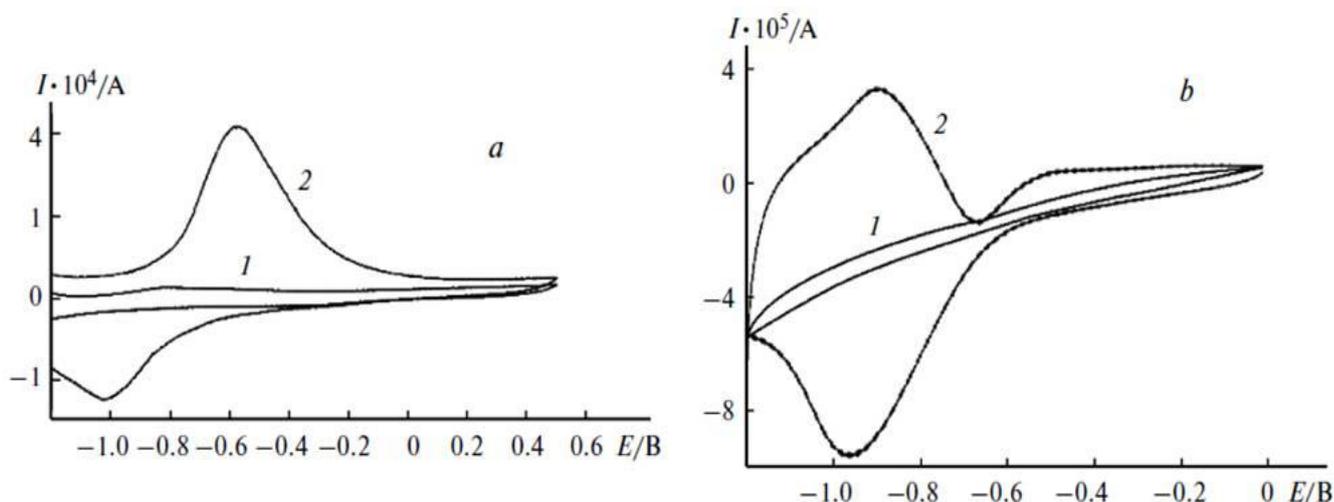


Рисунок 2 – ВА на Pt эл-де, без НЧ (1) и с НЧ Fe_3O_4 (2). $E_{\text{эл}} = -2,5$ В (а) и $-1,3$ В (б). $v_{\text{скан}} = 50$ мВ/с, $t_{\text{эл}} = 60$ с. $C_{\text{НЧ}} = 0,1$ г/л. Фоновый электролит 0,1 М LiClO_4 в CH_3CN .

Полученные анодные сигналы различаются как по положению потенциала пика, так и по величине максимального тока. Электрохимические сигналы на катодной ветви вольтамперограммы практически идентичны. По-видимому, катодные процессы протекают одинаково независимо от потенциала предварительного электролиза.

Интерес представляет определение возможных механизмов окислительно-восстановительных (ОВ) превращений наночастиц магнетита в апротонных условиях. В

таблице 1 приведены результаты расчета количества электронов, принимающих участие в исследуемых ОВ процессах, согласно теории электрохимического растворения металла с поверхности индифферентного электрода (Брайнина, Х.З. Инверсионная вольтамперометрия твёрдых фаз. М. : Химия, 1972. – 192 с.).

Таблица 1 - Результаты расчета количества электронов, участвующих в электрохимическом окислении продуктов предварительно восстановленных наночастиц Fe_3O_4

Потенциал пика, В	Количество электронов
Предварительный электролиз при -2,5 В	
$E_{pa} = -0,59$	3
Предварительный электролиз при -1,3 В	
$E_{pa1} = -0,85$	2
$E_{pa2} = -0,5$	1

Из таблицы видно, что окисление продуктов предварительного восстановления наночастиц магнетита в обоих случаях протекает с переносом трех электронов. Однако, в первом случае имеет место одностадийный трехэлектронный перенос, а во втором – наличие двух стадий окисления с последовательным переносом двух и еще одного электрона соответственно.

Полученные методом хронопотенциометрии результаты (рисунок 3) также позволяют представить одностадийность окисления продуктов предварительно восстановленных наночастиц при потенциале -2,5 В и наличие двух стадий при окислении продуктов предварительно восстановленных наночастиц Fe_3O_4 на поверхности рабочего электрода при потенциале -1,3 В.

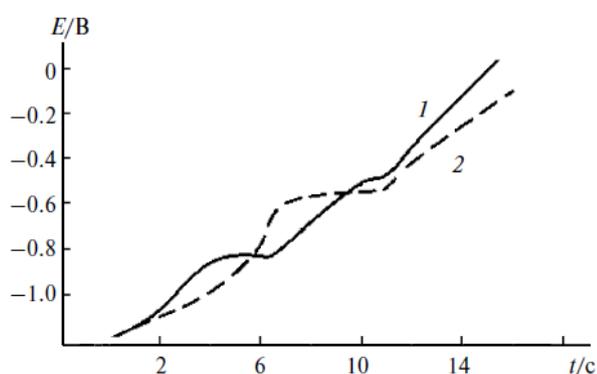


Рисунок 3 - Хронопотенциограммы окисления продуктов, предварительно восстановленных наночастиц Fe_3O_4 при потенциалах -1.3 В (1) и -2.5 В (2)

Таким образом, согласно результатам проведенных исследований, можно представить следующую вероятную схему протекания ОВ превращений наночастиц магнетита в апротонных условиях:



Различия в протекании процессов окисления, по-видимому, обусловлены тем, что при потенциале предварительного электролиза -2,5 В происходит более полное восстановление Fe_3O_4 до Fe^0 , а при потенциале электролиза -1,3 В в приэлектродном слое присутствуют оксидные формы железа. В связи с этим, в качестве сигналообразующей реакции в дальнейших исследованиях выбран процесс окисления продуктов предварительного восстановления наночастиц на поверхности рабочего электрода при потенциале -2,5 В.

Влияние природы фонового электролита и протонирования среды на характер исследуемых ОВ процессов определяли, регистрируя электрохимический отклик от наночастиц в ячейке, содержащей в качестве фоновых электролитов 0,1 М растворы NH_4PF_6 , Bu_4NBF_4 и LiClO_4 в ацетонитриле (рисунок 4 а) и несколько добавок бензойной кислоты (рисунок 4 б).

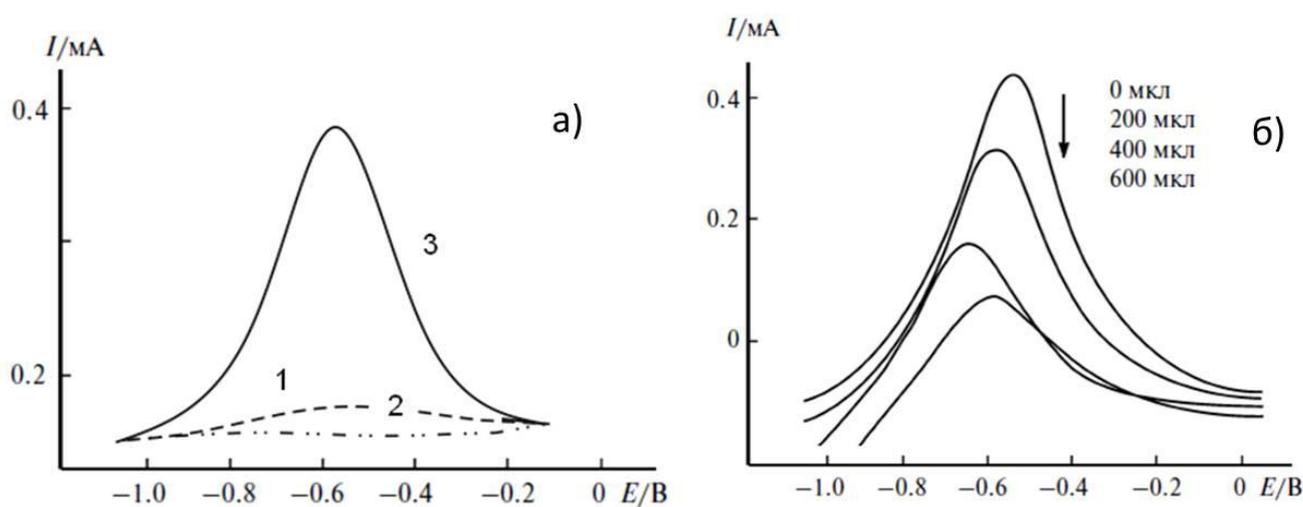


Рисунок 4 – ВА на Pt электроде, модифицированном наночастицами Fe_3O_4 при $E_{\text{эл}} = -2,5$ В: а) Фоновый электролит: 0,1 М р-р NH_4PF_6 (1), Bu_4NBF_4 (2), LiClO_4 (3) в CH_3CN . б) $C_{\text{бенз. к-ты}} = 0,01$ М. $V_{\text{ячейки}} = 10$ мл.

Из рисунка видно, что присутствие в фоновом электролите ионов лития способствует электрохимическим превращениям наночастиц Fe_3O_4 в апротонной среде

в заданных условиях. Вероятно, это связано с образованием промежуточных интерметаллических соединений железа и лития на поверхности рабочего электрода. Протонирование фонового электролита, напротив, затрудняет протекание электропревращений наночастиц магнетита. По-видимому, в данных условиях на поверхности рабочего электрода преимущественно протекает электролиз протонов из фонового электролита, а не процесс восстановления магнетита, вследствие существенных различий величин электрохимического перенапряжения.

Кроме того, были выбраны следующие оптимальные условия детектирования прямого электрохимического отклика от наночастиц магнетита: продолжительность предварительного электролиза ($t_{эл}=60$ с) и скорость развертки потенциала ($v_{скан}=0,5$ В/с).

В качестве основы для разработки бесферментных электрохимических иммуносенсоров первоначально были выбраны 4 типа планарных электродов (рисунок 5).

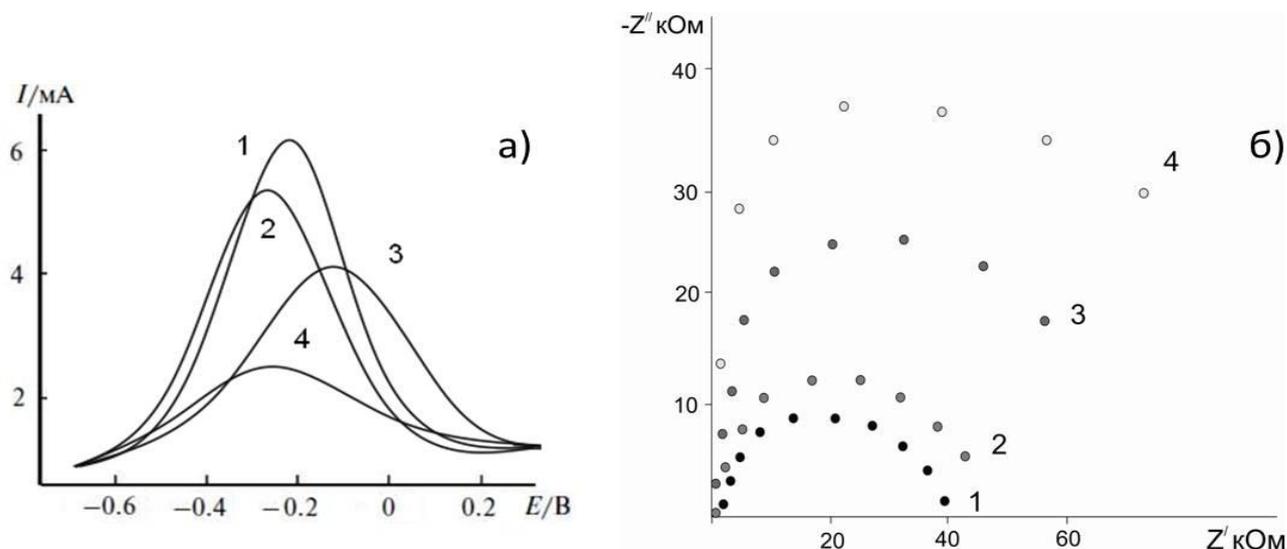


Рисунок 5 – ВА (а) и диаграммы Найквиста (б), полученные с использованием планарных электродов четырех типов. $E_{эл} = 2,5$ В, $t = 60$ с, $v = 0,5$ В/с.

Фоновый электролит 0,1 М LiClO_4 в CH_3CN (а) и 0,01 М р-р ферроцена в CH_3CN (б).

1 – планарный Pt эл-д, 2 – ТГЭ с Al токоподводом, 3 – ТГЭ с токоподводом из Ag пасты, 4 – чернильный эл-д.

Из рисунка видно, что при увеличении сопротивления переноса заряда в ряду 1-4 происходит уменьшение электрохимического отклика от метки, локализованной на

поверхности индикаторного электрода. Поэтому, в дальнейших исследованиях в качестве рабочего электрода использовали планарный платиновый электрод (тип 1).

С целью облегчения проникновения Fe_3O_4 в мембрану бактериальной клетки, поверхность наночастиц модифицировали хитозаном (в случае определения бактерий *E. coli*) и 3-аминопропилтриэтоксисиланом (в случае определения бактерий *St. aureus*). Выбор модифицирующих агентов обусловлен особенностями строения клеточных мембран детектируемых бактерий.

Исследовали влияние покрытия наночастиц на характер их электропревращений в апротонной среде (рисунок 6). Зарегистрированные вольтамперограммы практически идентичны по величине анодного тока. Небольшой сдвиг потенциала пика в анодную область может быть обусловлен влиянием полярного полимерного покрытия, которое облегчает процесс окисления наночастиц Fe_3O_4 . Следовательно, зарегистрированный анодный пик действительно соответствует процессу окисления продуктов предварительного восстановления наночастиц магнетита на поверхности платинового электрода.

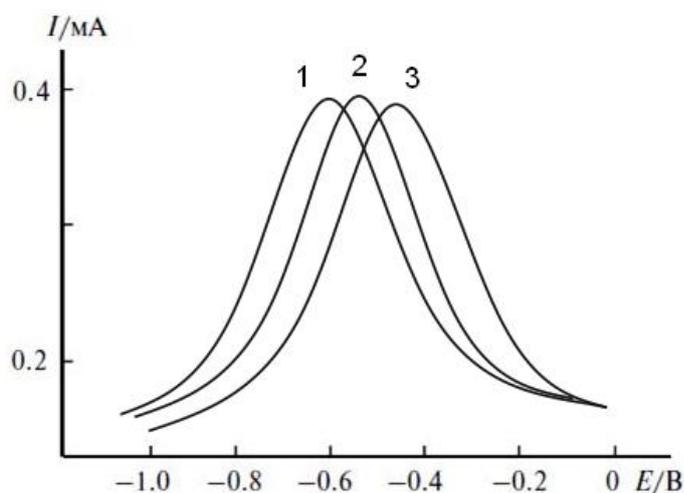


Рисунок 6 – ВА, на платиновом Pt электроде, модифицированном наночастицами Fe_3O_4 (1), Fe_3O_4 -хитозан (2) и Fe_3O_4 - SiO_2 - NH_2 (3). $E_{\text{эл}} = -2,5$ В. $v_{\text{скан}} = 50$ мВ/с, $t_{\text{эл}} = 60$ с. $C_{\text{НЧ}} = 0,1$ г/л. Фоновый электролит 0,1 М LiClO_4 в CH_3CN .

С использованием планарного платинового электрода и при выбранных оптимальных условиях формирования и детектирования прямого электрохимического отклика от наночастиц, была получена градуировочная зависимость величины количества электричества, затраченного на исследуемый анодный процесс от концентрации наночастиц в исходной модифицирующей суспензии $Q(\text{мКл}) = (3,91 \pm 0,23)C_{\text{магнетита}}(\text{г/л}) + (0,10 \pm 0,03)$. Полученная зависимость линейна в диапазоне концентраций наночастиц 0,05 – 0,5 г/л.

Исследования агрегативной устойчивости суспензий наночастиц Fe_3O_4 показали, что наиболее стабильными являются наночастицы магнетита, модифицированные

хитозаном. Видимые агрегаты не были обнаружены в течение 60 минут визуального наблюдения за суспензией с максимальной концентрацией наночастиц 0,4 г/л. Наночастицы « $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ » также устойчивы в концентрации 0,4 г/л, но в течение только 30 минут, что достаточно для проведения процедуры электрохимического иммуноанализа.

Таким образом, наночастицы Fe_3O_4 , модифицированные хитозаном и 3-аминопропилтриэтоксисиланом (с максимальной концентрацией наночастиц в исходной суспензии 0,4 г/л), могут быть использованы в качестве надежной сигналообразующей метки в электрохимическом иммуноанализе, способной генерировать прямой аналитический сигнал в апротонной среде.

3. Исследование процессов взаимодействия наночастиц с бактериальными клетками *Escherichia coli* ATCC 25992 и *Staphylococcus aureus* B-1266

Следующим этапом разработки бесферментных электрохимических иммуносенсоров являлось изучение кинетики взаимодействия *E. coli* и *St. aureus* с наночастицами « Fe_3O_4 -хитозан» и « $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ » соответственно (рисунок 7).

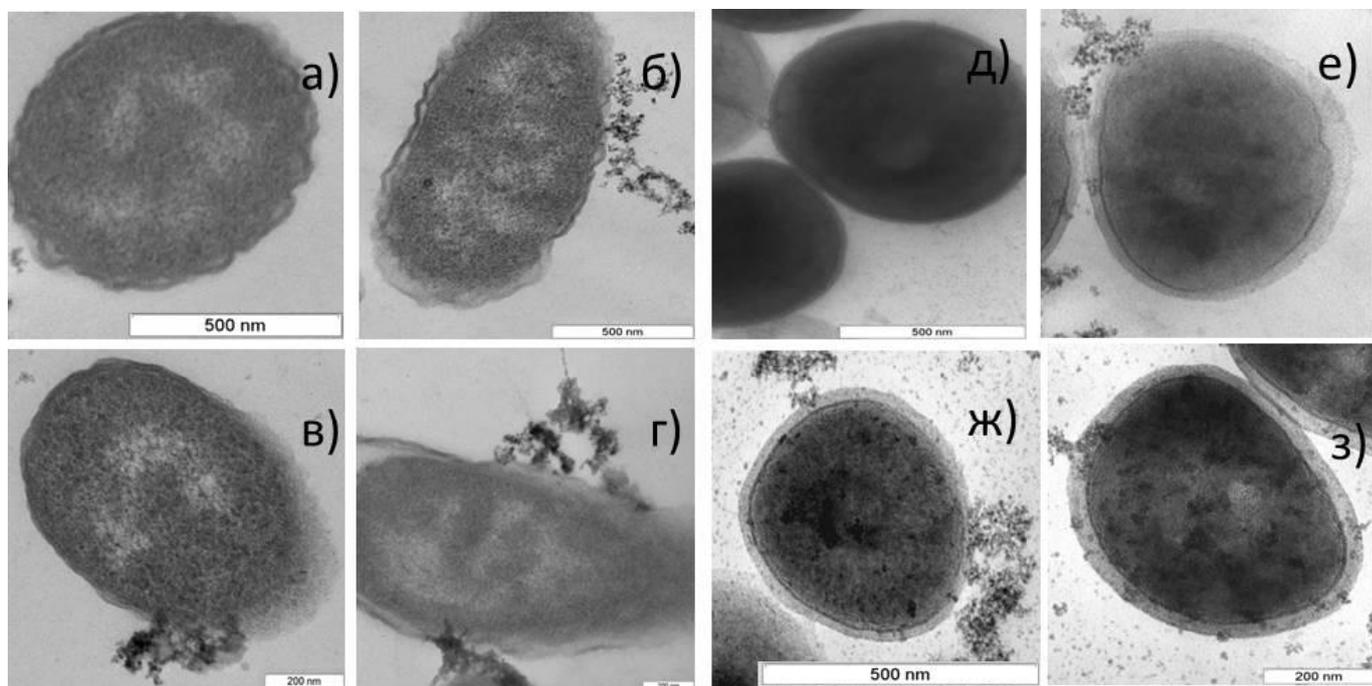


Рисунок 7– Электронные микрофотографии ультратонких срезов бактерий *E. coli* и *St. aureus* до (а, д) и после 10 (б, е), 20 (в, ж) и 30 (г, з) минут в взаимодействия с наночастицами « Fe_3O_4 -хитозан» и « $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ » соответственно

Проведенные эксперименты показали, что после 10 минут инкубирования в обоих случаях наночастицы находятся в межклеточном пространстве. После 20 минут инкубации наночастиц «Fe₃O₄-хитозан» с бактериями *E. coli* (рисунок 7 б) наблюдаются единичные проявления эндоцитоза. После 30 минут взаимодействия наночастиц «Fe₃O₄-хитозан» с бактериальными клетками *E. coli* (рисунок 7 в) наблюдается множественное выраженное проникновение во внешние слои мембраны бактериальной клетки. В случае инкубации наночастиц «Fe₃O₄-SiO₂-NH₂» с бактериями *St. aureus* в течение 20 минут имеют место множественные включения наночастиц в клеточную стенку бактерии. Наночастицы «встраиваются» в нее за счет ковалентного взаимодействия с поверхностными белками. В течение 30 минут единичные наночастицы проникают и во внутриклеточное пространство бактериальной клетки, что отрицательно влияет на формирование прямого аналитического сигнала.

Таким образом, наиболее выраженное взаимодействие наночастиц «Fe₃O₄-хитозан» с клетками *E. coli* наблюдается после 30 минут инкубирования, а для закрепления наночастиц «Fe₃O₄-3-аминопропилтриэтоксисилан» на поверхности бактериальной клетки *St. aureus* необходимо 20 минут инкубирования.

4. Разработка электрохимических иммуносенсоров для определения бактерий *Escherichia coli* ATCC 25992 и *Staphylococcus aureus* B-1266

4.1. Разработка алгоритма проведения электрохимического иммуноанализа

Предлагаемый алгоритм проведения электрохимического иммуноанализа с использованием в качестве прямой сигналообразующей метки наночастиц «Fe₃O₄-хитозан» и «Fe₃O₄-SiO₂-NH₂» для определения бактерий *E. coli* и *St. aureus* представлен на рисунке 8.



Рисунок 8 – Алгоритм проведения электрохимического иммуноанализа

На первой стадии (инкубация) в пробу, содержащую определяемые бактерии *E. coli* и *St. aureus*, помещали избыток наночастиц «Fe₃O₄-хитозан» и «Fe₃O₄-SiO₂-NH₂» в виде суспензии с концентрацией 0,4 г/л, после чего смесь выдерживали при температуре (37±0,1) °С в течение 30 и 20 минут соответственно.

На второй стадии проводили отделение несвязавшихся модифицированных наночастиц магнетита в течение 5 минут с использованием постоянного магнита с напряженностью магнитного поля 3·10⁴ А/м.

На третьей стадии в пробирку с исследуемой пробой помещали рабочий электрод с нанесенными на поверхность антителами, специфичными к определяемому штамму бактерий. Процедуру образования иммунокомплекса проводили при постоянной температуре (37±0,1) °С на магнитном штативе с напряженностью магнитного поля 31,83·10³ А/м.

На четвертой стадии рабочий электрод, содержащий на поверхности меченный иммунокомплекс, помещали в трехэлектродную ячейку, содержащую в качестве фонового электролита 0,1 М раствор LiClO₄ в ацетонитриле, и регистрировали прямой электрохимический отклик от наночастиц магнетита, включенных в иммунокомплекс на поверхности рабочего электрода.

4.2. Выбор способа иммобилизации антител на рабочей поверхности иммуносенсора

Важным этапом при разработке электрохимических иммуносенсоров является иммобилизация антител на поверхности рабочего электрода. В рамках данного исследования планарный платиновый электрод модифицировали антителами тремя различными способами: физическая иммобилизация на поверхности немодифицированного планарного платинового электрода (сенсор 1), иммобилизация на предварительно электроосажденную пленку золота (сенсор 2), иммобилизация на поверхность тиолированных углеродных нанотрубок, предварительно нанесенных на рабочую поверхность электрода (сенсор 3).

Получены линейные градуировочные зависимости величины аналитического сигнала наночастиц, включенных в иммунокомплекс на поверхности планарных платиновых электродов от концентрации бактерий *St. aureus* в модельных суспензиях (10 – 10⁴ КОЕ/мл):

Сенсор 1: $Q(\text{мКл}) = 0,124\text{LogC} - 0,055$;

Сенсор 2: $Q(\text{мКл}) = 0,084\text{LogC} - 0,030$;

Сенсор 3: $Q(\text{мКл}) = 0,027\text{LogC} - 0,015$.

Максимальная чувствительность электрохимического иммуносенсора наблюдается в случае применения сенсора 1 типа. В случае применения сенсоров 2 типа, также сохраняется достаточно высокая чувствительность определения. В случае применения сенсора тип 3 чувствительность определения заметно снижена. Это может быть обусловлено меньшим количеством иммобилизованных антител. Аналогичные результаты получены и в случае определения бактерий *Escherichia coli* ATCC 25992. Учитывая близкие по величине коэффициенты чувствительности и затраты на изготовление сенсоров, в качестве рабочего электрода был выбран планарный платиновый электрод, модифицированный антителами методом физической иммобилизации (сенсор 1).

4.3. Анализ содержания бактерий *Escherichia coli* ATCC 25992 и *Staphylococcus aureus* B-1266 в модельных суспензиях и реальных пробах

На основании проведенных исследований взаимодействия наночастиц с бактериальными клетками, с использованием предложенной процедуры электрохимического иммуноанализа и при выбранных оптимальных условиях анализа были исследованы модельные монокомпонентные суспензии, каждая из которых содержала только определяемые бактерии *E. coli* или *St. aureus*. Полученные градуировочные зависимости

$$Q(\text{мКл}) = (0,111 \pm 0,003) \cdot \lg C_{E.coli} + (0,053 \pm 0,009) \text{ и}$$

$$Q(\text{мКл}) = (0,136 \pm 0,002) \cdot \lg C_{St.aureus} + (0,086 \pm 0,008) \text{ линейны.}$$

Коэффициент чувствительности в случае определения *St. aureus* выше, чем для *E. coli*. Предел обнаружения электрохимического иммуносенсора в случае определения *E. coli* составляет 9,3 КОЕ/мл, в случае детектирования *St. aureus* – 8,7 КОЕ/мл. Таким образом, по показателю чувствительности электрохимические иммуносенсоры не уступают традиционно используемым в лабораторной практике методам определения бактерий. Воспроизводимость разработанных электрохимических иммуносенсоров оценивали путем количественного определения бактерий *E. coli* и *S. Aureus* в монокомпонентных модельных суспензиях (таблица 2).

Таблица 2 – Оценка воспроизводимости электрохимического иммуносенсора для определения бактерий *E. coli* и *St. aureus* (n=5, P=0,95)

Концентрация <i>E.coli</i> / <i>St. aureus</i> , КОЕ/мл	СО, %	Найдено <i>E.coli</i> / <i>St. aureus</i> , КОЕ/мл
10	9,7	10,90±1,31
	9,1	10,80±1,30
10 ²	8,1	(1,10±0,11)·10 ²
	8,3	(0,86±0,11)·10 ²
10 ³	5,8	(1,07±0,77)·10 ³
	7,8	(0,95±0,77)·10 ³
10 ⁴	4,3	(1,03±0,55)·10 ⁴
	6,3	(1,04±0,55)·10 ⁴
10 ⁵	3,6	(1,00±0,45)·10 ⁵
	4,6	(1,03±0,45)·10 ⁵

Величина относительного стандартного отклонения не превышает 10%, что указывает на удовлетворительную воспроизводимость полученных результатов.

С использованием разработанных алгоритмов электрохимического иммуноанализа и электрохимических иммуносенсоров, а также методами ИФА и бактериального посева в независимой лаборатории (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор») были проанализированы модельные смеси бактерий и реальные пробы (таблицы 3 и 4).

Таблица 3 – Результаты определения содержания бактерий *E. coli* в модельных смесях и реальных пробах (n=5, P=0,95, t_{кр}=2,67)

Объект	Обнаружено <i>E. coli</i> , КОЕ/мл			
	Электрохимический иммуносенсор	ИФА	Бактериальный посев	t _{эксп}
<i>E. coli</i> + <i>M. Flavus</i> (1:1)	(5,00±0,10)·10 ⁵	(5,01±0,10)·10 ⁵	~6·10 ⁵	0,18
<i>E.coli</i> + <i>B. licheniformis</i> (1:1)	(7,30±0,04)·10 ³	(7,04±0,50)·10 ³	~6·10 ³	1,37
<i>E. coli</i> + <i>S. infantis</i> (1:1)	(9,70±0,04)·10 ³	(1,02±0,40)·10 ⁴	~10 ⁴	1,42
Проба воды из природного водоема	(1,00±0,30)·10 ³	(1,03±0,71)·10 ³	~10 ³	1,23
Проба воздуха	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено	-

Таблица 4 – Результаты определения содержания бактерий *St. aureus* в модельных смесях ($n=5$, $P=0,95$, $t_{кр}=2,67$)

Состав смеси	Обнаружено <i>S. aureus</i> , КОЕ/мл			
	Электрохимический иммуносенсор	ИФА	Бактериальный посев	$t_{эксп}$
<i>S. aureus</i> + <i>E. coli</i> (1:1)	$(1,13 \pm 0,91) \cdot 10^3$	$(1,06 \pm 0,11) \cdot 10^3$	$\sim 10^3$	1,34
<i>S. aureus</i> + <i>E. coli</i> (1:10)	$(1,12 \pm 0,70) \cdot 10^3$	$(1,09 \pm 0,92) \cdot 10^3$	$\sim 10^3$	0,73
<i>S. aureus</i> + <i>E. coli</i> (10:1)	$(1,07 \pm 0,43) \cdot 10^4$	$(1,10 \pm 0,50) \cdot 10^4$	$\sim 10^4$	1,15
<i>S. aureus</i> + <i>E. coli</i> + <i>B. subtilis</i> (1:1:1)	$(1,04 \pm 0,38) \cdot 10^4$	$(1,05 \pm 0,53) \cdot 10^4$	$\sim 10^4$	0,28

Результаты определения бактерий *E. coli* и *St. aureus*, полученные с использованием разработанных электрохимических иммуносенсоров и в независимой лаборатории методами ИФА и бактериального посева, удовлетворительно коррелируют, что свидетельствует о правильности количественного определения бактерий.

ВЫВОДЫ

1. Методом соосаждения синтезированы наночастицы Fe_3O_4 , обладающие выраженными магнитными свойствами, используемые в качестве прямых сигналообразующих меток. Средний размер наночастиц составил 10 нм. Полученные наночастицы модифицированы хитозаном и 3-аминопропилтриэтоксисланом. Структура, состав, размеры и форма наночастиц подтверждены методами электронной микроскопии и ИК-спектроскопии.

Получен прямой электрохимический отклик от наночастиц магнетита в апротонной среде. Исследованы особенности процессов электропревращений наночастиц магнетита в апротонных растворах. Предложены схемы протекания исследуемых процессов: $Fe_3O_4 + n \cdot e^- \rightarrow (Fe^{n+}, Fe^0) - m \cdot e^- \rightarrow Fe^{2+}, Fe^{3+}$ ($n \leq 3$; $1 \leq m \leq 3$).

2. Выбран аналитический сигнал для дальнейшего использования в электрохимическом иммуноанализе и оптимальные условия его формирования (потенциал электролиза -2,5 В, время электролиза 60 с, скорость развертки потенциала 0,5 В/с). Получена линейная зависимость величины аналитического сигнала от

концентрации наночастиц в исходной модифицирующей суспензии в диапазоне концентраций 0,05-0,5 г/л: $Q(\text{мКл})=(3,91\pm 0,23)\cdot C_{\text{Fe}_3\text{O}_4}(\text{г/л}) + (0,10\pm 0,03)$.

3. Исследована кинетика процессов взаимодействия наночастиц « Fe_3O_4 -хитозан» и « Fe_3O_4 -3-аминопропилтриэтоксисилан» с бактериальными клетками *Escherichia coli* ATCC 25992 и *Staphylococcus aureus* В-1266 соответственно. Выбрано оптимальное время взаимодействия бактерий с наночастицами (30 минут в случае обнаружения *E. coli* и 20 минут в случае обнаружения *St. aureus*).

4. Получены линейные зависимости прямого аналитического сигнала наночастиц, включенных в иммунокомплекс от концентрации бактерий в модельных суспензиях: $Q(\text{мКл})=(0,111\pm 0,003)\cdot \lg C_{E.coli} + (0,053\pm 0,009)$,

$$Q(\text{мКл})=(0,136\pm 0,002)\cdot \lg C_{St.aureus} + (0,086\pm 0,008).$$

5. Разработаны бесферментные электрохимические иммуносенсоры с использованием в качестве прямой сигналообразующей метки наночастиц « Fe_3O_4 -хитозан» и « Fe_3O_4 -3-аминопропилтриэтоксисилан» для определения бактерий *Escherichia coli* ATCC 25992 и *Staphylococcus aureus* В-1266 в диапазоне $10 - 10^5$ КОЕ/мл. Предел обнаружения составил: для бактерий *Escherichia coli* ATCC 25992 – 9,3 КОЕ/мл, для бактерий *Staphylococcus aureus* В-1266 – 8,7 КОЕ/мл. Относительное стандартное отклонение не превышает 10%.

6. Точность определения бактерий в модельных суспензиях, и реальных пробах подтверждена методами ИФА и бактериального посева.

Автор выражает благодарность д. х. н., профессору заведующему кафедрой аналитической химии ХТИ УрФУ Матерну А. И.; коллективу ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» и лично д.т.н., Сафатову А. С.; коллективу отдела молодежной науки УрФУ и лично к. т. н., Корелину А. В. за содействие в организации и проведении исследований.

По семейным обстоятельствам прошу считать публикации **Митрофановой Т. С.** публикациями **Сваловой Т. С.**

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Статьи в журналах, входящих в базы цитирования Scopus и Web of science:

1. Kozitsina, A. A new enzyme-free electrochemical immunoassay for *Escherichia Coli* detection using magnetic nanoparticles / A. Kozitsina, **Т. Svalova**, N. Malysheva, Y. Glazyrina, A. Matern // Analytical letters. – 2016. - V. 49. – Is. 2. – P. 245-257 (1 п.л./0,3 п. л).

2. Козицина, А. Н. Исследования электрохимических превращений наночастиц Fe_3O_4 в апротонных средах / А. Н. Козицина, Т. С. Свалова, Ю. А. Глазырина, А. В. Иванова, А. И. Матерн // Изв. РАН. Серия химическая. – 2016. – №3. – С. 697-703 (0,7 п. л./0,15 п. л.).

Патенты РФ

3. Пат. 2538153 РФ. МПК C12N1/02, C12Q1/04, G01N33/00, B82B1/00 Электрохимический способ иммуноанализа для определения микроорганизмов / Козицина А. Н., Митрофанова Т. С. (Свалова Т. С.), Матерн А. И.; заявл. 22.03.2013; опубл. 20.02.2015, бюл. №1.

Материалы научных конференций

4. Gerasimova, E. L. A new enzyme-free electrochemical immunoassay for express detection of infectious species / E. L. Gerasimova, Y. A. Glazyrina, A. N. Kozitsina, N. N. Malysheva, T. S. Svalova, A. I. Matern // Materials of 7th International symposium on recent advances in food analysis. – Czech Republic, 2015. – P. 214 (0,12 п. л./0,07 п. л.).

5. Свалова, Т. С. Перспективы применения электрохимического иммуноанализа для определения бактериальных агентов / Т. С. Свалова, Ю. А. Глазырина, Н. Н. Малышева, И. А. Самкова, А. Н. Козицина // Тезисы I Всероссийской конференции с международным участием «Химический анализ и медицина». – Москва, 2015. – С. 52 (0,12 п. л./0,1 п. л.).

6. Gerasimova, E. L. Magnetite nanoparticles in an electrochemical immunoassay. New approaches to the bacteria agents detection / E. L. Gerasimova, T. S. Svalova, N. N. Malysheva, Y. A. Glazyrina, A. N. Kozitsina / Materials of the XVIII international conference «Euroanalysis 2015». – France, 2015. – P. 376 (0,12 п. л./0,1 п. л.).

7. Свалова, Т. С. Электрохимический иммуносенсор на основе наночастиц магнетита для определения грамотрицательных бактерий / Т. С. Свалова, Ю. А. Глазырина, А. И. Матерн, И. А. Самкова, А. Н. Козицина // «Химия и медицина» с молодежной научной школой: тезисы докладов X Всероссийской конференции. – Уфа-Абзаково, 2015. – С. 58-59 (0,12 п. л./0,1 п. л.).

8. Самкова, И. А. Перспективы применения наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ в качестве метки в электрохимическом иммуноанализе / И. А. Самкова, Т. С. Свалова, Н. Н. Малышева, Ю. А. Глазырина, А. Н. Козицина // Проблемы теоретической и

экспериментальной химии: тезисы докладов XXV Российской молодежной научной конференции. – Екатеринбург, 2015. – С 113-114 (0,12 п. л./0,07 п. л.).

9. Свалова, Т. С. Разработка электрохимического иммуносенсора для определения микроорганизмов *E. coli* на основе наночастиц магнетита в апротонных средах / **Т. С. Свалова**, Ю. А. Глазырина, А. Н. Козицина // Проблемы теоретической и экспериментальной химии: тезисы докладов XXIV Российской молодежной научной конференции. – Екатеринбург, 2014. – С 128-129 (0,12 п. л./0,1 п. л.).

10. Svalova, T. Electrochemical immunosensor for *E. coli* detection on the base of nanoparticles «Fe₃O₄-chitosan» / **T. Svalova**, Y. Glazyrina, A. Matern, A. Kozitsina // Materials of international conference Drug Analysis 2014. – Belgium, 2014. – P. 304 (0,12 п. л./0,1 п. л.).

11. Митрофанова, Т. С. Новые возможности в электрохимическом иммуноанализе с использованием наночастиц магнетита / **Т. С. Митрофанова (Т. С. Свалова)**, Ю. А. Глазырина, А. Н. Козицина, А. И. Матерн // Тезисы докладов Второго съезда аналитиков России. – Москва, 2013. – С. 78 (0,12 п. л./0,1 п. л.).

12. Митрофанова, Т. С. Перспективы использования наночастиц магнетита в электрохимическом иммуноанализе / **Т. С. Митрофанова (Т. С. Свалова)**, Ю. А. Глазырина, А. Н. Козицина, Н. А. Малахова, А. И. Матерн // Тезисы докладов IX всероссийской конференции «Химия и медицина» с молодежной научной школой по органической химии. – Уфа-Абзаково, 2013. – С. 231-232 (0,12 п. л./0,1 п. л.).

13. Митрофанова, Т. С. Исследование электрохимических превращений наночастиц магнетита в апротонных средах / **Т. С. Митрофанова (Т. С. Свалова)**, Ю. А. Глазырина, А. И. Матерн, А. В. Иванова, А. Н. Козицина // Материалы VIII Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа «ЭМА-2012». – Уфа-Абзаково, 2012. – С. 109 (0,12 п. л./0,08 п. л.).