

На правах рукописи



ТАРАСОВ СЕРГЕЙ ЕВГЕНЬЕВИЧ

**СВОЙСТВА БИОСЕНСОРОВ И МИКРОБНЫХ ТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ
ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ МЕТОДОМ ИМПЕДАНСНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ**

Специальность: 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пушино – 2018

Работа выполнена в Лаборатории биосенсоров Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН)

Научный руководитель:

Решетиллов Анатолий Николаевич, доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией биосенсоров ИБФМ РАН, г. Пущино

Официальные оппоненты:

Курочкин Илья Николаевич, доктор химических наук, профессор, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля Российской академии наук

Игнатов Сергей Георгиевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией нанобиотехнологии отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии

Ведущая организация:

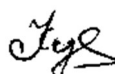
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН), г. Саратов

Защита состоится «__» _____ 2018 г. в _____ на заседании диссертационного совета Д 002.121.01 при ИБФМ РАН по адресу: 142290 Московская область, г. Пущино, проспект Науки, д.5.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ИБФМ РАН. Автореферат диссертации размещен на сайте <http://www.ibpm.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук



Т.В. Кулаковская

ОБЩЕЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Актуальность темы. Одним из приоритетных направлений развития современной биотехнологии является разработка аналитических и энергетических устройств на основе биоматериалов. К классу аналитических устройств на основе биоматериалов следует отнести биосенсоры, электроаналитические устройства, предназначенные для определения искомым соединений с помощью молекулярного распознавания (Turner, 2013). Класс энергетических систем представлен биотопливными элементами (БТЭ), генерирующими электрическую энергию с помощью реакций, проходящих с участием биокатализатора (Bullen et al., 2006). Их общей чертой является осуществление превращения химической энергии соединений в электрическую при помощи различных биокатализаторов.

Биосенсорные системы успешно применяются в клинической диагностике, промышленности, экологическом мониторинге и в различных областях биотехнологии. Задачи детекции некоторых соединений важны сразу для нескольких областей промышленности и биотехнологии. Обнаружение содержания органических соединений, включая спирты и углеводы, требуется для экологического мониторинга. В пищевой промышленности, например, в спиртопроизводстве, также необходимо иметь информацию о содержании глюкозы и этанола на каждой стадии технологического процесса. Кроме того, ферментные и микробные биосенсоры для определения глюкозы и этанола используются и в клинических исследованиях (Yoo and Lee, 2010). Наиболее важные направления их усовершенствования - сокращение времени анализа, миниатюризация и расширение области применения данных устройств. Одним из способов решения данных проблем является выбор подходящего электрохимического преобразователя.

К наиболее важным проблемам, стоящим перед человечеством, можно отнести грядущий дефицит источников энергии и проблему загрязнения антропогенными отходами окружающей среды. Данные проблемы являются взаимосвязанными, и одним из решений может стать разработка энергетических систем на основе биоматериалов, таких как БТЭ. Они осуществляют превращение химической энергии различных органических веществ в электрическую энергию в процессе биохимической трансформации (Liu et al., 2006). БТЭ привлекают внимание исследователей тем, что это один из наиболее доступных и экологически безопасных альтернативных источников энергии (Bullen, 2006), в качестве топлива для которого могут быть использованы отходы промышленных производств. Другое потенциальное применение БТЭ – источник питания для устройств низкой мощности, в том числе и для имплантируемых в организм животных и человека.

Метод электрохимической импедансной спектроскопии (ЭИС) применяется в качестве информативного рабочего инструмента при анализе гетерогенных систем в физике, электрохимии и материаловедении. Биологические объекты зачастую можно рассматривать именно как гетерогенные системы, близкие по свойствам к эмульсиям или суспензиям. Поэтому в последние 10 лет метод ЭИС начал привлекать внимание биологов и использоваться при изучении живых

организмов. Применение импедансометрических преобразователей в биосенсорах может помочь расширить диапазоны определяемых концентраций для исследуемых веществ, повысить селективность устройств, увеличить срок службы биоматериала в биосенсорах и преодолеть другие существующие недостатки электрохимических биосенсоров. В настоящее время в литературе описано лишь несколько импедансометрических сенсоров для определения глюкозы (Rahman et al., 2010), а импедансометрических сенсоров для определения спиртов в литературе не описано. Адаптация технологии трафаретной печати для нужд биосенсорного анализа позволила создавать коммерчески доступные одноразовые датчики, при создании которых биологический компонент наносится прямо на поверхность электрода при производстве. Использование подобных печатных электродов в сочетании с методом импедансной спектроскопии позволит создать новые биосенсоры для определения глюкозы и спиртов, которые смогут найти свое применение в различных областях промышленности и лабораторного анализа.

Метод ЭИС в последние годы становится важным дополнением при изучении свойств БТЭ. Он применяется для изучения вклада отдельных компонентов топливных элементов в общую производительность устройства. Использование метода ЭИС для изучения характеристик процессов переноса заряда в микробных БТЭ имеет свои особенности, связанные со сложностью изучаемой системы. На общую производительность элемента влияет вид биоматериала, природа субстрата и медиатора электронного транспорта, материал электродов и конструкционные особенности реакторы. К тому же в последнее время всё большую роль в производстве БТЭ играют нанотехнологии и выбор подходящего наноматериала для модификации электродов (Zhao et al., 2017).

В данной работе рассмотрено применение метода ЭИС для изучения влияния углеродных наноматериалов и метода иммобилизации микробных клеток на свойства биоэлектродов БТЭ. Поскольку метод ЭИС применяется для анализа изменения импеданса любых биологических систем, было исследовано применение ЭИС для изучения процесса разрушения бактериальных клеток. Полученные данные использованы для разработки потенциально имплантируемых микробных БТЭ и для оценки возможности использования метода конвертерного накопления электроэнергии от БТЭ для питания микроэлектронных устройств малой мощности.

Целью данной работы является изучение свойств систем на основе микробных клеток и их фрагментов при использовании в составе биосенсоров и биотопливных элементов методом электрохимической импедансной спектроскопии. Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Создать лабораторные модели и исследовать параметры импедансометрических биосенсоров на основе ферментов и целых клеток микроорганизмов для детекции глюкозы и этанола.

2. С помощью ЭИС проанализировать особенности изменения характеристик микробных топливных элементов при модификации биоанодов наноматериалами и предложить способы повышения их мощности.

3. Применить метод ЭИС как альтернативный электрохимический метод регистрации разрушения бактериальных клеток ферментным препаратом – лизоамидазой, а также регистрации электропорации мембран дрожжей.

4. Исследовать характеристики функционирования модифицированных биотопливных элементов при конвертерном накоплении электроэнергии, а также при имплантации разработанных микробных БТЭ в живой организм.

Научная новизна. Разработаны ферментные и микробные импедансометрические биосенсоры для определения глюкозы и этанола на базе печатных графитовых электродов.

Впервые для штамма бактерий *Gluconobacter* проведено исследование влияния свойств нанокompозита «углеродный материал – бактерии – наноматериал – гель-матрица» на электрохимические свойства биоанодов микробного БТЭ.

Выполнена оценка эффективности применения метода импедансной спектроскопии для описания процессов разрушения клеток под действием лизирующего препарата лизоамидазы и электропорации клеточных мембран дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Впервые для микробного БТЭ, модифицированного углеродными нанотрубками, показано значительное увеличение эффективности работы конвертерного преобразователя напряжения. Впервые описан способ получения электроэнергии с помощью микробного БТЭ, основанного на электродах из наноматериала, имплантированного в организм живого земноводного травяной лягушки *Rana temporaria* за счет окисления эндогенного субстрата (глюкозы).

Практическая значимость работы. Предложены новые варианты импедансометрических биосенсоров на основе ферментов и целых микробных клеток для определения глюкозы и этанола. Биосенсоры созданы на коммерчески доступных печатных графитовых электродах для экологического мониторинга, пищевой промышленности или клинических исследований.

Разработана методика введения наноматериалов в полимерные гели на поверхности биоэлектрода, что позволило увеличить мощность микробных БТЭ на 40% при использовании функционализированных углеродных нанотрубок и оксида графена по сравнению с элементами, использующими стандартные графитовые электроды. Исследование свойств углеродных высокодисперсных материалов на основе полиакрилонитрила показало возможность использования данного класса материалов с управляемыми параметрами для создания электродов с для микробных биосенсоров и БТЭ и эффективность создания механически гибких электродов.

Разработана модельная система для оценки конвертерного накопления электроэнергии от микробных топливных элементов, которая может быть применена в практическом внедрении технологий повышения напряжений постоянного тока от устройств малой мощности типа БТЭ. Работа по встраиванию микробного БТЭ в организм травяной лягушки может быть использована как база для дальнейших исследований имплантируемых БТЭ, топливом для которых служат эндогенные субстраты. Получен патент РФ на изобретение RU2599421 «Способ получения электрической энергии с помощью

микробного биотопливного элемента, имплантированного в организм живой травяной лягушки *Rana Temporaria*».

Личный вклад автора. Все исследования с использованием методов хроноамперометрии, хронопотенциометрии, циклической вольтамперометрии и электрохимической импедансной спектроскопии выполнялись автором лично. Соискатель принимал непосредственное участие в интерпретации, обсуждении и публикации полученных результатов.

Электронно-микроскопические исследования проводились совместно с к.ф.-м.н. Колесовым В.В. (Лаборатория физических свойств нанокompозитных материалов для информационных технологий и телекоммуникационных систем Института радиотехники и электроники РАН, г. Москва), с к.б.н. Мачулиным А.В. (лаборатория цитологии микроорганизмов, ИБФМ РАН, г. Пущино).

Разработка ферментного биосенсора для определения глюкозы проводилась совместно с д.х.н. Емцом В.В. (Лаборатория межфазных границ и электрокатализа, Институт физической химии и электрохимии РАН, г. Москва).

Имплантация микробного БТЭ в организм травяной лягушки проводилась совместно с к.б.н. Утешевым В.К. (Лаборатория криобиологии и биофизики воды, Институт биофизики клетки РАН, г. Пущино).

Место проведения работы и благодарности. Работа выполнена в лаборатории биосенсоров ФГБУН Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН). Выражаю искреннюю благодарность научному руководителю д.х.н., профессору Решетилу А.Н. за руководство и неоценимую помощь на всех этапах работы, а также всему коллективу лаборатории биосенсоров за полезные советы и поддержку при написании диссертации. Отдельную признательность выражаю к.б.н. Плехановой Ю.В. за постоянное внимание и активное обсуждение результатов. Также выражаю благодарность Гуторову М.А. (ООО «ГАММА») за предоставление использованного в исследовании оборудования, д.х.н. Емцу В.В. за помощь в овладении методом импедансной спектроскопии, к.б.н. Васильевой Н.В. и к.б.н. Валиахметову А.Я. (ИБФМ РАН) за помощь и обсуждение ряда полученных результатов.

Апробация работы и публикации. Материалы диссертации были представлены на конференциях: XII Международная научная конференция «Физика и радиоэлектроника в медицине и экологии» с элементами научной молодежной сессии. (Владимир – Суздаль, Россия, 4-7 июля 2016); Международная дистанционная научная конференция «Современная наука: актуальные проблемы и пути их решения» (Липецк, Россия, 20-21 февраля 2014); I, II и III Пущинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (Пущино, Россия, 2014, 2015, 2016); II Всероссийский семинар памяти профессора Ю.П. Волкова «Современные проблемы биофизики, генетики, электроники и приборостроения» (Саратов, Россия, 16-18 декабря 2015); Международная научно-техническая конференция «Системы контроля окружающей среды – 2016» (Севастополь, 24–27 октября 2016); Всероссийские конференции с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология-2014» (Тула, 2-3 октября 2014) и «Экотоксикология-2016» (Тула, 11-12 октября

2016); Научно-практическая конференция с международным участием «Экологическая, промышленная и энергетическая безопасность – 2017»; (Севастополь, 11–15 сентября 2017); I Российский микробиологический конгресс (Пушино, Россия, 17-18 октября 2017). Присуждена премия им. Г.К. Скрыбина (2015 г.). По материалам диссертации опубликовано 25 печатных работ, в том числе 7 статей (6 статей в рецензируемых журналах из списка ВАК), 17 тезисов, 1 патент на изобретение.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Результатов исследования и их обсуждения, Заключение, Выводов и Списка литературы. Работа изложена на 150 страницах, содержит 32 таблицы и 54 рисунка. Библиографический указатель содержит 251 источник литературы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы включает в себя описание и классификацию биоэлектрoхимических устройств, особенности использования микроорганизмов в качестве биоматериала, применение наноматериалов в биосенсорах и биотопливных элементах, а также теоретические основы импедансной спектроскопии и варианты её применения для изучения биологических объектов и электрoхимических систем на их основе.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В работе в качестве ферментных препаратов использовали глюкозооксидазу из *Aspergillus niger*, пероксидазу хрена, алкогольоксидазу из *Pichia Pastoris* (Sigma-Aldrich, США); препарат ферментного комплекса лизоамидаза был выделен из культуральной жидкости *Lysobacter sp.* XL1 в лаборатории биохимии клеточной поверхности микроорганизмов ИБФМ РАН. В работе использовали штаммы *Gluconobacter oxydans* sbsp. *industrius* ВКМ В-1280, *Staphylococcus aureus* 209Р, *Micrococcus luteus* В1819 и *Saccharomyces cerevisiae* ВКМ Y-1173 из Всероссийской коллекции микроорганизмов.

Разрушение бактерий ультразвуком. Для получения мембранных фракций *G. oxydans* клетки разрушали с использованием ультразвукового диспергатора УЗД11-0,1/22 в натрий-фосфатном буфере (рН 6,5). Время обработки ультразвуком составляло 2 минуты при подаваемой мощности 100 Вт, рабочей частоте 22 кГц. Полученный лизат центрифугировали при 4000 об/мин в течение 25 мин.

Электропорация мембран дрожжевых клеток. Электропорацию клеток *Saccharomyces cerevisiae* проводилась с помощью портативного электропоратора MicroPulser™ (Bio-RAD, США). Объем ячейки составлял 200 мкл. Температуру суспензии клеток поддерживали на уровне 4 °С, время воздействия составляло 5 мс, напряжение – 2500 В.

Иммобилизация биоматериала на поверхности печатных электродов. Иммобилизацию ферментов и микробных клеток осуществляли методом включения в гель хитозана. Использовали 2%-ный раствор хитозана (х.ч.) в 1 %-

ной уксусной кислоте. На поверхность рабочего графитового электрода наносили смесь биоматериала и хитозана объемом 5 мкл. Электроды высушивали в течение часа при комнатной температуре. Полученные электроды перед использованием промывали в фосфатном буферном растворе (рН 6,5, 25 мМ) в течение 5 мин.

Получение электродов с берлинской лазурью. Осаждение берлинской лазури (БЛ) на поверхность электродов проводили из реакционной смеси состава: 0,1 М FeCl₃ и 0,1 М K₃[Fe(CN)₆] в фоновом электролите 0,1 М KCl, 0,1 М HCl. Смесь наносили на рабочий электрод, через 15 мин добавляли пероксид водорода до достижения концентрации 100 мМ в капле, а через 45 минут проводили активацию электрода методом циклической вольтамперометрии (Karyakin et al., 1994). Затем электроды прокачивали при 100°C в течение часа и охлаждали до комнатной температуры.

Электрохимические измерения. Все импедансные и вольтамперные измерения проводили с помощью потенциостата/гальваностата «VersaSTAT 4» с модулем FRA (Princeton Applied Research, США), обеспечивающим возможность работать в различных вариантах вольтамперометрии и электрохимической импедансной спектроскопии. Измерения по двухэлектродной схеме проводили в ячейке биотопливного элемента, представляющей собой две взаимосвязанные кюветы, объём анодного отделения был равен объему катодного и составлял 5 мл. В качестве катода использовали чистый спектральный графитовый электрод (СГЭ). Кюветы разделяли протонселективной мембраной МФ-4СК («Пластполимер», Санкт-Петербург, Россия), являющейся аналогом мембраны Nafion 117. Измерения по трехэлектродной схеме проводили в ячейке объемом 5 мл. Электродом сравнения являлся насыщенный хлорсеребряный электрод; вспомогательным электродом - платиновая пластина площадью 10 мм².

Печатные электроды. В качестве основы биосенсоров использовали печатные графитовые электроды (рис. 1) производства ООО «КолорЭлектроникс» (Москва, Россия). Вспомогательный электрод был также изготовлен из углеродной пасты. Электрод сравнения был изготовлен из пасты Ag/AgCl. Печатные золотые электроды марки DRP-220AT (DropSens, Испания) использовали при изучении лизиса клеток. В печатных золотых электродах рабочий и вспомогательный электроды были изготовлены из золота, электрод сравнения – из серебра. Измерения проводили в ячейке объемом 200 мкл, образованной над поверхностью печатного электрода.

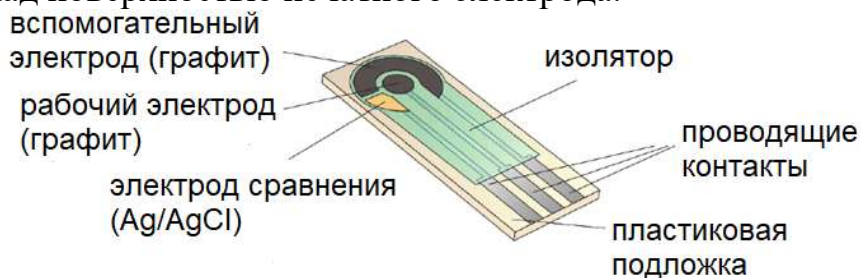


Рис. 1. Внешний вид печатных графитовых электродов, использованных в работе

Получение углеродных высокодисперсных материалов. Углеродные высокодисперсные материалы были получены на основе коммерческого

волокнистого материала, предоставленного ООО «Ниагара» путем термической обработки при температурах от 200 до 1200 °С в НИЦ «Курчатовский институт». Для получения нетканых волокнистых материалов в электрическом поле использовали полианилин (молекулярная масса $M_w = 3,7 \cdot 10^5$).

Формирование рабочих электродов БТЭ. Основой рабочего электрода (анода) являлся графитовый электрод спектральной чистоты (СГЭ) в виде цилиндра высотой 2 мм и радиусом 3 мм. Для приготовления биокатализатора использовали смесь суспензии бактериальных клеток (1 мг сырого веса/мкл) и полимера (хитозан, поливиниловый спирт или поливиниловый спирт, модифицированный N-винилпирролидоном), в объемном соотношении 2:1 или 1:5. Полученную смесь наносили на анод и подсушивали при комнатной температуре, концентрация клеток на поверхности электрода составляла 0,12 мг сырого веса/мм². При необходимости в данную смесь перед нанесением вносили определенное количество наноматериала. Схема иммобилизации бактериальных клеток и наноматериалов на поверхность электрода представлена на рис. 2.

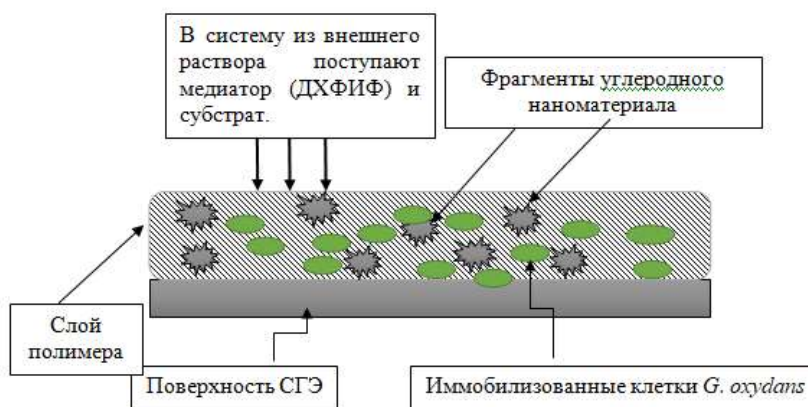


Рис. 2. Схема иммобилизации бактериальных клеток и углеродных наноматериалов на поверхности СГЭ.

Измерение дыхательной активности клеток. Измерения проводили на потенциостате IPC-2L («Кронас», Россия) с использованием кислородного электрода типа Кларка. В качестве несущей основы рецепторного элемента использовали хроматографическую стеклобумагу GF/A (Whatman, Великобритания).

Регистрация импедансных характеристик БТЭ. Использовали диапазон частот от 40 кГц до 0.1Гц при амплитуде напряжения в 10 мВ. В качестве базовой схемы для описания процессов в анодном и катодном отделениях биотопливного элемента использовали стандартную схему Рэндлса. Импедансные спектры обрабатывались с помощью специализированного ПО ZSimpWin (Princeton Applied Research, США).

Конвертерное накопление электричества от микробных БТЭ. Накопление производили с помощью конвертера на основе микросхемы BQ25504 (Texas Instruments), производящей трансформацию постоянного тока. Режим накопления исследовали, используя конденсаторы емкостью 1000 и 6800 мкФ, а также ионистор емкостью 1 Ф.

Встраивание микробного БТЭ в организм травяной лягушки. В качестве анода использовали электроды, приготовленные из терморасширенного графита.

Размер электродов составлял $\sim 8 \times 5 \times 0,5$ мм³. Генерация разности потенциалов начиналась сразу же после введения электродов в животное, для чего регистрацию электрического сигнала производили постоянно. Как водонерастворимый медиатор был выбран диметилферроцен, исключаяющий попадание токсичного соединения в организм животного. Исследование проводили с использованием травяной лягушки *Rana temporaria*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Создание импедансометрических биосенсоров.

В данном разделе рассматриваются параметры созданных микробных и ферментных биосенсоров с импедансометрическим преобразователем. Данные биосенсоры могут использоваться как альтернатива существующим электрохимическим биосенсорам для определения глюкозы и спиртов.

1.1. Биосенсоры на основе глюкозооксидазы

В литературе описано множество типов биосенсоров для определения глюкозы, однако нам встретилась лишь одна публикация, в которой представлен биосенсор, основанный на импедансометрическом преобразователе. В описанном устройстве были использованы дорогостоящие материалы и длительная пробоподготовка, поэтому нашей задачей было создание дешевого и доступного биосенсора. В качестве основы биосенсора использовали глюкозооксидазу (ГО), которая обладает абсолютной специфичностью по отношению к β -D-глюкозе и катализирует реакцию ее окисления с выделением пероксида водорода. Рабочий потенциал биосенсоров был выбран на основании изучения анодных пиков циклических вольтамперных характеристик, и составлял 280 мВ для бензохинона (БХ), 400 мВ для гексацианоферрата калия (III), 300 мВ для гексацианоферрата калия (II) и 200 мВ для 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ).

В качестве эквивалентной электрической схемы, описывающей опытные образцы, использовали модифицированную схему Рэндлса, в которой емкость двойного слоя была заменена на элемент постоянной фазы (CPE) (рис. 3 а). В системе с использованием ДХФИФ наблюдались диффузионные ограничения, и для описания системы использовали схему, представленную на рис. 3 б.

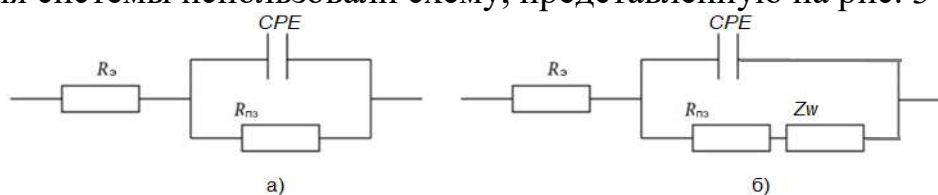


Рис. 3. Эквивалентные схемы, используемые для характеристики биосенсоров на основе БХ, гексацианоферрата калия (II) и гексацианоферрата калия (III) (а); и на основе ДХФИФ (б). R_e – сопротивление электролита, CPE – элемент постоянной фазы, R_{ct} – сопротивление переноса заряда, Z_w – элемент Варбурга.

Диаграммы Найквиста для биосенсора на основе ДХФИФ представлены на рис. 4. Характерные изгибы диаграмм в области низких частот сигнализируют о наличии в системе диффузионных ограничений, не наблюдавшихся при использовании других медиаторов.

После вычисления оптимальных эквивалентных схем для каждой системы произвели выбор значимого параметра биосенсора. Все три основных параметра схемы ($R_{Э}$, CPE и $R_{ПЗ}$) изменялись при добавлении субстрата к системе. В качестве характеристики активности биосенсора была выбрана калибровочная зависимость величины, обратной сопротивлению переноса заряда, от концентрации глюкозы. Значение сопротивления переноса заряда обратно пропорционально концентрации глюкозы в системе, и это значение уменьшается при добавлении новых порций глюкозы в ячейку.

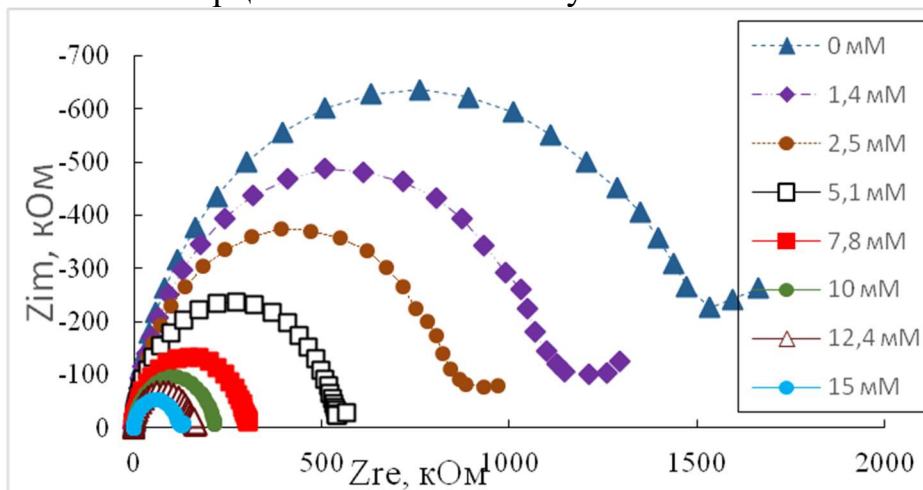


Рис. 4. Диаграммы Найквиста биосенсора на основе ГО, иммобилизованной в хитозан, в буферном растворе в присутствии ДХФИФ; $E=+0.200$; интервал частот: от 40кГц до 100мГц.

Ключевые параметры разработанных биосенсоров представлены в табл. 1. В качестве контрольного биосенсора использовался амперометрический биосенсор, основанный на базе тех же графитовых печатных электродов с добавлением берлинской лазури (БЛ). Амперометрический биосенсор позволял определять более низкие концентрации глюкозы, однако он обладал более узким линейным диапазоном детекции (0,02-3 мМ).

Таблица 1. Параметры калибровочных зависимостей для глюкозы при использовании четырех медиаторов электронного транспорта.

Использованный медиатор	Линейный диапазон детекции, мМ	Чувствительность, $1/\text{мМ} \cdot \text{кОм}$	Стабильность при хранении
Гексацианоферрат калия (III)	1,0-12,0	$5,0 \times 10^{-4} \pm 0,3 \times 10^{-4}$	7 суток
Гексацианоферрат калия (II)	1,0-10,0	$5,2 \times 10^{-4} \pm 0,4 \times 10^{-4}$	8 суток
Бензохинон	0,2-12,5	$4,1 \times 10^{-3} \pm 0,2 \times 10^{-3}$	8 суток
ДХФИФ	1,0-15,0	$8,0 \times 10^{-5} \pm 1,0 \times 10^{-5}$	5 суток

Таким образом, в работе представлен вариант электрохимического биосенсора для определения глюкозы на основе метода ЭИС. Концентрация глюкозы в исследуемой пробе определяется из линейной зависимости ответа биосенсора ($1/R_{ПЗ}$) от концентрации глюкозы в растворе. Описанные в диссертационной работе биосенсоры отличаются достаточно широким линейным диапазоном определяемых концентраций, однако слегка уступают по

нижней границе определяемых концентраций амперометрическому биосенсору на основе БЛ.

К преимуществам разработанных сенсоров по сравнению с биосенсором на основе БЛ можно отнести легкость пробоподготовки электрода – время подготовки одного электрода без БЛ составляло всего 1 ч против 6 ч у амперометрического биосенсора. Использование метода ЭИС позволило снизить рабочий потенциал, прикладываемый к системе, по сравнению с амперометрическими аналогами (например, 280 мВ для биосенсора с бензохиноном, в то время как стандартный редокс-потенциал бензохинона составляет 600 мВ).

1.2. Биосенсоры на основе алкогольоксидазы

В литературе к настоящему моменту не описаны импедансометрические биосенсоры на основе алкогольоксидазы (АО). В данном исследовании в качестве основы биосенсора для определения содержания этанола использовали алкогольоксидазу, выделенную из *Pichia pastoris*. Конфигурация биосенсора повторяла описанную в предыдущей главе, но фермент глюкозооксидаза (ГО) была заменена на АО. Особенностью АО является то, что данный фермент не способен отдавать электроны любому другому акцептору, кроме кислорода. Поэтому была использована технология «биферментного электрода» с добавлением на поверхность биосенсора пероксидазы хрена (ПХ). При работе АО выделяется пероксид водорода, который ПХ использует в качестве субстрата. В разработанных биосенсорах в качестве медиаторов электронного транспорта применяли ДХФИФ и бензохинон, в качестве характеристики активности биосенсора была выбрана калибровочная зависимость величины, обратной сопротивлению переноса заряда, от концентрации этанола. Ключевые параметры разработанных биосенсоров представлены в табл. 2. Как и в случае с сенсорами на основе ГО, в качестве контрольного биосенсора применяли амперометрический биосенсор с использованием берлинской лазури.

Таблица 2. Параметры разработанных биосенсоров для определения этанола

Медиатор	Линейный диапазон детекции, мМ	Чувствительность	Стабильность при хранении	Операционная стабильность, %
Бензохинон	0,1-10,0	$1,1 \times 10^{-4} \pm 0,1 \times 10^{-4}$ 1/мМ*кОм	9 сут	10
ДХФИФ	0,5-10,0	$1,2 \times 10^{-5} \pm 0,2 \times 10^{-5}$, 1/мМ*кОм	8 сут	15
БЛ	0,05-5	0,10 ± 0,01, мкА/мМ	5 сут	12

Наибольшую чувствительность, как и в случае с измерением глюкозы, продемонстрировал биосенсор с использованием бензохинона, для которого данный параметр составлял $1,1 \times 10^{-4} \pm 0,1 \times 10^{-4}$ 1/мМ×кОм. Следует отметить, что чувствительность обоих биосенсоров оказалась ниже, чем для глюкозных биосенсоров с использованием аналогичных медиаторов. Данный факт можно связать с тем, что в данной системе используется два фермента вместо одного, что усложняет цепочку переноса электронов.

Таким образом, разработанные биосенсоры с импедансометрическим преобразователем на основе АО и ПХ могут рассматриваться в качестве альтернативы для амперометрических АО-биосенсоров, превосходя их по долговременной стабильности и по верхнему пределу обнаружения.

1.3. Микробные биосенсоры на основе бактерий *G. oxydans*

Поскольку большинство ферментов, применяемых в биосенсорах, выделяют из микроорганизмов, как потенциальные биокатализаторы для импедансометрических биосенсоров были рассмотрены и целые клетки бактерий. В качестве биокатализатора для биосенсоров были выбраны бактерии *Gluconobacter oxydans* sbsp. *industrius* ВКМ В-1280. Клетки *G. oxydans* отличаются мембранной локализацией основных ферментных цепей, а также на них практически не оказывают токсического влияния популярные медиаторы электронного транспорта. В качестве медиатора для разрабатываемых биосенсоров был выбран 2,6-дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ), являющийся одним из наиболее часто используемых совместно с бактериями рода *Gluconobacter* медиаторов (Vertokova et al., 2015). Биосенсор на основе *G. oxydans* и ДХФИФ позволяет определять более низкие концентрации глюкозы, чем ферментные импедансометрические сенсоры, однако, его линейный диапазон детекции не столь широк, как линейный диапазон ферментных аналогов на основе глюкозооксидазы, а нижний предел обнаружения уступает амперометрическому сенсору на основе ГО и берлинской лазури. Все характеристики биосенсоров на основе печатных электродов, модифицированных бактериями *G. oxydans* и ферментами сведены в табл. 3.

Таблица 3. Характеристики импедансометрических биосенсоров для определения глюкозы и этанола.

Определяемое вещество / тип сенсора	Линейный диапазон детекции, мМ	Чувствительность, 1/мМ*кОм	Стабильность при хранении	Операционная стабильность, %
Глюкоза / микробный	0,1-5,0	$7,2 \times 10^{-5} \pm 0,5 \times 10^{-5}$	20 сут	8
Глюкоза / ферментный (медиатор – бензохинон)	0,2-12,5	$4,1 \times 10^{-3} \pm 0,2 \times 10^{-3}$	8 сут	5
Этанол / микробный	0,01-30,0	$3,0 \times 10^{-4} \pm 0,2 \times 10^{-4}$	20 сут	10
Этанол / ферментный (медиатор – бензохинон)	0,1-10,0	$1,1 \times 10^{-4} \pm 0,1 \times 10^{-4}$	9 сут	10

Таким образом, разработанный микробный импедансометрический биосенсор на основе *G. oxydans* может быть использован для определения глюкозы и этанола. В сравнении с рассмотренными в пункте 1.2. ферментными биосенсорами на основе АО и ПХ, разработанный микробный биосенсор при определении этанола превосходит конкурентов по всем параметрам. При этом он отличается более высокой стабильностью, что может быть связано с большей устойчивостью ферментов внутри живых бактериальных клеток, чем при иммобилизации их на поверхности электрода в очищенном виде. Показано, что клетки уксуснокислых бактерий *G. oxydans* могут быть использованы в качестве биокатализатора в импедансометрических биосенсорах наравне с ферментами, в

тех областях промышленности, где низкая селективность данных биосенсоров не станет препятствием для их использования. Существенным преимуществом данного типа биосенсоров является их простота и низкая стоимость по сравнению с многими существующими аналогами.

2. Применение метода ЭИС при разработке микробных БТЭ

В полной мере спектральные возможности метода ЭИС используются при анализе таких сложных объектов, как биотопливные элементы. В первую очередь был выбран тип электродов, наиболее подходящий для использования в микробных БТЭ. Показано, что удельное сопротивление электродов матричной печати во всех условиях измерений было на несколько порядков выше, чем удельное сопротивление спектральных графитовых электродов (СГЭ), и их использование не являлось целесообразным. На основании проведенных экспериментов были выбраны оптимальные концентрации медиаторов (ДХФИФ – 120 мкМ, гексацианоферрат калия (III) – 4 мМ), субстрата (этиловый спирт, 10 мМ), а также рабочие потенциалы для методов хроноамперометрии (200 мВ) и импедансной спектроскопии (-150 мВ, 0 мВ и 200 мВ).

2.1. Модификация биоанода БТЭ углеродными наноматериалами

Модификация электродов наноматериалами является одним из основных способов повышения мощности БТЭ, поэтому была поставлена задача провести анализ влияния различных наноматериалов на биокатализатор микробного БТЭ. Основой электродов являлись СГЭ, поверхность которых была модифицирована различными углеродными наноматериалами (терморасширенный графит - ТРГ, высокоориентированный пиролитический графит - ВОПГ, интеркалированный пиролитический графит, функционализированные углеродные нанотрубки - ФМНТ, многостенные углеродные нанотрубки - МУНТ, оксид графена - ОГ, восстановленный оксид графена - ОГв, углеродное волокно). Кроме того, в качестве биоанодов были испробованы электроды из ТРГ и ВОПГ, которые составляли подобно СГЭ, основу электрода. Были исследованы импедансные характеристики биоанодов БТЭ на основе клеток *G. oxydans*, модифицированных различными наноматериалами. В качестве значимых параметров были выбраны сопротивление переноса заряда анода (R_A) и его емкость (C_A). Результаты представлены в табл. 4.

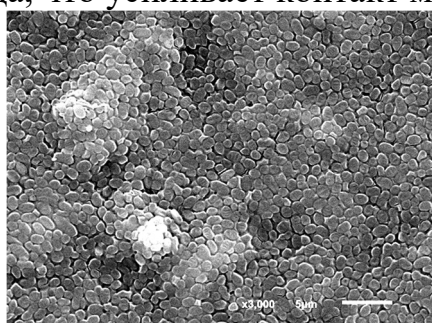
Таблица 4. Значения импедансных характеристик биоанодов на основе *G. oxydans*, модифицированных различными углеродными наноматериалами (двухэлектродная схема измерения, концентрация этилового спирта 10 мМ).

Материал	R_A при $U=0$ мВ, Ом см ²	R_A при $U=200$ мВ, Ом см ²	C_A при $U=0$ мВ, мФ/см ²	C_A при $U=200$ мВ, мФ/см ²
СГЭ	3119 ± 332; 10,6 %	4310 ± 666; 15,4 %	3,63 ± 0,37; 10,2 %	3,66 ± 0,55; 14,9 %
СГЭ + ТРГ	3359 ± 162; 4,8 %	5332 ± 1149; 21,6 %	1,69 ± 0,26; 15,5 %	1,90 ± 0,12; 6,2 %
ВОПГ фрагмент	8018 ± 881; 10,9 %	5790 ± 687; 11,8 %	0,17 ± 0,03; 19,0 %	0,216 ± 0,036; 16,6 %
СГЭ+ ВОПГ	10655 ± 1289; 12,1 %	11232 ± 1556; 13,8 %	1,78 ± 0,53; 30,1 %	1,93 ± 0,32; 16,6 %

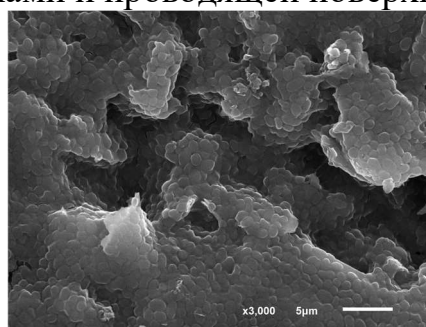
СГЭ + ФМНТ	2172 ± 286; 13,2 %	2279 ± 362; 15,9 %	6,61 ± 1,01; 15,3 %	4,61 ± 0,30; 6,4 %
СГЭ + МУНТ (Таунит)	3605 ± 420; 11,6 %	4245 ± 334; 7,9 %	4,28 ± 0,20; 4,8 %	4,22 ± 0,06; 1,4 %
СГЭ + ОГ _В	2669 ± 328; 12,3 %	3272 ± 237; 7,2 %	4,50 ± 0,41; 9,1 %	4,20 ± 0,20; 7,0 %
СГЭ + ОГ	3922 ± 336; 8,6 %	3911 ± 326; 8,4 %	2,69 ± 0,26; 9,6 %	2,56 ± 0,10; 3,9 %
СГЭ + волокна	3442 ± 478; 13,9 %	3994 ± 309; 7,7 %	3,66 ± 0,42; 11,4 %	3,45 ± 0,09; 2,6 %

Примечание: приведены средние значения параметров по 6 измерениям ± стандартное отклонение от среднего значения и ошибка измерения в процентах.

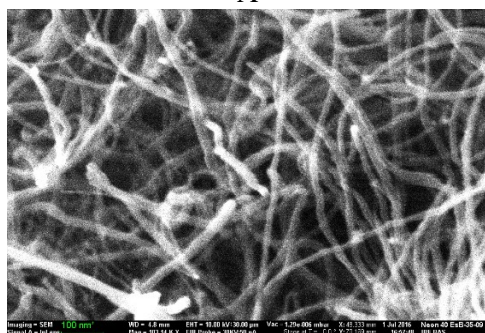
Наименьшее значение сопротивления переноса заряда и наибольшее значение емкости при обоих приложенных потенциалах демонстрируют биоаноды, модифицированные ФМНТ. На рис. 5 представлены СЭМ-фотографии анодов из спектрального графита и СГЭ, модифицированных ФМНТ, содержащих иммобилизованные клетками *G. oxydans*. Из данных снимков можно сделать вывод, что улучшение производительности электродов при их модификации ФМНТ может быть связано не только с улучшенной проводимостью нанотрубок, но и с увеличением активной поверхности электрода, что усиливает контакт между клетками и проводящей поверхностью.



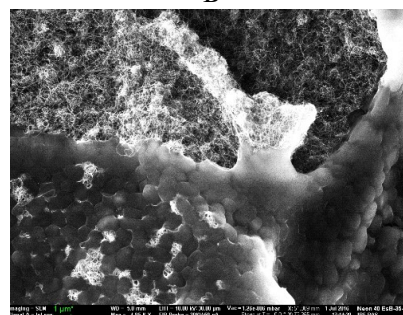
А



Б



В



Г

Рис. 5. СЭМ-фотографии поверхности электрода из спектрального графита, покрытого клетками *G. oxydans* (А), клетками *G. oxydans* в геле хитозана (Б), модифицированного ФМНТ (В), клетками *G. oxydans*, находящимися в геле хитозана с ФМНТ (Г).

Модификация биоанода восстановленным оксидом графена уменьшает сопротивление переноса заряда и увеличивает емкость анода по сравнению с

контрольным графитовым, хоть и в меньшей степени, чем модификация ФМНТ. Таким образом, можно сделать вывод, что два данных наноматериала являются наиболее перспективными для последующего изучения и использования в микробных БТЭ. В дальнейшем были изучены особенности взаимодействия каждого из наноматериалов с бактериальными клетками при использовании трех различных иммобилизующих агентов. Метод иммобилизации бактериальных клеток в гели является одним из наиболее часто используемых при разработке микробных БТЭ, поэтому была поставлена задача выбрать тип геля. В данной работе было рассмотрено применение трех полимеров при модификации биоанодов БТЭ. В качестве иммобилизующих агентов были выбраны хитозан, поливиниловый спирт (ПВС) и поливиниловый спирт, модифицированный N-винилпирролидоном (ПВС_м). В дальнейшем изучались электрохимические параметры систем «полимер-наноматериал» в сочетании с бактериальными клетками. В табл. 5 представлены сравнительные характеристики контрольных электродов из СГЭ с различными полимерами без модификации наноматериалами. Электроды, в которых в качестве полимера использован хитозан (соотношение бактериальных клеток и полимера составляет 5:1) обладают наибольшей мощностью (8,33 мкВт/см²), а БТЭ на их основе характеризовался наименьшим сопротивлением анода (1069 Ом см²). Это подтверждается данными, полученными методом импедансной спектроскопии: наименьшим сопротивлением обладал электрод, в котором использовался полимер хитозан.

Таблица 5. Характеристики БТЭ на основе немодифицированных СГЭ при иммобилизации в различные гели

$a \pm s;$ $s_r, \%$	R_A при $U = -150$ мВ, Ом см ²	R_O при $U = -150$ мВ, Ом см ²	C_A при $U = -150$ мВ, мФ/см ²	$R_{вн},$ Ом см ²	$P_{уд},$ мкВт/см ²	$\Delta I,$ мкА
ПВС	1254 ± 212; 17%	1669 ± 233; 14 %	0,0068 ± 0,0017; 26 %	1251 ± 201; 16 %	6,56 ± 0,74; 11 %	134 ± 9; 6 %
ПВС _м	1293 ± 103; 8 %	1817 ± 121; 7 %	0,0040 ± 0,0004; 10 %	1455 ± 192; 13 %	6,10 ± 0,32; 5 %	139 ± 7; 5 %
Хитозан (2:1)	1069 ± 58; 5 %	1513 ± 68; 4 %	0,0068 ± 0,0005; 7 %	1342 ± 114; 8 %	6,55 ± 0,42; 6 %	149 ± 4; 3 %
Хитозан (1:5)	1421 ± 123; 8 %	1911 ± 123; 6 %	0,0038 ± 0,0006; 17 %	1111 ± 71; 6 %	8,33 ± 0,28; 3 %	159 ± 6; 4 %

Примечание: представлены средние значения сопротивления биоанода (R_A), общего сопротивления системы (R_O), емкости анода (C_A), внутреннего сопротивления ($R_{вн}$), удельной мощности БТЭ ($P_{уд}$) и генерируемого сигнала (ΔI)

Наиболее перспективным наноматериалом для использования в БТЭ по результатам предыдущих опытов оказались ФМНТ, в табл. 6 представлены сравнительные характеристики электродов с различными полимерами, модифицированные функционализированными углеродными нанотрубками. Максимальной мощностью обладают электроды, в составе которых есть хитозан в соотношении с клетками 1:2, а минимальной – электроды с ПВС_м.

Таблица 6. Характеристики БТЭ на основе СГЭ, модифицированных функционализированными углеродными нанотрубками, при иммобилизации в различные гели

$a \pm s;$ $s_r, \%$	R_A при $U = -$ 150 мВ, Ом $см^2$	R_0 при $U = -$ 150 мВ, Ом $см^2$	C_A при $U = -$ 150 мВ, мФ/ $см^2$	$R_{вн},$ Ом $см^2$	$P_{уд},$ мкВт/ $см^2$	$\Delta I,$ мкА
ПВС	908 ± 52; 5 %	1328 ± 50; 4 %	0,0056 ± 0,0006; 10 %	1219 ± 43; 3 %	7,92 ± 0,51; 6 %	139 ± 5; 3 %
ПВС _м	1088 ± 70; 6 %	1385 ± 237; 17 %	0,0043 ± 0,0003; 6 %	1277 ± 53; 4 %	7,23 ± 0,80; 11 %	147 ± 10; 7 %
Хитозан (2:1)	722 ± 30; 4 %	1092 ± 39; 3 %	0,0088 ± 0,0003; 3%	1077 ± 85; 8 %	9,93 ± 0,78; 8 %	194 ± 14; 7 %
Хитозан (1:5)	828 ± 74; 9 %	1177 ± 79; 7 %	0,0110 ± 0,0008; 7 %	976 ± 57; 6 %	8,59 ± 0,51; 6 %	171 ± 8; 5 %

Примечание: представлены средние значения сопротивления биоанода (R_A), общего сопротивления системы (R_0), емкости анода (C_A), внутреннего сопротивления ($R_{вн}$), удельной мощности БТЭ ($P_{уд}$) и генерируемого сигнала (ΔI)

Проведена сравнительная оценка мощностных, вольтамперных и импедансных характеристик БТЭ при иммобилизации клеток бактерий *G. oxydans* в три геля. Иммобилизация биоматериала в гель хитозана позволила снизить сопротивление анода до 1069 Ом и увеличить мощность до 8,33 мкВт/ $см^2$. Дополнительная модификация анода БТЭ углеродными нанотрубками при иммобилизации в гель хитозана позволила увеличить мощность до 9,93 мкВт/ $см^2$, а в случае иммобилизации в гель ПВС – до 7,92 мкВт/ $см^2$. Для БТЭ с иммобилизацией в ПВС, модифицированный N-винилпирролидоном, мощность при модификации углеродными нанотрубками составила 7,23 мкВт/ $см^2$. В случае модификации анода данными наноматериалами наилучшие показатели мощности достигались при использовании геля хитозана, в то время как при иммобилизации анода БТЭ МУНТ наибольший показатель мощности (9,77 мкВт/ $см^2$) был достигнут при иммобилизации в гель ПВС, а мощность БТЭ с иммобилизацией биоматериала в гель хитозана составила 8,65 мкВт/ $см^2$. Показано, что максимальные значения мощности БТЭ и минимальные значения внутреннего сопротивления БТЭ получены при соотношении клеток и хитозана на поверхности электрода, равном 1:5, а для соотношения клеток и ПВС_м, на поверхности электрода, равном 2:1.

2.2. Мембранные фракции бактерий в БТЭ

Теоретически, мембранные фракции бактериальных клеток должны занимать промежуточное место в иерархии биокатализаторов для БТЭ между ферментами и клетками, при этом стоимость их выделения на порядок ниже стоимости выделения чистых ферментов. Была поставлена задача провести сравнительную оценку характеристик БТЭ на основе трех различных биокатализаторов (фермент глюкозооксидаза, мембранные фракции клеток и целые клетки микроорганизмов) в присутствии медиаторов электронного транспорта. Мощность всех трех типов БТЭ была прямо пропорциональна концентрации используемого биокатализатора (при одинаковом количестве субстрата, 10 мМ глюкозы), и достигала максимальной мощности при максимальном увеличении

концентрации биокатализатора. При этом наибольшей удельной мощностью обладали БТЭ на основе фермента – 12 мкВт/см², меньшей – на основе мембранных фракций и целых клеток *G. oxydans*, 8,6 мкВт/см² и 6,4 мкВт/см² соответственно. Биоаноды с использованием мембранных фракций демонстрировали высокую стабильность при хранении (активность до 3 месяцев) и обеспечивали повышенную по сравнению с целыми клетками мощность работы БТЭ.

БТЭ на основе мембранных фракций не превосходят по мощности ферментные аналоги, однако являются более дешевыми и надежными в эксплуатации.

2.3. Углеродные высокодисперсные материалы в БТЭ

Была поставлена задача изучения возможности использования в качестве биоэлектродов БТЭ альтернативных традиционным материалов, например, углеродных высокодисперсных материалов (УВМ). УВМ относятся к материалам, позволяющим производить регулировку электрической проводимости в процессе их синтеза. Были изучены 3 типа УВМ, различающиеся степенью карбонизации. В качестве прекурсора для трех волокнистых материалов был использован полиакрилонитрил. УВМ №1 представлял собой коммерческий волокнистый материал, представленный ООО «Ниагара» (Москва, Россия), УВМ №2 и 3 являлись термоокисленными и карбонизированными производными УВМ №1. Вид исходного углеродного материала и полученных в процессе обработки УВМ представлен на рис. 6.

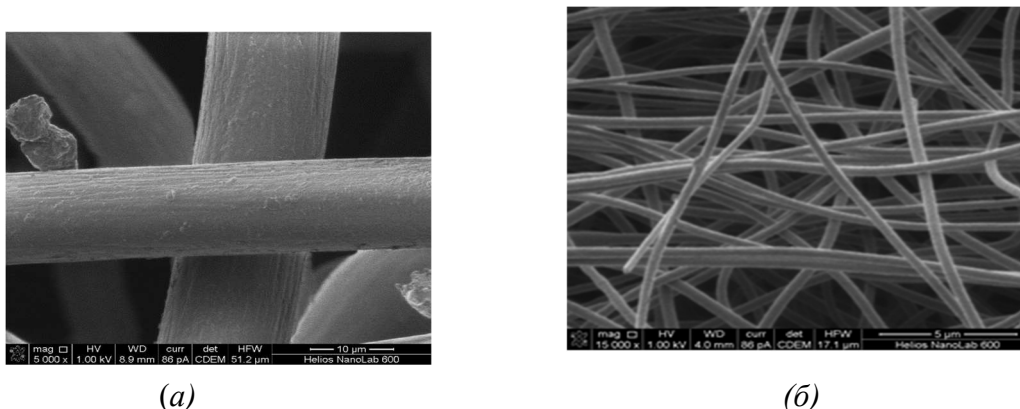


Рис. 6. СЭМ-фотографии исходного коммерческого материала (а) и УВМ, карбонизированного при температуре 1000 °С (б). Средний диаметр волокна для исходного материала – 15 мкм, для УВМ №2 – 490 нм, УВМ №3 – 430 нм.

В качестве биоматериала, иммобилизуемого на УВМ, использовали клетки *G. oxydans*. Генерацию тока и потенциала при введении этилового спирта в присутствии медиатора наблюдали только для материала УВМ №3. При этом удельное сопротивление анода из УВМ №3 с биоматериалом составляло 7,3 кОм/см², в то время как аналогичное сопротивление УВМ №1 и УВМ №2 составило 1329 и 630 кОм/см² соответственно. В дальнейшем были использованы три модификации материала №3, отличающиеся по скорости и температуре карбонизации, получившие условные обозначения УВМ 3.1, УВМ 3.2 и УВМ 3.3. Импедансные параметры электродов с иммобилизованными клетками *G. oxydans* и их мембранными фракциями представлены в табл. 7.

Наиболее перспективным для дальнейшего использования оказался материал, карбонизацию которого проводили при температуре 1000°C и при замедленной скорости набора температуры (УВМ 3.1.). Данный материал позволил создать БТЭ с мощностью 8 мкВт/см², что превосходит мощность аналогичных традиционных микробных БТЭ на основе СГЭ электродов.

Таблица 7. Электрохимические характеристики биоэлектродов из УВМ с иммобилизованными клетками *G. oxydans* и их мембранными фракциями

Схема измерения	3-эл. U=200 мВ		2-эл. U=-150 мВ	3-эл. U=200 мВ		2-эл. U=-150 мВ
Биоматериал	Клетки <i>G. oxydans</i>			Мембранные фракции <i>G. oxydans</i>		
	R _A до введения субстрата, Ом см ²	R _A после введения субстрата, Ом см ²	R _A после введения субстрата, Ом см ²	R _A до введения субстрата, Ом см ²	R _A после введения субстрата, Ом см ²	R _A после введения субстрата, Ом см ²
УВМ 3	6809	1158	1503	13170	1621	2629
УВМ 3.1	18880	1385	1556	4350	495	928
УВМ 3.2	11050	1814	2188	8298	631	2467
УВМ 3.3	7387	674	601	5476	655	2791

Примечание: приведены средние значения параметров по 3 измерениям. Измерения проводились по трехэлектродной (3-эл) и двухэлектродной (2-эл) схемам.

3. Регистрация разрушения клеток и их мембран методом ЭИС

Метод ЭИС может быть применен не только при изучении сложных биоэлектрохимических систем, но и для характеристики процессов, происходящих в живых клетках.

Для качественной проверки возможности использования метода было исследовано три суспензии различных микроорганизмов (*Staphylococcus aureus* 209P, *Micrococcus luteus* B1819 и *Glucanobacter oxydans* sbsp. *industrius* ВКМ В-1280) и эти же растворы после воздействия биологического разрушающего агента – лизоамидазы (ЛА). По результатам опытов для всех трех культур значение общего сопротивления системы с раствором разрушенных клеток оказалось меньше, чем значение общего сопротивления системы с суспензией живых клеток в среднем на 25%. Для проверки возможности детекции изменения отдельных электрохимических параметров в процессе лизиса клеток в реальном времени ячейку заполняли суспензией бактерий, а затем после установления равновесия вводили лизоамидазу. В качестве наблюдаемого параметра была выбрана емкость двойного электрического слоя (ДЭС), зависящая от наличия слоя клеток на поверхности электрода. В случае с грамположительными бактериями емкость ДЭС уменьшалась после добавления лизоамидазы в суспензию клеток, что показывает теоретическую возможность использования данного метода регистрации для мониторинга процессов бактериального лизиса. Однако, при использовании грамотрицательных бактерий (на примере *Glucanobacter oxydans*) уменьшение емкости ДЭС практически не наблюдалось, что можно связать с различием в структуре и проводимости мембран разных видов бактерий. Кроме того, само добавление в систему ЛА характеризуется резким падением емкости, что не дает возможности наблюдать кинетику разрушения клеток на всём протяжении процесса лизиса.

В дальнейшем оценивали изменения импеданса системы в зависимости от концентрации клеток. Для этого измеряли импеданс пяти суспензий с различной концентрацией клеток *G. oxydans*. Наименьшее общее сопротивление соответствовало системе с наибольшей концентрацией клеток. Диаграммы импеданса растворов с разной концентрацией клеток представлены на рис. 7А. Для более подробного изучения влияния действия лизоамидазы на клетки было проведено измерение проводимости раствора суспензии клеток в процессе воздействия на нее препарата. Для этого изучался высокочастотный спектр импедансных характеристик, который соответствует сопротивлению электролита в системе. Сопротивление электролита после добавления ЛА уменьшалось от значения $1,22 \pm 0,11$ кОм до $1,01 \pm 0,09$ кОм.

Измеряли изменение сопротивления электролита в системе непосредственно в процессе действия лизоамидазы на суспензию клеток *Staphylococcus aureus*. На рис. 7Б зависимость №1 отражает сопротивление электролита до начала реакции в суспензии клеток (915 ± 10 Ом), зависимость №2 показывает значение сопротивления через 5 мин, сразу после добавления лизоамидазы произошел резкий скачок до 850 ± 9 Ом. Через 10 мин (зависимость №3) наблюдали небольшое смещение сопротивления до 842 ± 5 Ом; состояние системы после окончания реакции (через 30 мин) отражает зависимость №4, 825 ± 9 Ом.

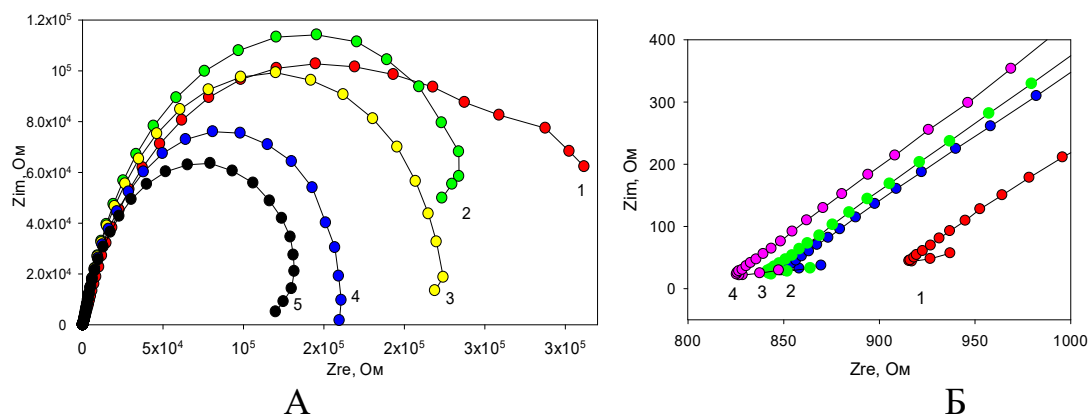


Рис. 7. Диаграммы Найквиста для суспензий с разным содержанием клеток *G. oxydans* (1 – 0 мг/мл клеток; 2 – 10; 3 – 20; 4 – 30; 5 – 50) (А).

Начальный участок диаграмм Найквиста для суспензии клеток *S. aureus* (1) и после добавления раствора лизоамидазы через 5 (2), 10 (3) и 30 (4) мин (Б).

Добавление лизоамидазы в раствор вызывало уменьшение сопротивления электролита, разрушение клеток *Staphylococcus* изменяет сопротивление электролита на меньшую величину. В изменение сопротивления раствора после биологического лизиса бактерий вносят вклад как ионы ЛА, так и непосредственное разрушение клеток под её действием. При уменьшении концентрации ЛА в 5 раз влияние лизоамидазы снижается до приемлемого (1-2 Ом), но при этом разрушение бактериальных клеток происходит в 5 раз дольше.

Метод ЭИС был применен при регистрации процессов, происходящих при нарушениях клеточной мембраны, то есть в отсутствии полного разрушения клеток. В качестве агента был выбран метод электропорации, т.к. это позволило избежать эффектов, подобных тем, что наблюдались в случае использования лизоамидазы. В качестве объекта исследования был выбран штамм дрожжей

Saccharomyces cerevisiae ВКМ У-1173. Для проверки возможности детекции ионов, выходящих в раствор в процессе электропорации клеток, были построены калибровочные кривые методом ЭИС с зависимостью сопротивления раствора от содержания в нем ионов калия и калибровочная кривая с использованием K^+ электрода. Калибровочные кривые представлены на рис. 8. Показано, что метод ЭИС имеет более высокую чувствительность при концентрации клеток 33 мг сырого веса/мл. Реальный образец суспензии клеток *S. cerevisiae* в концентрации 33 мг сырого веса/мл исследовали при температуре 4 °С калиевым электродом и методом ЭИС одновременно. Получены данные о содержании ионов – $5,8 \times 10^{-4}$ М методом ЭИС и $4,1 \times 10^{-4}$ М калиевым электродом. Так как метод ЭИС позволяет определить общую концентрацию ионов в растворе, а калиевый электрод – концентрацию ионов калия, можно сделать вывод, что в данных клетках доля калия составила 70,6 %.

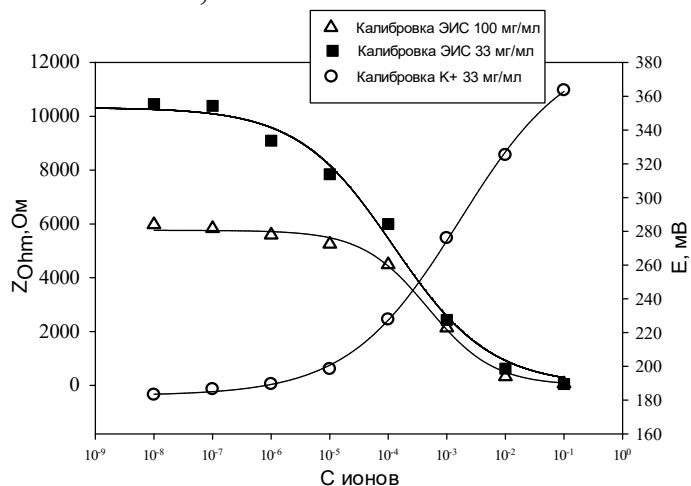


Рис. 8. Калибровочные кривые, полученные методом ЭИС при разной концентрации клеток в суспензии и калиевым электродом.

В результате проведенных исследований показано, что метод ЭИС позволяет регистрировать изменение количества клеток в исследуемом образце по изменению общего импеданса системы. В случае грамотрицательных бактерий возможна регистрация бактериологического лизиса клеток в реальном времени по уменьшению емкости ДЭС суспензии клеток. На примере дрожжей показано, что методом ЭИС можно регистрировать изменения проводимости раствора в суспензии клеток и оценивать влияние различных агентов на структуру клеток по выходу общего количества ионов во внешнюю среду.

4. Конвертерное накопление электроэнергии и имплантация микробных БТЭ в организм травяной лягушки

Для практического применения БТЭ как источников питания малой мощности необходимо повышение их реальной электрической мощности. Один из вариантов увеличения эффективности работы БТЭ – соединение нескольких ячеек друг с другом. Для экспериментов с конвертерным накоплением энергии использовали последовательное подключение, так как при этом суммируется выходное напряжение БТЭ, которое должно быть достаточно высоким (от 0,3 В и выше) для включения функции накопления энергии конвертером. Для изучения конвертерного метода преобразования и накопления электроэнергии от маломощного микробного БТЭ в работе использовали стенд, основанный на

микросхеме BQ25504 (Texas Instruments). Система включала в себя два микробных БТЭ на основе СГЭ с иммобилизованными в гель хитозана бактериальными клетками *G. oxydans*. Режим накопления исследовали с использованием двух различных конфигураций БТЭ. Один из элементов был основан на СГЭ, биоаноды второго элемента были модифицированными наноматериалом – МУНТ. На рис. 9 представлен график заряда конденсатора емкостью 6800 мкФ двумя БТЭ, модифицированными МУНТ. Заряд конденсатора производили периодически в течение 2 сут непрерывной работы БТЭ до конечного напряжения в 3,2 В, при этом после 48 ч эффективность работы БТЭ не уменьшалась.

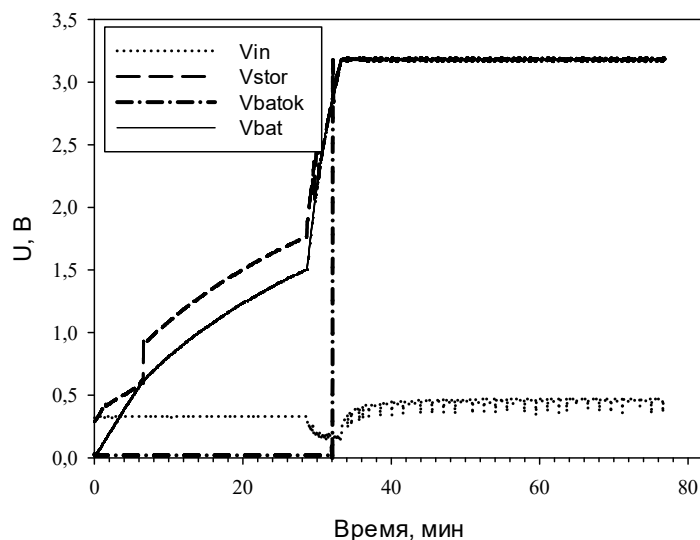


Рис. 9. Накопление электроэнергии на емкости 6800 мкФ с помощью двух БТЭ, модифицированных МУНТ. V_{in} – входное напряжение, поступающее на конвертер; V_{stor} – напряжение заряда; V_{bat} – напряжение на накопительной емкости; V_{batok} – напряжение, сигнализирующее о достижении установленного уровня напряжения заряда.

Характеристики систем, использованных для конвертерного накопления электричества, представлены в таблице 8. Стоит отметить, что два последовательно соединенных модифицированных БТЭ эффективно заряжали конденсатор емкостью 6800 мкФ после 2 сут непрерывной работы, при этом время заряда уменьшалось более чем в 2 раза по сравнению с двумя не модифицированными МУНТ элементами. Заряженный таким образом конденсатор 6800 мкФ содержал заряд 21×10^{-3} Кл, обеспечивающий накопленную энергию в 32,7 мДж.

Полученные результаты создают основу для реализации практического использования конвертерного накопления энергии, например, в имплантированном БТЭ.

Таблица 8. Характеристики БТЭ и время заряда конденсатора

Элемент	Мощность, мкВт	Внутреннее сопротивление, Ом	Время заряда конденсатора в 6800 мкФ
Одиночный БТЭ, немодифицированный	80	200	Не заряжается

Одиночный БТЭ, модифицированный МУНТ	110	160	Не заряжается
Последовательно соединенные немодифицированные БТЭ	140	380	1й цикл заряда – 80 минут; 2й цикл – 70 минут
Последовательно соединенные БТЭ, модифицированные МУНТ	198	290	1 цикл – 58 минут; ... 4 цикл – 32 минуты (через 48 часов)

Примечание: приведены средние значения параметров по 3 измерениям.

В диссертационной работе также была поставлена задача разработать микробный биотопливный элемент, который функционировал бы как имплантированный в живой организм, и исследовать его характеристики методом ЭИС. Объектом для имплантации была выбрана травяная лягушка *Rana temporaria*. Данный БТЭ должен был генерировать электрическую энергию за счет окисления глюкозы, вырабатываемой организмом животного. Это направление в настоящее время активно развивается (MacVittie et al., 2013, Schröder, 2012). В диссертационной работе оба электрода – анод и катод – были изготовлены из наноматериала, ТРГ, имеющего высокое отношение «поверхность/объем». Один из электродов (анод) содержал водонерастворимый медиатор диметилферроцен и иммобилизованные в геле хитозана клетки *Gluconobacter oxydans* ВКМ В-1280. Результаты измерения приведены на рис. 10, на котором показана типичная зависимость генерации разности потенциалов ΔU . Генерируемая разность потенциалов ΔU достигала величины порядка 50 мВ за время ~ 800 с.

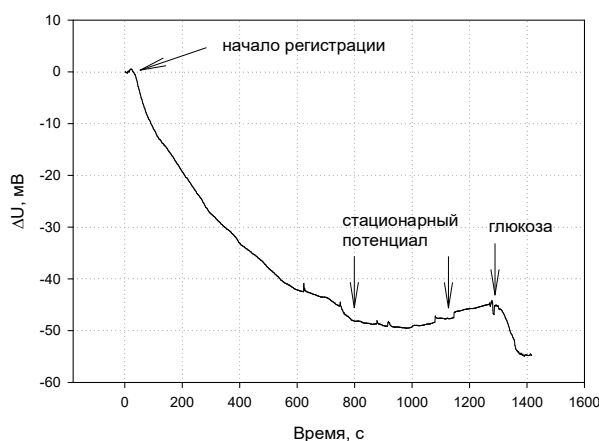


Рис. 10. Генерация разности потенциалов при окислении глюкозы организма травяной лягушки *Rana temporaria* встроенным биотопливным элементом.

Измерения с использованием метода ЭИС показали, что сопротивление электролита до и после окончания генерации потенциалов остается неизменным, в то время как общее внутреннее сопротивление ячейки и сопротивление переноса заряда увеличивается с течением времени. Это явление связано с уменьшением концентрации глюкозы во внутриполостной жидкости лягушки и показывает возможность генерации электроэнергии без внешнего топлива (максимальной концентрации глюкозы соответствует минимальное внутреннее

сопротивление и максимальная мощность). Общее сопротивление системы при максимальной концентрации глюкозы составляло 770 Ом, а после окончания генерации потенциала – 1150 Ом.

Таким образом, в работе впервые показана генерация электроэнергии имплантируемым микробным БТЭ при его питании эндогенной глюкозой в организме земноводного и впервые для изучения характеристик имплантированного БТЭ применен метод ЭИС. Полученные данные расширяют представления о возможности дальнейшего совершенствования устройств, используемых для генерации электроэнергии *in vivo*.

ВЫВОДЫ

1. Созданы лабораторные модели ферментных и микробных биосенсоров с импедансометрическим преобразователем для детекции глюкозы и этанола на основе электродов матричной печати. Электроды имели линейный диапазон определяемых концентраций: 0,2-12,5 мМ глюкозы для биосенсора на основе глюкозооксидазы, 0,1-10 мМ этанола для биосенсора на основе алкогольоксидазы и 0,01-30 мМ этанола для микробного биосенсора. Биосенсоры обладали повышенной стабильностью по сравнению с амперометрическими аналогами и упрощенным способом создания.

2. Модификация электродов биотопливного элемента функционализированными многостенными углеродными нанотрубками (ФМНТ) приводила к снижению сопротивления биоанода на 33 %, а использование восстановленного оксида графена – на 15 % по сравнению с немодифицированным электродом. Эффективной комбинацией «полимер-наноматериал» являлась система из ФМНТ и геля хитозана, позволяющая повысить мощность элемента с 6 мкВт/см² до значения в 10 мкВт/см².

3. В качестве материала для биоэлектродов биотопливных элементов на основе целых клеток и мембранных фракций *G. oxydans* впервые использованы углеродные высокодисперсные материалы (УВМ). БТЭ на основе электродов из УВМ обладали характеристиками, сравнимыми с традиционными элементами как при использовании целых клеток, так и их мембранных фракций. Мембранные фракции позволили увеличить мощность БТЭ с 6,4 мкВт/см² до 8,6 мкВт/см² по сравнению с целыми клетками *G. oxydans*.

4. Метод импедансной спектроскопии использован для регистрации разрушения грамположительных бактериальных клеток *Micrococcus* и *Staphylococcus* по регистрации изменения емкости системы в реальном времени. Разрушение клеток бактерий и мембран дрожжей рода *Saccharomyces* детектировали по изменениям проводимости суспензий вследствие выделения ионов из цитоплазмы.

5. Практическая значимость модификации электродов БТЭ углеродными нанотрубками показана на эффекте увеличения скорости конвертерного накопления электроэнергии. Продемонстрирована работа микробного БТЭ с электродами из наноматериала - терморасширенного графита - впервые имплантированного в организм живой лягушки *Rana temporaria*, в котором в качестве топлива использовалась эндогенная глюкоза.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Тарасов С.Е., Емец В.В., Гуторов М.А., Решетиллов А.Н. Импедансная спектроскопия в современных электрохимических ДНК-биосенсорах // Вестник биотехнологии. – 2014. – Т.10. – №3. – С. 43-49.
2. Решетиллов А.Н., Плеханова Ю.В., Тарасов С.Е., Китова А.Е., Колесов В.В., Утешев В.К., Василлов Р.Г. Живая батарея – микробный биотопливный элемент, функционирующий в организме травяной лягушки *Rana temporaria* // Вестник биотехнологии. – 2015. – Т.11. – №2. – С. 5-10.
3. Решетиллов А.Н., Китова А.Е., Мачулин М.В., Тарасов С.Е., Гуторов М.А., Алферов С.В., Колесов В.В., Готовцев П.М., Василлов Р.Г. Биосенсор на основе клеток *Glucanobacter* и терморасширенного графита // Сенсорные системы. – 2016. – Т.30. – №4. – С. 351-354.
4. Решетиллов А.Н., Плеханова Ю.В., Тарасов С.Е., Арляпов В.А., Колесов В.В., Гуторов М.А., Готовцев П.М., Василлов Р.Г. Влияние некоторых углеродных наноматериалов на окисление этилового спирта бактериальными клетками *Glucanobacter oxydans* // Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – Т.53. – №1. – С. 1-8.
5. Решетиллов А.Н., Плеханова Ю.В., Тарасов С.Е., Быков А.Г., Гуторов М.А., Алферов С.В., Тенчуриин Т.Х., Чвалун С. Н., Орехов А. С., Шепелев А.Д., Готовцев П.М., Василлов Р.Г. Оценка свойств биоэлектродов на основе углеродных высокодисперсных материалов, содержащих модельные микроорганизмы *Glucanobacter* // Российские нанотехнологии. – 2017. – Т.12. – №1-2. – С. 83-89.
6. Тарасов С.Е., Плеханова Ю.В., Решетиллов А.Н. Применение импедансной спектроскопии для исследования характеристик биосенсоров и биотопливных элементов. // Вестник биотехнологии. – 2017. – Т.13. – №1. – С. 63-71.
7. Тарасов С.Е., Плеханова Ю.В., Быков А.Г., Васильева Н.В., Кудрякова И.В., Валиахметов А.Я., Решетиллов А.Н. Регистрация процессов разрушения клеток и их мембран методом импедансной спектроскопии. // Известия ТулГУ. Естественные науки. – 2017. – Т.3. – С. 12-22.

Патент:

8. Решетиллов А.Н., Плеханова Ю.В., Тарасов С.Е., Китова А.Н., Утешев В.К., Василлов Р.Г., Колесов В.В. Способ получения электрической энергии с помощью микробного биотопливного элемента, имплантированного в организм живой травяной лягушки *Rana temporaria* // Патент № 2599421. Зарегистрирован 15.09.2016. Заявка № 2016106824 от 25.02.2016.

Тезисы:

9. Плеханова Ю.В., Решетиллов А.Н., Тарасов С.Е., Китова А.Е. Имплантированный биотопливный элемент на основе клеток *Glucanobacter oxydans* // XII Международная научная конференция «Физика и радиоэлектроника в медицине и экологии» с элементами научной молодежной сессии. 4-7 июля 2016 г. Владимир – Суздаль. Труды, книга II. С. 105-109.
10. Китова А.Е., Быков А.Н., Тарасов С.Е., Колесов В.В., Ярополов А.И., Решетиллов А.Н. Анод микробного биотопливного элемента на основе терморасширенного графита и мембранных фракций бактериальных клеток *Glucanobacter oxydans* // Труды Международной дистанционной научной конференции «Современная наука: актуальные проблемы и пути их решения» г. Липецк 20-21 февраля 2014г. (Под ред. М.Ю. Левина Липецк: ООО «Максимал информационные технологии» 2014. № 7. С. 12-15. ISSN 2307-8782.
11. Тарасов С.Е., Решетиллов А.Н. Сенсорное определение глюкозы методом электрохимической импедансной спектроскопии // Первая Пущинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». Сб. Пущино. 11-12 декабря 2014г. Материалы конференции. Пущино: ИБФМ РАН. С. 16-20.
12. Тарасов С.Е., Плеханова Ю.В., Быков А.Г., Китова А.Е., Ивахненко А.А., Решетиллов А.Н. Конвертерное накопление напряженности от биотопливного элемента на основе клеток *Glucanobacter oxydans* // II Пущинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». 7-11- декабря 2015. Материалы конференции. Пущино: ИБФМ РАН. С. 138-140.
13. Плеханова Ю.В., Китова А.Е., Тарасов С.Е., Быков А.Г., Решетиллов А.Н. Безмедиаторное биоэлектродокаталитическое окисление этилового спирта на электроде из терморасширенного графита, модифицированного клетками *Glucanobacter oxydans* и их мембранными фракциями // II Пущинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». 7-11- декабря 2015. Материалы конференции. Пущино: ИБФМ РАН. С. 140 –142.

14. Плеханова Ю.В., Тарасов С.Е., Китова А.Е., Решетиллов А.Н. Сравнение характеристик биоанодов в биотопливном элементе при модификации их углеродными наноматериалами // II Пущинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». 7-11 декабря 2015. Материалы конференции. Пущино: ИБФМ РАН. С.142 – 144.
15. Решетиллов А.Н., Плеханова Ю.В., Тарасов С.Е., Китова А.Е., Быков А.Г., Колесов В.В., Гуторов М.А. Изменение активности бактериальных клеток *Glucanobacter oxydans* в биотопливном элементе при модификации биоанодов углеродными наноматериалами. // Материалы II Всероссийского семинара памяти профессора Ю.П. Волкова «Современные проблемы биофизики, генетики, электроники и приборостроения». Саратов 2015 г.16-18 декабря. 2015. С.105-109
16. Плеханова Ю.В., Тарасов С.Е., Быков А.Г., Решетиллов А.Н. Использование углеродных наноматериалов для модификации анодов биотопливных элементов // Международная научно-техническая конференция «Системы контроля окружающей среды – 2016»; Севастополь. 24–27 октября 2016 г. Севастополь: ИПТС, 2016. 234 с. Тезисы докладов С. 208.
17. Тарасов С.Е. Определение глюкозы методом электрохимической импедансной спектроскопии// Всероссийская конференция с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология-2014» Тула. 2-3 октября 2014 г. Материалы конференции. Тула: Изд-во ТулГУ. С. 26.
18. Тарасов С.Е., Плеханова Ю.В., Решетиллов А.Н. Оценка параметров модифицированных электродов микробных биотопливных элементов с помощью импедансной спектроскопии // Всероссийская конференция с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология-2016» Тула. 11-12 октября 2016 г. Материалы конференции. Тула: ТулГУ. С. 112.
19. Пташник И.В., Китова А.Е., Плеханова Ю.В., Тарасов С.Е., Решетиллов А.Н. Сравнение безмедиаторного и медиаторного окисления некоторых субстратов бактерий *Glucanobacter oxydans*, иммобилизованными на спектральном графитовом электроде // Всероссийская конференция с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология-2016». 11-12 октября 2016 г. Материалы конференции. Тула: ТулГУ. С. 97.
20. Плеханова Ю.В., Тарасов С.Е., Решетиллов А.Н. Выбор проводящего биополимера для микробного биотопливного элемента на основе клеток *Glucanobacter oxydans* // III Пущинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». 5-9 декабря 2016. Материалы конференции. М.: ООО ИД «Вода: химия и экология». С. 156 –157.
21. Китова А.Е., Тарасов С.Е., Решетиллов А.Н. Модификация печатных электродов терморасширенным графитом // III Пущинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». 5-9 декабря 2016. Материалы конференции. М.: ООО ИД «Вода: химия и экология». С. 160 –161.
22. Тарасов С.Е., Плеханова Ю.В., Пташник И.В., Быков А.Г., Решетиллов А.Н. Особенности безмедиаторного переноса электронов клетками и мембранными фракциями бактерий *Glucanobacter oxydans* // III Пущинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». 5-9 декабря 2016. Материалы конференции. М.: ООО ИД «Вода: химия и экология». С. 162–163.
23. Тарасов С.Е., Плеханова Ю.В., Решетиллов А.Н. Углеродные волокнистые материалы как основа биоанодов микробных биотопливных элементов // Сборник статей по материалам научно-практической конференция с международным участием «Экологическая, промышленная и энергетическая безопасность – 2017»; Севастополь. 11–15 сентября 2017 г. Севастополь: СевГУ, 2017. 1617 с. Тезисы докладов. С. 1318 –1320.
24. Плеханова Ю.В., Тарасов С.Е., Быков А.Е., Решетиллов А.Н. Влияние некоторых углеродных наноматериалов на свойства анода микробного биотопливного элемента // Материалы 1-го Российского микробиологического конгресса. Пущино, 17-18 октября 2017 г. М.: ООО ИД «Вода: химия и экология». С. 166.
25. Тарасов С.Е., Плеханова Ю.В., Быков А.Г., Решетиллов А.Н. Взаимодействие бактериальных клеток с наноматериалами. // Тезисы докладов Третьего съезда аналитиков России. 8-13 октября 2017 г., г. Москва; М: ГЕОХИ РАН, 2017. С. 474.