

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина
Российской академии наук

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)

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук,
профессор Решетилов А. Н.

Пушино – 2018

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ УСТРОЙСТВА НА ОСНОВЕ БИОМАТЕРИАЛОВ.....	12
1.1.1. Биосенсоры и их классификация.....	12
1.1.2. Биотопливные элементы (БТЭ), их преимущества и перспективы.....	19
1.1.3. Использование целых клеток микроорганизмов в БТЭ и биосенсорах.....	23
1.1.4. Использование наноматериалов в БТЭ и биосенсорах.....	26
1.1.5. Методы изучения свойств БТЭ.....	29
1.2. ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКАЯ ИМПЕДАНСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ (ЭИС) В	
БИОСЕНСОРАХ И БТЭ.....	30
1.2.1. Теоретические основы импеданса.....	31
1.2.2. Параметры эквивалентных электрических схем.....	33
1.2.3. Применение ЭИС для исследования небιологических и биологических	
объектов.....	36
1.2.4. Использование ЭИС для создания биосенсоров.....	38
1.2.5. Использование ЭИС при изучении характеристик БТЭ.....	45
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	52
2.1. РЕАГЕНТЫ.....	52
2.2. ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ	52
2.3. УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ	52
2.4. ВЫДЕЛЕНИЕ МЕМБРАННЫХ ФРАКЦИЙ <i>GLUCONOBACTER OXYDANS</i>.....	53
2.5. ЭЛЕКТРОПОРАЦИЯ МЕМБРАН КЛЕТОК <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	53
2.6. ИЗМЕРИТЕЛЬНАЯ АППАРАТУРА	53
2.7 ИММОБИЛИЗАЦИЯ БИОМАТЕРИАЛА НА ПОВЕРХНОСТИ ПЕЧАТНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ ...	54
2.8. ПОЛУЧЕНИЕ ЭЛЕКТРОДОВ С БЕРЛИНСКОЙ ЛАЗУРЬЮ.....	54
2.9. ПРОВЕДЕНИЕ БИОСЕНСОРНЫХ ИЗМЕРЕНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЕЧАТНЫХ	
ЭЛЕКТРОДОВ.....	55
2.10. ФОРМИРОВАНИЕ РАБОЧИХ ЭЛЕКТРОДОВ ДЛЯ БТЭ	56
2.11. ПОЛУЧЕНИЕ УГЛЕРОДНЫХ ВЫСОКОДИСПЕРСНЫХ МАТЕРИАЛОВ (УВМ).....	57
2.12. ВОЛЬТАМПЕРНЫЕ И ХРОНОАМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БТЭ	57
2.12.1. Измерения по двухэлектродной схеме.....	57
2.12.2. Измерения по трехэлектродной схеме.....	58

2.13. ИЗМЕРЕНИЕ ДЫХАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК	59
2.14. РЕГИСТРАЦИЯ ИМПЕДАНСНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК БТЭ	59
2.15. СКАНИРУЮЩАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ (СЭМ)	60
2.16. КОНВЕРТЕРНОЕ НАКОПЛЕНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСТВА	60
2.17. ВСТРАИВАНИЕ МИКРОБНОГО БТЭ В ОРГАНИЗМ ТРАВЯНОЙ ЛЯГУШКИ	61
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	62
3.1. СОЗДАНИЕ ИМПЕДАНСОМЕТРИЧЕСКИХ БИОСЕНСОРОВ	62
3.1.1. Биосенсоры на основе глюкозооксидазы	62
3.1.2. Биосенсоры на основе алкогольоксидазы	68
3.1.3. Микробные биосенсоры на основе целых клеток <i>Glucopobacter oxydans</i> для определения спиртов и моносахаридов.....	72
3.2. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ЭИС ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ МИКРОБНЫХ БТЭ	74
3.2.1. Влияние конфигурации микробного БТЭ на его внутренние параметры	75
3.2.2. Модификация биоанода БТЭ углеродными наноматериалами	84
3.2.3. Влияние иммобилизующего агента на свойства биоанода БТЭ.....	88
3.2.4. Характеристики системы «полимер – наноматериал» в составе биоанодов БТЭ.....	93
3.2.5. Мембранные фракции бактерий в качестве биокатализатора БТЭ.....	99
3.2.6. Углеродные высокодисперсные материалы в качестве анода БТЭ	105
3.3. РЕГИСТРАЦИИ РАЗРУШЕНИЯ КЛЕТОК И ИХ МЕМБРАН МЕТОДОМ ЭИС	111
3.3.1. Воздействие лизоамидазы на бактериальные клетки	112
3.3.2. Пермеабиллизация клеточной мембраны дрожжей.....	116
3.4. ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОБНЫХ БТЭ	118
3.4.1. Конвертерное накопление электроэнергии от микробных БТЭ	118
3.4.2. Генерация электроэнергии микробным БТЭ от эндогенной глюкозы травяной лягушки.....	124
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	128
ВЫВОДЫ	130
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	131

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АО – алкогольоксидаза;
- БЛ – берлинская лазурь;
- БХ – бензохинон;
- БТЭ- биотопливный элемент;
- ВОПГ – высокоориентированный пиролитический графит;
- ГО – глюкозооксидаза;
- ГЦФ – гексацианоферрат калия (III);
- ДМФ – диметилферроцен;
- ДХФИФ – 2,6-дихлорофенолиндофенол;
- ДЭС – двойной электрический слой;
- ЛА – лизоамидаза;
- МУНТ – многостенные углеродные нанотрубки;
- НХХ – напряжение холостого хода;
- ОГ – оксид графена;
- ОГв – восстановленный оксид графена;
- ПВС – поливиниловый спирт;
- ПВС_М – поливиниловый спирт, модифицированный N-винилпирролидоном;
- ПХ – пероксидаза хрена;
- СГЭ – спектральный графитовый электрод;
- СЭМ – сканирующая электронная микроскопия;
- ТРГ – терморасширенный графит;
- УВ – углеродные волокна;
- УВМ – углеродные высокодисперсные материалы;
- ФМНТ – функционализированные многостенные нанотрубки;
- ЦВА – циклические вольтамперные характеристики;
- ЭИС – электрохимическая импедансная спектроскопия;

CPE – элемент постоянной фазы;

C_{dl} – емкость двойного электрического слоя;

C_A - электрическая емкость анода;

C_K - электрическая емкость катода;

$P_{уд}$ – удельная мощность;

R_p – поляризационное сопротивление;

R_A – сопротивление переноса заряда через анод;

$R_{вн}$ – внутреннее сопротивление БТЭ;

R_K – сопротивление переноса заряда через катод;

R_0 – общее сопротивление системы;

$R_{пз}$ – сопротивление переноса заряда;

$R_{э}$ – сопротивление электролита;

$S_{э}$ – площадь электрода.

ВВЕДЕНИЕ

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. В настоящее время практически весь рынок электрохимических биосенсоров занят устройствами с потенциометрическими или амперометрическими преобразователями, при этом до 90% рынка занимают биосенсоры для определения глюкозы (Turner, 2013).

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 биотопливные элементы (БТЭ). Они осуществляют превращение химической энергии различных органических веществ в электрическую энергию в процессе биохимической трансформации (Liu et al., 2006). В первую очередь, 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 в том числе и отходы промышленных производств.

Другое потенциальное применение БТЭ – в качестве источников питания для устройств низкой мощности, в том числе и для имплантируемых в организм животных и человека. Для изучения БТЭ используется комплексный подход, сочетающий в себе аналитические, спектроскопические, биохимические и электрохимические методы анализа (Liu et al., 2005).

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 коммерчески доступные биосенсоры для определения глюкозы и спиртов, которые смогут найти свое применение в различных областях промышленности и лабораторного анализа.

Метод электрохимической импедансной спектроскопии в последние годы становится важным дополнением при изучении свойств БТЭ. Этот неdestructивный метод не мешает работе БТЭ при анализе и подходит 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 выбора углеродного наноматериала 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 работы

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

Впервые для штамма бактерий *Glucobacter* 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 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), а также 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 Решетилову 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

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» (Пушино, 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, Россия, 24 – 27 октября 2016); Всероссийские конференции с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология-2014» (Тула, Россия 2-3 октября 2014) и «Экотоксикология-2016» (Тула, Россия 11-12 октября 2016); Научно-практическая конференция с международным участием «Экологическая, промышленная и энергетическая безопасность – 2017»; (Севастополь, Россия 11 – 15 сентября 2017); I Российский микробиологический конгресс (Пушино, Россия, 17-18 октября 2017). Присуждена премия им. Г.К. Скрыбина (2015 г.).

Публикации

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, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 150 страницах, содержит 32 таблицы и 54 рисунка. Библиографический указатель содержит 251 источник литературы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Электрохимические устройства на основе биоматериалов

В настоящее время наблюдается неуклонный рост интереса исследователей к созданию аналитических и энергетических систем на основе биоматериалов в качестве альтернативы для более традиционных устройств (Vajracharya et al., 2017). Разработка подобных систем стала возможной благодаря развитию биоэлектрохимии, мультидисциплинарной области на границе биотехнологии, электрохимии и нанотехнологий. 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. Сочетание биокаталитической и электрохимической реакций в подобных системах может осуществляться по двум механизмам: либо по прямому биоэлектрокаталитическому механизму, либо с использованием специальных переносчиков - медиаторов электронного транспорта. В первом варианте электрод принимает или отдает электроны, выделяемые в процессе ферментативной реакции молекулой субстрата. Во втором случае для увеличения скорости обмена электронами между электродом и активным центром биокатализатора в систему вводят низкомолекулярный редокс-медиатор (Chaubey and Malhotra, 2002; Grieshaber et al., 2008). Оба механизма в настоящий момент применяются как в биосенсорах, так и в БТЭ, но считается, что большим потенциалом обладают именно системы, основанные на прямом электронном переносе.

1.1.1. Биосенсоры и их классификация

Существует множество определений понятия «биосенсор», но чаще всего используется краткий классический вариант: «аналитическое устройство, которое конвертирует отклик биологической реакции в считываемый и преобразуемый сигнал» (Lowe, 1984). Основное предназначение биосенсора – предоставлять быструю, точную и надежную информацию в реальном времени об исследуемом веществе. Биосенсоры состоят из двух основных компонентов – чувствительного слоя (биорецептора), содержащего материал биологического происхождения, отвечающего за генерацию сигнала сенсора (Banica, 2012), и физико-химического преобразователя, конвертирующего изменения свойств биоматериала в распознаваемый

электрический сигнал (Newman and Turner, 2005). Многообразие существующих биорецепторов и преобразователей представлено на рис. 1.

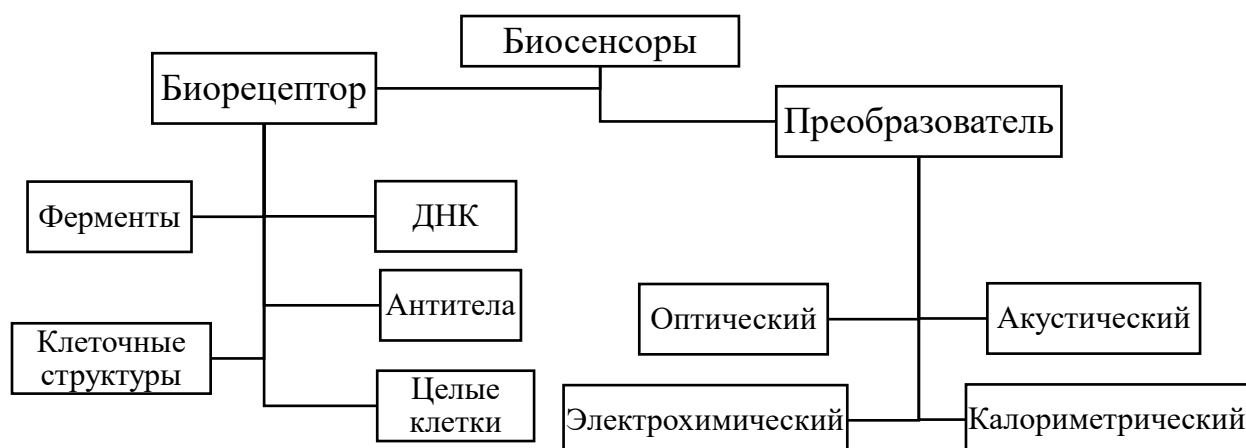


Рис.1. Наиболее распространенные в настоящее время биорецепторы и преобразователи в биосенсорах.

Физико-химические преобразователи играют важнейшую роль в устройстве биосенсора, поэтому в первую очередь биосенсоры принято делить на электрохимические, оптические, термические и акустические, в зависимости от используемого преобразователя (Perumal and Hashim, 2014). Наибольшее распространение в настоящее время получили именно электрохимические преобразователи сигнала. Их, в свою очередь, можно поделить на два основных типа. Первый тип преобразователей, используемый в амперометрических и кондуктометрических биосенсорах, работает по принципу измерения электрического тока, возникающего в результате окисления или восстановления электрохимически активных веществ на поверхности электрода (Eggins, 2002; Vanica, 2012). Сенсоры второго типа (потенциометрические) измеряют разность потенциалов между двумя электродами – рабочим и электродом сравнения при постоянном токе (D'Orazio, 2003, Bakker et al., 2005). Так как потенциометрические сенсоры основаны на измерении разности потенциалов между индикаторным электродом и электродом сравнения, их свойства во многом зависят от используемых индикаторных электродов (Makarychev-Mikhailov et al., 2008). Преимуществом данного типа сенсоров является измерение в условиях нулевого тока, что позволяет избавиться от влияния мешающих электрохимических реакций. В то же время, к недостаткам можно отнести необходимость установления термодинамического равновесия на поверхности электрода и логарифмическую зависимость потенциала электрода от концентрации анализируемого вещества ($\ln C = \text{const} + nEF / RT$, где n – заряд иона; F – число Фарадея; R – газовая постоянная и

Т абсолютная температура), что может привести к серьезным погрешностям при измерениях (Wang et al., 2008).

Кондуктометрические сенсоры основаны на измерении непосредственно электропроводности анализируемого раствора, которая изменяется вместе с его ионной силой. Продукты биохимической реакции в большинстве случаев влияют на электропроводность раствора, что и регистрируется кондуктометрическими сенсорами. В зависимости от типа биокатализатора, подобные сенсоры могут быть использованы для определения широкого спектра соединений, таких как спирты, мочевины и др. (Chouteau et al., 2004; Arora et al., 2011). Тем не менее, кондуктометрические биосенсоры достаточно мало распространены, так как сильно зависят от неспецифических изменений, сопровождающих биохимическую реакцию (Grieshaber et al., 2008, Eggins, 2002).

Амперометрические биосенсоры регистрируют изменения тока как функции от времени в связи с процессами окисления и восстановления электрохимически активных соединений в биохимических реакциях при определенном подаваемом извне потенциале (Perumal and Hashim, 2014). Амперометрия - наиболее распространенный способ преобразования сигнала в биосенсорах. Генерация сигнала в подобных биосенсорах может быть трёх типов: регистрация убыли одного из субстратов ферментативной реакции или образования продукта (биосенсоры первого поколения), медиаторный перенос электронов (биосенсоры второго поколения) и прямой перенос электронов (биосенсоры третьего поколения) (Borgmann et al., 2011)

Один из первых и наиболее широко используемых в биосенсорных исследованиях электродов для измерения концентрации кислорода в газовых и воздушных фазах является так называемый «электрод Кларка», названный в честь своего создателя, Леланда Кларка-младшего (Clark and Lyons, 1962). Подобные электроды и стали в дальнейшем считаться биосенсорами «первого поколения» - в них были использованы ферменты, для которых характерным являлось поглощение кислорода при окислении субстратов (Turner, 2013). Регистрация концентрации кислорода в слое иммобилизованного биоматериала позволяла оценить присутствие в среде того соединения, которое окисляется данным биологическим объектом (Карубе и др., 1992). При этом биосенсоры первого поколения имели серьезный недостаток, связанный с прямой зависимостью сигнала сенсора от концентрации кислорода в среде, что не всегда является результатом лишь биологической реакции (Fang et al., 2003).

Во втором поколении биосенсоров для передачи электронов из активного центра ферментов на электрод стали использоваться медиаторы электронного транспорта. Главная особенность данных соединений – способность к обратимому окислению и восстановлению

(Eggins, 2002; Yoo and Lee, 2010). Обычно под медиатором электронного транспорта понимается окислительно-восстановительная пара (чаще всего низкомолекулярная), способная к переносу электрона из активного центра фермента к рабочему электроду. Медиатор электронного транспорта заменяет кислород в роли окислителя в ферментативной реакции, а сам при этом окисляется на поверхности электрода. Подобная схема позволяет устранить влияние концентрации кислорода в среде на точность результатов измерения. Кроме того, использование медиаторов электронного транспорта повышает уровень сигналов биосенсоров и их селективность (Понаморёва и др., 2007). К безусловным недостаткам следует отнести то, что внешний медиатор постоянно должен находиться вблизи активного центра реакции. Кроме того, молекулы медиатора рано или поздно могут покинуть сенсорную поверхность, что негативно скажется на точности и долговременной стабильности биосенсора.

Третье поколение биосенсоров основано на прямом переносе электронов с фермента на преобразователь. Возможный прямой электронный перенос между ферментами и различными электродными материалами активно изучался в последние 30 лет (Ghindilis et al., 1997; Ghindilis, 2000, Yin et al., 2005). При этом эффективный прямой перенос возможен только для биоматериала, находящегося в непосредственном контакте с электродом, то есть в первом монослое на его поверхности (Kuznetsov et al., 2001) Одним из способов расширения области применения прямого электронного переноса является разработка подходящих поверхностей для иммобилизации ферментов, к которым относятся, например, самособирающиеся монослои. Другой подход – поиск новых ферментов, обладающих способностью к прямому переносу, либо химическая модификация известных ферментов. Большинство ферментов, к сожалению, не обеспечивают прямой электронный перенос на поверхностях традиционных электродов без специальной модификации этих поверхностей. В настоящее время именно нахождение работающей комбинации «электрод-фермент» является лимитирующим фактором в производстве биосенсоров третьего поколения. Тем не менее, разнообразие проводящих материалов позволяет создавать сенсоры с необходимыми аналитическими характеристиками, основанные на прямом переносе электронов, и их число с каждым годом неуклонно растёт (Wu and Hu, 2007; Borgmann et al., 2011).

Биологические компоненты в биосенсорах и их иммобилизация

Кроме классификации по типу преобразователя, биосенсоры разделяют и по биологическому компоненту, используемому в качестве биорецепторного элемента, генерирующего аналитический сигнал (Chaubey and Malhotra, 2002). Важнейшим свойством для рецептора является селективность и чувствительность к определенному анализируемому

веществу для предотвращения ответов сенсора на другие присутствующие в анализируемой системе примеси (Lowe, 2007). Биологические и физико-химические свойства используемого биоматериала во многом определяют выбор преобразователя, метод иммобилизации материала, формат проведения анализа, вид зависимости сигнала биосенсора от концентрации определяемого вещества в пробе и т.д. По данному признаку биосенсоры можно разделить на:

- Ферментные сенсоры, которые включают в себя очищенные ферменты или биологические препараты, проявляющие некоторую биологическую активность. Основаны на взаимодействии между субстратом и ферментом (Leca-Bouvier and Blum, 2010)
- Иммуносенсоры, использующие иммуноглобулины (белки, выделяемые иммунной системой организмов) в качестве биохимического рецептора, и регистрирующие взаимодействие антиген-антитело (Fowler et al., 2008).
- ДНК-сенсоры, включающие в себя нуклеиновые кислоты, в основном использующие высокоспецифичные аффинные реакции (Liu et al., 2012).
- Микробные биосенсоры, использующие в качестве биохимического рецептора живые микроорганизмы. В отличие от ферментных сенсоров, здесь в превращении субстрата может участвовать не один, а несколько ферментов (Wang and Liu, 2010).
- Биосенсоры на основе клеточных структур. Для их работы применяются внутриклеточные структуры сложного строения, т.е. данные сенсоры занимают промежуточное положение между микробными и ферментными.

Каждый из данных типов биосенсоров имеет свои отличительные особенности и преимущества. Иммуносенсоры и ДНК-сенсоры отличаются тем, что не используют в рецепторных элементах ферменты, которые в том или ином виде присутствуют в биохимических рецепторах других типов биосенсоров. Данные биосенсоры можно выделить в группу «аффинных» (Turner, 2013). Их особенностью являются процессы высокоспецифического связывания анализируемого соединения с мишенью, содержащейся в распознающем элементе биосенсора (которой могут быть антитела, части молекулы ДНК или рецепторы клеток) без образования побочных продуктов реакции. В большинстве случаев аффинные сенсоры предназначены для одноразового использования в детекции гормонов или лекарственных веществ в крайне низких концентрациях (Bora et al., 2013). Главный недостаток подобных сенсоров вытекает именно из отсутствия побочного продукта реакции, соответственно для регистрации самого факта реакции необходимо использовать специальные методы, например, флуоресцентные маркеры (Li et al., 2016)

Группа так называемых «каталитических» биосенсоров основана на ферментах, срезах тканей или клетках микроорганизмов; их основная особенность состоит в расходовании анализируемого соединения в процессе ферментативной реакции и образовании продукта катализа. Биосенсоры каталитического типа позволяют производить анализ в непрерывном режиме; типичный диапазон измеряемых концентраций заключен в пределах от микро- до миллимоль/л (Понаморёва и др., 2012). Ферментные сенсоры основаны на очищенных ферментах, выделенных из живых клеток. К основным свойствам ферментов, определяющим их применение в биосенсорах, относятся их исключительная субстратная специфичность, зависимость активности фермента от условий окружающей среды и влияние на скорость ферментативных реакций групп кофакторов и ингибиторов (Leca-Bouvier and Blum, 2010).

Из данных свойств следуют и основные преимущества, и недостатки ферментных биосенсоров. Так, абсолютная субстратная специфичность части ферментов обеспечивает высочайшую селективность биосенсорного анализа, но при этом слабая стабильность ферментов ограничивает время хранения и работы сенсоров (Kumar and Neelam, 2016). Большинство ферментов изменяют свою активность в зависимости от pH среды, поэтому для работы с ферментами необходимо поддерживать pH с помощью соответствующего буферного раствора. Кроме того, при работе с ферментными сенсорами нельзя забывать и об ингибирующем действии некоторых классов соединений на рецепторный элемент, что может затруднить корректное определение исследуемого вещества в сложной смеси (Eggins, 2002). Таким образом, к плюсам ферментных сенсоров можно отнести высокую скорость реакций, высокую специфичность, повышенный уровень чувствительности сенсора и аналитического сигнала (Newman and Setford, 2006). Из недостатков следует отметить высокую стоимость их выделения и очистки, некоторую нестабильность и уменьшение активности ферментов при их иммобилизации (Harris et al., 2013).

Поскольку большинство ферментных биосенсоров основаны на ферментах, выделяемых из микроорганизмов, вполне логично в качестве биокатализаторов использовать и сами микроорганизмы (Park et al., 2013). Основой для использования целых клеток в биосенсорных рецепторных элементах является наличие в них целых ферментативных комплексов (Švitel et al., 2006). Так, например, в биосенсорах могут использоваться одновременно все ферменты дыхательной цепи, находящиеся внутри одной клетки, либо особым образом выделенные из неё в составе клеточных структур (Bartlett, 2008). При этом возможны сразу, как минимум, три способа регистрации аналитического сигнала: по увеличению дыхательной активности микроорганизмов, по изменению показателя pH среды и по изменению скорости потока электронов в цепи переноса электронов.

В сравнении с ферментами, клетки и клеточные структуры более доступны, не требуют дорогостоящей очистки, а также дольше сохраняют свою стабильность (Xu and Ying, 2011). Но при этом данные биосенсоры отличаются более низкой селективностью и скоростью анализа (Katrlik et al., 2007). В настоящее время к целоклеточным биосенсорам приковано особое внимание, что можно оценить по количеству обзоров, посвященных данному типу сенсоров (Park et al., 2013; Xu and Ying, 2011; Su et al., 2011; Tkac et al., 2009; De Muynck et al., 2007; Švitel et al., 2006; Lei et al., 2006; Reshetilov, 2005), однако для широкого применения микробных биосенсоров необходимо решить еще множество задач, связанных, прежде всего, со стабильностью и точностью работы систем. Одним из возможных подходов к решению этой проблемы является поиск наиболее подходящих методов иммобилизации биоматериала.

Эффективная работа биосенсора возможна лишь в том случае, если биоматериал находится в непосредственном контакте с электрохимическим преобразователем. Метод иммобилизации можно считать подходящим, если после внедрения в носитель живые компоненты сохраняют свою биологическую активность на протяжении значительного времени (Kahn and Plaxco, 2010). Иммобилизация может быть разделена на активную и пассивную (Moreno-Garrido, 2013). К пассивному способу иммобилизации можно отнести способность микроорганизмов к «приклеиванию» и росту на различных поверхностях. С другой стороны, активная иммобилизация включает использование химических и физических способов фиксации и удерживания клеток, ферментов и других биоматериалов. Также иммобилизацию можно разделить на обратимую и необратимую.

Наиболее простым методом иммобилизации считается *адсорбция*. Чаще всего этот метод используется в том случае, когда не ожидается длительная эксплуатация сенсора и достаточно слабого прикрепления биоматериала. Адсорбция может быть физической (используются слабые силы Ван-дер-Ваальса), либо химической, протекающей с образованием более сильных связей. Адсорбированный биоматериал крайне чувствителен к изменениям условий внешней среды, однако благодаря легкости иммобилизации этот метод достаточно часто применяется в лабораторных условиях (Mohanty and Kougiannos, 2006).

Метод *капсулирования* отличается тем, что биоматериал иммобилизуется с помощью полупроницаемых мембран вместе с окружающим его раствором. Крупные молекулы удерживаются внутри капсулы, а мелкие могут свободно диффундировать через капсульную мембрану (Rother and Nidetzky, 2014).

Метод *ковалентного связывания* биоматериала позволяет создавать биосенсоры, в которых биологический компонент остается иммобилизованным в течение всего срока работы

сенсора. При этом заранее известно, через какие функциональные группы биоматериал прикрепляется к носителю. Однако далеко не всегда на проводящей поверхности локализованы функциональные группы, поэтому чаще всего требуется предварительная модификация поверхности преобразователя (Zhao et al., 2006).

Сшивка – это формирование поперечных связей между молекулами-биокомпонента. Для этого используют бифункциональные реагенты, то есть реагенты с двумя реакционноспособными группами (глутаровый альдегид, карбодимиды и т.д.). Как и в случае капсулирования, диффузия субстратов через полученные материалы снижается. Метод может быть полезен для повышения стабильности адсорбированных биоматериалов. Однако, при этом происходит потеря активности ферментов и снижение механической прочности (Sheldon, 2007).

Одним из наиболее современных методов иммобилизации является *встраивание биоматериала в гели* или *захват носителем*. В данном методе биоматериал удерживается в пространственной структуре, сформированной каким-либо гелем. В качестве основы может использоваться агар, желатин, коллаген, полиакриламид, поливиниловый спирт, полиуретан и др. (Пономорёва и др., 2007). Полученную пленку геля, содержащую биоматериал, фиксируют на поверхности физико-химического преобразователя за счет проницаемой мембраны или сетки.

В целом, в настоящее время усилия затрачиваются не столько на создание новых, сколько на модифицирование существующих методов иммобилизации (Rodrigues et al., 2013). Сравнивая же различные методы иммобилизации, можно сделать вывод о том, что для создания аналитических систем с высокой стабильностью и длительным временем хранения электродов предпочтение следует отдать методу включения в гели. Этот же метод можно признать и самым перспективным, так как современные технологии могут позволить создавать биогибридные гидрогели, теоретически значительно повышающие чувствительность и селективность анализа (Mateo et al., 2007).

1.1.2. Биотопливные элементы (БТЭ), их преимущества и перспективы

Электрохимические системы на основе биоматериала нашли свое применение не только среди аналитических устройств, но и в области биоэнергетики. К классу энергетических систем на основе биоматериалов относятся так называемые биотопливные элементы. Это устройства, в которых осуществляется превращение химической энергии различных органических веществ в электрическую энергию в процессе биохимической трансформации (Liu et al., 2006). В первую очередь, БТЭ привлекают внимание исследователей тем, что это один из наиболее доступных и экологически безопасных альтернативных источников энергии (Bullen, 2006). В качестве топлива для БТЭ могут быть использованы отходы промышленных производств, так как микроорганизмы

и ферменты способны к деструкции множества как низко-, так и высокомолекулярных соединений (Carrette et al., 2000). Таким образом, биотопливные элементы потенциально могут частично решить как проблему утилизации отходов, так и проблему истощения источников полезных ископаемых на Земле (Kannan et al., 2008). Биотопливные устройства, имеющие большую мощность, могут заменять обычные батареи, обеспечивая работу имплантированных медицинских и портативных конструкций, а также объектов, находящихся в труднодоступных местах, биороботов и т.д.

В настоящее время одно из наиболее быстро развивающихся направлений биоэнергетики — применение топливных элементов в медицине (Falk et al., 2013). Многие научные коллективы сосредоточены сегодня на создании биосовместимых имплантируемых медицинских устройств, работающих за счет энергии от переработки органических веществ, поступающих в организм с пищей (Stetten et al., 2006). Опубликованы данные об успешных работах по вживлению подобных устройств в организм животных (от моллюсков и насекомых (Halankova et al., 2012) до млекопитающих (Zebda et al., 2013)). Так, глюкозный биотопливный элемент мощностью 7.5 мкВт/мл, помещенный в брюшную полость живой крысы, успешно работал в течение нескольких часов (Cinquin et al., 2010). Американские исследователи из Университета Кларксон создали гибридное устройство, помещенное внутрь раковины улитки, в котором для генерирования электричества использовали эндогенную глюкозу моллюска (Szczupak et al., 2012). В настоящее время проводятся опыты с ферментными БТЭ, вживленными двум омарам (MacVittie et al., 2013). В результате удалось получить более эффективную систему, работающую в течение нескольких часов, а батарея из пяти таких топливных элементов могла бы поддерживать функционирование стимулятора сердца. Значит, уже в обозримом будущем можно рассчитывать на разработку и практическое применение стимуляторов, не требующих операций для замены источников питания (Cosnier et al., 2013).

Другое потенциальное применение БТЭ – использование в качестве источников питания для устройств низкой мощности (Bullen et al., 2006). Под «низкой» подразумевается удельная мощность (Руд), заключенная в диапазоне от 10^{-7} до 10^{-3} Вт на квадратный сантиметр площади электрода элемента. Для более широкого применения БТЭ требуется повышение генерируемой ими мощности, и тогда подобные источники могут быть использованы в медицине как источники электрической энергии для микроустройств типа кардиостимуляторов, микронасосов и тому подобного оборудования (Bandodkar and Wang, 2016). Причем в данном случае постоянный отбор электроэнергии от них не обязателен, вполне достаточным является периодическое включение, например, для подачи лекарств микронасосом. К настоящему моменту создано большое количество типов БТЭ, различающихся по материалам электродов, формату ячеек и

используемому биокатализатору, основные особенности которых описаны в следующих обзорах (Meredith and Minteer, 2012; Rahimnejad et al., 2015).

Биоматериалы, используемые в БТЭ

Конструкция всех существующих типов БТЭ приблизительно одинакова. Ячейка биотопливного элемента обычно состоит из двух инертных электродов – анода и катода – выполненных из золота, платины или углерода, и погруженных в буферный раствор (Katz and Wilner, 2003). Анодом называется электрод, на котором происходит окисление восстановленного источника электронов, а катодом – электрод, на котором происходит восстановление какого-либо акцептора за счет поступивших по электрической цепи от анода электронов (Atanassov et al., 2007). Электроды разделены ионообменной мембраной; анодное отделение зачастую продувают азотом, катодное – воздухом (или кислородом). Мембрана позволяет пространственно разделить реакции, протекающие в электродных отделениях элемента, и в то же время обеспечивает обмен протонами между ними, т.е. связывает два отделения электрически (Logan et al., 2006). Схема типичного БТЭ на примере микробного элемента представлена на рисунке 2.

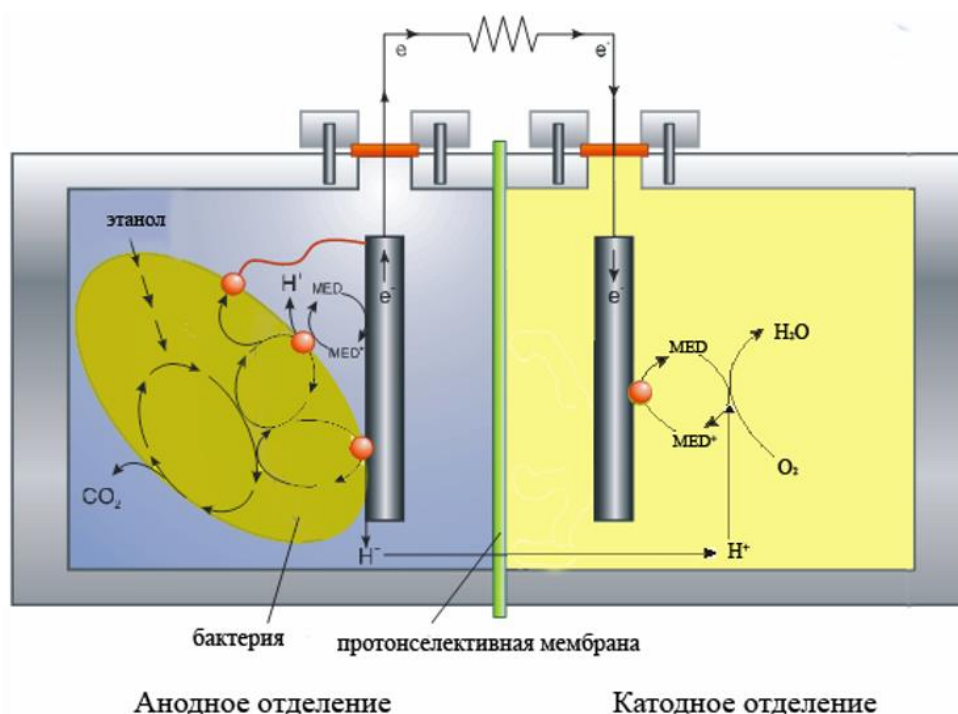


Рис.2. Схема двухкамерного микробного биотопливного элемента (Logan et al., 2006).

В качестве биокатализатора БТЭ могут быть использованы ферменты или бактерии, способные к передаче электронов на электрод. Конструкция ферментных биотопливных элементов обычно состоит из двух электродов с иммобилизованными на них очищенными ферментами. Чаще всего в качестве основного фермента анода используют иммобилизованную

глюкозооксидазу (ГО) в смеси с различными медиаторами, реже используются другие ферменты: алкогольдегидрогеназы (часто в паре с формиатдегидрогеназой), глюкозодегидрогеназы и гидрогеназы. Рабочим ферментом катода служит, главным образом, лакказа или билирубиноксидаза (Barriere et al., 2006). Как показывает изучение имеющихся работ, максимальная мощность этих систем все еще относительно низка и составляет не более 50 мВт/см². Пока такие элементы стабильно работают часами, днями, реже —десятками дней. (Yuhashi et al., 2005) Ферменты вне живых организмов являются не слишком устойчивыми соединениями (Kim et al., 2009), но современные достижения в области генетической инженерии позволили разработать простую систему экспрессии ферментов на поверхности клеток, делая их тем самым воспроизводимыми и более устойчивыми к внешним условиям. Ферментные БТЭ могут работать как с помощью прямого электронного переноса, так и с использованием искусственных медиаторов электронного транспорта (Luz et al., 2014). Последний вариант позволяет добиться большей мощности и эффективности топливных элементов (Cracknell et al., 2008), однако будущее подобных систем, несомненно, лежит в области прямой транспортировки электронов без использования дополнительных реагентов (Falk et al., 2012). К факторам, лимитирующим потенциал ферментных сенсоров можно отнести и проблему размеров. Ферменты – достаточно крупные молекулы, и из-за этого для иммобилизованных ферментов отношение плотности тока к площади электрода не столько высоко, как у традиционных топливных элементов. Однако, и эта проблема решаема – использование трехмерных электродов из материалов с увеличенной площадью поверхности позволяет обойти ограничения, связанные с очевидной невозможностью уменьшить размер самого биоматериала (Chenevier et al., 2013).

Как потенциальные биокатализаторы рассматриваются и микроорганизмы, из которых выделяются отдельные ферменты, применяемые в разработке БТЭ. У клеточных микроорганизмов в процессе биоэлектрокатализа участвуют всё те же ферменты, локализованные внутри клетки (Virdis et al., 2011). В микробной клетке энергия окисления органических субстратов расходуется по двум путям – на электрическую часть, обеспечивающую мембранные потенциалы, и на химическую, с образованием АТФ. Первые предположения о том, что микроорганизмы можно использовать для генерации электричества, выдвигались еще в начале прошлого века (Potter, 1910), но предметно данный вопрос стал изучаться лишь в последние 15-20 лет, когда появились идеи использовать сначала медиаторный, а затем и безмедиаторный транспорт электронов (Mokhtarian et al., 2012).

Отдельной важной задачей является подбор микроорганизмов для использования в БТЭ из всего их многообразия, поскольку виды микроорганизмов значительно различаются по физиологии дыхания и биохимии. Для использования в БТЭ штаммы бактерий тестируются на

эффективность (Sayed et al., 2012), и если свойства микроорганизма оказываются подходящими, то уже затем начинается его применение в качестве биокатализатора БТЭ. В качестве катализаторов на сегодняшний день используются не только целые клетки микроорганизмов, но и отдельные органеллы, такие как митохондрии (Arechederra et al., 2008).

В целом, оба типа биотопливных элементов имеют свои преимущества и недостатки, и каждый из них может найти свое применение в зависимости от конкретной практической задачи. Для максимально разумного использования всего спектра существующих и потенциально создаваемых БТЭ необходимо особое внимание уделить комплексному изучению параметров БТЭ и их оптимизации с помощью физических, химических и биологических методов анализа.

1.1.3. Использование целых клеток микроорганизмов в БТЭ и биосенсорах

Применение целых микробных клеток как биокатализаторов в БТЭ и биосенсорах имеет свои особенности, поэтому основные направления работы с микроорганизмами во многом определяются достоинствами и недостатками микроорганизмов как биокатализаторов. Если говорить о микробных БТЭ, то в качестве преимуществ целых клеток микроорганизмов следует отметить, что:

1. Субстратная специфичность микроорганизмов очень велика, и, они могут перерабатывать широкий круг субстратов, например, подавляющее большинство природных углеродных соединений.

2. Стоимость производства биокатализатора из целых микроорганизмов намного ниже стоимости очистки и выделения индивидуальных ферментов (Sun et al., 2015).

3. Нередко процесс окисления субстрата в клетках является многостадийным, и в этом случае электрохимический сигнал от клеток может быть выше, чем в случае изолированного фермента (Bond et al., 2002).

4. Некоторые потенциально пригодные для работы в БТЭ ферменты не используются из-за своей неустойчивости, в то время как в клетках они защищены природной естественной оболочкой и находятся в оптимальных для себя условиях.

5. В микроорганизмах ферментам обеспечивается лучшая защита от посторонних растворенных веществ, что положительно сказывается на качестве сигнала.

6. Для работы микроорганизмам не требуются экзогенные кофакторы, часто необходимые изолированным ферментам.

7. Многие микроорганизмы подробно охарактеризованы генетически, имеются отработанные методы селекции штаммов с высоким выходом определенных ферментов, что положительно сказывается на активности и селективности БТЭ (Franks and Nevin, 2010)

Однако, нельзя обойти вниманием и следующие недостатки устройств на основе целых клеток:

1. Целые клетки обладают высокой приспособляемостью и изменчивостью, так что параметры БТЭ могут неконтролируемо изменяться в процессе работы как в положительную, так и в отрицательную сторону. Например, клетки, лишенные какого-либо субстрата, могут перейти на альтернативный путь метаболизма, который будет неэффективен для генерации электроэнергии (Logan, 2009). Высокая изменчивость для биосенсоров также является неприемлемой, т.к. это может сильно снизить его аналитические параметры.

2. Проблемой является необходимость поддержания активности микроорганизмов в течение длительного времени на одинаковом уровне (Kim et al., 2007).

3. Наличие дыхательной цепи в системе приводит к нежелательной ингибирующей активности атмосферного кислорода (Zhao et al., 2005).

4. Проблема «крупных молекул фермента» еще сильнее выражена в случае использования целых клеток.

5. Широкая субстратная специфичность клеток хороша при применении клеток в БТЭ, но для целоклеточных биосенсоров это является серьезнейшим минусом, уменьшающим селективность сенсора.

Если рассматривать все многообразие микроорганизмов с точки зрения пригодности для использования в БТЭ и биосенсорах, то, в основном, исследователи предпочитают использовать прокариотические организмы, так как бактериальные клетки чаще обладают способностью либо к прямому переносу электронов, либо к взаимодействию с медиаторами электронного транспорта. Эукариотические организмы используются в целом виде редко, лишь некоторые дрожжи применяются в биосенсорах на основе кислородного электрода (Akyilmaz et al., 2007; Arlyarov et al., 2012). В последнее время в литературе описаны биоэлектрохимические системы на основе как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий (Lin and Tanaka, 2006; Wrighton et al., 2011.). Наиболее активно в конструкции биосенсоров и БТЭ применяются бактерии родов *Pseudomonas sp.*, *Escherichia sp.*, *Shewanella sp.* (Rabaey, 2004) и *Gluconobacter sp* (Bertokova et al., 2015), которые обладают наиболее подходящим набором свойств: либо высокой окислительной активностью к определенным субстратам, либо широким диапазоном

определяемых соединений. Бактерии других штаммов используются реже, хотя некоторые находят свое применение благодаря способности к активному окислению определенных субстратов, что позволяет положить их в основу определенных высокоселективных биосенсоров.

Бактерии рода *Gluconobacter sp.* из семейства уксуснокислых бактерий относятся к грамотрицательным аэробным бактериям, которые для роста предпочитают богатые сахарами среды (Sievers, 2015), получили широкое распространение в области конструирования БТЭ и биосенсоров благодаря своей способности окислять широкий спектр углеводов и спиртов. Особенности использования *Gluconobacter sp.* в биосенсорике описаны в обзоре (Švitel et al., 2010). Широкая субстратная специфичность данного рода позволяет использовать его в области экологического контроля сточных вод, а также для генерации электричества из целого ряда органических соединений. Так, на основе бактерий *Gluconobacter* существует возможность создавать гибридные устройства, сочетающие в себе качества как биосенсора, так и биотопливного элемента. Устройство может одновременно генерировать электричество на основе содержащихся в пробе субстратов и оценивать загрязненность пробы по изменению уровня генерируемой силы тока. В частности, подобная идея рассматривается в работах (Stein et al., 2012; Wang et al., 2014.), где биосенсоры на основе целоклеточного БТЭ используются для определения токсичности пробы и уровня химического потребления кислорода.

Из всего рода *Gluconobacter* наибольшую известность имеет вид *Gluconobacter oxydans*, имеющий несколько биотехнологических применений. Основной физиологической особенностью бактерий этого рода является организация их метаболической системы, которая характеризуется околосоматической локализацией основных окислительных ферментов в клетке и высокой скоростью работы электрон-транспортной цепи (Gupta et al., 2001). Бактерии вида *Gluconobacter oxydans*, ранее известные как *Acetobacter suboxydans*, грамотрицательны и имеют палочковидную или эллипсообразную форму с размерами 0,5-0,8 мкм до 4,2 мкм (Macauley et al., 2001). Клетки имеют две мембраны и не имеют жгутиков, из-за чего они не подвижны (иногда наблюдаются и подвижные формы с 3-8 жгутиками). Так как бактерии относятся к аэробам, им необходим кислород для генерации энергии. Предполагается, что в клетках *G. oxydans* содержится незаконченный комплект ферментов трикарбонового цикла, т.к. бактерии не способны к полному окислению ацетатов и лактатов до углекислого газа и воды (Macauley et al., 2001).

Применение *G. oxydans* в биотехнологии можно отнести к нескольким областям. Они часто используются в биотехнологических экспериментах благодаря наличию мембрано-локализованных дегидрогеназ, что очень полезно для неполного окисления субстратов (Katrlik et

al., 2007). *G. oxydans* применяют для синтеза витамина С, сорбита, ксилита и уксуса. Так как *G. oxydans* может с высокой скоростью окислять около 80 различных органических соединений, широко их применение и в области биосенсорики и биотопливных элементов. Современные взгляды на перспективы данного вида в области создания эффективных электрохимических биосенсоров и биотопливных элементов представлены в обзоре (Bertokova et al., 2015). В частности, в нём отмечается высокая биотрансформационная активность данных бактерий в сочетании с простыми условиями роста биомассы. Кроме того, авторами отмечается способность систем на основе данных бактерий как к медиаторному, так и к прямому электронному переносу. Использование прямого электронного переноса в сочетании с разнообразием дегидрогеназ может успешно использоваться при генерации электричества на основе сточных вод или сложных образцов, в которых присутствует широкий диапазон окисляемых субстратов. Высокая устойчивость *G. oxydans* к некоторым токсичным соединениям также является большим плюсом для применения этого микроорганизма в биоэлектрохимических системах (Ricelli et al., 2007).

1.1.4. Использование наноматериалов в БТЭ и биосенсорах

Для разработки БТЭ и биосенсоров на основе ферментов и клеток микроорганизмов крайне важен правильный выбор материала электрода. Материал электрода для данных устройств должен обладать целым рядом свойств: иметь высокую электропроводность, химическую стойкость, большую удельную поверхность и адсорбционную удельную емкость, а также обладать достаточной биосовместимостью с используемым биокомпонентом (Shen et al., 2012). Одной из современных тенденций выбора материалов электродов для БТЭ и биосенсоров является применение для модификации электродов наноструктурированных материалов, что связано с их уникальными физико-химическими свойствами (Šefčovičová and Tkáč, 2014). Современные наноматериалы представлены веществами с различной химической природой и самыми разнообразными свойствами (Dios, 2010; Vashist, 2015). При выборе наноматериала для решения конкретной задачи принимают во внимание природу используемого вещества, способ его получения, доступность, а также физические и химические свойства наноматериала. Большинство используемых наноматериалов можно разделить на три группы: углеродные наноматериалы (графен, углеродные нанотрубки, углеродные волокна и т.д.), наночастицы металлов (чаще всего используются частицы золота и серебра) и разветвленные полимеры. Каждый из этих типов наноматериалов обладает своими уникальными свойствами, которые позволяют совершенствовать электроды биоэлектрохимических устройств, при модификации их поверхности. Углеродные наноматериалы, в первую очередь, отличаются высокой электропроводностью, одновременно увеличивая при этом и активную поверхность электрода.

Наночастицы металлов также обеспечивают наличие высокоразвитой поверхности и могут участвовать в электрохимических процессах в системе (Habib et al., 2012).

Области применения наноматериалов в биосенсорике с каждым годом только расширяются, и анализ литературных данных показывает, что применение углеродных нанотрубок и металлических наночастиц может приводить к получению новых полезных свойств биосенсоров, и такой вариант все чаще используется для модификации поверхности электродов при разработке современных амперометрических сенсоров и биосенсоров (Pei et al., 2013). Области использования биосенсоров в практических целях в настоящее время постоянно расширяются (химический синтез, контроль качества продукции, экологический контроль, биомедицинские исследования), и исследователи часто обращаются к совершенствованию этих устройств при помощи наноматериалов. Одним из важных параметров биосенсоров является скорость протекания электрохимической реакции между биологическим компонентом и поверхностью электрода. Модификация поверхности углеродными наноматериалами, обладающими высокой электропроводностью, может увеличить скорость переноса электрона или облегчить прямой перенос электронов. В некоторых работах высказывается мнение (Chang et al., 2013), что большая площадь поверхности многостенных углеродных нанотрубок (МУНТ) способствует улучшенному размещению биомолекул (например, ферментов или антител), таким образом, улучшая чувствительность сенсоров и биосенсоров через усиление электрических сигналов. Возможно и использование углеродных нанотрубок в биосенсорах для передачи сигнала непосредственно между электроактивным компонентом и электродом, что представлено в работе (Jacobs, 2010).

Наночастицы металлов чаще всего применяются в иммуносенсорах, причем для более удобного закрепления наночастиц металлов на поверхности сенсоров зачастую применяют дополнительные компоненты, например, тиоловые группы (Bhattacharya and Mukherjee, 2008). Кроме того, совместно с наночастицами металлов могут использоваться и углеродные нанотрубки, увеличивающие поверхность электродов и позволяющие наночастицам металлов прочнее удерживаться на поверхности (Lin et al., 2009). В иммуноанализе наночастицы золота могут выступать не только как модификаторы поверхности, но и как метки. В частности, в работе (Ding et al., 2010) предложен иммуносенсор для определения вируса гепатита В на основе стеклоуглеродного электрода, модифицированного N-сукцинимидиловым эфиром 3,3-дителиодипропионовой кислоты и первичными антителами. Вторичные антитела же были мечены пероксидазой хрена и наночастицами золота.

Рассматривая публикации последних 5 лет в области создания БТЭ можно рассмотреть точно ту же тенденцию, что и в области разработки биосенсоров – повышенное внимание к применению новых материалов при создании электродов. При этом основной интерес вызывают именно углеродные наноматериалы (Karimi et al., 2015; Wen and Eychmüller, 2016). Задача исследователей состоит в поиске условий максимальной энергоотдачи для БТЭ за счет нахождения оптимальных условий переноса заряда. При этом углеродные наноматериалы могут решить сразу две проблемы, связанные с переносом заряда - увеличить удельную поверхность электродов, доступную для иммобилизации биоматериала, а также уменьшить сопротивление полученного модифицированного биоэлектрода, что положительно скажется на производительности всего элемента (Mohanakrishna, 2012). В последние годы наибольшее внимание приковано к одномерным наноматериалам, таким как нановолокна и нанотрубки. Их электронные, оптические и магнитные свойства (Hsin et al., 2007) позволяют им использоваться во многих областях. В частности, цилиндрическая структура нанотрубок с отношением длины к диаметру 28000000:1 является уникальной, благодаря чему проявляется отличная электропроводность этого материала и способность к прямому электронному переносу (Gambhir et al., 2009; Smart et al., 2006). При этом в литературе отмечено, что свежеприготовленные углеродные нанотрубки не могут быть использованы в БТЭ в связи с их высокой токсичностью для клеток, и должны быть предварительно модифицированы для уменьшения токсичности и повышения стабильности БТЭ (Liu et al., 2012). Находится применение в биотопливных элементах и графену, что подробно описано в обзоре (Filip and Tkac, 2014). Графен, как и нанотрубки, обладает высокой электрической проводимостью, при этом его механическая прочность, совместимость с биоматериалом и ряд других ценных свойств делает его подходящим материалом для конструирования электронных устройств. При этом в БТЭ графен стал использоваться лишь с 2010 года, когда появились первые упоминания созданных устройств на основе графена и глюкозооксидазы (Shan et al., 2010.).

Таким образом, в настоящее время исследования в области разработки БТЭ направлены на изучение свойств проводящих наноматериалов, поиск новых схем использования наноматериалов в составе электродов, позволяющих осуществлять перенос электронов по механизму медиаторного и прямого биоэлектрокатализа в сочетании с новыми ферментами или микробными клетками. При этом в число чаще всего используемых как в биосенсорах, так и в БТЭ, наноматериалов входят углеродные нанотрубки, нановолокна и графен. Как показывают исследования, углеродные нанотрубки и нанокomпозиты на их основе, несмотря на свою токсичность, способствуют улучшенному электронному переносу между биоматериалом и электродами (Ghasemi et al., 2013), а графеноподобные материалы благодаря своему высокому

соотношению поверхность/объем, электропроводности и прочности, могут расширить спектр возможностей для разработки малогабаритных БТЭ нового поколения (Алфёров и др., 2014).

1.1.5. Методы изучения свойств БТЭ

Биотопливные элементы относятся к гибридным системам, состоящим из нескольких компонентов. Изучать БТЭ можно с разных сторон: аналитическими, спектроскопическими, биохимическими или электрохимическими методами (Liu et al., 2005). Методы исследования морфологии поверхностей электродов, такие как сканирующая электронная микроскопия, флуоресцентная микроскопия или конфокальная микроскопия используются в случае активного роста биопленок на электродах БТЭ для понимания характера роста, плотности пленки, гетерогенности и толщины слоя биомассы (Li et al., 2011). Кроме того, эти же методы помогают оценить пористость материалов и мембран, используемых в конструкции БТЭ (Zhou et al., 2011). Биохимические методы помогают оценивать концентрации редокс-медиаторов в системе, а спектроскопические – идентифицировать качественный и количественный состав химический состав продуктов реакции.

Основной проблемой, препятствующей коммерциализации и распространению БТЭ, является их производительность, на которую влияют следующие факторы: внутреннее сопротивление, расстояние между анодом и катодом, скорость переноса электронов от бактерий к аноду, концентрация субстрата, эффективность передачи электронов с катода, температура, ионная сила раствора и другие. Важную роль играет тип микроорганизмов, источник энергии, материал проводящей мембраны, электронный медиатор и акцептор (Logan and Regan, 2006; Franks and Nevin, 2010). Для успешного создания высокопроизводительных БТЭ необходимо иметь возможность анализировать влияние всех этих компонентов на работу системы. Большие усилия ученых направлены именно на попытки увеличить производительность БТЭ варьированием различных их параметров (Hamelers et al., 2009, Zhao et al., 2009).

Важнейшей группой методов для характеристики биоэлектрохимических систем являются электрохимические методы анализа. К наиболее часто используемым методам относятся циклическая вольтамперометрия и дифференциальная импульсная вольтамперометрия, которые характеризуют процессы электронного переноса в системе. Циклическая вольтамперометрия становится основным методом характеристики в случае, если медиаторный электронный перенос является доминантным способом переноса электронов в системе, так как этот метод способствует четкому пониманию происходящих в биотопливных элементах процессов переноса электронов (Logan et al., 2006). В некоторых случаях требуется и

применение дополнительных методов, например, методов хроматографии, для наблюдений за количеством выделяемых в процессе работы БТЭ продуктов (Roy et al., 2012).

В последние 10-15 лет начинается активное использование метода электрохимической импедансной спектроскопии (ЭИС) при изучении биологических систем. ЭИС является мощным неdestructивным инструментом для исследования электрохимических систем. Она применяется во множестве областей, но в основном распространена при изучении коррозии, в том числе и вызываемой микроорганизмами (Kelly et al., 2002). Использование ЭИС для изучения биотопливных элементов пока что находится на достаточно ранних стадиях, так что у этого метода исследования есть большой потенциал в данной области. В целом, можно сказать, что импедансная спектроскопия выглядит хорошим дополнением для известных электрохимических и спектроскопических методов анализа при изучении и оптимизации электрохимических свойств биологических систем. В методе вольтамперометрии, одном из самых популярных методов анализа микробных БТЭ на сегодняшний день, электрод приводится в состояние, далекое от равновесия путем введения внешнего потенциала, и наблюдается ответ системы на это. В ЭИС же на систему воздействует переменный ток малой величины, и ответ системы на воздействие наблюдается в стационарном состоянии (He and Mansfield, 2009). Другим серьезным преимуществом ЭИС является то, что этот метод неdestructивен и не мешает нормальной работе топливного элемента при проведении измерений. Таким образом, ЭИС является тем методом измерений, в котором никакие параметры работающего БТЭ не меняются извне. Кроме того, ЭИС является отличным инструментом для изучения вклада отдельных сопротивлений в общий импеданс топливных элементов и благодаря подобной возможности может хорошо работать в паре с методом циклической вольтамперометрии при комплексном изучении биотопливных элементов.

1.2. Электрохимическая импедансная спектроскопия (ЭИС) в биосенсорах и БТЭ

Большинство электрохимических методов характеризуются тем, что на измерительную ячейку подается фиксированное напряжение, выводящее систему из состояния равновесия, и регистрируется возникающий при этом электрический ток. На этом принципе основана работа амперометрических биосенсоров, с помощью подобных методов, например, циклической вольтамперометрии, изучались и биотопливные элементы (Vielstich, 2010). В последнее время возрос интерес к применению переменных напряжений для исследования процессов переноса электронов в биоэлектрических системах (Katz and Wilner, 2003). Даже без учета особенностей исследуемого образца, у таких методов наблюдается минимум два преимущества. Во-первых, это высокое соотношение сигнал\шум и возможность использования средств математического

анализа для изучения любых систем. Во-вторых, в процессе измерения есть возможность изменять частоту возбуждающего сигнала, что делает подобный метод одной из форм спектроскопии, позволяя изучать частотно-зависимые электрические свойства любой системы, в том числе и системы, содержащей в себе биоматериал (Park and Yoo, 2003).

Частотно-зависимые электрические свойства (или «импеданс») важны для понимания таких сложных гетерогенных систем, как биотопливные элементы. В микробных БТЭ клетки колонизируют поверхность электрода, делая электрохимические взаимодействия в системе крайне запутанными, ведь для их изучения необходимо разделять процессы, происходящие внутри клеток, внутри электрода, между электродом и клетками, а также процессы с участием всех этих компонентов, субстратов и медиаторов реакций. Для четкого понимания всех процессов, происходящих в системе, необходим метод, регистрирующий движение зарядов внутри и на поверхностях всех компонентов системы, а также способный разделять их (Kashyap et al., 2014). Таким методом и является электрохимическая импедансная спектроскопия. ЭИС до настоящего времени являлась, в основном, инструментом для электрохимических исследований, не связанных с применением биологического материала (Решетилов и др., 2013). Однако, данный метод может быть использован для изучения абсолютно любых систем, независимо от их происхождения, поэтому следует обратить особое внимание на возможные применения этого перспективного метода в биологии и, в частности, в биоэлектрохимических системах, таких как биосенсоры и биотопливные элементы.

1.2.1. Теоретические основы импеданса

Если вспомнить закон Ома, то сопротивление (R) это величина, обратно пропорциональная проводимости электрического тока через проводник, равная отношению напряжения (U) к силе тока (I). Однако, кроме омического сопротивления есть еще два механизма, описывающих потоки зарядов в электрической цепи. Магнитные свойства электрических цепей выражаются индуктивностью (L), а способность некоторых элементов накапливать электрический заряд определяется их емкостью (C) (Шольц, 2006). Вместе величины индуктивного и емкостного сопротивлений дают значение реактивного сопротивления (X), которое вместе с омическим (реальным) сопротивлением являются составляющими полного сопротивления, или импеданса, обозначаемого символом Z (1), (2):

$$Z = R + jX \quad (1)$$

$$X = X_L - X_C \quad (2)$$

Термин «импеданс» впервые был введен в конце девятнадцатого века английским физиком О. Хевисайдом, применившим комплексные величины для обработки электрических сигналов (Heaviside, 1886). В общем случае, импеданс состоит из двух компонент – реальной и мнимой. Реальная компонента импеданса – это омическое сопротивление, а мнимая компонента составляется из реактивности системы. Таким образом, для тока или напряжения синусоидальной формы величина комплексного сопротивления — это отношение переменного тока к переменному напряжению, в то время как фазовый угол комплексного сопротивления — это сдвиг фазы, на который ток смещен по отношению к напряжению (Barsoukov and Macdonald, 2005).

Значение и фазовый угол импеданса легко можно представить с помощью комплексной диаграммы, представляющей значение вектора импеданса как $|Z|$, а его фазовый угол как θ . Значение импеданса при этом может быть представлено через его реальную (Z_{re}) и мнимую (Z_{im}) компоненты по формуле (3):

$$|Z| = \sqrt{Z_{re}^2 + Z_{im}^2} \quad (3)$$

Фазовый угол при этом выражается по формуле (4):

$$\theta = \tan^{-1} \frac{Z_{im}}{Z_{re}} \quad (4)$$

Графически данные импеданса чаще всего представляются с помощью частотных диаграмм, из которых наиболее распространенными являются диаграммы Найквиста и Боде (рис. 3) (Bard and Faulkner, 2001). В диаграмме Найквиста (рис. 3, а) реальная компонента импеданса представлена осью x , а мнимая компонента – осью y . При этом каждая точка на графике соответствует импедансу исследуемой системы при определенной частоте переменного тока. Главным недостатком диаграмм Найквиста является то, что при одном взгляде на график невозможно точно сказать о том, какой частоте соответствует каждая конкретная точка. В левой части графика у нулевой точки оси абсцисс представлены высокочастотные данные, в правой части этой оси – значения, полученные при низких частотах, но значения самих частот на графике не указываются, иначе диаграмма получилась бы слишком перегруженной данными. Для исправления этого недостатка диаграмм Найквиста и существуют диаграммы Боде или фазовые диаграммы, где по оси x откладывается значение приложенной частоты переменного, а абсолютное значение импеданса (для диаграммы Боде) или фазовый угол (для фазовой диаграммы) – по оси y (Стойнов и др., 1991).

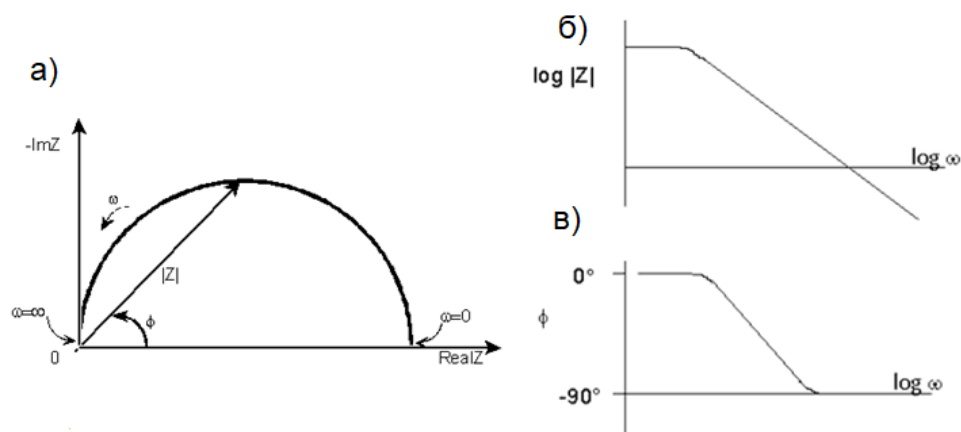


Рис.3. Диаграммы Найквиста (а), Боде (б) и фазового угла (в). $\text{Im}Z$ – мнимая часть импеданса, $\text{Real}Z$ – реальная часть импеданса.

1.2.2. Параметры эквивалентных электрических схем

Данные, получаемые методом ЭИС, чаще всего обрабатывают с помощью выбора или составления подходящей эквивалентной электрической схемы. При этом большинство элементов эквивалентной цепи — это стандартные электрические элементы, такие как резисторы, конденсаторы и индуктивности (Orazem and Tribollet, 2008). Вне зависимости от того, какова природа объекта исследования, он может быть упрощен до базовых эквивалентных элементов, благодаря чему практически любую сложную электрохимическую систему (в том числе и биологическую) можно выразить в виде простой эквивалентной электрической схемы (Dominguez-Benetton et al., 2012.). Эквивалентная схема идеального сопротивления будет состоять всего из одного элемента – сопротивления R , при этом импеданс такого элемента будет состоять только из реальной компоненты. Импеданс идеального конденсатора будет полностью мнимым, а схема – состоять из одной емкости, но при этом значения импеданса для данной системы будут зависеть от частоты приложенного тока. Для реальных систем чаще всего эквивалентные схемы состоят из нескольких простых элементов, соединенных между собой параллельным или последовательным соединением (Chang and Park, 2010). Отметим наиболее часто применяемые в электрохимии параметры, отражаемые в эквивалентных схемах.

Сопротивление электролита ($R_{\text{э}}$). В электрохимической ячейке сопротивление ионного раствора вносит серьезный вклад в общий импеданс системы. Сопротивление электролита зависит от ионной концентрации, природы раствора, его температуры и объема, через который проходит электрический ток. Кроме того, в случае наличия микроорганизмов в проводящем растворе, бактерии тоже могут вносить свой вклад в значение сопротивления электролита (Laurent et al., 2001). В большинстве случаев, сопротивление электролита (одно или несколько)

всегда присутствует в эквивалентных электрических схемах и может быть высчитано из общего импеданса системы.

Емкость двойного электрического слоя (C_{dl}). Разделение зарядов или двойной электрический слой (ДЭС) присутствует около каждой поверхности поляризованной системы, например, на границе между раствором и электродом или у ионообменной мембраны, что является эквивалентом конденсаторов в электрической цепи. Подобное разделение зарядов возникает и у мембран бактериальных клеток (Nelson, 2008). Данный параметр сильно зависит от наличия и роста биоматериала в системах, в частности, от толщины биопленок на электродах, и может быть использован для наблюдения за ростом биомассы (Kim et al., 2011). Для того, чтобы описать неидеальность конденсаторов в исследуемых системах, применяется понятие *элемента постоянной фазы (CPE)*. В реальных системах «конденсатор двойного слоя» часто ведет себя как элемент постоянной фазы, для численного выражения данной неидеальности вводится коэффициент α , равный единице для идеального конденсатора и имеющий значение <1 для реальных систем (Hirschorn et al., 2010).

Поляризационное сопротивление (R_p). Электрод считается поляризованным в случае, если приложенный потенциал отличается от равновесного потенциала электрохимической реакции на поверхности электрода, что в свою очередь ведет к окислению\восстановлению веществ на поверхности электрода. Численно поляризационное сопротивление – это величина, равная отношению поляризации электрода к значению проходящего через электрод тока (Barsoukov and Macdonald, 2005).

Сопротивление переноса заряда ($R_{пз}$). Данный параметр отвечает за перенос заряда из одной фазы в другую, например, от ионсодержащих жидкостей к твердым проводникам. Сопротивление переноса заряда для каждого конкретного случая зависит от типа реакции, температуры, концентрации продуктов реакции и приложенного потенциала. Во многих случаях сопротивление переноса заряда и поляризационного сопротивление равны друг другу, однако, в комплексных системах это не всегда так (Cugioni et al., 2015).

Диффузия (Z_w). Присутствие диффузионных ограничений в системе также отражается в общем импедансе системы, и элемент, соответствующий диффузии, называется элементом Варбурга. Данный элемент зависит от частоты приложенного тока и проявляется при низких частотах, т.к. с уменьшением частоты увеличивается расстояние, на которое частицы диффундируют (Macdonald, 1992). На диаграмме Найквиста наличие элемента Варбурга выражается как диагональная линия с наклоном в 45 градусов в области низких частот.

Все упомянутые элементы можно включить в цепь таким образом, чтобы они обеспечили те же параметры выходного тока, которые вырабатываются изучаемой системой. Этот процесс и называется построением эквивалентной электрической схемы. На рис. 4 приведена одна из основных и наиболее часто применяемых в ЭИС схем, схема Рэндлса. Эта схема является базовой для многих других схем и состоит из сопротивления электролита, емкости ДЭС и сопротивления переноса заряда (или поляризационного сопротивления). Она является эквивалентом простого металлического электрода, опущенного в раствор электролита (Lasia, 1999.). Соответствующая данной схеме диаграмма Найквиста представлена на рисунке 4(b). Она состоит из полукруга, пересекающего ось x в двух местах. Ближайшее к нулю пересечение соответствует значению сопротивления электролита, дальнее – значению общего сопротивления системы. Главной особенностью схемы Рэндлса является её универсальность. Например, если в системе возникают диффузионные ограничения, то это сразу же отражается на виде диаграммы Найквиста (рис.4d), где проявляется прямая с наклоном 45 градусов в области высоких частот. В таком случае в схему Рэндлса добавляется элемент Варбурга, как показано на рисунке 4с, и модифицированная схема позволяет точно высчитать значения всех параметров системы. В зависимости от конкретного случая, схема Рэндлса может бесконечно модифицироваться и быть основой для любых комплексных схем, описывающих сложные электрохимические системы (Ruiz and Felice, 2015).

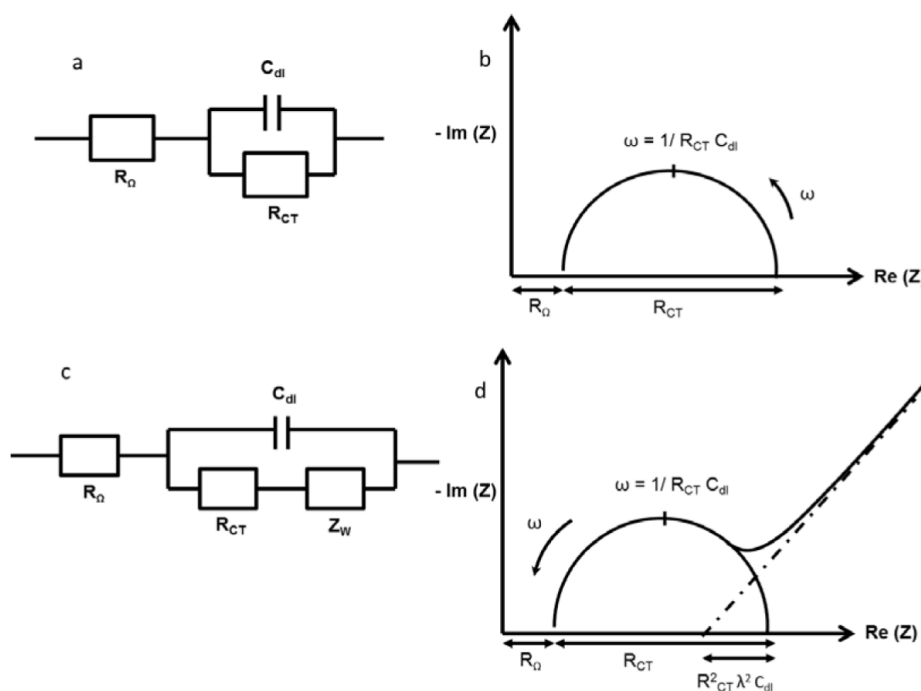


Рис. 4. Эквивалентная схема Рэндлса (а) и соответствующая ей диаграмма Найквиста (b); схема Рэндлса с элементом Варбурга (с) и характерная диаграмма Найквиста (d) (Sekar and Ramasamy, 2013). R_{CT} – сопротивление переноса заряда, R_Ω – сопротивление электролита. ω – частота

приложенного тока. Наличие диффузионных ограничений в системе проявляется наличием характерной прямой с фазовым углом в 45° .

1.2.3. Применение ЭИС для исследования небιологических и биологических объектов

Первые примеры работы с импедансом можно найти еще в начале прошлого столетия, но как самостоятельный метод ЭИС впервые применил французский исследователь Эппелбойн с коллегами, изучавший с его помощью процессы коррозии в 1960-х годах (Macdonald, 2006). Именно после его работ метод импеданса стал основным в данной области, до этого же импеданс систем измеряли, в основном, с помощью различных измерительных мостов, которые не могли обеспечивать частоты ниже 100 герц. Совместными усилиями группа Эппелбойна и компании SOLARTRON разработали первый «анализатор частотного отклика» SOLARTRON 1172, который позволил понизить нижнюю границу прикладываемых частот до немыслимых в то время 0,1 мГц (Macdonald, 2002). В дальнейшем данный метод развивался группами Эппелбойна во Франции, Смита в США, Фрумкина в СССР и Армстронга в Великобритании, благодаря чему сейчас его можно назвать методом, давшим ученым большее представление о механизмах коррозии, чем все остальные методы до него.

В последние двадцать лет востребованность импедансной спектроскопии как метода сильно возросла и вышла за пределы изучения коррозии (Pejčić and De Marco, 2006). Метод электрохимического импеданса закрепился в качестве одного из самых высокоэффективных для изучения электрических процессов и свойств в фундаментальных и прикладных исследованиях. Его применяют в качестве информативного рабочего инструмента в различных областях электрохимии, физике, материаловедении (Lasia, 1999). Он используется для определения механизмов реакций, изучения комплексных систем, для исследования кинетики электродных процессов и свойств пористых электродов, изучения свойств двойного электрического слоя (ДЭС), аккумуляторов, твердотельной электрохимии, а также биоэлектрохимии (Orazem and Tribollet, 2008). С одной стороны, это обусловлено возросшим уровнем технического и программного обеспечения метода, что сокращает временные затраты на получение и обработку экспериментальных данных. С другой стороны, сейчас разработаны и научно обоснованы подходы, позволяющие получить уникальную информацию как о свойствах изучаемой системы, так и о механизме процессов, протекающих в ней.

В последние годы все сильнее стираются границы между традиционными отраслями науки, так что никого уже не удивит непрофильным применением методов исследования. Так и ЭИС, изначально используемая исключительно в материаловедении и при изучении

поверхностных явлений, неожиданно нашла для себя новую область применения – в исследовании биологических систем.

Первым применением ЭИС в биологии стало изучение электрических свойств отдельных тканей. Каждому типу ткани организма соответствует свой электрический импеданс, причем обычно биологические ткани содержат компоненты как с емкостными, так и с резистивными свойствами (Rutkove, 2009). И значение импеданса, и зависимость импеданса системы от частоты являются функциями строения ткани. Измерение импеданса в полном диапазоне частот создает спектр, который будет характерным для каждой конкретной биологической ткани. Соответственно, любое изменение, наблюдаемое в данном спектре, должно быть прямо связано с какими-то изменениями в самой ткани, что можно использовать для биологического и медицинского мониторинга (Clemente, 2013). Кроме того, существуют и подходы, связанные с измерениями электрического импеданса целых организмов, в том числе и организма человека. Такие методы называют биоимпедансометрией (Kyle et al., 2004). С помощью данной техники существует возможность рассчитать индивидуальную дозу введения лекарственных средств для каждого организма, а также получить данные о внутреннем строении организма (количество жировой ткани, внеклеточной и внутриклеточной жидкости, количество активной клеточной массы, индекс массы тела, соотношение ионов натрия и калия в организме, а также отклонение всех этих параметров от нормы) (Lewis et al., 2011).

Логичным следующим шагом был переход на изучение более мелких биологических структур, к которым относятся отдельные клетки. У ЭИС нет серьезных ограничений по размеру исследуемого образца, поэтому использование сенсоров небольшого размера оказалось удачным решением для изучения свойств клеток и клеточных систем (Liu et al., 2011). Сам принцип изучения импеданса отдельных клеток не отличается сложностью: обычно используются два микроэлектрода, поверхность рабочего остается доступной для исследуемых клеток, поверхность же противоэлектрода покрывается специальным пассивирующим слоем (Yang and Bashir, 2008). Для того, чтобы сами электроды не оказывали большого влияния на свойства клеток, через клетки следует пропускать небольшой ток, амплитудой не более 1 мкА (Bard and Faulkner, 2001). После подключения электродов изучается импедансный спектр клеток, по которому определяется область, наиболее подверженная изменению импеданса в процессе каких-либо внутриклеточных процессов или внешних возбуждающих факторов. Дальнейшие измерения возможны уже без приложения всего спектра частот, а лишь в той области, которая оказалась наиболее чувствительна к изменениям.

В целом, современные методы клеточной диагностики с использованием ЭИС можно разделить на 3 группы, различающиеся по сенсорному механизму. Первая группа регистрирует изменение выхода ионов из живых клеток по изменению сопротивления электролита в системе. Во второй категории методов изучаются изоляционные свойства клеточной мембраны. Как известно, различные компоненты клеток очень сильно отличаются по своим электрическим свойствам: если цитоплазма очень хорошо проводит электрический ток (0,3-0,6 См/м), то клеточная мембрана сильно изолирована (до 10^{-7} См/м) (Pethig and Markx, 1997). Эти электрические свойства характерны для каждого типа клеток, и любые их изменения в процессе роста или размножения, могут быть измерены с помощью ЭИС. Третья же группа методов изучает потоки веществ и пространственное распределение клеток или клеточных фрагментов, которое также влияет на импеданс пространства между двумя измерительными электродами. Все эти методы можно использовать как для изучения свойств целых клеток, так и различных их составляющих (отдельных ферментов, ДНК, митохондрий) (Du et al., 2013; Padmaraj et al., 2014), и данная область в последние годы очень активно развивается.

1.2.4. Использование ЭИС для создания биосенсоров

Метод ЭИС нашел свое применение в изучении простых биологических объектов, но наиболее подходящими для этого электрохимического метода всё же являются комплексные электрохимические системы, которые содержат как неорганическую часть, так и биоматериал (Тарасов и др., 2017б). К таким системам, безусловно, относятся биосенсоры, и в последние годы появилась масса работ, посвященных импедансометрическим сенсорам. Конечной целью разработки биосенсоров в последнее десятилетие является создание устройств третьего поколения, основанных на прямом электронном переносе (Wang, 2008). ЭИС при этом в данный момент рассматривается как один из методов, который потенциально может обеспечивать точное определение исследуемых веществ даже в отсутствие медиатора (Hammond et al., 2016). ЭИС в биосенсорах впервые стали применять в прошлом десятилетии в паре с вольтамперометрией как дополнительный метод при исследовании электрохимических сенсоров на основе ферментов, например, глюкозооксидазы (Deng et al., 2009; Kang et al., 2009). В данных работах ЭИС применяется для характеристики различных стадий подготовки электрода, в то время как в виде аналитического сигнала используются значения силы тока, полученные вольтамперометрией. В то же время существуют и сенсоры, основанные исключительно на импедансометрическом отклике исследуемой системы.

Детекция с помощью ЭИС в биосенсорах основана на изменениях импеданса системы, возникающих в ответ на биомолекулярные взаимодействия, происходящие вблизи поверхности

электрода, что позволяет проводить детекцию без добавления каких-либо соединений в область реакции (Daniels and Pourmand, 2007). Кроме того, возможность получать информацию на разных частотах позволяет получать большую информацию об эффектах молекулярных взаимодействий и механизмов диффузии, происходящих на разном расстоянии от поверхности электрода (Katz and Wilner, 2003). В настоящее время импедансная спектроскопия применяется в различных типах биосенсоров, включая иммуносенсоры, ДНК-сенсоры и ферментные сенсоры, а также сенсоры на основе целых клеток микроорганизмов. Подробнее информация по каждому из типов сенсоров представлена далее.

Иммуносенсоры. Ключевые особенности использования метода ЭИС при создании иммуносенсоров подробно описаны в обзоре (Prodromidis, 2010). В нем отмечено, что импедиметрические иммуносенсоры успешно разработаны и описаны на лабораторном уровне, но пока что не получили широкого выхода на коммерческий уровень. К их положительным качествам следует отнести широкое разнообразие потенциальных областей применения, но исследователей и потенциальных покупателей беспокоит не самая высокая воспроизводимость данных систем (Daniels and Pourmand, 2007). В зависимости от типа измеряемого сигнала, импедансометрические иммуносенсоры делятся на два типа: емкостные и фарадеевские. Емкостные сенсоры полностью покрыты диэлектрическим слоем, а в качестве измеряемого параметра используется емкостной сигнал, возникающий при воздействии низкочастотного тока. Взаимодействие антигенов и антител уменьшает измеряемую на электроде емкость, что и регистрируется биосенсором. В случае фарадеевского сенсора измеряемым параметром является сопротивление переноса заряда (т.е. реальная компонента импеданса при частотах около 0,1-1 Гц), которое увеличивается при взаимодействии антиген-антитело в связи с затруднением фарадеевского переноса электронов. Можно отметить, что импедансометрические иммуносенсоры обеспечивают низкие пределы обнаружения, в частности в работе (Fredj et al., 2008) был представлен сенсор для определения атразина с использованием магнитных наночастиц, обладающий пределом обнаружения в 5 нг/мл. Особенностью данного сенсора является иммобилизация магнитных наночастиц со стрептавидином на полипирроловую пленку и функционализированы биотинилированным фрагментом F_{ab} антитела K47. В настоящий момент в данной области ищутся пути амплификации сигнала сенсоров, что может привести к дальнейшему понижению пределов обнаружения. Один из предлагаемых вариантов достижения этого результата – применение дополнительного биотин-авидинового комплекса, что усиливает сигнал взаимодействия антиген-антитело.

ДНК-сенсоры. ДНК-биосенсоры отличаются разнообразием как используемых электродов (золото, углерод, кремний), так и методов детекции аналитического сигнала. В

последние 10 лет импедансная спектроскопия стала одной из измерительных техник для регистрации событий, связанных с ДНК (Ozsoz, 2012). Наиболее часто встречаются биосенсоры, основанные на процессе гибридизации ДНК, называемые также «геносенсорами». Рецептором в таких сенсорах является слой одноцепочечных ДНК, иммобилизованный на поверхности электрода, а детектируется построение двойной спирали ДНК с участием иммобилизованной пробы и комплементарных цепей ДНК или отдельных нуклеотидов, находящихся в анализируемом растворе. Встраивание комплементарного нуклеотида в одноцепочечную ДНК при работе ДНК-полимеразы сопровождается выделением иона водорода и пирофосфата, а также увеличением отрицательного заряда растущей ДНК-цепи (Pourmand et al., 2006). В общем случае процессы в ячейке импедансометрических ДНК-биосенсоров могут быть описаны стандартной эквивалентной схемой Рэндлса.

В соответствии со схемой Рэндлса в рамках импедансометрического метода биосенсор способен:

1) детектировать изменение сопротивления электролита R_{Σ} (электропроводности) вследствие изменения концентрации протонов в растворе при гибридизации ДНК.

2) при дополнительном внесении в электролит редокс-пары, состоящей из отрицательно заряженных ионов, детектировать изменение $R_{ПЗ}$. После гибридизации иммобилизованной ДНК из-за стерических затруднений часть поверхности электрода блокируется, растет и отрицательный заряд ДНК. Это усиливает отталкивание отрицательных редокс частиц, в результате чего $R_{ПЗ}$ возрастает.

3) детектировать изменение емкости C_{dl} , т.к. при гибридизации иммобилизованной ДНК диэлектрическая проницаемость ДЭС снижается, а толщина ДЭС увеличивается, в результате C_{dl} снижается.

Работа ДНК-сенсора основана на взаимодействии между комплементарными цепочками ДНК, одни из которых «мишени» - иммобилизованы на поверхности электрода, а другие - «цели», свободно диффундируют в растворе. Упрощенная схема детекции ДНК сенсором представлена на рисунке 5.



Рис. 5. Схема работы ДНК-биосенсора с использованием электрохимических меток (Тарасов и др., 2014). В качестве меток используется редокс-пара ферри/ферроцианид.

Принцип электрохимической детекции процесса гибридизации ДНК описан в работе (Kafka et al., 2008), авторы которой одними из первых предложили метод детекции гибридизации ДНК на золотом электроде с помощью импедансной спектроскопии. В качестве меток использовались ионы $(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{3-/4}$. Синтез двухцепочечной ДНК увеличивает отрицательный заряд на границе раздела, которая в результате отталкивает отрицательные ионы меток. Это ведет к замедлению межфазного переноса заряда, приводит к значительному возрастанию сопротивления переноса заряда $R_{\text{ПЗ}}$ с 330 ± 75 Ом до 1150 ± 250 Ом после гибридизации ДНК. В обзорной работе (Bonanni and del Valle, 2010) рассмотрено современное состояние ДНК-сенсоров, которые используют импедансную спектроскопию в качестве метода детекции. Авторы данного обзора обращают внимание на то, что импедансометрические геносенсоры являются привлекательными инструментами для детекции гибридизации ДНК в том числе и из-за потенциального использования метода ЭИС в области простого, быстрого, недорогого и не требующего меток секвенирования. В целом, за последние 10 лет в литературе описаны приложения ЭИС к геносенсорам с использованием как нефарадеевских измерений, включающих определение емкости (Moreno-Hagelsieb et al., 2007; Bonanni et al., 2010), так и фарадеевских измерений с использованием редокс-индикаторов, контролирующих изменение сопротивления на проводящих и полупроводящих поверхностях (Dharuman, 2005; Bonanni et al., 2006).

В ДНК-сенсорах обширно применяются современные наноматериалы, в частности в некоторых работах наноматериалы (углеродные нанотрубки, графен, наночастицы золота) модифицируют поверхность электрода для усиления сигнала (Feng et al., 2007), в других же статьях используются олигонуклеотиды, помеченные наночастицами (Peng et al., 2006). Так, в

работе (Xin et al., 2014) описывается платформа на основе электрода из оксида индия-олова, модифицированного наночастицами золота. С помощью методов ЭИС и поверхностного плазмонного резонанса определялась гибридизация ДНК, связанная со специфической мутацией гена Аполипротеина Е (АпоЕ), с которой связано прогрессирование болезни Альцгеймера. Модифицированные углеродными нанотрубками электроды, используются и в другой важнейшей области медицинских исследований – в исследованиях рака (Fayazfar, 2014). В данной работе показано на примере мутаций известного гена *TP53*, что совместное использование ЭИС в качестве метода детекции и углеродных нанотрубок в качестве модификаторов электрода позволяет добиться серьезного улучшения чувствительности сенсора к мутациям данного гена по сравнению с существующими аналогами.

Известно, что применение ДНК биосенсоров не ограничивается лишь определением последовательности целевой ДНК. Некоторые исследования уже показали, что биосенсоры, основанные на иммобилизованной ДНК, способны к определению некоторых высоко- и низкомолекулярных соединений. В работе (Witte and Lisdat, 2011) представлена импедансометрическая система для детекции взаимодействий ДНК-лиганд, состоящая из тиол-модифицированной ss-ДНК, хемосорбированной на золоте, способная к детекции трех различных соединений. Сенсоры на основе одноцепочечной ДНК пригодны и для определения взаимодействий ДНК-белок. Как показано в работе (Tersch and Lisdat, 2011), электрохимическую импедансную спектроскопию можно использовать для безметочной детекции специфического распознавания последовательностей ДНК молекулами белков. Изучалось последовательно-специфическое расщепление иммобилизованной двойной спирали ДНК (dsДНК) рестриктазой второго типа *VamNI*. Было показано, что во время взаимодействия *VamNI* с dsДНК происходит расщепление последовательности ДНК, а значение сопротивления переноса заряда ($R_{пз}$) на электродах, модифицированных dsДНК уменьшается с 2994 Ом до 1005 Ом после выдерживания в растворе *VamNI* в течение 3 часов.

Таким образом, в данных работах показано, что возможность мониторинга изменений электрических свойств поверхности сенсора с помощью импедансной спектроскопии имеет потенциал для создания простого, быстрого и недорогого метода анализа. Кроме того, метод электрохимической импедансной спектроскопии лишен одного серьезного недостатка, присутствующего у амперометрических и вольтамперометрических методов детекции: необходимости приложения напряжения и пропускания электрического тока. Можно сказать, что область импедансометрических ДНК-биосенсоров в настоящее время активно развивается и в литературе описано множество решений для нахождения требуемых свойств импедансометрических биосенсоров. В отличие от импедансометрических иммуносенсоров,

ДНК-сенсоры на основе метода ЭИС не только успешно применяются в лабораторных условиях, но и выходят на мировой рынок.

Ферментные биосенсоры. Если поделить все ферментные сенсоры по типу преобразователя на потенциометрические, амперометрические и кондукто\импедансометрические, то последние в литературе будут встречаться на порядок реже. В частности, несмотря на огромное количество описанных сенсоров для определения глюкозы, в литературных данных до сегодняшнего дня подробно описано лишь считаное количество импедиметрических сенсоров на основе глюкозооксидазы (Rahman et al., 2010). Например, Шерведани и др. в работе (Shervedani et al., 2006) предложили количественный метод определения глюкозы с помощью ЭИС. Для этого глюкозооксидаза иммобилизовалась на золотой электрод, модифицированный самоорганизующимися монослоями меркаптановой кислоты, а в качестве измеряемого параметра использовалось величину, обратную сопротивлению переноса заряда, уменьшавшуюся как функция от концентрации глюкозы в системе. При этом авторами был достигнут предел обнаружения глюкозы в 15,6 мкМ, а чувствительность сенсора составила $9,66 \times 10^{-7} \text{ Ом}^{-1}\text{мМ}^{-1}$.

Во многих случаях метод ЭИС используется как дополнительный в процессе создания сенсора для определения влияния каждого нового слоя на электроде на электрохимические свойства сенсорной системы. В частности, блокирование поверхности электрода крупными молекулами фермента и осаждение нерастворимых веществ в связи с ферментативными реакциями легко могут быть измерены методами фарадеевской импедансной спектроскопии (Alfonta et al., 2000; Alfonta et al., 2001.). Сами же биосенсоры при этом остаются потенциометрическими или амперометрическими. Однако, есть и системы, которые основаны исключительно на измерении импеданса, причем используются такие сенсоры для определения самых разных веществ, включая мочевины (Mondal and Sangaranarayanan, 2013; Cortina et al., 2006), пероксид водорода (Shamsipur et al., 2012), цианиды (Bouyahia et al., 2011) или спирты (Myler et al., 2005). Ключевым шагом для разработки эффективных импедансометрических ферментных сенсоров является стадия иммобилизация фермента или белка. В частности, Оливейра и др. в работе (Oliveira et al., 2011) создали сенсор для определения бактериальных липополисахаридов. Для этого поверхность электрода модифицировалась сополимером винилхлорида, винилацетата и малеиновой кислоты для иммобилизации наночастиц золота, покрытых цистеином и дальнейшего осаждения лектина CranoLL. Сенсор для определения мочевины использует в своем составе уреазу и полимер Eudragit S-100, который является сополимером метилметакрилата, и разрушается при значениях pH выше 7. В данном ферментном биосенсоре гидролиз мочевины под воздействием уреазы вызывает повышение pH, что запускает

деградацию полимера и способствует увеличению электрической емкости, измеряемой методом ЭИС (Cortina et al., 2006). Общая производительность сенсоров сильно зависит от стадии иммобилизации ферментов, и в связи с сложностью данной стадии область ферментных импедансметрических сенсоров менее развита, чем область иммуносенсоров, ДНК-сенсоров или даже целоклеточных сенсоров (Bahadir, 2014).

Клеточные биосенсоры. В биосенсорах на основе целых клеток для детекции исследуемых соединений используются обычно прокариотические клетки. Использование целых клеток для биораспознавания имеет свои преимущества, в первую очередь хорошую приспособленность подобных систем для детекции *in situ*, а также коммерческую доступность большинства питательных сред. Кроме того, по данным (Banerjee and Bhunia, 2009), многие целоклеточные биосенсоры предоставляют более обширную и комплексную информацию, чем их аналоги, основанные на антителах или нуклеиновых кислотах. Живые клетки сильно отличаются по своим электрическим свойствам, что связано с различным строением их липидных мембран (или вообще их отсутствием). В большинстве случаев, мембраны клеток обладают изолирующими свойствами, а внутренняя часть клеток высоко проводима (Yang and Bashir, 2008).

Бактериальные биосенсоры с импедансометрическими преобразователями можно условно разделить на два типа, в зависимости от места нахождения клеток на сенсоре. Первый тип биосенсоров измеряет изменения импеданса системы, связанные с взаимодействиями между анализируемой смесью и электродами, поверхность которых модифицирована бактериями. Второй тип работает по принципу измерения метаболитов, продуцируемых бактериальными клетками в процессе роста в присутствии аналита. К целоклеточным импедансометрическим биосенсорам следует отнести сенсоры для определения присутствия *E.coli* (Kim et al., 2009), Muñoz-Berbel et al., 2008), сульфат-редукторов (Qi et al., 2013), трихлорэтилена (Hnaïen et al., 2011) и бактериофагов PhiX174 (García-Aljaro et al., 2009).

В целом, в настоящее время в литературе описаны импедансметрические сенсоры, основанные на иммобилизации антител, нуклеиновых кислот, ферментов, лектинов, целых клеток и бактерий. Следует признать, что наиболее развитыми областями применения импедансометрических сенсоров остаются область иммуноанализа и область разработки ДНК-сенсоров, в которых подобные сенсоры успешно применяются в последнее десятилетие благодаря своей чувствительности, низкому пределу обнаружения и хорошей воспроизводимости. В дальнейшем, данная область может развиваться за счет использования

новых типов биоматериалов в качестве распознающих элементов, что позволит найти более широкое применение и ферментным, и целоклеточным биосенсорам.

1.2.5. Использование ЭИС при изучении характеристик БТЭ

Так как импедансная спектроскопия много лет применяется при изучении свойств батарей и традиционных топливных элементов (Katz and Wilner, 2003; Mansfield, 2007), вполне логичным выглядит применение данной техники для характеристики параметров БТЭ. Изначально, ЭИС применялась для изучения БТЭ точно так же, как и для топливных элементов – для получения значения общего внутреннего сопротивления элемента ($R_{вн}$) (He et al., 2006), однако затем стало очевидно, что для характеристики комплексной системы, которой является биотопливный элемент, метод ЭИС предоставляет намного больше возможностей. До 2000-х годов внутреннее сопротивление БТЭ рассчитывалось по закону Ома или с помощью метода прерывания тока, при этом оба варианта позволяли рассчитать лишь омическое сопротивление. Если для стандартных топливных элементов это вполне подходит, то в случае сложной биоэлектрохимической системы, какой и является БТЭ, важную роль начинают играть активационные и концентрационные сопротивления. В результате большую часть общего внутреннего сопротивления начинает составлять поляризационное сопротивление, что приводит к ошибкам измерения внутреннего сопротивления традиционными методами. Метод импедансной спектроскопии же позволяет не только получить вклад каждого конкретного компонента в общее внутреннее сопротивление БТЭ, но и производить измерения без какого-либо серьезного вмешательства в работу системы, не выводя её из равновесного состояния (Park and Yoo, 2003).

Биотопливный элемент может быть присоединен к потенциостату для ЭИС-измерений как по трехэлектродной схеме, так и по двухэлектродной схеме, в зависимости от задач (Manohar et al., 2008). Использовать двухэлектродную схему имеет смысл в том случае, если нужно изучить работу всей системы в целом или получить значения сопротивлений, напрямую зависящих от конфигурации и дизайна реактора, от концентраций веществ в реакторе или от характеристик мембран и других элементов системы. Для детального описания всех процессов, происходящих на электродах в БТЭ, часто изучают отдельно импеданс анода, и отдельно импеданс катода. В данном случае исследуемый электрод подключается в качестве рабочего, и изучаются его характеристики, зависящие от субстратов, медиаторов, буферов, материалов электрода и биоматериала. Для оптимизации параметров БТЭ необходимо комбинировать оба варианта, и в литературе широко описаны примеры применения ЭИС как для изучения импеданса анодов и катодов, так и для изучения импеданса всего БТЭ (Sekar and Ramasamy, 2013). Если говорить об инструментальных особенностях, то импеданс БТЭ изучают в диапазоне прикладываемых частот

от 100 кГц до 0,01 Гц, так как на более высоких частотах большой вклад в импеданс вносит индуктивность проводов прибора и самого БТЭ, а измерение на более низких частотах слишком увеличивает время одного измерения. В данном же диапазоне частот значимые параметры импеданса практически полностью контролируются поверхностными свойствами электродов БТЭ (Katz and Wilner, 2003). К ячейке БТЭ прикладывается переменный ток с небольшой амплитудой (обычно 5 или 10 мВ). Это позволяет, с одной стороны, получить отклик от БТЭ, а с другой стороны, не создает большого перенапряжения, которое могло бы внести серьезные отклонения в работу биотопливного элемента. В качестве базовой схемы для описания одного из электродов БТЭ используется схема Рэндлса. Стандартная схема для описания БТЭ состоит из двух схем Рэндлса, соединенных между собой сопротивлением электролита. Ниже представлены наиболее значимые работы, посвященные применению метода ЭИС для изучения свойств биотопливных элементов.

Одна из первых работ, посвященных использованию ЭИС для изучения микробного биотопливного элемента, была направлена на исследование поверхностных электрохимических свойств анода (Manohar et al., 2008). Была найдена зависимость поляризационного сопротивления анода БТЭ от кинетики формирования на нем биопленки *Shewanella oneidensis* MR-1, которое снижалось с 7790 кОм до 10,2 кОм в процессе роста бактерий. При этом было отмечено, что другие параметры системы (омическое сопротивление, поляризационное сопротивление катода и емкость ДЭС) не изменялись в процессе роста бактерий, что позволило четко связать изменения в свойствах биоматериала с изменением поляризационного сопротивления анода БТЭ. Подобное уменьшение поляризационного сопротивления, сопряженное с увеличением емкости, наблюдалось при работе с бактериями *Geobacter sulfurreducens* (Srikanth et al., 2008). В работе (Yuan et al., 2013.) изучались особенности влияния образования биопленки на разных типах углеродных анодов, и в результате наблюдалось снижение сопротивления переноса заряда при росте биопленки на всех 6 исследованных анодах. Часть работ посвящена и влиянию роста бактерий на общую емкость анода или катода. В частности, в работе (Kim et al., 2011) было замечено двукратное увеличение емкости ДЭС на аноде после роста биопленки *Geobacter sulfurreducens* по сравнению с контрольным электродом без бактерий. Динамику изменения поляризационного сопротивления продемонстрировали в своих работах Рен и др. (Ren et al., 2011), показавшие снижение импеданса анода с 9 кОм см² на третий день роста биопленки до 2,5 кОм см² через 2 недели после начала роста. Все эти исследования подтверждают влияние свойств биоматериала на электрохимические свойства электродов БТЭ.

Известно, что некоторые бактерии синтезируют эндогенные медиаторы, стимулирующие перенос электронов между бактерией и анодом. Тем не менее, их концентрация недостаточно

высока для того, чтобы значительно уменьшать сопротивление переноса заряда электродов (Kashyap et al., 2014; Ramasamy et al., 2009). Добавление внешних медиаторов электронного транспорта значительно уменьшает сопротивление переноса заряда для окисления субстрата и улучшает кинетику электронного транспорта от субстрата к аноду. С помощью метода ЭИС изучалась разница в сопротивлении переноса заряда и мощности БТЭ в присутствии и отсутствии медиатора. В частности, в системе из графитового анода и платинового катода сопротивление электролита в 410 Ом в буфере уменьшалось до 282 Ом и 153 Ом после добавления метилового оранжевого и метилового красного соответственно. Поляризационное сопротивление анода же снижалось с 471 Ома до 330 Ом и 176 Ом (Hosseini and Ahadzadeh, 2013). В работе (Sun et al., 2013) изучался эффект медиаторов рибофлавина, гуминовой кислоты и натриевой соли антрахинон-2,6-дисульфоновой кислоты на работу гибридной БТЭ-системы, направленной на одновременное обесцвечивание красителей и генерацию электричества. Добавление медиаторов дало существенное увеличение выходной мощности БТЭ, а с помощью метода ЭИС было доказано, что оно связано именно со снижением сопротивления переноса заряда с добавлением медиатора.

Как известно, для каждого микроорганизма существует свой оптимум pH, и этот показатель также является важным для работы БТЭ (Marsili et al., 2008). Обычно бактерии лучше всего растут при нейтральном pH и могут выдерживать небольшие отклонения, однако сильно кислые и сильно щелочные среды вредят их жизнедеятельности. К тому же, зачастую возникает ситуация, когда микроорганизмам в анодном и катодном отделении требуется разный уровень pH: бактерии, используемые для окисления топлива в анодном отделении зачастую предпочитают нейтральный pH, а восстанавливающие кислород в катодном отделении микроорганизмы оптимально работают в щелочной среде (Zhang et al., 2011). В двухкамерных БТЭ pH анодного и катодного отделения может быть разным, и метод ЭИС был применен для изучения влияния водородного показателя на производительность электродов. Масштабная работа (He et al., 2008) посвящена применению импеданса для изучения анодной и катодной реакций при уровнях pH от 5 до 10. Авторами было доказано, что поляризационное сопротивление анода уменьшалось при увеличении pH от 5, достигало минимума при значении pH в 7 единиц и в дальнейшем вновь увеличивалось до показателя в 10, что можно связать со скоростью роста бактерий на поверхности анода при разных показателях pH. Катодная же реакция ускорялась со смещением pH в щелочную область, при этом поляризационное сопротивление катода уменьшалось во всем диапазоне pH вплоть до 10, что коррелирует с теоретическими выкладками, представленными выше.

Кроме перечисленных выше, существует еще несколько других факторов, которые нужно принимать во внимание при проектировании БТЭ, и помочь в изучении которых может ЭИС. В частности, в работе (Ramasamy et al., 2009.) представлены преимущества применения феррицианида в качестве заместителя кислорода в катодной реакции. Было доказано, что $R_{\text{ПЗ}}$ катода при использовании феррицианида снижается, что связывалось с увеличением скорости реакции восстановления. Кроме того, в случае с окислением кислорода в катодном отделении, существовали диффузионные ограничения, регистрируемые с помощью элемента Варбурга методом ЭИС, которые пропадали при добавлении феррицианида в раствор, что также положительно сказывалось на производительности всего БТЭ. Влияние диффузии кислорода на производительность БТЭ детально изучено в работах (Lepage et al., 2012; Kim et al., 2009), где оно также было охарактеризовано с помощью эквивалентных схем, включающих в себя элемент Варбурга.

Материал катода также имеет большое влияние на скорость реакции восстановления в катодном отделении. Мартин и коллеги в работе (Martin et al., 2011) сравнил катоды, изготовленные из графита, платины, оксида марганца и оксида железа. С помощью метода ЭИС было показано, что их сопротивления переносу заряда были равны 18,1 Ом, 4,4 Ом, 3,6 Ом и 4,1 Ом соответственно, и после изучения общего импеданса катодов сделан вывод о преимуществе платиновых катодов над другими металлическими и графитовыми. С другой стороны, противоположные результаты представлены в работе (Zhang et al., 2012). Были исследованы биокатоды из углеродной бумаги, графитового волокна и ткани из нержавеющей стали. Сопротивление переносу заряда катода из нержавеющей стали (823 Ом) на порядок превышало значения сопротивлений других катодов (11 и 23 Ом), из чего был сделан вывод о наибольшей пригодности материала с наименьшим сопротивлением – графитового волокна.

Если изучать работы, посвященные определению импеданса всего БТЭ целиком, то можно заметить, что в некоторых ранних работах по БТЭ ключевую роль в общем внутреннем сопротивлении играло омическое сопротивление (Barbir, 2005), что связано в первую очередь с конфигурацией реактора, а не с ростом бактерий в нем. В частности, в работе (You et al., 2008.) почти 60% от общего внутреннего сопротивления элемента составляло омическое сопротивление. В той же работе был предложен один из вариантов уменьшения значения сопротивления – двукратное увеличение площади сетки БТЭ уменьшило омическое сопротивление с 24 Ом до 14 Ом, что привело к уменьшению общего сопротивления элемента с 41 Ом до 27,5 Ом. Ключевую роль сопротивление электролита играло и в элементе, описанном в статье (He et al., 2006.), где сопротивление электролита было примерно равно общему поляризационному сопротивлению элемента и составляло до 48% от общего внутреннего

сопротивления элемента. Этими же авторами были предложены и шаги для улучшения производительности своего элемента – изменение конфигурации реактора для уменьшения расстояния между электродами и понижение сопротивления электролита с помощью изменения состава буфера.

Еще одной составляющей общего сопротивления элемента является сопротивление мембраны, разделяющей анодное и катодное отделение. Обычно оно включается в общее омическое сопротивление, но с помощью метода ЭИС можно выделить и отдельное сопротивление мембраны. В частности, в работе (Kim et al., 2014) метод ЭИС использовался для характеристики влияния материала протонпроницаемой мембраны на производительность БТЭ. Авторами были выбраны нафионовая, незаряженная поливинилиденфторидная (PVDF) и сульфонирующая поливинилиденфторидная мембраны. Сульфонирующая PVDF мембрана показала наименьшее сопротивление среди всех трех вариантов (7,5 Ом против 11,3 Ом у нафионовой мембраны), и в результате была предложена авторами в качестве альтернативы для широко используемой нафионовой мембраны, так как это позволит увеличить производительность всего БТЭ.

Кроме того, ЭИС применялось для изучения влияния магнитного поля на производительность микробных БТЭ. В работах (Saheb Jamei et al., 2007; Li et al., 2011) описывалось положительное влияние магнитного поля на метаболическую активность некоторых микроорганизмов, что в теории должно было привести к увеличению производительности БТЭ на их основе. Метод ЭИС был применен для изучения внутреннего сопротивления БТЭ при приложении магнитного поля различной силы. В результате было показано, что сопротивление переноса заряда всего БТЭ было минимальным при приложенном магнитном поле в 200 мТ, при этом было замечено и увеличение потенциала холостого хода при влиянии полей в 100 мТ и 200 мТ. Два этих фактора могут серьезно увеличить общую производительность микробного биотопливного элемента (Yin et al., 234).

В целом, можно отметить, что метод ЭИС показал себя при изучении БТЭ с лучшей стороны, и к его недостаткам следует отнести лишь то, что система должна находиться в равновесном или квазиравновесном состоянии для получения стопроцентно точного импедансного спектра. В остальном, способность метода ЭИС исследовать влияние множества факторов на характеристики БТЭ делает этот метод крайне привлекательным при изучении БТЭ. Можно заключить, что именно сложность и комплексность всех электрохимических реакций, проходящих в системе, не позволяет изучать БТЭ с помощью какого-то одного метода, и импедансная спектроскопия будет хорошим дополнением для традиционных методов

циклической вольтамперометрии и поляризационных измерений при исследовании и оптимизации характеристик БТЭ.

Таким образом, в связи с повышенным вниманием к биоэлектрохимическим системам на основе клеток живых организмов и ферментов, представляется важным их комплексное изучение и характеристика. В области разработки биосенсоров все еще продолжается поиск новых чувствительных и точных методов детекции, которые смогли бы облегчить переход к разработке сенсоров третьего поколения, не требующих внешних медиаторов электронного транспорта. К таким методам безусловно относится метод ЭИС, позволяющий конструировать импедансометрические сенсоры, которые детектируют изменения импеданса системы, возникающие в ответ на био-молекулярные взаимодействия, происходящие вблизи поверхности электрода. В настоящее время импедансная спектроскопия применяется в различных типах биосенсоров, включая иммуносенсоры, ДНК-сенсоры и ферментные сенсоры, причем особенно широко представлены сенсоры первых двух типов. Однако, в основном данные сенсоры существуют на лабораторном уровне, и их выход на коммерческий рынок ограничен такими аналитическими параметрами, как относительно низкая воспроизводимость. Тем не менее, потенциал импедансометрических и ДНК-сенсоров очевиден из-за возможности быстрого и точного определения молекулярных взаимодействий, происходящих у поверхности электрода. Кроме того, нельзя забывать и о потенциале ЭИС в плане изучения электрохимических свойств тканей живых организмов, отдельных клеток и даже их фрагментов.

Анализ современного состояния проблемы показывает, что из всех биотехнологических применений наибольшую популярность метод ЭИС получил при изучении биотопливных элементов. Так как изначально метод применялся для изучения традиционных топливных элементов, то его применение для их биологических аналогов выглядит логично. Метод применяется как для нахождения общего внутреннего сопротивления элемента, так и для оценки вклада каждого конкретного компонента в работу БТЭ. Всего за последние 10 лет опубликовано более ста работ, так или иначе посвященных изучению импеданса целых БТЭ или отдельных их элементов. Основное внимание исследователей приковано к оптимизации параметров БТЭ для их дальнейшего практического применения, в основном путем снижения сопротивления биоанодов и биокатодов с помощью подбора медиаторов электронного транспорта, субстратов, материалов электродов и нахождения оптимальных условий роста биопленок.

Таким образом, актуальным представляется расширенное и углубленное изучение возможности применения импедансной спектроскопии в сочетании с традиционными методами исследования в области биосенсоров и биотопливных элементов. Интересным является

наблюдение за изменениями импеданса биологических систем в реальном времени при приложенном переменном токе определенной частоты, что практически не описано в мировой литературе. Кроме того, будет рассмотрена возможность применения метода ЭИС для создания более простых и коммерчески доступных ферментных биосенсоров для определения глюкозы и этанола, нежели разработанные на данный момент. Применение ЭИС для изучения биотопливных элементов позволит выявить закономерности влияния материалов электродов и их модификации наноматериалами на общую производительность БТЭ. Кроме того, на примере клеток *Gluconobacter oxydans* будут рассмотрены особенности применения разных штаммов микроорганизма, а также фрагментов их клеточных мембран, с точки зрения электрохимических параметров БТЭ, созданных на их основе. Все полученные знания в дальнейшем должны привести к созданию более совершенных микробных БТЭ, которые найдут свое применение во многих областях биоэнергетики.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Реагенты

В работе использовали: калий фосфорнокислый двузамещенный $\times 3 \text{ H}_2\text{O}$, натрия гидроокись, натрий хлористый, этиловый спирт, глюкоза, уксусная кислота («МОСРЕАКТИВ», Россия); хлорид железа шестиводный $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, гексацианоферрат (III) калия $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, соляная кислота (Химмед, Россия); 2,6-дихлорфенолиндофенол, натриевая соль (Sigma- Aldrich, США); хитозан низкомолекулярный (Sigma-Aldrich, Co, США); сорбит, дрожжевой экстракт, агар-агар бактериологический Американского типа (Диа-М, Россия); поливиниловый спирт (молекулярная масса 1×10^5 - $1,1 \times 10^5$ а.е.м., марка 16/1, Россия); нитрат церия-аммония, пара-бензохинон (БХ) (Вектон, Россия); N-винилпирролидон (BASF, Германия). В качестве рабочих электродов БТЭ использовали электроды графитовые спектральные (СГЭ) (С-3М, ООО «Полипроф-Л», Москва, Россия). Для модификации графитовых электродов использовали следующие наноматериалы: терморасширенный графит, ВОПГ, интеркалированный графит, функционализированные многостенные нанотрубки (ФМНТ) (Институт радиотехники и электроники (ИРЭ) им. В.А. Котельникова, Лаборатория наноэлектроники); оксид графена, оксид графена восстановленный сверхвысокочастотным облучением (НТЦ «ТАТА», Саров); МУНТ «Таунит-М» (ООО «НаноТехЦентр», Тамбов, Россия); углеродное волокно ЛТ-1-22/40 (ОАО Полоцк-Стекловолокно, Беларусь).

2.2. Ферментные препараты

В работе использовали коммерчески доступные препараты оксидоредуктаз: глюкозооксидазы (ГО), выделенной из *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich, США) и алкогольоксидазы (АО), выделенной из *Pichia pastoris* (Sigma-Aldrich, США). В состав модифицированного печатного электрода для определения концентрации крахмала входила смесь двух ферментов: АО и пероксидазы хрена (ПХ), (Sigma-Aldrich, США). Препарат ферментного комплекса лизоамидаза был выделен из культуральной жидкости *Lysobacter* sp. XL1 в лаборатории биохимии клеточной поверхности микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН.

2.3. Условия культивирования бактериальных штаммов

В работе использовали штамм *Gluconobacter oxydans* sbsp. *industrius* ВКМ В-1280 (Всероссийская коллекция микроорганизмов). Выращивание проводили в течение 18 - 20 ч в колбах Эрленмейера объемом 750 мл, содержащих 50 мл ростовой среды (сорбит – 10 %, дрожжевой экстракт – 0,2 %, дистиллированная вода – 100 мл) при перемешивании (200 об/мин,

28°C). Клетки отделяли центрифугированием при 10000 g в течение 5 мин. Осадок отмывали дважды калий-фосфатным буферным раствором (25 мМ, рН 6,5). Культуру поддерживали на скошенной агаризованной среде, содержащей сорбит (100 г/л или 10 %), дрожжевой экстракт (5 г/л или 0,5 %) и агар (15 г/л или 1,5 %).

В качестве тест-культур использовали штаммы *Staphylococcus aureus* 209P и *Micrococcus luteus* B1819 (Vasilyeva et al., 2013).

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* ВКМ Y-1173 из Всероссийской коллекции микроорганизмов РАН выращивали на качалке (120 об/мин) при 29°C в течение 24 ч до стационарной стадии роста в 200 мл среды, содержащей (г/л): глюкозу – 20; дрожжевой экстракт – 2; (NH₄)₂SO₄ – 3; MgSO₄ × 7H₂O – 0,7; Ca(NO₃)₂ – 0,4; K₂SO₄ – 2,77. После культивирования клетки отделяли центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин и дважды промывали дистиллированной водой.

2.4. Выделение мембранных фракций *Gluconobacter oxydans*

Выделение мембранных фракции проводили по методике (Indzhgiya et al., 2012). Разрушение бактерий *G. oxydans* производили 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. Затем производили центрифугирование при 14000 об/мин в течение 30 мин. Полученные осадки подсушивали на воздухе и использовали в качестве биокатализатора БТЭ.

2.5. Электропорация мембран клеток *Saccharomyces cerevisiae*

Электропорация мембран дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* проводилась с помощью портативного электропоратора MicroPulser™ (Bio-RAD, США). Объем ячейки составлял 200 мкл. Температура суспензии клеток поддерживалась на уровне 4 °C, время воздействия составляло 5 мс, сила тока – 2500 В. Импедансные спектральные характеристики суспензии регистрировались непосредственно до электропорации и сразу после неё при поддерживаемом уровне температуры (Тарасов и др., 2017а).

2.6. Измерительная аппаратура

Все электрохимические измерения с использованием печатных графитовых электродов и спектральных графитовых электродов 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.

2.7 Иммобилизация биоматериала на поверхности печатных электродов

На поверхность печатного электрода наносили 5 мкл смеси низкомолекулярного хитозана и ГО в соотношении 2:1. Использовался 2 %-ный раствор хитозана (х.ч.) в 1 %-ной уксусной кислоте и раствор ГО в концентрации 100 мг/мл с удельной активностью 30 Е/мг. Электроды высушивались в течение часа при комнатной температуре. Полученный электрод перед использованием промывали в фосфатном буферном растворе (рН 6,5, 25 мМ) в течение 5 мин.

Для создания двухферментного сенсора на основе АО и ПХ на поверхность электрода наносилось 4 мкл смеси низкомолекулярного хитозана, ПХ и АО в соотношении 2:1:1. Использовался 2%-ный раствор хитозана (х.ч.) в 1 %-ной уксусной кислоте, раствор АО с удельной активностью 30 Е/мг и раствор ПХ с удельной активностью 40 Е/мг. Электроды высушивались в течение часа при комнатной температуре. Полученный электрод перед использованием промывали в буферном растворе в течение 5 мин.

Для создания микробных сенсоров в микропробирке смешивали 10 мкл суспензии клеток *G. oxydans* (1 мг/мкл) и 20 мкл 2% раствора хитозана в 1 %-ной уксусной кислоте. На поверхность рабочего электрода наносили 5 мкл полученной смеси, концентрация клеток на поверхности электрода составляла 0,12 мг/мм². Электрод просушивали на воздухе в течение часа. Модифицированный печатный электрод перед использованием промывали в буферном растворе в течение 5 мин.

2.8. 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 предварительно выдерживали в течение 20 мин в пробирке «Эппендорф» в темноте, затем ее наносили на рабочий электрод. Через 15 мин, в каплю на электроде добавляли пероксид водорода до достижения концентрации 100 мМ в капле и выдерживали полученную смесь на электроде в течение 45 мин. По окончании осаждения (поверхность электродов промывали дистиллированной водой. Затем проводили активацию электрода (потенциодинамическая обработка модифицированного БЛ электрода в циклическом режиме в фоновом электролите в интервале потенциалов от -0,05 до 0,35 В) (Karyakin et al., 1994). После высыхания электроды прокаливали при 100°C в течение часа и охлаждали до комнатной температуры.

2.9. Проведение биосенсорных измерений с использованием печатных электродов

В качестве основы для разрабатываемых биосенсоров служили печатные графитовые электроды конструкции «3:1» (рис. 6), на поверхности которых располагался биологический компонент.

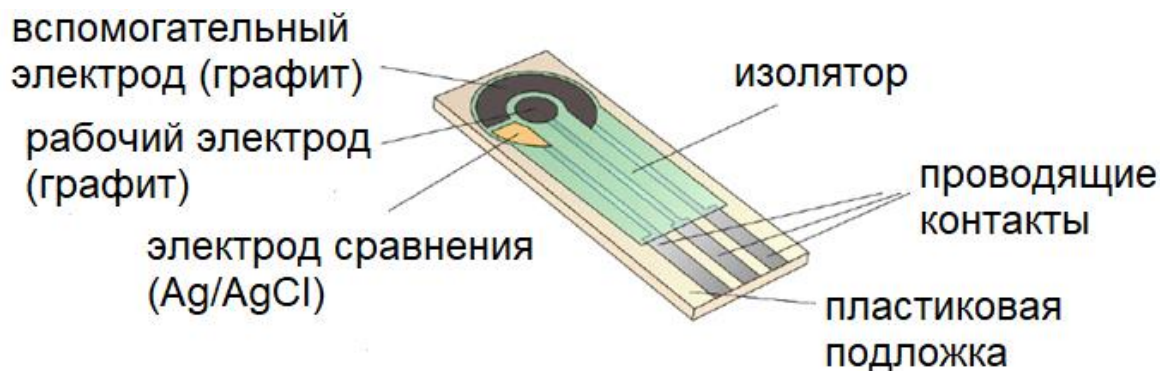


Рис. 6. Внешний вид печатных графитовых электродов, использованных в работе.

Использовали печатные графитовые электроды производства ООО «КолорЭлектроникс» (Москва, Россия) и печатные золотые электроды марки DRP-220AT (DropSens, Испания), которые представляли собой систему, состоящую из рабочего, вспомогательного электродов и электрода сравнения на полимерной подложке. Материалом поверхности рабочего электрода, на которой иммобилизуются модификатор и фермент, является углеродная паста (Gwent Electronic Materials, США). Вспомогательный электрод изготовлен также из углеродной пасты. Электрод сравнения – паста Ag/AgCl. В печатных золотых электродах рабочий и вспомогательный электроды изготовлены из золота, электрод сравнения – из серебра. Измерения с использованием печатных электродов проводились в ячейке объемом 200 мкл, образованной над поверхностью печатного электрода. Рабочий потенциал варьировался в зависимости от применяемого медиатора электронного транспорта: +400 мВ для ферроцианида, +300 мВ для феррицианида, +280 мВ для бензохинона и +200 мВ для дихлорфенолиндофенола. Потенциалы были выбраны на основании данных, полученных с циклических вольтамперограмм рассматриваемых в работе биоэлектрохимических систем. Измерения проводили в кювете с натрий-калиевым фосфатным буферным раствором (рН 6,5, 25 мМ), содержащим KCl в концентрации 0,1 М. Импедансометрические измерения проводились в диапазоне частот от 40 кГц до 0,1 Гц, при амплитуде тока в 10 мВ. После каждого измерения осуществляли промывание электрода буферным раствором в течение 5 минут. Перед каждой серией измерений ячейка продувалась аргоном высокой чистоты в течение 30 минут, продувание продолжалось и в процессе эксперимента для перемешивания смеси и удаления кислорода.

2.10. Формирование рабочих электродов для БТЭ

Основой рабочего электрода (анода) являлся СГЭ в виде цилиндра высотой 2 мм и радиусом 3 мм. Для приготовления биокатализатора использовали смесь суспензии бактериальных клеток (1 мг/мкл) и полимера (хитозан, поливиниловый спирт (ПВС) или поливиниловый спирт, модифицированный N-винилпирролидоном (ПВС_М)), в объемном соотношении 2:1. Полученную смесь наносили на анод и подсушивали при комнатной температуре, концентрация клеток на поверхности электрода составляла 0,12 мг/мм². Схема иммобилизации бактериальных клеток и наноматериалов на поверхность графитового электрода представлена на рисунке 7.

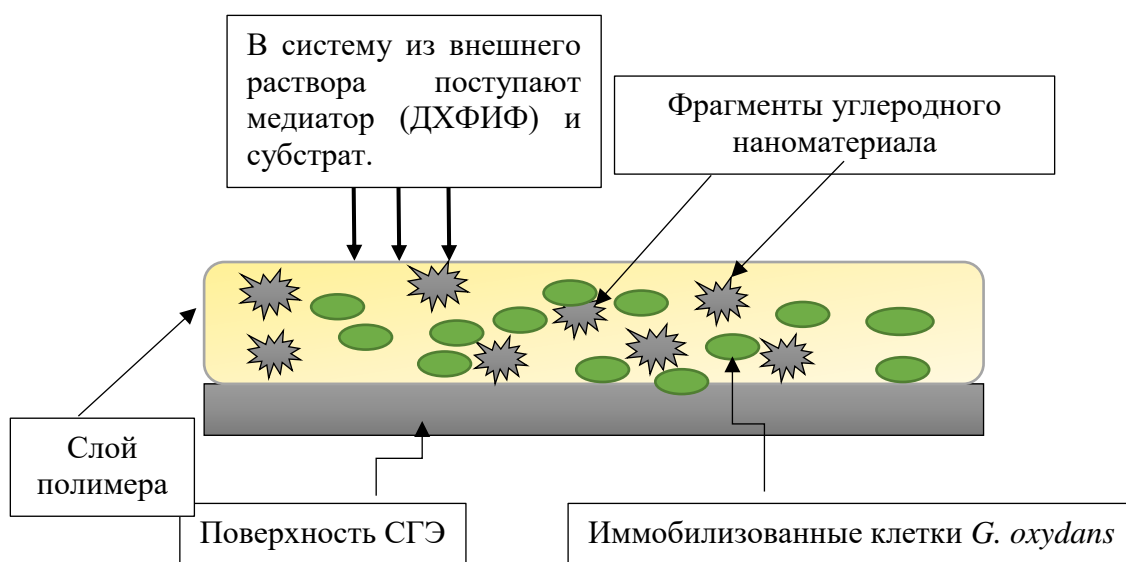


Рис. 7. Схема иммобилизации бактериальных клеток и углеродных наноматериалов на поверхности СГЭ

1) *Приготовление контрольного электрода.* На анод наносили смесь, состоящую из суспензии бактериальных клеток и полимера и подсушивали при комнатной температуре. Содержание клеток на поверхности электрода составляло 0,12 мг сырого веса/мм².

2) *Приготовление электрода, модифицированного наноматериалом.* Навеску наноматериала массой 0,5 мг смешивали с 30 мкл суспензии бактериальных клеток и полимера. Полученную смесь наносили на рабочий электрод и подсушивали при комнатной температуре. Содержание клеток и наноматериала на поверхности электрода составляло 0,12 мг сырого веса/мм² и 2,96 мкг/мм², соответственно.

3) *Приготовление электрода, модифицированного оксидом графена.* Суспензию оксида графена (7 мг/мл) объемом 5 мкл смешивали с 30 мкл смеси суспензии бактериальных клеток и полимера. Полученную смесь наносили на рабочий электрод и подсушивали при комнатной температуре. Содержание клеток и оксида графена на поверхности электрода составляло 0,12 мг сырого веса/мм² и 0,18 мкг/мм², соответственно (Решетилов и др., 2017а).

2.11. Получение углеродных высокодисперсных материалов (УВМ)

В работе изучены биосовместимые и электрохимические свойства волокнистого материала, предоставленного компанией ООО «Ниагара» (УВМ №1) прошедшего термическую обработку. Для получения нетканых волокнистых материалов в электрическом поле использовали полианилин молекулярной массой $M_w = 3,7 \cdot 10^5$. Для получения карбонизированного волокнистого материала проводили термоокислительную стабилизацию (сшивку) в присутствии кислорода воздуха в диапазоне температур от 20 до 275°C, скорость подъема температуры варьировалась в зависимости от температурного интервала и составляла от 0,1 до 5°C/мин. Конечная температура окислительной стабилизации (275°C) была выбрана на основе того, что при температурах выше 275°C массовые потери существенно возрастают, вследствие прогрессирующей термоокислительной деструкции волокна. Вторую стадию температурной обработки проводили в инертной среде (N₂) в диапазоне температур от 275 до 700-1000 °C. Скорость подъема температуры варьировалась в интервале от 0,9 до 21 °C/мин. Объемный расход инертного газа составлял 40 л/ч. Для проведения этих процессов использовалась модифицированная муфельная печь СНОЛ-3/11. Средний диаметр карбонизированного волокна при температуре 700 °C (УВМ №2) и 1000 °C (УВМ №3) составил 490 и 430 нм соответственно. Термическая обработка УВМ №2 происходила под нагрузкой (Решетилов и др., 2017б). Получение углеродных высокодисперсных материалов проводилось сотрудниками НИЦ «Курчатовский институт», Москва.

2.12. Вольтамперные и хроноамперометрические характеристики БТЭ

2.12.1. Измерения по двухэлектродной схеме

Ячейка биотопливного элемента представляла собой две взаимосвязанные кюветы, объём анодного отделения был равен объёму катодного и составлял 5 мл. В качестве катода использовали спектральный графитовый электрод общей площадью 75,3 мм². Основой анода являлся спектральный графитовый электрод, общая площадь которого варьировалась в диапазоне от 75 до 94 мм². Кюветы разделяли протонселективной мембраной МФ-4СК («Пластполимер», Санкт-Петербург, Россия), являющейся аналогом мембраны Nafion 117 в протонированной форме. Площадь мембраны составляла 1,2 см². В качестве фонового раствора

использовали 25 мМ калий-фосфатный буфер рН 6.5, содержащий 10 мМ хлорида натрия, а в качестве медиаторов использовали 2,6-дихлорофенолиндофенол (ДХФИФ) в анодной ячейке и гексацианоферрат(III) калия (ГЦФ) в катодной ячейке. В качестве субстрата для окисления клетками *G. oxydans* использовали этиловый спирт (ДиаЭм, Россия) в концентрации 10 мМ. Регистрацию циклических вольтамперных характеристик (ЦВА) проводили при скорости развертки 3 мВ/с.

Расчет мощностных характеристик БТЭ проводили по формуле:

$$P=I \times U \quad (5),$$

где P – мощность БТЭ, I – генерируемая сила тока, U – подаваемое напряжение. Значения тока и напряжения (поляризационную зависимость) получали из вольтамперных характеристик. Внутреннее сопротивление БТЭ вычисляли по формуле (Logan, 2008):

$$R_{\text{вн}} = \frac{U^2}{P} \quad (6).$$

Значения U (подаваемое напряжение) и P (мощность БТЭ) для вычисления внутреннего сопротивления соответствуют максимальному значению мощности.

Значения $R_{\text{вн}}$ и P пересчитывали на площадь поверхности электрода, и удельные значения использовали для сравнения характеристик модифицированных электродов

2.12.2. Измерения по трехэлектродной схеме

Использовали измерительную ячейку объемом 5 мл. В качестве рабочего электрода использовали спектральный графитовый электрод, общая площадь которого варьировалась в диапазоне от 75 до 94 мм². Электродом сравнения являлся насыщенный хлорсеребряный электрод; вспомогательным электродом - платиновая пластина площадью 10 мм². Хронопотенциометрические исследования проводили путем измерения зависимости стационарного потенциала рабочего электрода от времени относительно электрода сравнения. Циклические вольтамперограммы (ЦВА) записывали при скорости сканирования потенциала 3 мВ/с. Импедансные измерения проводились при потенциалах 0 мВ и 200 мВ в диапазоне частот от 40 кГц до 0,02 Гц, при амплитуде в 10 мВ. Измерения проводили в 25 мМ калий-фосфатном буферном растворе (рН 6.5), содержащем 10 мМ хлорида натрия. Концентрация субстрата (этиловый спирт) в рабочем электролите составляла 10 мМ. В качестве редокс-медиатора использовали 2,6-дихлорофенолиндофенол в концентрации 42 мкМ.

2.13. Измерение дыхательной активности клеток

В качестве матрицы рецепторного элемента использовали хроматографическую стеклобумагу GF/A (Whatman, Великобритания). На фрагмент бумаги размером 3×3 мм² наносили 5 мкл смеси, содержащей бактериальные клетки, хитозан и соответствующий наноматериал. Применяли те же смеси, которые использовали при формирования рабочего электрода БТЭ (см выше). Рецепторный элемент подсушивали в течение 10-15 минут при комнатной температуре и закрепляли с помощью фиксатора на поверхности измерительного электрода, которым являлся кислородный электрод типа Кларка. Измерения проводили в фосфатном буфере (25 мМ, рН 6,5) в кювете объемом 2 мл при постоянном перемешивании. В качестве субстрата использовали этиловый спирт в концентрации 0,25 мМ. Измерения выполняли на потенциостате IPC-2L («Кронас», Россия).

2.14. Регистрация импедансных характеристик БТЭ

Для характеристики каждого модифицированного БТЭ регистрировали спектральные импедансные параметры системы. Импедансометрические измерения проводились в диапазоне частот от 40 кГц до 0,1 Гц, при амплитуде тока в 10 мВ. В качестве базовой схемы для описания процессов в анодном и катодном отделениях биотопливного элемента использовали стандартную схему Рэндлса (рис.8).

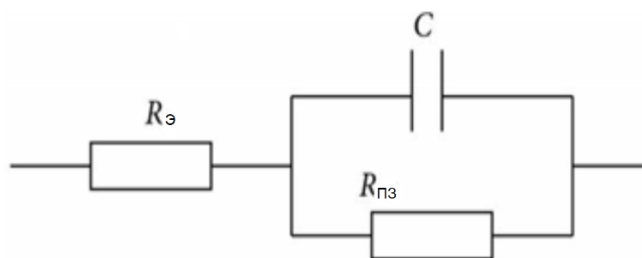


Рис. 8. Эквивалентная электрическая схема для описания процессов в анодном и катодном отделениях БТЭ. Обозначения на эквивалентной электрической схеме: C – электрическая емкость электрода, $R_{\text{ПЗ}}$ и $R_{\text{э}}$ – соответственно, сопротивления переноса заряда электрода и межэлектродного раствора.

Для описания импеданса биотопливного элемента в целом, подключенного по двухэлектродной схеме, использовали эквивалентную электрическую схему, представленную на рисунке 9.

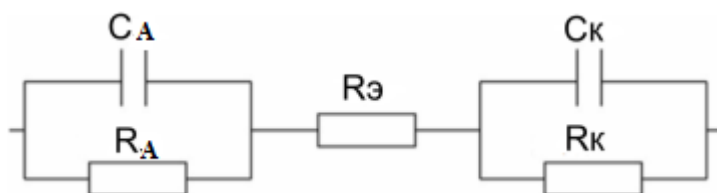


Рис. 9. Эквивалентная электрическая схема для биотопливного элемента при подключении по двухэлектродной схеме. Обозначения на эквивалентной электрической схеме: C – электрическая емкость электродов (анода и катода), R_A , R_K и $R_Э$ – соответственно, сопротивления переноса заряда анода, переноса заряда катода и межэлектродного раствора.

Импедансные спектры обрабатывались с помощью специализированного ПО ZSimpWin (Princeton Applied Research, США). Вычисленные значения сопротивления и емкости анода, а также значение общего внутреннего сопротивления биотопливного элемента (сумма всех трех сопротивлений), пересчитывали на площадь поверхности электрода, и удельные значения использовали для сравнения параметров модифицированных электродов. Точки на диаграммах Найквиста в диапазоне частот ниже 0.2 Гц были получены программной экстраполяцией данных.

2.15. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

Электронно–микроскопические исследования проводились совместно с Колесовым В.В. (Лаборатория нанoeлектроники ИРЭ РАН, г. Москва), а также с к.б.н. Мачулиным А.В. (лаборатория цитологии микроорганизмов, ИБФМ РАН, г. Пущино). Электроды с нанесенными клетками крепили на поверхность металлических дисков (объектодержателей) с помощью токопроводящего углеродного скотча. Далее на поверхность электрода напыляли тонкий слой платиново-углеродной смеси. Напыление осуществлялось в вакуумно-напылительной установке JEE-4X (JEOL, Япония). Электронно-микроскопический анализ образцов проводили с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6510 LV (JEOL, Япония) в режиме регистрации вторичных электронов (SE).

2.16. Конвертерное накопление электричества

Для накопления энергии биотопливного элемента использовали конвертер 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. В качестве приемников накопленной электроэнергии использовались светодиод L-1154SURDK (Kingbright; 2,0 В, 20 мА) и ротор электродвигателя M25E-4L (MITSUMI; 3,0 В, 100 мА).

2.17. Встраивание микробного БТЭ в организм травяной лягушки

В качестве анода использовали электроды, приготовленные из наноматериала - терморасширенного графита (ТРГ) (Решетилов и др., 2016). Электроды имели малый размер для того, чтобы не наносить значительные травмы животному. Размер электродов составлял $\sim 8 \times 5 \times 0,5$ мм³. Общая площадь рабочей поверхности электрода (анода), содержащего иммобилизованные бактериальные клетки *Gluconobacter oxydans* ВКМ В-1280, составляла 75 – 80 мм². Электродом сравнения (катодом) являлся электрод такой же площади, не содержащий биоматериал (Решетилов и др., 2015).

Токопроводящий материал (использовали серебряную проволоку диаметром 0,3 мм) крепили к электроду клеем "Контактол" (Keller, Германия), имеющим высокую электрическую проводимость ($R = 1,5 \text{ Ом} \times \text{мм}^2$) и предназначенным для выполнения токопроводящих коммуникаций на диэлектриках. После прикрепления серебряного проводника место склейки и проволоку на длине 20 мм от места склейки изолировали непроводящим клеем БФ-6. Электроды (анод и катод) вводили через надрезы в брюшной части лимфатической пазухи животного. После введения места надрезов в брюшной части изолировали, для чего также использовали предназначенный для склеивания увлажненных поверхностей клей БФ-6.

Генерация разности потенциалов начиналась сразу же после введения электродов, для чего регистрацию электрического сигнала производили постоянно. Последовательность введения электродов была следующей – катод, затем вводили анод.

Как водонерастворимый медиатор был выбран диметилферроцен (ДМФ), исключающий попадание токсичного соединения в организм животного. Его использование возможно путем введения в графитовый электрод из полярных растворителей. Для этого 2 мг ДМФ растворяли в 1 мл ацетона. 50 мкл раствора наносили на поверхность электрода и подсушивали на воздухе в течение 5-10 мин, затем 50 мкл наносили на другую сторону электрода и подсушивали еще 5-10 мин.

Исследование проводили с использованием травяной лягушки *Rana temporaria*. Спинализированную лягушку фиксировали на пенопластовой пластинке (15x10 см²) вентральной (брюшной) стороной вверх. Небольшими надрезами вскрывали брюшную полость для введения электродов. Для измерения разности потенциалов *in vivo* в брюшную полость лягушки вводили измерительные электроды. После введения надрезы изолировали клеем БФ-6. До проведения экспериментов животные, отловленные в местах зимовки на дне небольших водоемов, находились в лабораторном холодильнике при температуре = 4 °С. Всего проведено 12 экспериментов. Время проведения экспериментов – март – апрель 2015 г.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования можно условно разделить на несколько этапов. В первую очередь, необходимо было оценить на практике возможность использования метода ЭИС для определения параметров биологических систем. Метод ЭИС был использован в качестве основы преобразователя для создания биосенсоров для определения глюкозы и этанола. При этом в качестве биоматериала были проверены как отдельные ферменты, так и целые микробные клетки. Далее метод ЭИС был применен для характеристики различных аспектов работы микробных БТЭ. Было оценено влияние конфигурации элемента на параметры его работы, а также отслеживалось улучшение характеристик БТЭ при изменении параметров биоанода. В процессе работы изменялся материал электродов, биокатализатор и способ его иммобилизации, использовались углеродные наноматериалы, и была выбрана комбинация с наибольшей эффективностью генерации электричества. Все параметры данных БТЭ оценивались как с помощью метода ЭИС, так и с помощью методов циклической вольтамперометрии и хроноамперометрии. Теоретически, любой объект при исследовании можно разложить на простейшие компоненты, но необходимо было оценить применимость данного метода на примере конкретных микроорганизмов, хранящихся во Всероссийской коллекции микроорганизмов. Метод ЭИС был использован для регистрации процессов клеточного лизиса или электропорации клеточных мембран, для чего был исследован импеданс суспензий различных микроорганизмов сначала в интактном состоянии, а затем после разрушающего внешнего воздействия. Полученные результаты были использованы для практического применения разработанных микробных БТЭ. Система из нескольких связанных микробных топливных элементов была использована для конвертерного накопления электричества, а микробный БТЭ с электродами из ТРГ был имплантирован в организм живой травяной лягушки *Rana Temporaria*. Подробно каждый из описанных этапов рассматривается ниже.

3.1. Создание импедансометрических биосенсоров

3.1.1. Биосенсоры на основе глюкозооксидазы

В качестве основы биосенсора для определения содержания глюкозы использовали глюкозооксидазу (ГО), которая обладает абсолютной специфичностью по отношению к β -D-глюкозе и катализирует реакцию ее окисления с выделением пероксида водорода. В литературе к настоящему моменту описано лишь несколько импедансометрических биосенсоров для определения глюкозы, при этом ни один из них не основан на коммерчески доступных печатных электродах. Для подтверждения факта иммобилизации глюкозооксидазы в геле хитозана на поверхности печатных электродов и того, что импедансометрический ответ сенсора на глюкозу

не является простой реакцией на добавление нового компонента в раствор, перед добавлением каждой новой порции глюкозы в раствор проводили хроноамперометрические измерения. Рабочий потенциал сенсоров был выбран на основании изучения анодных пиков циклических вольтамперных характеристик, и составлял 280 мВ для бензохинона, 400 мВ для гексацианоферрата калия (III), 300 мВ для гексацианоферрата калия (II) и 200 мВ для 2,6-дихлорфенолиндофенола. При этих потенциалах прямого окисления глюкозы на электродах с иммобилизованной глюкозооксидазой в отсутствие медиаторов электронного транспорта не наблюдалось. Виды диаграмм Найквиста импедансометрических сенсоров представлены на рис. 10 на примере диаграмм, полученных для системы, где в качестве медиатора использовался бензохинон.

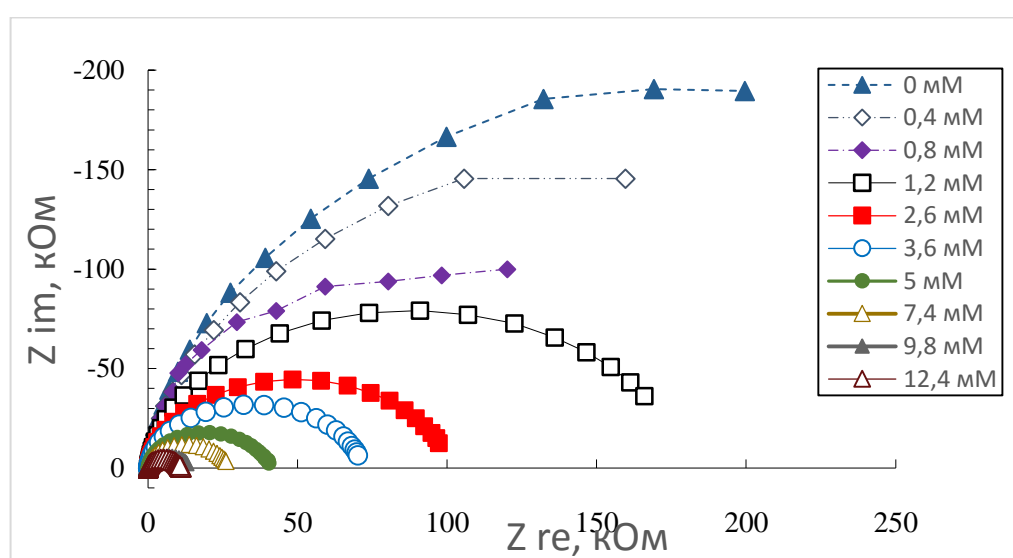


Рис. 10. Диаграммы Найквиста биосенсора на основе ГО, иммобилизованной в хитозан, в буферном растворе в присутствии бензохинона; $E = +0,280$ мВ; интервал частот: от 40 кГц до 100 мГц. На вставке указаны концентрации глюкозы, соответствующие каждой диаграмме.

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. 11, а). Данная эквивалентная схема использовалась для описания всех сенсоров, кроме сенсора с использованием ДХФИФ. В данном случае в системе наблюдались диффузионные ограничения, и для характеристики системы использовали схему, представленную на рис. 11 (б). Диаграммы Найквиста для сенсора на основе ДХФИФ представлены на рисунке 12. Характерные изгибы диаграмм в области низких частот сигнализируют о наличии в системе диффузионных ограничений, не наблюдавшихся при использовании других медиаторов электронного транспорта.

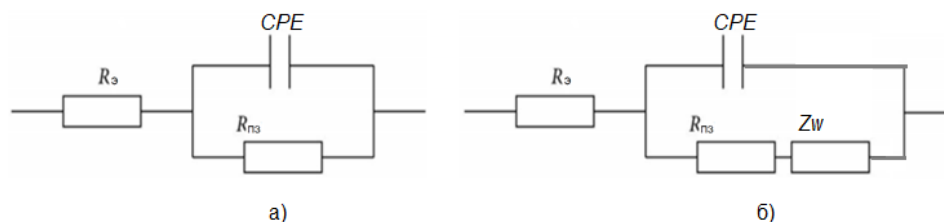


Рис. 11. Эквивалентные схемы, используемые для характеристики сенсоров на основе бензохинона, гексацианоферрата калия (II) и гексацианоферрата калия (III) (а); и на основе ДХФИФ (б).

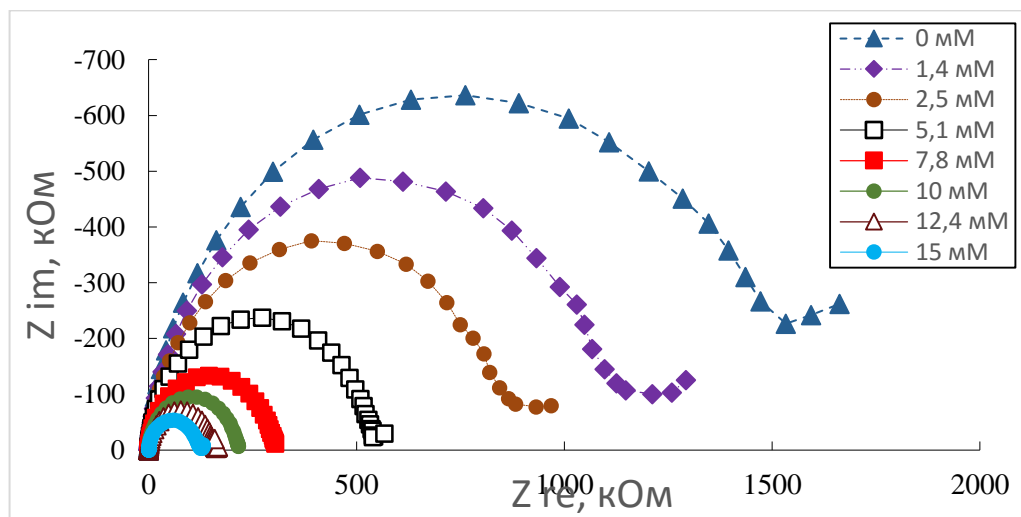


Рис. 12. Диаграммы Найквиста биосенсора на основе ГО, иммобилизованной в хитозан, в буферном растворе в присутствии ДХФИФ; $E = +0,200$ мВ; интервал частот: от 40 кГц до 100 мГц. На вставке указаны концентрации глюкозы, соответствующие каждой диаграмме.

После вычисления оптимальных эквивалентных схем для каждой системы произвели выбор значимого параметра сенсора. Все 3 основных параметра схемы (R_s , 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. Если допустить, что обе электрохимические реакции, проходящие на электроде (переход окисленной формы медиатора в восстановленную и переход флавинадениндинуклеотида из окисленной в восстановленную форму), являются быстрыми и обратимыми, то изменение количества медиатора электронного транспорта зависит исключительно от концентрации глюкозы в системе, что в свою очередь связано с сопротивлением переноса заряда формулой (7):

$$R_{ПЗ} = RT \times (n^2 F^2 S_{э} k_{ПЗ} [C])^{-1}, \quad (7)$$

где R – газовая постоянная, T – температура, n – число перенесенных электронов на одну молекулу редокс-соединения, F – число Фарадея, $S_{\text{Э}}$ – площадь поверхности электрода (см^2), $K_{\text{ПЗ}}$ – константа переноса заряда, зависящая от приложенного потенциала, и $[C]$ – это концентрация редокс-соединения (моль/см^3). Соответственно, мы можем заменить в данном уравнении $[C]$ на $k_1[C_6H_{12}O_6]$, где k_1 – константа. Если все остальные параметры уравнения также являются константами, то получается линейное уравнение вида $1/R_{\text{ct}}=k[C_6H_{12}O_6]$, где константа k включает в себя все эти постоянные. Таким образом, значение сопротивления переноса заряда обратно пропорционально концентрации глюкозы в системе, и это значение должно постепенно уменьшаться при добавлении новых объемов глюкозы в ячейку.

Для биосенсорного анализа чаще всего используется линейный участок градуировочной кривой, что позволяет снизить ошибки анализа. Поэтому в дальнейшем для разработанных биосенсоров представлены именно линейные участки градуировочных кривых, а не полные градуировочные зависимости. Коэффициент чувствительности сенсора в данном случае – это тангенс угла наклона градуировочной функции. Линейные участки градуировочных кривых сенсоров представлены на рисунке 13.

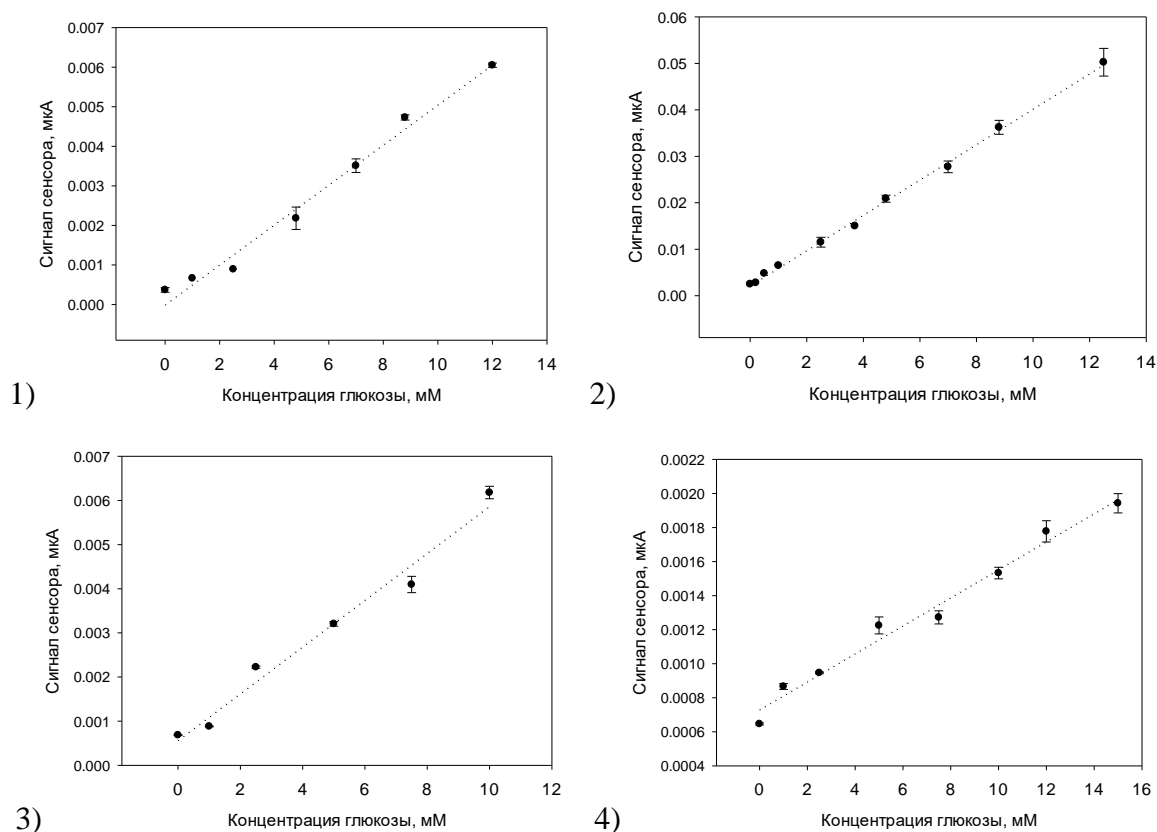


Рис. 13. Линейный участок градуировочной зависимости для биосенсоров на основе печатных электродов, содержащих разные медиаторы: 1) ГЦФ (III); 2) бензохинон; 3) ГЦФ (II); 4) ДХФИФ ($n = 5$, $P = 0,95$).

Наибольшую чувствительность продемонстрировал сенсор с использованием бензохинона, для которого данный параметр составлял $4,1 \times 10^{-3} \pm 0,2 \times 10^{-3}$ 1/мМ*кОм. Чувствительность трех остальных сенсоров оказалась на порядок ниже. Наибольший диапазон линейного участка продемонстрировал сенсор с использованием ДХФИФ, для которого верхняя граница линейного диапазона составила 15 мМ. Наименьшая концентрация, определяемая данным сенсором, составила 0,2 мМ для сенсора с использованием бензохинона. Ключевые параметры разработанных биосенсоров представлены в таблице 1.

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

Использованный медиатор	Линейный диапазон детекции, мМ	Чувствительность, 1/мМ*кОм	Стабильность при хранении без снижения активности
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

Одной из важнейших характеристик для сенсоров является их операционная стабильность. Она показывает устойчивость ответа сенсора на одну и ту же концентрацию субстрата при проведении большого числа последовательных измерений и тесно связана с метрологической характеристикой сходимостью (повторяемостью). Операционную стабильность определяли путём проведения серии параллельных измерений содержания определяемого вещества в пробе. В качестве концентрации определяемого вещества выбрали 5 мМ глюкозы, т.к. данная концентрация находится примерно в середине диапазона определяемых концентраций каждого из биосенсоров. Мерой операционной стабильности считали стандартное отклонение серии результатов 10 параллельных измерений содержания глюкозы. Количественная характеристика операционной стабильности биосенсоров представлена в таблице 2. Наилучшую операционную стабильность продемонстрировал сенсор на основе бензохинона, при этом наихудшее значение – у сенсора с использованием ДХФИФ. Это напрямую можно связать с уровнем тока в данных системах. В системе на основе ДХФИФ уровень тока самый низкий среди всех сенсоров (соответственно, значение сопротивления

переноса заряда самое высокое), а при низком уровне тока повышается влияние шумов и прочих факторов, мешающих точному и стабильному измерению определяемых проб.

Таблица 2. Операционная стабильность биосенсоров на основе ферментов

Использованный медиатор	Количество параллельных измерений	Операционная стабильность, %	Длительность одиночного измерения, мин
Гексацианоферрат калия (III)	10	8	6
Гексацианоферрат калия (II)	10	7	6
Бензохинон	10	5	6
ДХФИФ	10	12	6

В качестве контрольного биосенсора использовался амперометрический биосенсор, основанный на базе тех же графитовых печатных электродов с добавлением берлинской лазури. Эксперименты с данным биосенсором проводились в тех же условиях, но на поверхность электродов заранее был нанесен мультислой берлинской лазури, что позволило обойтись в экспериментах без медиатора и без прикладываемого потенциала. Линейный участок градуировочной кривой для данного сенсора представлен на рисунке 14.

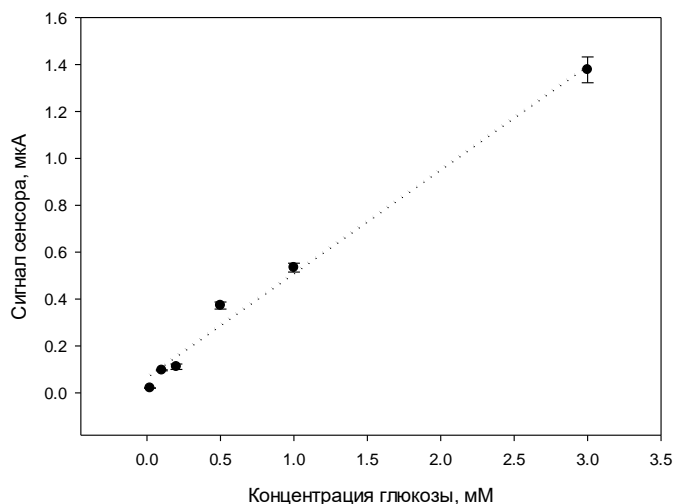


Рис. 14. Линейный участок градуировочной зависимости для биосенсора на основе печатного электрода, модифицированного ГО и берлинской лазурью ($n = 3$, $R = 0,95$)

Данный амперометрический сенсор обладает более низким пределом определяемых концентраций ($0,02$ мМ) и чувствительностью в $0,35 \pm 0,02$ мкА/мМ, однако по сравнению с импедансометрическими сенсорами он обладает более узким линейным диапазоном детекции.

Таким образом, в работе представлен вариант электрохимического биосенсора для определения глюкозы на основе метода ЭИС. Показано, что увеличение концентрации глюкозы на сенсоре приводит к уменьшению сопротивления переноса заряда ($R_{ПЗ}$), полученного с помощью импедансометрических измерений. Концентрация глюкозы в исследуемой пробе определяется из линейной зависимости ответа биосенсора ($1/R_{ПЗ}$) от концентрации глюкозы в растворе. Описанные в работе биосенсоры отличаются достаточно широким линейным диапазоном определяемых концентраций, однако слегка уступают по нижней границе определяемых концентраций биосенсору на основе БЛ. Тем не менее, к преимуществам разработанных сенсоров по сравнению с сенсором на основе БЛ можно отнести легкость пробоподготовки электрода – на поверхность печатного электрода наносится смесь фермента и полимерного геля, после чего сенсор готов к работе в течение часа. Для электрода на основе БЛ необходимо предварительное нанесение одного или нескольких слоев БЛ на поверхность электрода, что занимает около суток. Разработанные биосенсоры также обладают преимуществом перед стандартными амперометрическими сенсорами с использованием редокс-медиаторов. Использование метода ЭИС позволило снизить рабочий потенциал, прикладываемый к системе, по сравнению с амперометрическими аналогами (например, 280 мВ для сенсора с бензохиноном, в то время как стандартный потенциал работы бензохинона – 600 мВ). Отсутствие дополнительного перенапряжения позволяет получать более точные данные с использованием ЭИС-сенсоров, а также замедляет деградиационные процессы на электроде и способствует увеличению его стабильности.

3.1.2. Биосенсоры на основе алкогольоксидазы

В качестве основы биосенсора для определения содержания глюкозы использовали алкогольоксидазу (АО), выделенную из *Pichia pastoris*. Алкогольоксидаза окисляет низкомолекулярные спирты до соответствующих альдегидов, используя молекулярный кислород в качестве акцептора электронов:



Обычно при проведении анализа регистрируется электрохимический отклик пероксида водорода, выделяемого в ходе реакции (Azevedo et al., 2005). Существует два варианта регистрации окисления\восстановления образующейся перекиси водорода. В первом случае необходимо подавать на электрод потенциал выше +600 мВ и наблюдать за переносом электронов на электрод без использования дополнительных соединений. Для того, чтобы перенос электронов наблюдался без прикладывания значительного потенциала к системе, используют электрохимически активные соединения, в первую очередь, берлинскую лазурь.

В первую очередь, был опробован вариант создания импедансометрического сенсора на этанол с использованием БЛ. Конфигурация сенсора повторяла описанную в предыдущей главе, но фермент глюкозооксидаза была заменена на АО. В качестве эквивалентной схемы была использована схема Рэндлса. Однако, если в случае с ГО все 3 основных параметра схемы (R_{Σ} , CPE и $R_{ПЗ}$) изменялись при добавлении субстрата к системе, то в случае с сенсором на основе АО и БЛ значительно изменялось лишь сопротивление электролита. Если для определения глюкозы данный параметр можно было использовать в качестве значимого, то для определения спиртов он не подходит. Низшие спирты являются полярными соединениями, поэтому при добавлении субстрата в систему происходит автоматическое резкое повышение концентрации ионов в системе, что сильно влияет на точность работы сенсора.

Алкогольоксидаза не демонстрировала прямого электронного переноса в наших исследованиях (в связи с тем, что активный центр фермента находится глубоко внутри молекулы и не контактирует непосредственно с поверхностью электрода), поэтому единственным вариантом для разработки импедансометрического сенсора оставалось использование медиаторов электронного транспорта. Особенностью АО является то, что данный фермент не способен отдавать электроны любому другому акцептору, кроме кислорода, благодаря чему был отнесен к категории «истинных оксидаз» (Jordan and Ciolkosz, 1991). Поэтому была использована технология «биферментного электрода» с добавлением на поверхность сенсора пероксидазы хрена (ПХ). Особенностью данного сенсора является то, что при добавлении в реакционную смесь спирта выделяется перекись водорода, восстановление которой катализуется ПХ, что в дальнейшем регистрируется рабочим электродом сенсора с помощью медиатора электронного транспорта или прямого переноса. В разработанных сенсорах в качестве медиаторов электронного транспорта использовались ДХФИФ и бензохинон, в качестве характеристики активности биосенсора была выбрана калибровочная зависимость величины, обратной сопротивлению переноса заряда, от концентрации этанола.

На рисунке 15 представлены диаграммы Найквиста для сенсора на основе бензохинона. Как видно из области низких частот, в данном сенсоре вновь проявляются диффузионные ограничения, поэтому в качестве эквивалентной схемы была выбрана модифицированная схема Рэндлса с элементом Варбурга (рис. 11 б). Линейные участки калибровочных кривых сенсоров на основе БХ и ДХФИФ представлены на рисунке 16.

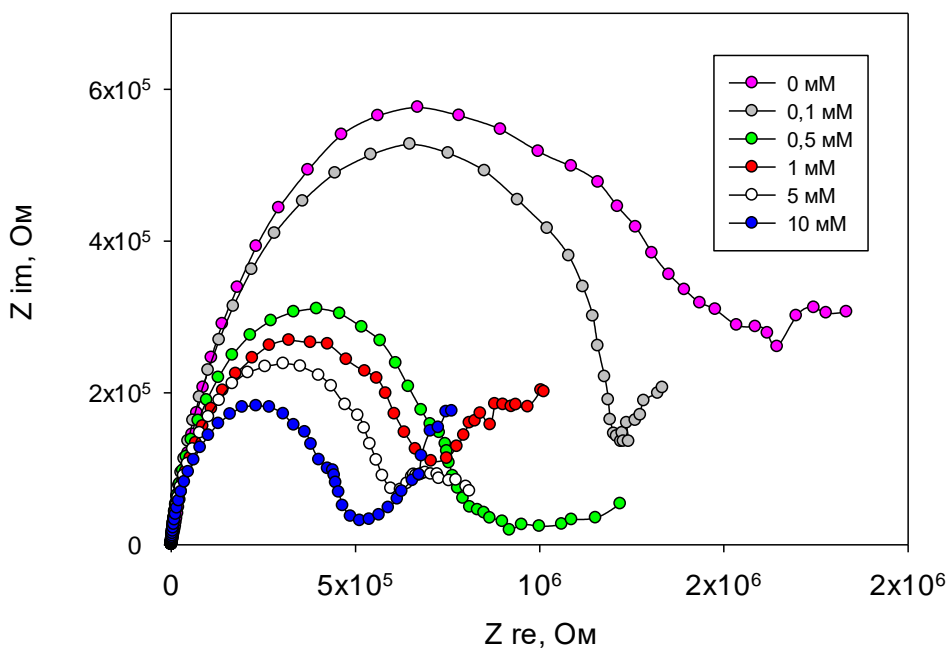


Рис. 15. Диаграммы Найквиста биосенсора на основе АО, иммобилизованной в хитозан, в буферном растворе в присутствии бензохинона; $E = +0,280$ мВ; интервал частот: от 40 кГц до 100 мГц. На вставке указаны концентрации этанола, соответствующие каждой диаграмме.

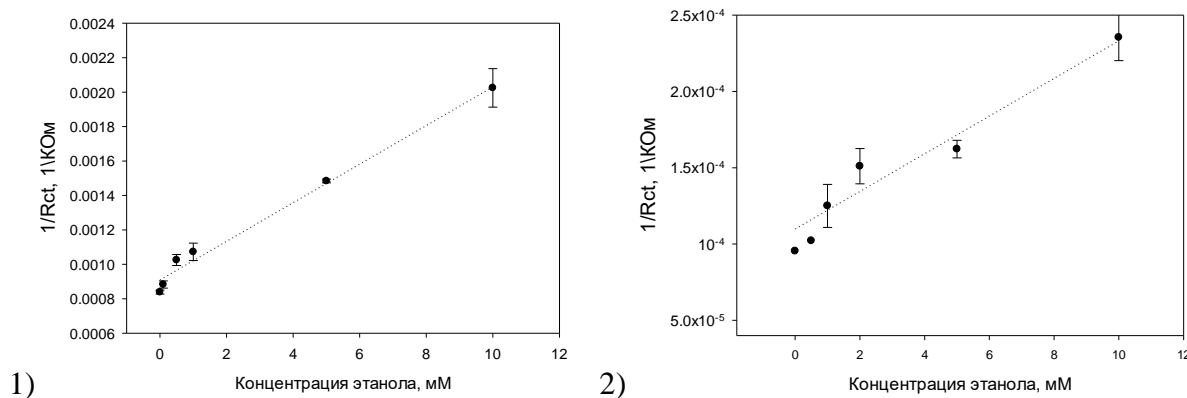


Рис. 16. Линейный участок градуировочной зависимости для биосенсора на основе печатного электрода, модифицированного АО и ПХ с использованием: 1) бензохинона; 2) ДХФИФ ($n = 5$, $P = 0,95$)

Наибольшую чувствительность, как и в случае с измерением глюкозы, продемонстрировал сенсор с использованием бензохинона, для которого данный параметр составлял $1,1 \times 10^{-4} \pm 0,1 \times 10^{-4}$ $1/\text{мМ} \cdot \text{кОм}$. Стоит отметить, что чувствительность обоих сенсоров оказалась ниже, чем для глюкозных сенсоров с использованием аналогичных медиаторов. Данный факт можно связать с тем, что в данной системе используется 2 фермента вместо одного,

что усложняет цепочку переноса электронов. Косвенным доказательством этого можно считать наличие диффузионных ограничений в системе как при использовании бензохинона, так и при использовании ДХФИФ. Все эти факторы негативно сказываются на параметрах разработанных сенсоров. Ключевые параметры разработанных биосенсоров представлены в таблице 3. Как и в случае с сенсорами на основе ГО, в качестве контрольного биосенсора использовался амперометрический сенсор с использованием берлинской лазури. Его параметры также представлены в таблице.

Таблица 3. Параметры разработанных биосенсоров для определения этанола

Использованный медиатор	Линейный диапазон детекции, мМ	Чувствительность	Стабильность при хранении без снижения активности	Операционная стабильность, %
Бензохинон	0,1-10,0	$1,1 \times 10^{-4} \pm 0,1 \times 10^{-4}$ 1/мМ*кОм	9 суток	10
ДХФИФ	0,5-10,0	$1,2 \times 10^{-5} \pm 0,2 \times 10^{-5}$, 1/мМ*кОм	8 суток	15
БЛ (амперометрический)	0,05-5	0,10 \pm 0,01, мкА/мМ	5 суток	12

Как видно из представленной таблицы, амперометрический сенсор на основе БЛ продемонстрировал самую низкую границу предела линейного диапазона детекции, однако верхний предел линейного диапазона обоих импедансометрических сенсоров оказался выше. Стоит отметить также возросшую долговременную стабильность сенсоров с использованием импедансометрического метода определения. Данный факт можно связать с тем, что при хранении сенсора на основе БЛ происходит естественная деградация биосенсора, связанная и с уменьшением активности ферментов, и с разложением берлинской лазури, которая является достаточно неустойчивым соединением. В случае разработанных нами сенсоров не используется каких-либо дополнительных соединений (кроме редокс-медиаторов, которые добавляются в ячейку непосредственно в процессе измерения), так что уменьшение активности сенсора связано только со снижением активности ферментов. Таким образом, разработанные импедансометрические сенсоры на основе алкогольоксидазы и ПХ могут рассматриваться в качестве альтернативы для амперометрических АО-сенсоров, превосходя их по долговременной стабильности и по верхнему пределу обнаружения. В литературе импедансометрические сенсоры на основе фермента алкогольоксидазы описаны не были.

3.1.3. Микробные биосенсоры на основе целых клеток *Glucanobacter oxydans* для определения спиртов и моносахаридов

Поскольку большинство ферментов, применяемых в биосенсорах, выделяют из микроорганизмов, как потенциальные биокатализаторы для импедансометрических сенсоров были рассмотрены и целые клетки бактерий. В качестве биокатализатора для биосенсоров были выбраны бактерии *Glucanobacter oxydans* sbsp. *industrius* ВКМ В-1280. Благодаря околосмембранной локализации основных окислительных ферментов в клетке и высокой скорости работы электрон-транспортной цепи данные микроорганизмы нашли широкое применение в биотехнологии. Подобная структура ферментных комплексов в клетках сочетается с простыми условиями роста биомассы и с высокой устойчивостью клеток к воздействию внешних факторов. В частности, на клетки *G. oxydans* практически не оказывают токсического влияния популярные редокс-медиаторы, что положительно сказывается на долговременной стабильности биосенсоров. В качестве медиатора для разрабатываемых сенсоров был выбран 2,6-дихлорфенолиндофенол, являющийся одним из наиболее часто используемых совместно с бактериями рода *Glucanobacter* медиаторов (Bertokova et al., 2015).

На рисунке 17 представлены линейные участки градуировочных зависимостей ответов биосенсора от концентрации глюкозы и этанола при использовании иммобилизованных в геле хитозана клеток *G. oxydans* и медиатора ДХФИФ.

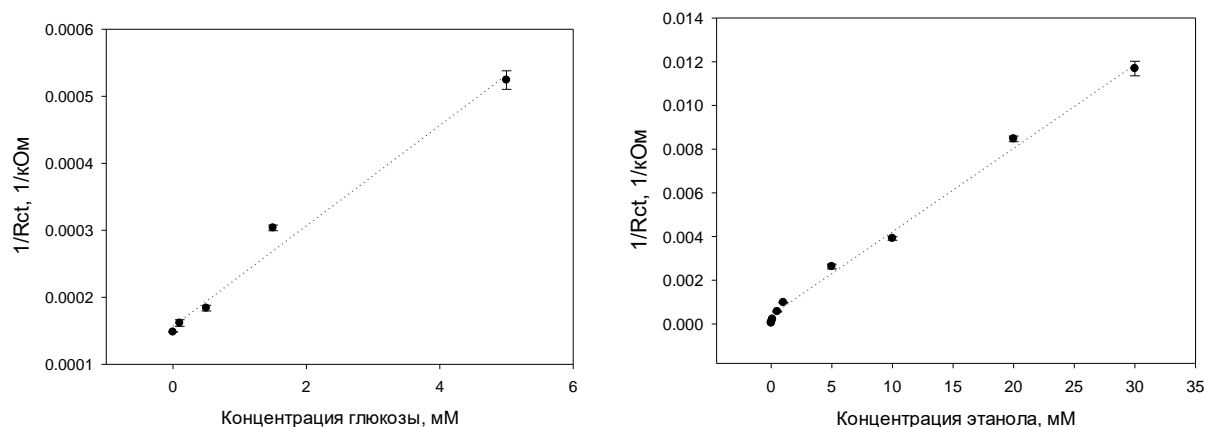


Рис. 17. Линейный участок градуировочных зависимостей для биосенсора на основе печатного электрода, модифицированного бактериальными клетками *G. oxydans* в хитозане с использованием ДХФИФ ($n = 5$, $P = 0.95$).

Биосенсор на основе *G. oxydans* и ДХФИФ позволяет определять более низкие концентрации глюкозы, чем импедансометрические сенсоры, использующие различные медиаторы электронного транспорта, рассмотренные в пункте 3.2.1. 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. Коэффициент чувствительности сенсора при определении глюкозы составил $7,2 \times 10^{-5} \pm 0,5 \times 10^{-5}$ 1/мМ*кОм, что также ниже, чем у всех четырех ферментных импедансометрических биосенсоров.

В сравнении с рассмотренными в пункте 3.2.2 импедансометрическими ферментными сенсорами на основе АО и ПХ, разработанный микробный сенсор при определении этанола превосходит конкурентов по всем параметрам. Он обладает самым широким линейным диапазоном детекции (0,01 мМ – 30 мМ) среди всех вариантов разработанных сенсоров, а также обладает самой высокой чувствительностью, составляющей $3,0 \times 10^{-4} \pm 0,2 \times 10^{-4}$, 1/мМ*кОм, что практически в 3 раза выше, чем чувствительность импедансометрического сенсора на основе АО и ПХ с использованием бензохинона. Для удобства сравнения все характеристики биосенсоров на основе печатных электродов, модифицированных бактериями *G. oxydans* и ферментами сведены в таблице 4.

Таблица 4. Характеристики импедансометрических биосенсоров для определения глюкозы и этанола на основе бактерий *G. oxydans*, ферментов глюкозооксидазы и алкогольоксидазы

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

Таким образом, разработанный микробный импедансометрический сенсор на основе *G. oxydans* может быть использован для определения глюкозы и этанола. При этом по сравнению с аналогичными сенсорами на основе ферментов у микробных импедансометрических сенсоров возрастает долговременная стабильность, что может быть связано с большей устойчивостью

ферментов внутри живых бактериальных клеток, чем при иммобилизации их на поверхности электрода в очищенном виде. Биосенсор на основе целых клеток *G. oxydans* уступает аналогичным сенсорам на основе глюкозооксидазы, описанным в работе, при определении глюкозы по ширине линейного диапазона и по чувствительности. В то же время, сравнение характеристик биосенсора на основе клеток *G. oxydans* и сенсоров на основе биферментной системы АО+ПХ показывает, что микробный импедансометрический сенсор по всем параметрам превосходит описанные в работе ферментные сенсоры. Кроме того, микробный сенсор превосходит по ширине линейного диапазона детекции и долговременной стабильности оба амперометрических сенсора на основе берлинской лазури, рассмотренных в работе. 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 сенсоров не станет препятствием для их использования. Существенным преимуществом данного типа сенсоров является их низкая стоимость по сравнению с многими существующими аналогами: в качестве основы для печатных электродов выбраны дешевые коммерчески доступные графитовые электроды, а стоимость производства микробных клеток *G. oxydans*, используемых в качестве биокатализатора, на порядок ниже стоимости очистки и выделения отдельных ферментов при изготовлении ферментных биосенсоров.

3.2. Применение метода ЭИС для характеристики микробных БТЭ

В полной мере спектральные возможности метода ЭИС используются при анализе таких сложных объектов, как биотопливные элементы. Учитывая строение типичного биотопливного элемента, на его характеристики могут влиять одновременно более десятка различных факторов, такие как конфигурация реактора, ионная сила буфера, используемый субстрат и его концентрация, материал электродов, природа биоматериала, используемые наноматериалы и т.д. Существующие электрохимические методы позволяют оценить суммарное влияние данных факторов на производительность БТЭ, однако для наблюдения за каждым параметром в отдельности необходимо по очереди изменять каждый из факторов и следить за реакцией всей системы на изменение одного параметра. Для упрощения данной процедуры благодаря своей спектральной природе лучше всего подходит метод ЭИС. Он позволяет не только получать информацию о нескольких изменяющихся параметрах системы одновременно, но и связать конкретные изменения разных областей спектра с отдельными частями БТЭ. В случае правильного подбора эквивалентной электрической схемы, данный метод позволяет наблюдать за всеми изменяемыми характеристиками БТЭ одновременно, чего не может обеспечить ни один другой аналитический метод анализа. В данной работе будет рассмотрено применение метода

ЭИС для анализа различных компонентов микробных БТЭ и изучены возможности практического применения разработанных БТЭ.

3.2.1. Влияние конфигурации микробного БТЭ на его внутренние параметры

В предыдущих пунктах работы в качестве рабочих электродов использовались золотые и графитовые электроды матричной печати. При измерениях с помощью электродов, полученных матричной печатью, используют трех электродную схему измерения, но при проведении исследований в формате БТЭ, необходимо два электрода – анод и катод. Рабочие электроды от двух электродов матричной печати могут быть использованы в качестве анода и катода БТЭ, однако необходимо провести сравнение с традиционными графитовыми стержнями и оценить целесообразность данного подхода. Золотые печатные электроды Dropsens не рассматривались в качестве возможной основы БТЭ, т.к. их использование слишком увеличивало бы стоимость БТЭ. Поэтому были получены вольтамперные характеристики элементов, в которых в качестве анода использовался рабочий электрод от графитового печатного электрода, а в качестве катода – либо еще один рабочий электрод от подобного электрода, либо электрод сравнения от печатного электрода, стандартный электрод из спектрального графита (СГЭ). В систему добавлялись медиаторы электронного транспорта, используемые в дальнейших измерениях. В анодное отделение был добавлен ДХФИФ, в катодное – ГЦФ. Наибольшее смещение ЦВА при добавлении медиаторов наблюдали при использовании в качестве катода и анода рабочих электродов от электрода матричной печати. Использование в качестве катода электрода сравнения от матричной печати дает очень слабые изменения ЦВА при добавлении медиаторов в систему. Токи, полученные в этих измерениях, не превышали 120 нА.

Для выбора основных электродов для дальнейших экспериментов два БТЭ на основе СГЭ и электродов матричной печати сравнили с помощью метода ЭИС. Площадь электродов из СГЭ в 10 раз больше, чем у рабочего печатного электрода, поэтому все значения сопротивлений были пересчитаны на одинаковую площадь. Полученные значения представлены в таблице 5.

Таблица 5. Сравнение электрохимических параметров анодов и БТЭ на их основе.

Параметр	Анод из СГЭ	Анод из электрода матричной печати
Площадь электрода, см ²	0,75	0,07
R (в сухом состоянии), Ом	4,7	30
R _{вн} для чистых электродов в буфере, Ом/см ²	63019	-

$R_{вн}$ при -150 мВ для чистых электродов, Ом/см ²	93450	1780000
$R_{вн}$ для чистых электродов в буфере с медиаторами, Ом/см ²	73067	2338983
$R_{вн}$ для чистых электродов в буфере с медиаторами при U=-150 мВ, Ом/см ²	43652	2014000
$R_{вн}$ для БТЭ, Ом см ²	1085	9455
$R_{вн}$ при U= -150 мВ, Ом см ²	1632	11347
$R_{вн}$ для БТЭ, Ом	1643	125883
$R_{вн}$ при U= -150 мВ, Ом	2176	162100
$R_{БТЭ}$, мкВт/см ²	6,61	1,09

Примечание: приведены средние значения параметров по 3 измерениям.

Таким образом, удельное сопротивление электродов матричной печати во всех условиях измерений было на порядок выше, чем удельное сопротивление СГЭ. Высокое сопротивление анодов из электродов матричной печати приводит к низкой проводимости системы и к уменьшению скорости электронного переноса в системе, что негативно сказывается на общей мощности биотопливного элемента на основе электродов матричной печати. В связи с этим можно сделать вывод о нецелесообразности использования печатных электродов в формате микробного БТЭ.

Работа БТЭ при различных соотношениях числа катодов и анодов.

Одним из простейших способов увеличения мощности БТЭ является увеличение числа электродов элемента. Однако, необходимо было определить, становится ли генерация электричества более эффективной пропорционально количеству электродов. На начальных этапах эксперимента исследовали условия работы БТЭ с кюветой объемом 5 мл и площадью мембранного окна 0.3 мм², разделяющего катодное и анодное отделения. В качестве анода и катода использовали стержни спектрального графита. На анод иммобилизовали клетки *G. oxydans* в геле хитозана. Рабочая площадь анода составляла 3 см².

На рис. 19 рассмотрены четыре варианта формирования БТЭ с целью повышения мощности биотопливной ячейки. Регистрировали ЦВА в системах: 1 анод – 1 катод, 4 катода – 1 анод, 4 катода – 4 анода, 1 катод – 1 анод (буфер). На основе полученных ЦВА рассчитывали мощность одного БТЭ. Для варианта 1 анод – 1 катод получили значение мощности 4,9 мкВт, для варианта 4 катода – 4 анода значение составило 7.3 мкВт, 4 катода – 1 анод получили значение мощности 6,5 мкВт. В таблице 6 приведены значения внутреннего сопротивления ячейки и её мощность, рассчитанные на основе рис. 18.

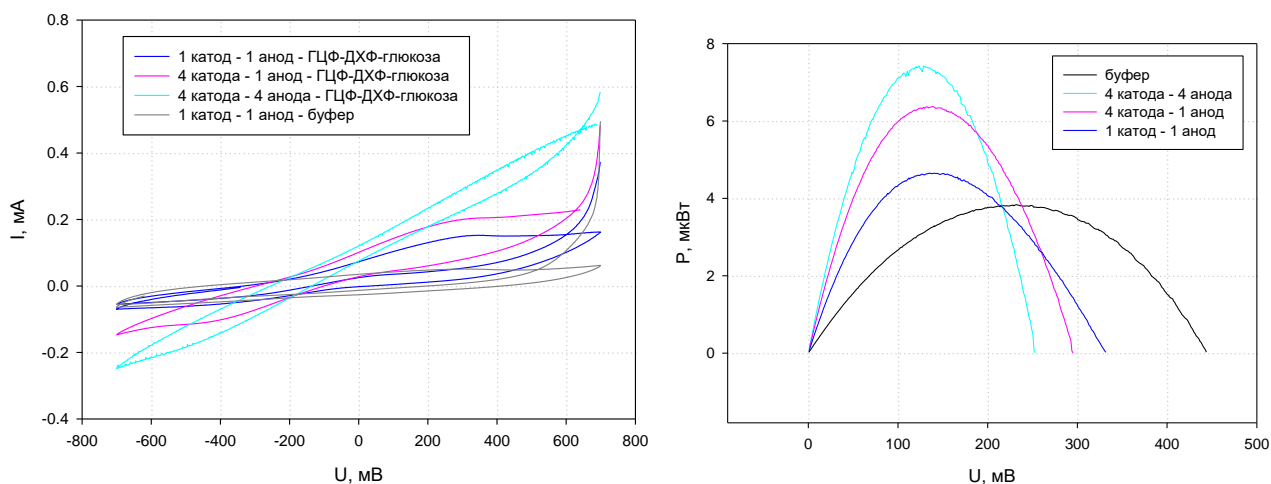


Рис. 18. Циклические вольтамперные и мощностные характеристики БТЭ с различным количеством анодов и катодов. В реакционную среду вносили 25 мМ калий-натрий фосфатный буфер, ГЦФ, ДХФИФ и глюкозу.

Таблица 6. Внутреннее сопротивление и мощность БТЭ в зависимости от количества электродов

Конфигурация БТЭ	Внутреннее сопротивление	Мощность, мкВт
1 анод + 1 катод в буфере	$230 \text{ мВ} / 0,018 \text{ мА} = 12777 \text{ Ом}$	3,9
1 анод + 1 катод в рабочих условиях	$140 / 0,038 = 3684$	4,9
1 анод + 4 катода в рабочих условиях	$140 / 0,05 = 2800$	6,5
4 анода + 4 катода в рабочих условиях	$125 / 0,06 = 2083$	7,3

Примечание: приведены средние значения параметров по 3 измерениям.

Как следует из полученных данных, наибольшее значение мощности и наименьшее значение внутреннего сопротивления было получено для системы 4 катода – 4 анода. Однако, следует отметить, что увеличение количества электродов в 4 раза не привело к четырехкратному увеличению мощности и снижению внутреннего сопротивления в 4 раза, так что данный путь оптимизации производительности БТЭ не является наиболее привлекательным. В дальнейшем с целью увеличения мощности и снижения сопротивлений БТЭ рассматривали различные компоненты ячеек БТЭ.

Работа БТЭ при различной ионной силе буферного раствора.

С целью снижения внутреннего сопротивления БТЭ в дальнейших экспериментах изменяли условия работы топливного элемента. Так, например, увеличивали ионную силу буферного раствора путем добавления NaCl, увеличивали площадь окна, разделяющего два отделения кюветы, а также изменяли объем кювет. В таблице 7 приведены значения внутреннего

сопротивления БТЭ, измеренного с помощью метода ЭИС при нулевом приложенном потенциале. Использовали ячейку объемом 5 мл, площадь окна, разделяющего анодное и катодное отделения, составляла 0,3 см², рабочая площадь анода составляла 3 см².

Таблица 7. Сопротивление БТЭ в реакционной среде различной ионной силы для двухэлектродного БТЭ, содержащего 1 катод и 1 анод.

Условия измерений	Сопротивление, Ом
Кюветы заполнены только 25 мМ калий-фосфатным буферным раствором.	1040
Кюветы заполнены 25 мМ буфером, ГЦФ, ДХФИФ и глюкозой.	900
Кюветы заполнены только 25 мМ буфером, содержащим 25 мМ хлористого натрия.	730
Кюветы заполнены только 25 мМ буфером, содержащим 100 мМ хлористого натрия.	370
Кюветы заполнены только 25 мМ буфером, содержащим 100 мМ хлористого натрия. Кювета без разделяющей мембраны.	347
Кюветы заполнены 25 мМ буфером, содержащим 100 мМ хлористого натрия, ГЦФ, ДХФИФ и глюкозой.	320
Кюветы заполнены 25 мМ буфером, содержащим 100 мМ хлористого натрия, ГЦФ, ДХФИФ и глюкозой. Кювета без разделяющей мембраны.	330

Примечание: приведены средние значения параметров по 3 измерениям.

Таким образом, повышение ионной силы буферного раствора снижает внутреннее сопротивление ячейки. Наименьшее внутреннее сопротивление (320 Ом) было получено при высокой ионной силе буферного раствора (при внесении 100 мМ хлористого натрия). При этом отсутствие протонпроницаемой мембраны между отделениями повышает общее внутреннее сопротивление элемента, несмотря на то, что сама по себе мембрана обладает сопротивлением около 10-20 Ом.

Работа БТЭ при различной площади мембраны, разделяющей анодное и катодное отделения кюветы.

Так как протонпроницаемая мембрана является важным элементом двухкамерного БТЭ, исследовали влияние площади мембраны, разделяющей кюветы, на внутреннее сопротивление БТЭ. Исследовали два типа кювет: с мембраной площадью 1,2 см² и 0,3 см², при использовании 25 мМ калий-натрий фосфатного буферного раствора и аналогичного буферного раствора с повышенной ионной силой (100 мМ NaCl). На рис. 19 приведены мощностные характеристики

БТЭ, рассчитанные на основе ЦВА. Наибольшая мощность 13,5 мкВт получена для ячейки с мембраной в 1,2 см² с добавлением 100 мМ NaCl.

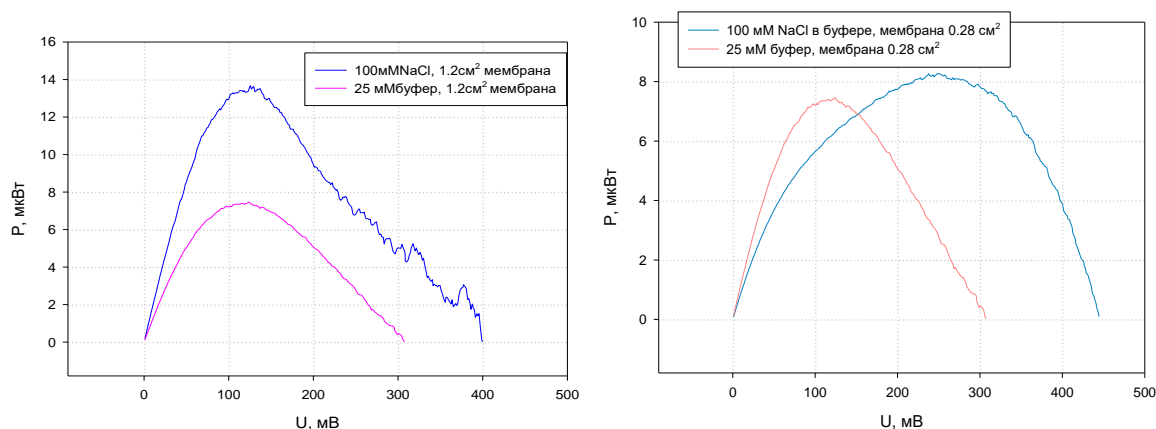


Рис. 19. Мощностные характеристики для БТЭ с площадью мембраны 1,2 см² и 0,28 см² при измерениях в буфере с различной ионной силой.

В таблице 8 приведены значения внутреннего сопротивления ячейки при использовании БТЭ с мембраной различной площади и различной ионной силой буферного раствора, измеренные методом ЭИС. Увеличение площади мембраны резко снижает общее сопротивление элемента, поэтому в дальнейшем во всех рассмотренных в работе БТЭ применялись мембраны площадью 1,2 см².

Таблица 8. Внутреннее сопротивление БТЭ при использовании кювет с различным размером мембранного окна.

Условия измерения	Сопротивление, Ом
Мембрана 1,2 см ² , 100 мМ NaCl в 50 мМ буфере	65
Мембрана 1,2 см ² , 25 мМ буфер	420
Мембрана 0,28 см ² , 100 мМ NaCl в 50 мМ буфере	300
Мембрана 0,28 см ² , 25мМ буфер	1370

Примечание: приведены средние значения параметров по 3 измерениям.

Таким образом, исследование условий измерения, способствующих снижению внутреннего сопротивления БТЭ, показало, что использование буферного раствора с добавлением 100 мМ хлористого натрия в три раза снижает внутреннее сопротивление БТЭ (320 Ом) по сравнению с буферным раствором без добавления дополнительных солей. Увеличение площади мембраны приводило к снижению внутреннего сопротивления БТЭ в 3,5 – 4,5 раза и, как следствие, к увеличению мощности. Как показали дальнейшие исследования, стабильность БТЭ сильно снижалась при использовании буферного раствора с добавлением 100 мМ NaCl. В

этой связи, для поддержания стабильности БТЭ в дальнейших экспериментах использовали буфер с добавлением 10 или 50 мМ NaCl.

Влияние температуры буфера на величину сигнала

Исследовали влияние температуры буфера на величину амперометрического сигнала БТЭ и на сопротивление анода при введении субстрата. Результаты приведены в таблице 9.

Таблица 9. Влияние температуры буфера на величину сигнала БТЭ.

Буфер комнатной температуры			Буфер с температурой +4° С		
ΔI , мкА	Начальный уровень сигнала, мкА	R_A , Ом см ²	ΔI , мкА	Начальный уровень сигнала, мкА	R_A , Ом см ²
27,5	3,8	4758	24,7	6,6	4919
28,3	4,4	4823	27,6	7,1	4608

Примечание: приведены средние значения параметров по 3 измерениям.

Значение сопротивления анода на основе СГЭ не зависит от температуры буфера в диапазоне от 4 до 25° С (4777 ± 113 Ом; 2,36 %). Температура буферного раствора не влияет и на амплитуду сигнала ($27,045 \pm 1,39$ мкА; 5,17 %), но изменяет начальный уровень сигнала.

Влияние различных компонентов анодного отделения на параметры БТЭ

Влияние различных компонентов биоанода (клетки, иммобилизующий агент) и среды (буфер, медиатор, субстрат) на ЦВА показаны на рис. 20. Как видно из вольтамперных характеристик, добавление отдельных компонентов в систему не приводит к значительному увеличению анодных токов. Значительное увеличение токов окисления наблюдается при полностью сформированной ячейке БТЭ, в которой клетки иммобилизованы на электроде, поглощают субстрат и переносят заряд на электрод с помощью медиатора. Иммобилизация бактериальных клеток в геле хитозана на поверхности электрода увеличивает время функционирования БТЭ и увеличивает токи окисления в 2 раза по сравнению с БТЭ, в котором бактериальные клетки иммобилизованы сорбцией.

В таблице 10 приведены параметры БТЭ на основе СГЭ при внесении медиатора, субстрата, при добавлении или в отсутствие клеток или хитозана. Как следует из полученных данных, наибольшая удельная мощность и наименьшее сопротивление (R_A) соответствуют БТЭ, содержащему анод на основе СГЭ с иммобилизованными в хитозан бактериальными клетками, которые осуществляют окисление субстрата в присутствии медиатора. При сорбции бактериальных клеток на электрод (без использования хитозана) мощность системы

уменьшается в 1,5 раза, что может быть связано со слабым удерживанием клеток на поверхности графита. Таким образом, сорбция бактериальных клеток на поверхности электрода без дополнительных агентов не дает возможности получить долговременно и стабильно работающий БТЭ. Поэтому в дальнейших экспериментах использовали метод иммобилизации в гели для удерживания биоматериала на поверхности электрода.

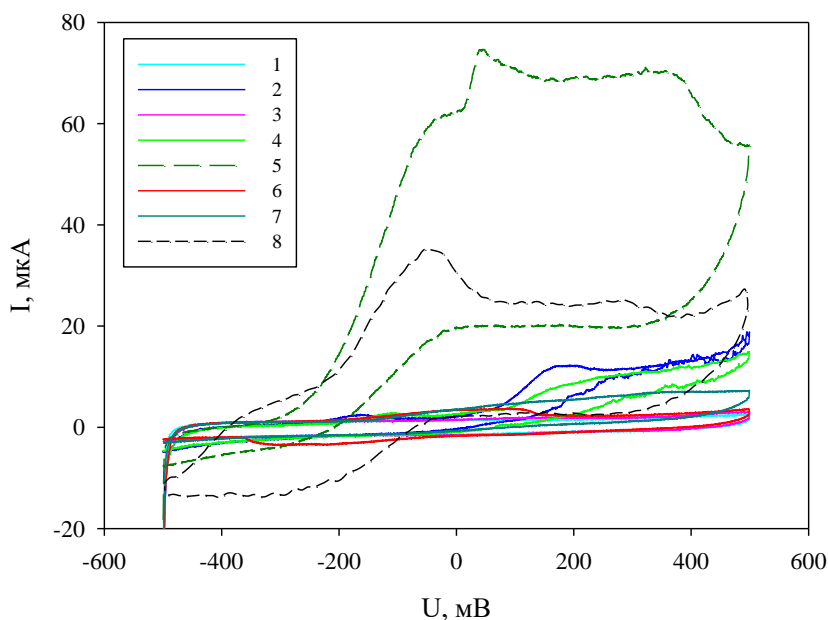


Рис. 20. ЦВА электрода на основе спектрального графита в разных средах. 1 – буфер; 2 – буфер + медиатор; 3 - буфер + субстрат; 4 - буфер + медиатор + субстрат; 5 – бактериальные клетки + хитозан + буфер + медиатор + субстрат; 6 – хитозан; 7 - бактериальные клетки; 8 - бактериальные клетки + медиатор + субстрат. Измерения проведены по двухэлектродной схеме.

Таблица 10. Основные характеристики БТЭ в разных средах.

	$R_{\text{Э}},$ Ом см^2	$R_{\text{А}},$ Ом см^2	$R_{\text{уд}},$ мкВт/ см^2	$R_{\text{внутр}},$ Ом см^2
СГЭ в буфере	309	148000	0,69	209775
СГЭ в буфере + ДХФИФ	185	79430	0,74	46063
СГЭ в буфере + ДХФИФ +этанол	181	66200	0,57	29311
СГЭ в буфере + этанол	213	50000	0,65	205826
СГЭ + бактериальные клетки в буфере	199	93570	0,64	219470
СГЭ + бактериальные клетки + ДХФИФ + этанол	177	6700	4,21	5834
СГЭ + хитозан	374	63430	0,65	207909
СГЭ + бактериальные клетки + хитозан + ДХФИФ + этанол	204	3100	6,30	2783

Примечание: приведены средние значения параметров по 3 измерениям.

Значения параметра R_{Σ} (табл. 10) не менялось при добавлении субстрата и при изменении прикладываемого потенциала. Это подтверждает тот факт, что параметр R_{Σ} отвечает за сопротивление электролита, и его значение не зависит от процессов, протекающих на электроде. В дальнейшем этот параметр не учитывался при обработке результатов, т.к. его минимальное значение обеспечивалось добавлением дополнительных солей в буферный раствор. Значения сопротивлений до введения субстрата также не являются информативными, так в ячейке до введения субстрата не происходит электрохимической реакции. В дальнейшем параметры импеданса снимались в присутствии субстрата (этиловый спирт) после установления равновесия в системе.

Выбор концентраций субстрата, медиатора и потенциала для дальнейших измерений

Были получены зависимости амплитуды силы тока и сопротивления переноса заряда ($R_{ПЗ}$) от подаваемого потенциала (рис. 21). На рис. 21 видно, что максимальные сигналы на введение этилового спирта в присутствии медиатора наблюдаются при подаваемом потенциале 200 мВ, что близко к стандартному редокс-потенциалу ДХФИФ (Kumar and Acharya, 1999). Минимальные значения $R_{ПЗ}$ были получены при подаваемом потенциале от -150 до -180 мВ, максимальные - при 200 мВ. Кроме того, значения сопротивлений, измеренные при потенциале -150 мВ, были наиболее близки к значениям внутренних сопротивлений БТЭ, вычисленных из вольтамперных характеристик.

Таким образом, дальнейшие амперометрические измерения проводили при подаваемом потенциале 200 мВ, а импедансные измерения проводили при подаваемом потенциале -150 мВ.

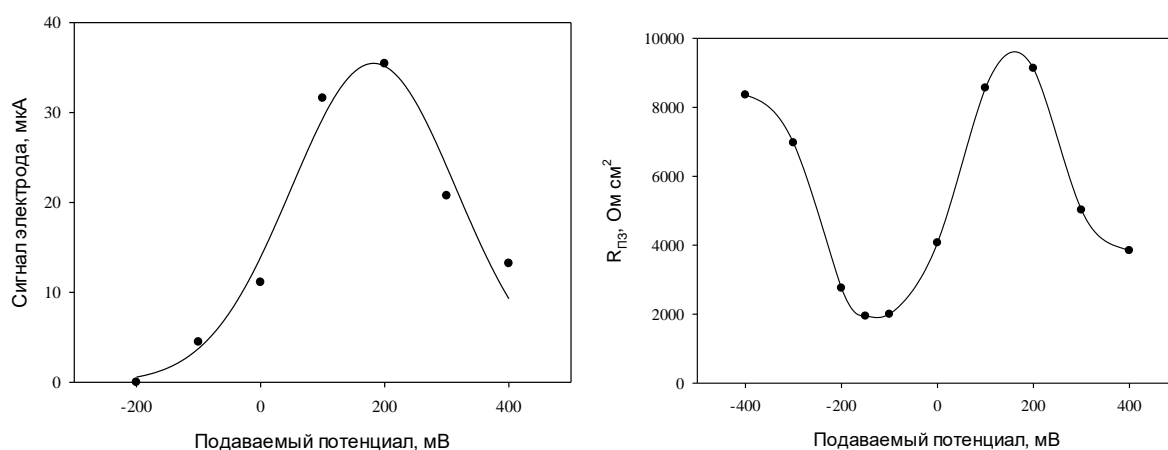


Рис. 21. Зависимость амперометрических сигналов и сопротивления переноса заряда стандартного электрода с клетками *G. oxydans* и хитозаном на введение этилового спирта (10 мМ) от подаваемого потенциала

Для определения оптимальной концентрации реактивов в ячейках БТЭ варьировали концентрации субстратов и медиаторов. При этом в качестве рабочего электрода использовали электрод из спектрального графита, модифицированный наноматериалом – МУНТ Таунит-М. На рис. 22 представлена зависимость сигналов электрода от концентрации добавляемого субстрата (этиловый спирт). Для получения максимальной мощности БТЭ концентрация субстрата составляла 10 мМ.

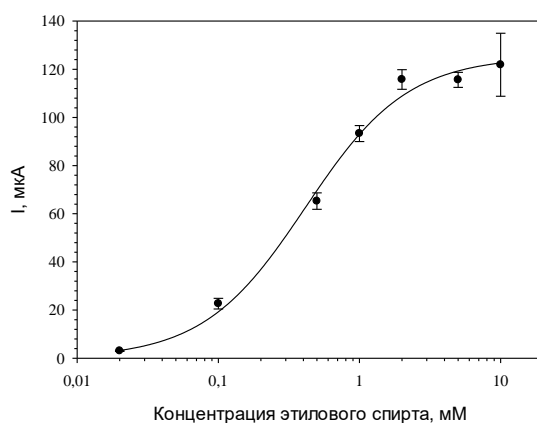


Рис. 22. Зависимость сигналов электрода, модифицированного МУНТ, от концентрации субстрата (этиловый спирт) при $U=200$ мВ, концентрация ДХФИФ в анодном отделении 112 мМ, концентрация ГЦФ в катодном отделении 4 мМ.

На рис. 23 показаны зависимости амперометрических сигналов на введение субстрата от концентрации медиаторов в катодном и анодном отделениях БТЭ. Максимальные сигналы на введение субстрата (этанол, 10 мМ) получены при концентрациях ДХФИФ 120-160 мМ и при концентрации ГЦФ 4-6 мМ.

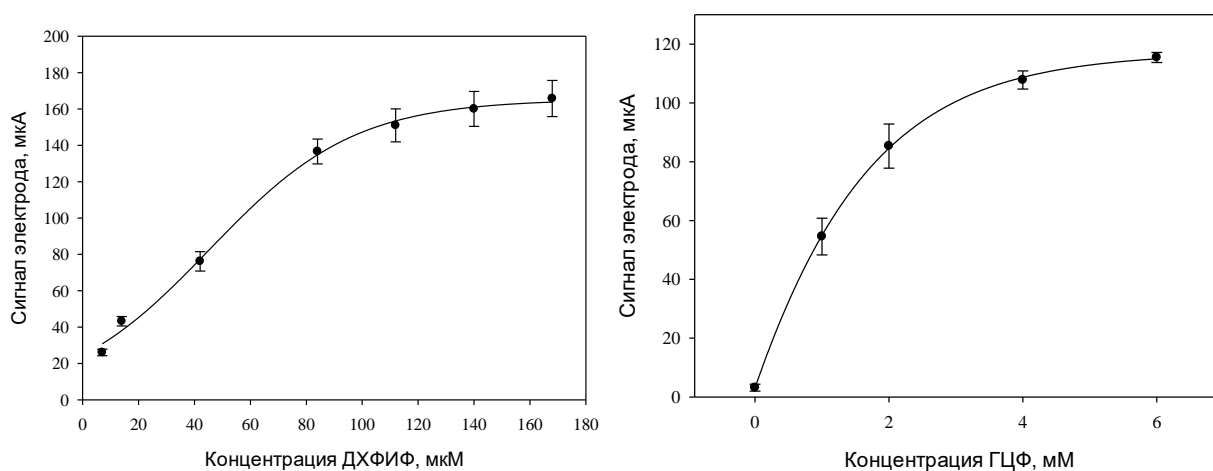


Рис. 23. Зависимость сигналов электрода, модифицированного МУНТ, от концентрации ДХФИФ в анодном отделении и концентрации ГЦФ в катодном отделении

На основании проведенных экспериментов были выбраны рабочие концентрации медиаторов (ДХФИФ – 120 мкМ, ГЦФ – 4 мМ), субстрата (этиловый спирт, 10 мМ), а также рабочие потенциалы для методов хроноамперометрии (200 мВ) и импедансной спектроскопии (-150 мВ).

3.2.2. Модификация биоанода БТЭ углеродными наноматериалами

Конечная цель модификации биоанодов микробного БТЭ наноматериалами состоит в том, чтобы увеличить мощность микробного биотопливного элемента. Основой электродов являлись СГЭ, поверхность которых была модифицирована 8 различными углеродными наноматериалами (ТРГ, ВОПГ, интеркалированный пиролитический графит, ФМНТ, МУНТ, оксид графена, восстановленный оксид графена, углеродное волокно). Углеродные наноматериалы находились в контакте с бактериальными клетками *G. oxydans* и были иммобилизованы на поверхности электрода в геле хитозана. Кроме того, в качестве биоанодов были испробованы электроды из чистых ТРГ и ВОПГ. Измерения с использованием трехэлектродной схемы позволили описать электрохимические параметры процессов, происходящих на аноде. Для полного описания процессов, происходящих в биотопливном элементе, использовали двухэлектродную схему измерения, которая наиболее полно моделирует реальные процессы, проходящие в биотопливном элементе.

Значения импедансных характеристик биоанодов, модифицированных углеродными наноматериалами, представлены в таблице 11. Измерялись значения сопротивления электролита и сопротивления переноса заряда для каждого биоанода при двух приложенных потенциалах (0 мВ и напряжении холостого хода) до и после добавления субстрата.

Таблица 11. Значения импедансных характеристик биоанодов на основе *G. oxydans*, модифицированных различными углеродными наноматериалами, измеренных по трехэлектродной схеме до и после добавления субстрата (этиловый спирт, 10 мМ)

R, Ом см ² Материал	R _э , НХХ, без субстр.	R _{пз} , НХХ, без субстр.	R _э , 0 мВ, без субстр.	R _{пз} , 0 мВ, без субстр.	R _э , НХХ, с субстр.	R _{пз} , НХХ, с субстр.	R _э , 0 мВ, с субстр.	R _{пз} , 0 мВ, с субстр.
СГЭ	57	12650	45	6012	50	2153	45	5778
ТРГ	37	7222	43	6437	55	3289	52	5445
СГЭ + ТРГ	41	6070	-	-	61	2050	56	6475
ВОПГ	87	358700	73	512300	102	44890	107	314400

СГЭ + ВОПГ	48	15290	40	6744	40	2336	45	10530
Пирографит интеркал.	30	52350	34	11160	22	6370	20	12570
СГЭ + ФМНТ	36	18930	30	4080	36	6565	36	9002
СГЭ + ОГВ	68	10330	64	790	43	985	40	1154
СГЭ + ОГ	48	30840	47	2250	52	1875	48	3367
СГЭ + ВОЛОКНО	55	15030	46	5232	55	4884	45	5591

Примечание: приведены средние значения параметров по 3 измерениям.

Было показано, что значение R_E во всех опытах было одинаково, т.к. состав электролита не менялся, и этот параметр считали неинформативным. В дальнейшем было решено использовать значения параметров системы, полученных после добавления субстрата и установления равновесия в системе, т.к. эти параметры более достоверно и полно описывают процессы электронного транспорта в системе. После обработки результатов, полученных при измерениях по трехэлектродной схеме, наименьшие значения сопротивления переноса заряда продемонстрировали электроды, модифицированные восстановленным оксидом графена. Однако, изучение одного биоанода в составе трехэлектродной схемы измерения не дает полной картины процессов, происходящих в ячейке БТЭ при его работе, поэтому изученные электроды в дальнейшем были применены в качестве анодов БТЭ и изучены методом ЭИС при двухэлектродной схеме подключения. Полученные частотные зависимости реальной и мнимой составляющих импеданса БТЭ, представленные в виде диаграмм Найквиста, показаны на рисунке 24. При измерении импедансных характеристик БТЭ использовали эквивалентную схему, представленную на вставке к рисунку 24. В данном случае измерения проводились при двух прикладываемых потенциалах, в качестве которых были выбраны потенциалы в 0 мВ и 200 мВ. В качестве значимых параметров использовали емкость анода (C_A) и сопротивление переноса заряда анода (R_A). Катод в данных измерениях всегда оставался неизменным, поэтому его параметры, как и значения сопротивления электролита, не менялись при модификации анода наноматериалами. Значения параметров систем, полученные с помощью обработки по выбранной эквивалентной схеме, представлены в таблице 12.

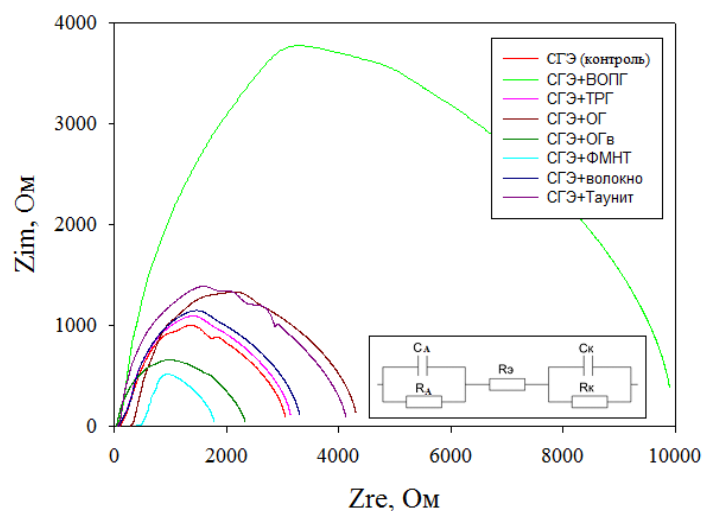


Рис. 25. Диаграммы Найквиста для биоанодов, модифицированных углеродными наноматериалами (измерения проведены по двухэлектродной схеме). На вставке приведена использованная эквивалентная электрическая схема.

Таблица 12. 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	3119,4±332,2; 10,6 %	4310,4±666,7; 15,4 %	3,63±0,37; 10,2 %	3,66±0,55; 14,9 %
СГЭ +ТРГ	3359,4±162,7; 4,8 %	5332,5±1149,5; 21,6 %	1,69±0,26; 15,5 %	1,90±0,12; 6,2 %
ВОПГ фрагмент	8018,1±881,6; 10,9 %	5790,5±687,2; 11,8 %	0,17±0,03; 19,0 %	0,216±0,036; 16,6 %
СГЭ+ ВОПГ	10655,1±1289,2; 12,1 %	11232,2±1556,7; 13,8 %	1,78±0,53; 30,1 %	1,93±0,32; 16,6 %
СГЭ + ФМНТ	2172,4±286,4 13,2 %	2279,8±362,5 15,9 %	6,61±1,01; 15,3 %	4,61±0,30; 6,4 %
СГЭ + МУНТ	3605,4±420,6; 11,6 %	4245,0±334,8; 7,9 %	4,28±0,20; 4,8 %	4,22±0,06; 1,4 %
СГЭ + ОГв	2669,3±328,3; 12,3 %	3272,2±237,8; 7,2 %	4,50±0,41; 9,1 %	4,20±0,20; 7,0 %
СГЭ + ОГ	3922,0±336,3; 8,6 %	3911,4±326,6; 8,4 %	2,69±0,26; 9,6 %	2,56±0,10; 3,9 %
СГЭ + волокна	3442,7±478,9; 13,9 %	3994,5±309,9; 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.

топливных элементах. Однако, большую роль в эффективности работы наноматериала играет выбор агента, иммобилизующего наноматериал и бактериальные клетки на поверхности анода. Поэтому в дальнейшем были изучены особенности взаимодействия каждого из наноматериалов с бактериальными клетками при использовании 3 различных иммобилизующих агентов.

3.2.3. Влияние иммобилизующего агента на свойства биоанода БТЭ

Метод иммобилизации бактериальных клеток в гели является одним из наиболее часто используемых при разработке микробных БТЭ. В данной работе было рассмотрено применение 3 полимеров при модификации биоанодов БТЭ. В качестве иммобилизующих агентов были выбраны хитозан, поливиниловый спирт и поливиниловый спирт (ПВС), модифицированный N-винилпирролидоном (ПВС_м). В первую очередь, были подобраны оптимальные параметры работы для систем, основанных на каждом из изученных полимеров. В качестве макета БТЭ вновь использовался микробный БТЭ на основе клеток *G. oxydans*. Было изучено влияние соотношения количества бактериальных клеток и типа полимера на поверхности анода на электрохимические характеристики БТЭ.

Выбор оптимальных условий для иммобилизации бактериальных клеток в ПВС_м

На рис. 26 показаны зависимости мощности и внутреннего сопротивления БТЭ от соотношения клеток и ПВС_м на поверхности анода. Максимальные значения мощности БТЭ и минимальные значения $R_{вн}$ БТЭ получены при соотношении клеток и ПВС_м, равном 2:1.

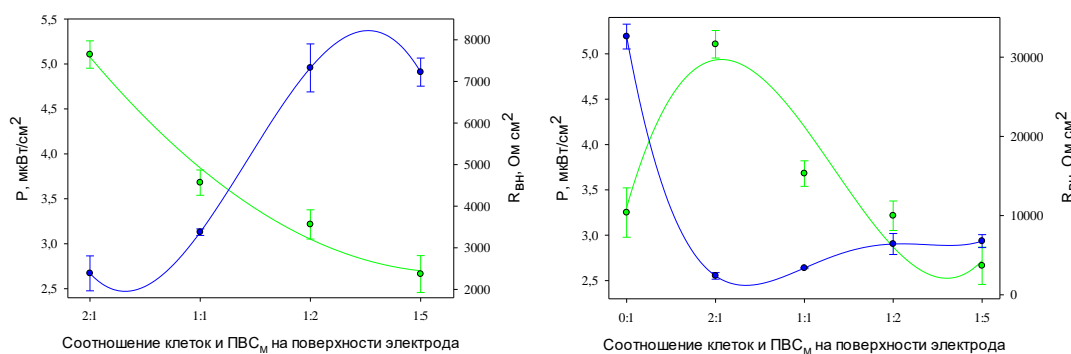


Рис. 26. Зависимость мощности и внутреннего сопротивления БТЭ от соотношения клеток и ПВС_м на поверхности анода (количество клеток на поверхности электрода 0,12 мг/мм²).

Зеленым цветом показана мощность БТЭ, синим – $R_{вн}$.

На рис. 26 добавлены значения мощности и внутреннего сопротивления БТЭ при отсутствии клеток на электроде. Как видно на рисунке электрод, содержащий полимер ПВС_м обладает достаточно высоким сопротивлением (30000 Ом см²), после внесения в полимер клеток внутреннее сопротивление БТЭ заметно снижается (до 2000 Ом см²), увеличение количества полимера при сохранении количества клеток ведет к повышению внутреннего сопротивления и

уменьшению мощности БТЭ. Сопротивление методом импедансной спектроскопии измеряли при двух подаваемых потенциалах $U = -150$ мВ, $U = +200$ мВ. Результаты представлены на рисунке 27. При всех соотношениях полимера и клеток наименьшие значения внутренних сопротивлений при потенциале -150 мВ были примерно в 2 раза ниже сопротивлений, полученных при потенциале 200 мВ.

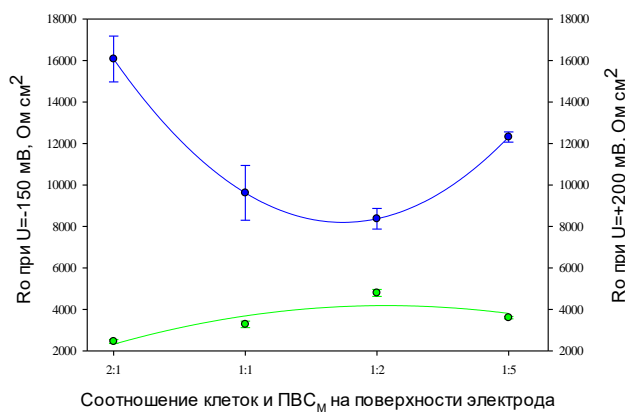


Рис. 27. Влияние соотношения клеток и ПВС_М на сопротивление БТЭ, измеренное методом импедансной спектроскопии при различных подаваемых потенциалах: $U = -150$ мВ – показано зеленым цветом, $U = +200$ мВ – показано синим цветом.

Как видно из рис. 28, измеренное с помощью импедансной спектроскопии минимальное значение сопротивления совпадает со значением внутреннего сопротивления БТЭ, вычисленного из ЦВА электродов, поэтому в дальнейшем изучение импедансных характеристик БТЭ, модифицированных ПВС, проводили при подаваемом потенциале, равном -150 мВ.

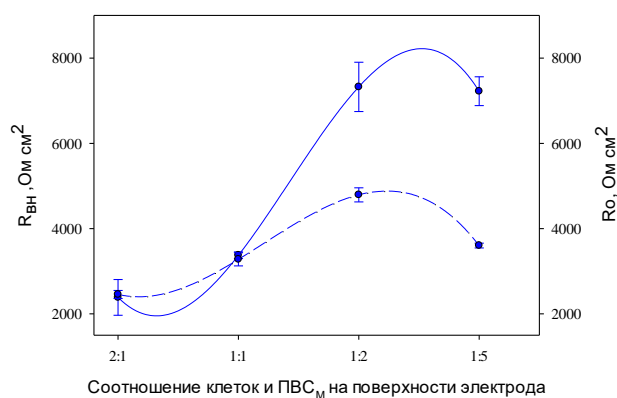


Рис. 28. Влияние соотношения клеток и ПВС_М на сопротивление БТЭ, измеренное методом импедансной спектроскопии при $U = -150$ мВ (показано пунктиром) и вычисленное из мощностных характеристик (показано сплошной линией).

Для оценки влияния поливинилового спирта на дыхательную активность микроорганизмов использовали биосенсор на основе кислородного электрода типа Кларка. Результаты представлены в таблице 13. При различном соотношении клеток и ПВС_М на мембране GF/A тесты по изменению дыхательной активности после введения субстрата (глюкоза) показали, что присутствие ПВС_М в рецепторном элементе снижает дыхательную активность клеток. Минимальное влияние ПВС_М на снижение дыхательной активности клеток оказывает при соотношении клеток и ПВС_М 2:1. При дальнейшем увеличении концентрации ПВС при сохранении количества биоматериала происходит снижение дыхательной активности клеток в присутствии глюкозы в среде.

Таблица 13. Характеристика дыхательной активности биосенсоров, модифицированных клетками и ПВС_М, при различном соотношении клеток и ПВС_М на поверхности рецепторного элемента, по отношению к субстрату (глюкоза, 1,25 мМ)

Соотношение клеток и ПВС _М	Дыхательная активность
Без ПВС	0,49±0,05 ; 9,51 %
2:1	0,46±0,02; 4,97 %
1:1	0,43±0,06; 14,54 %
1:2	0,37±0,05; 14,78 %
1:5	0,37±0,01; 1,39 %

Были получены зависимости мощности и внутреннего сопротивления БТЭ для ПВС_М в оптимальных условиях (при соотношении клеток и ПВС_М на поверхности электрода 2:1) при различном количестве бактериальных клеток на поверхности анода. Как видно на рис. 29, варьирование содержания клеток на поверхности анода в диапазоне 0,012 мг/мм² – 0,12 мг/мм² практически не влияет на электрохимические параметры БТЭ.

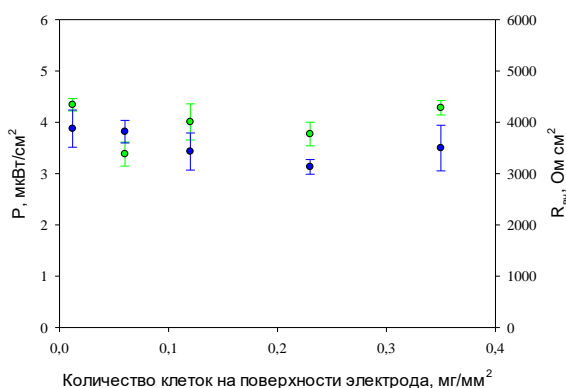


Рис. 29. Зависимость мощности и внутреннего сопротивления БТЭ от концентрации клеток на поверхности биоанода при соотношении клеток и ПВС_М 2:1. Зеленым цветом показана мощность БТЭ, синим – R_{вн}.

Выбор оптимальных условий для иммобилизации бактериальных клеток в хитозан и ПВС

На рис. 30 показано сравнение ЦВА электродов с клетками при использовании ПВС и хитозана при различном соотношении клеток и полимера на поверхности электрода.

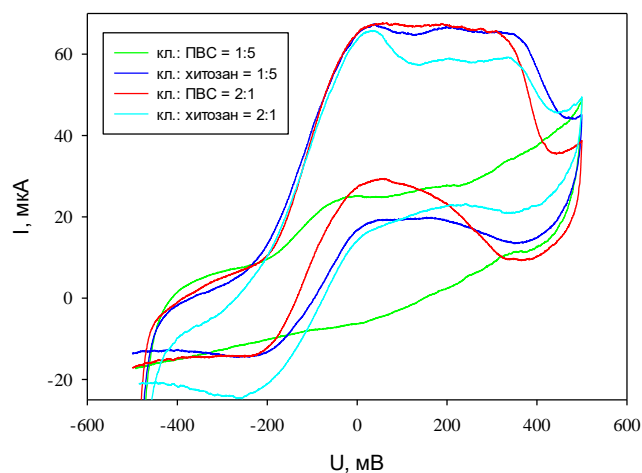


Рис. 30. Сравнение ЦВА анодов при различных соотношениях количества клеток и закрепляющего агента хитозан/ПВС на поверхности электрода

Было изучено влияние соотношения количества бактериальных клеток и полимера хитозана на поверхности анода на электрохимические характеристики БТЭ (рис. 31). Максимальные значения мощности БТЭ и минимальные значения внутреннего сопротивления БТЭ получены при соотношении клеток и хитозана, равном 1:5.

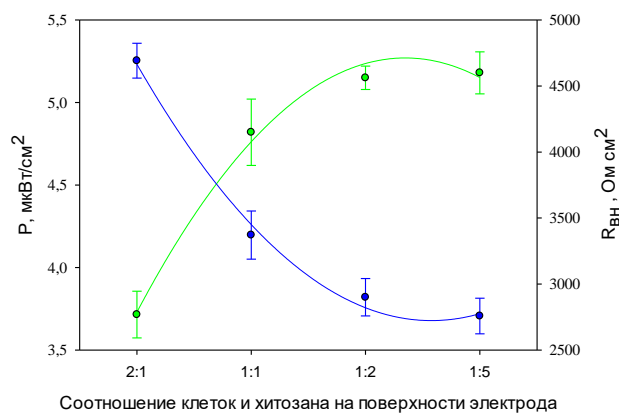


Рис. 31. Зависимость мощности и внутреннего сопротивления БТЭ от соотношения клеток и хитозана на поверхности анода (количество клеток на поверхности электрода 0,12 мг/мм²).

Зеленым цветом показана мощность БТЭ, синим – $R_{вн}$.

На рис. 32 показаны значения внутреннего сопротивления БТЭ, модифицированного хитозаном, измеренные методом вольтамперометрии и импедансной спектроскопии. Измерения методом ЭИС проводили при подаваемом потенциале равном -150 мВ. Как видно из графиков, значения сопротивлений совпадают во всем диапазоне концентраций клеток.

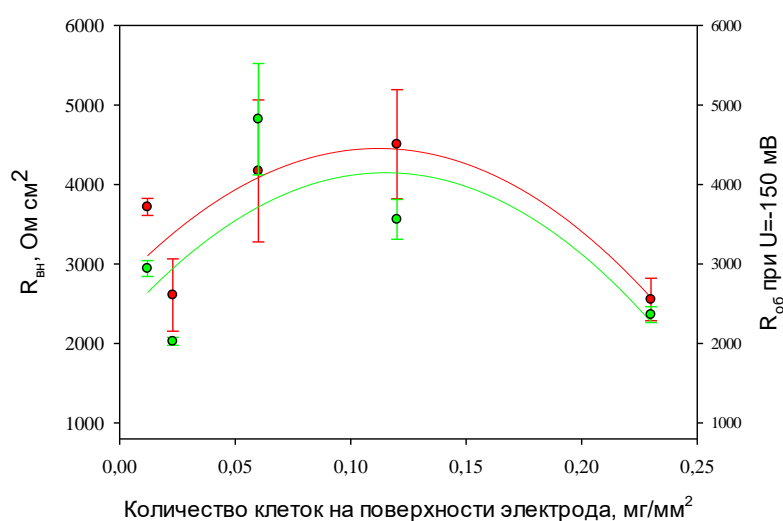


Рис. 32. Зависимость внутреннего сопротивления БТЭ от количества клеток на поверхности анода, при соотношении клеток *Gl. oxydans* 1280 к хитозану 1:1. Зеленым цветом показано сопротивление БТЭ, измеренное методом импедансной спектроскопии при $U=-150$ мВ, красным цветом - сопротивление БТЭ, вычисленное из мощностных характеристик

Для оценки влияния хитозана на дыхательную активность микроорганизмов использовали биосенсор на основе кислородного электрода типа Кларка. Результаты представлены в таблице 14. Так как гель хитозана уже был использован ранее для иммобилизации различных наноматериалов совместно с бактериальными клетками на поверхности анодов, изучали дыхательную активность клеток в сочетании с хитозаном и некоторыми углеродными наноматериалами, такими как углеродное волокно, ТРГ и ФМНТ. При различном соотношении клеток и хитозана на мембране GF/A тесты по изменению дыхательной активности после введения субстрата (глюкоза) показали, что большее влияние на активность клеток оказывает используемый для модификации анода наноматериал, чем соотношение клеток и хитозана на рецепторе.

Таблица 14. Характеристики дыхательной активности биосенсора, модифицированного углеродными наноматериалами в геле хитозана

Углеродный наноматериал	Соотношение клеток и хитозана на поверхности рецептора	Дыхательная активность
Углеродное волокно	2:1	0,73±0,09; 12,88 %
	1:5	0,68±0,05; 7,02 %
ТРГ	2:1	0,28±0,02; 3,87 %
	1:5	0,20±0,02; 10,83 %
ФМНТ	2:1	0,43±0,03; 7,26 %
	1:5	0,31±0,05; 16,17 %

3.2.4. Характеристики системы «полимер – наноматериал» в составе биоанодов БТЭ

Электрохимические характеристики БТЭ зависят не только от того, насколько хорошо бактериальные клетки иммобилизуются гелем на поверхности электрода, но и от качества электрического контакта между наноматериалом, клетками и электродом. Поэтому важным было оценить электрохимические параметры каждого из вариантов сочетания «полимер-наноматериал» в составе биоанодов БТЭ. В таблице 15 представлены сравнительные характеристики контрольных электродов из СГЭ с различными полимерами без модификации наноматериалами. Как видно из таблицы, 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 показывают наименьшее внутреннее сопротивление (1111,06 Ом см²). Это подтверждается данными, полученными методом импедансной спектроскопии: наименьшим сопротивлением обладает электрод, в котором используется полимер хитозан. Что касается величины сигналов модифицированного различными полимерами биоэлектрода, что они примерно одинаковы, исключение составляет электрод, модифицированный хитозаном (соотношение клеток и полимера равно 5:1). Таким образом электроды без модификации углеродным материалом проявляют лучшие электрохимические характеристики при иммобилизации бактериальных клеток в гель хитозана. проявляют

Таблица 15. 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; 25%	1250 ± 201; 16 %	6,56 ± 0,74; 11 %	134 ± 9; 6 %
ПВС _м	1293 ± 103; 8 %	1817 ± 1212; 6 %	0,0040 ± 0,0004; 10%	1455 ± 192; 13 %	6,10 ± 0,32; 5 %	139 ± 7; 5 %
Хитозан (2:1)	1069 ± 58; 5 %	1512 ± 67; 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 %

Углеродное волокно. В таблице 16 представлены сравнительные характеристики электродов с различными полимерами, модифицированные измельченным углеродным волокном. Как видно из таблицы максимальная мощность наблюдается при использовании полимера ПВС (7,14 мкВт/см²), минимальная при использовании хитозана в соотношении 5 к 1 к бактериальным клеткам (5,06 мкВт/см²). Минимальные внутренние сопротивления БТЭ наблюдаются при использовании в качестве полимера для иммобилизации бактериальных клеток ПВС и ПВС_м. Метод импедансной спектроскопии подтверждает, что электроды на основе ПВС обладают меньшими значениями сопротивлений по сравнению с хитозаном. В то же время величина сигналов этих электродов на введение субстрата не сильно различается.

Таблица 16. Характеристики БТЭ на основе СГЭ, модифицированных углеродным волокном, 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	1183 ± 104; 9 %	1522 ± 129; 8 %	0,0064 ± 0,0007; 10 %	1305 ± 83; 6 %	7,14 ± 0,76; 10 %	131 ± 3; 2 %
ПВС _м	1237 ± 56; 4 %	1589 ± 49; 3 %	0,0046 ± 0,0003; 5 %	1341 ± 42; 3 %	6,70 ± 0,43; 6 %	122 ± 10; 8 %
Хитозан (2:1)	1441 ± 116; 8 %	1871 ± 129; 7 %	0,0052 ± 0,0003; 5 %	1681 ± 51; 3 %	5,89 ± 0,10; 1 %	140 ± 5; 3 %
Хитозан (1:5)	1429 ± 55; 4 %	1848 ± 56; 3 %	0,0038 ± 0,0003; 7 %	1536 ± 177; 11 %	5,06 ± 0,19; 3 %	134 ± 1; 1 %

Оксид графена восстановленный. В таблице 17 показаны сравнительные характеристики электродов с различными полимерами, модифицированные восстановленным

оксидом графена. Как видно из таблицы максимальная мощность наблюдается при использовании полимера хитозана (соотношение бактериальных клеток и полимера 1:5) – 9,60 мкВт/см², минимальная при использовании ПВС_м - 6,48 мкВт/см², применение ПВС и хитозана при соотношении клеток и полимера равное 2:1 вызывает одинаковые значения мощностных характеристик. Внутреннее сопротивление БТЭ на основе модифицированных восстановленным оксидом графена электродов минимально при использовании ПВС (1063,71 Ом см²). Результаты, полученные методом импедансной спектроскопии, отличаются. Минимальным сопротивлением обладают электроды, модифицированные хитозаном, где соотношение бактериальных клеток и полимера составляет 1:5 (674,03 Ом см²), а максимальным - электроды, модифицированные хитозаном, где это соотношение равно 2:1 (1079,33 Ом см²).

Таблица 17. Характеристики БТЭ на основе СГЭ, модифицированных восстановленным оксидом графена, 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	864 ± 111; 12 %	1203 ± 100; 8 %	0,0071 ± 0,0013; 19 %	1063 ± 61; 5 %	7,79 ± 0,83; 10 %	147 ± 7; 5 %
ПВС _м	1061 ± 191 18 %	1563 ± 174; 11 %	0,0036 ± 0,0004; 10 %	1486 ± 116 8 %	6,48 ± 0,67; 10 %	155 ± 23; 15 %
Хитозан (2:1)	1079 ± 36; 3 %	1533 ± 66; 4 %	0,0060 ± 0,0010; 16 %	1375 ± 33; 2 %	7,23 ± 0,40; 5 %	131 ± 6; 4 %
Хитозан (1:5)	674 ± 44; 6 %	1011 ± 83; 8 %	0,0097 ± 0,0006; 6 %	1324 ± 47; 3 %	9,60 ± 0,37; 3 %	128 ± 4; 3 %

Оксид графена. В таблице 18 представлены сравнительные характеристики электродов с различными полимерами, модифицированные оксидом графена. Как видно из таблицы максимальной мощностью обладают электроды, на которых бактериальные клетки иммобилизованы в геле хитозана как в соотношении 1:5 (7,51 мкВт/см²), так и в соотношении 2:1 (7,35 мкВт/см²), минимальной – при иммобилизации в ПВС_м (5,05 мкВт/см²). Минимальным сопротивлением обладают БТЭ на основе электродов, в которых бактериальные клетки иммобилизованы в гель хитозана в соотношении 1:2 (1214,52 Ом см²), что подтверждается также методом импедансной спектроскопии (1001,60 Ом см²). Что касается величины сигналов электродов на введение субстратов, то минимальные сигналы наблюдали у электродов,

модифицированных хитозаном (соотношение клеток и полимера 1:5) (68,61 мкА) и ПВС_м (78,890 мкА), максимальные у электродов, модифицированных ПВС (140,33 мкА).

Таблица 18. Характеристики БТЭ на основе СГЭ, модифицированных оксидом графена, 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	1095 ± 155; 14 %	1516 ± 214; 14 %	0,0041 ± 0,0005; 13 %	1394 ± 223; 16 %	6,92 ± 0,59; 8 %	140 ± 12; 9 %
ПВС _м	1530 ± 41; 3 %	2079 ± 105; 5 %	0,0031 ± 0,0005; 17 %	2199 ± 196; 9 %	5,05 ± 0,29; 5 %	79 ± 15; 19 %
Хитозан (1:2)	1001 ± 40; 4 %	1385 ± 47; 3 %	0,0073 ± 0,0005; 6 %	1214 ± 100; 8 %	7,35 ± 0,31; 4 %	131 ± 9; 7 %
Хитозан (1:5)	1048 ± 48; 4 %	1539 ± 85; 5 %	0,0075 ± 0,0004; 5 %	1494 ± 37; 2 %	7,51 ± 0,30; 4 %	68 ± 6; 9 %

МУНТ Таунит-М. В таблице 19 представлены сравнительные характеристики электродов с различными полимерами, модифицированные углеродными нанотрубками. Как видно из таблицы максимальной мощностью обладают электроды, модифицированные ПВС (9,77 мкВт/см²), минимальной мощностью – модифицированные ПВС_м (7,56 мкВт/см²). Но даже минимальные значения выше, чем у контрольных электродов без добавления каких-либо наноматериалов (6,56 и 6,10 мкВт/см² для электродов, модифицированных ПВС и ПВС_м, соответственно). Внутреннее сопротивление БТЭ на основе этих электродов минимальное при иммобилизации клеток с помощью ПВС (1110,84 Ом см²) и максимальное при иммобилизации с помощью ПВС_м (1328,44 Ом см²). Внутреннее сопротивление электродов, измеренное методом импедансной спектроскопии, минимально у электродов, модифицированных хитозаном при соотношении клеток и полимера равном 1:5, и максимально у электродов, модифицированных хитозаном при соотношении клеток и полимера равном 2:1. Значения сопротивлений, полученные как методом импедансной спектроскопии, так и вольтамперометрии, выше для электродов, модифицированных ПВС_м, чем ПВС. А вот в случае модификации хитозаном результаты прямо противоположные. Величина сигналов электродов на введение субстрата минимальная в случае использования полимера ПВС_м, а максимальная при использовании хитозана (при соотношении клеток и полимера равном 1:5).

Таблица 19. Характеристики БТЭ на основе СГЭ, модифицированных углеродными нанотрубками Таунит-М, 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	ΔI , мкА
ПВС	735 ± 21; 3 %	1099 ± 27; 2 %	0,0088 ± 0,0006; 7 %	1110 ± 39; 3 %	9,77 ± 0,32; 3 %	163 ± 5; 3 %
ПВС _М	912 ± 52; 5 %	1356 ± 85; 6 %	0,0025 ± 0,0002; 8 %	1328 ± 98; 7 %	7,56 ± 0,32; 4 %	117 ± 8; 7 %
Хитозан (2:1)	1048 ± 48; 4 %	1539 ± 85; 5 %	0,0075 ± 0,0004; 5 %	1193 ± 57; 4 %	8,65 ± 0,19; 2 %	141 ± 5; 4 %
Хитозан (1:5)	705 ± 55; 8 %	1102 ± 73; 6 %	0,0066 ± 0,0012; 18 %	1277 ± 89; 7 %	8,52 ± 0,56; 6 %	174 ± 3; 2 %

ФМНТ. В таблице 20 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 к 2, а минимальной электроды с ПВС_М. Минимальное внутреннее сопротивление БТЭ характерно для модификации анода хитозаном (соотношение клеток и полимера 1:5), максимальное – ПВС_М. Если сравнивать спирты, то внутреннее сопротивление БТЭ ниже при модификации анода ПВС, чем ПВС_М, это подтверждается данными, полученными методом импедансной спектроскопии. При рассмотрении хитозана внутреннее сопротивление БТЭ ниже при соотношении клеток и полимера 1:5, чем 2:1, данные по импедансной спектроскопии противоположные. Сигналы электродов на введение субстрата выше в случае использования полимера хитозана.

Таблица 20. 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_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	ΔI , мкА
ПВС	908 ± 52; 5 %	1328 ± 50; 3 %	0,0056 ± 0,0006; 10 %	1218 ± 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; 6 %

Хитозан (2:1)	722 ± 30; 4 %	1092 ± 39; 3 %	0,0088 ± 0,0003; 3 %	1077 ± 85; 8 %	9,93 ± 0,78; 7 %	194 ± 14; 7 %
Хитозан (1:5)	828 ± 74; 9 %	1177 ± 79; 6 %	0,0110 ± 0,0008; 7 %	977 ± 57; 6 %	8,59 ± 0,51; 6 %	170 ± 8; 4 %

Порошок ТРГ. В таблице 21 представлены сравнительные характеристики электродов с различными полимерами, модифицированные порошком ТРГ. Максимальная мощность наблюдается у БТЭ аноды которых модифицированы хитозаном при соотношении клеток и полимера 1:5 (6,82 мкВт/см²). Мощности электродов, модифицированные ПВС и хитозаном в соотношении клеток и полимера 2:1, одинаковы (6,28 и 6,24 мкВт/см²), при модификации анода ПВС_м мощность снижается до 6,12 мкВт/см². Внутреннее сопротивление БТЭ минимальное, если анод модифицирован хитозаном при соотношении клеток и полимера 1:5 (1146,47 Ом см²). Эти данные подтверждаются и данными, полученными с помощью метода импедансной спектроскопии (R_A при $U=-150$ мВ составляет 1159,33 Ом см²). Величины сигналов электродов на введение субстрата совпадают у электродов, модифицированных ПВС и хитозаном (соотношение клеток и хитозана 1:5) – 127,22 и 125,35 мкА, соответственно, и у электродов, модифицированных ПВС_м и хитозаном (соотношение клеток и хитозана 2:1) – 138,59 и 137,55 мкА, соответственно.

Таблица 21. Характеристики БТЭ на основе СГЭ, модифицированных порошком ТРГ, 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	1258 ± 89; 7 %	1738 ± 139; 8 %	0,0045 ± 0,0006; 14 %	1423 ± 166; 11 %	6,28 ± 0,48; 7 %	127 ± 12; 10 %
ПВС _м	1268 ± 78; 6 %	1666 ± 85; 5 %	0,0054 ± 0,0007; 12 %	1504 ± 62; 4 %	6,12 ± 0,45; 7 %	138 ± 7; 5 %
Хитозан (2:1)	1280 ± 106; 8 %	1663 ± 124; 7 %	0,0057 ± 0,0005; 8 %	1789 ± 91; 5 %	6,24 ± 0,22; 3 %	137 ± 5; 4 %
Хитозан (1:5)	1159 ± 21; 2 %	1455 ± 22; 1 %	0,0067 ± 0,0006; 8 %	1146 ± 34; 3 %	6,82 ± 0,30; 4 %	125 ± 6; 5 %

Таким образом, проведена сравнительная оценка мощностных, вольтамперных и импедансных характеристик биотопливных элементов при иммобилизации клеток бактерий *G.*

oxydans в следующие полимерные материалы: поливиниловый спирт, поливиниловый спирт, модифицированный N-винилпирролидоном, хитозан. Иммобилизация биоматериала в гель хитозана позволяла снизить внутреннее сопротивление БТЭ на основе немодифицированных СГЭ до 1111 Ом см² и увеличить мощность до 8,33 мкВт/см², в то время как эти показатели для БТЭ с иммобилизацией в ПВС составляли 1250,88 Ом см² и 6,56 мкВт/см², соответственно, а для БТЭ, с иммобилизацией в ПВС, модифицированный N-винилпирролидоном, 1455 Ом см² и 6,10 мкВт/см², соответственно. Дополнительная модификация анода БТЭ углеродными нанотрубками при иммобилизации в гель хитозана позволила увеличить мощность до 9,93 мкВт/см², а в случае иммобилизации в гель ПВС – до 7,92 мкВт/см². Для БТЭ с иммобилизацией в ПВС, модифицированный N-винилпирролидоном, мощность при модификации углеродными нанотрубками составила 7,23 мкВт/см². 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/см²) был достигнут при иммобилизации в гель ПВС, а мощность БТЭ с иммобилизацией биоматериала в гель хитозана составила 8,65 мкВт/см².

Изучено влияние соотношения количества бактериальных клеток и полимера на поверхности электрода (анода) на электрохимические характеристики БТЭ. 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, модифицированного N-винилпирролидоном, на поверхности электрода, равном 2:1.

3.2.5. Мембранные фракции бактерий в качестве биокатализатора БТЭ

. По своей природе мембранные фракции (МФ) являются частями клеточной мембраны и содержат в себе различные клеточные мембранные структуры, в том числе мембранные PQQ-зависимые дегидрогеназы (Okuda and Sode, 2004). Их метаболическая активность аналогична активности целых клеток. Мембранные фракции (МФ) бактериальных клеток получают при разрушении целых клеток бактерий ультразвуком. Теоретически, мембранные фракции должны занимать промежуточное место в иерархии биокатализаторов для БТЭ между ферментами и клетками. Выделение мембранных фракций из клеток дешевле, выделение и очистка отдельных ферментов, при этом их активность должна быть выше активности целых клеток бактерий.

На рис. 33 показана зависимость амплитуды сигналов электродов БТЭ от количества мембранных фракций *G. oxydans* на их поверхности. Как видно из графика, увеличение количества МФ на поверхности выше концентрации в 100 мкг/мм² не приводит к дальнейшему

увеличению сигнала, так как материал электрода не может удержать большее количество биоматериала на своей поверхности.

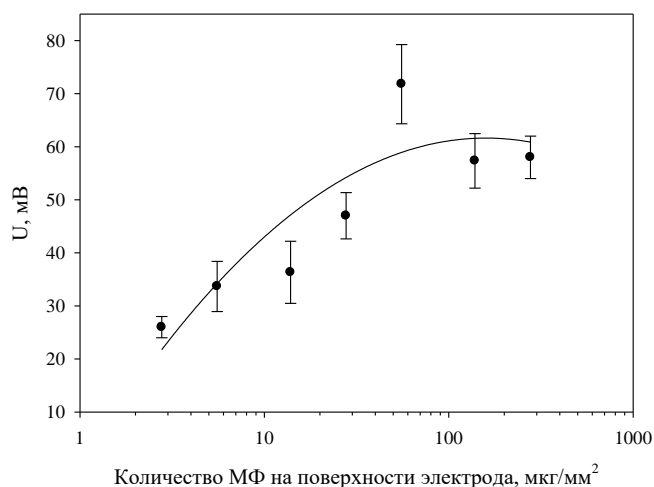


Рис. 33. Влияние количества мембранных фракций на сигнал электродов БТЭ

Применение МФ в качестве биокатализатора БТЭ позволяет увеличить сигнал электрода при введении субстрата в систему как в случае хронопотенциометрии, так и хроноамперометрии (рис. 34). В случае амперометрии разница более зная – сигналы электрода увеличиваются в четыре раза при использовании МФ и клеток при одинаковой концентрации биокатализатора на поверхности электрода. Такой рост связан с большей концентрацией ферментов в суспензии МФ, чем в суспензии клеток того же веса. Таким образом, использование мембранных фракций в качестве биокатализатора БТЭ позволяет увеличить сигналы анода на введение субстрата и в дальнейшем повысить мощность БТЭ, но при этом необходимы дополнительные ресурсы для их получения.

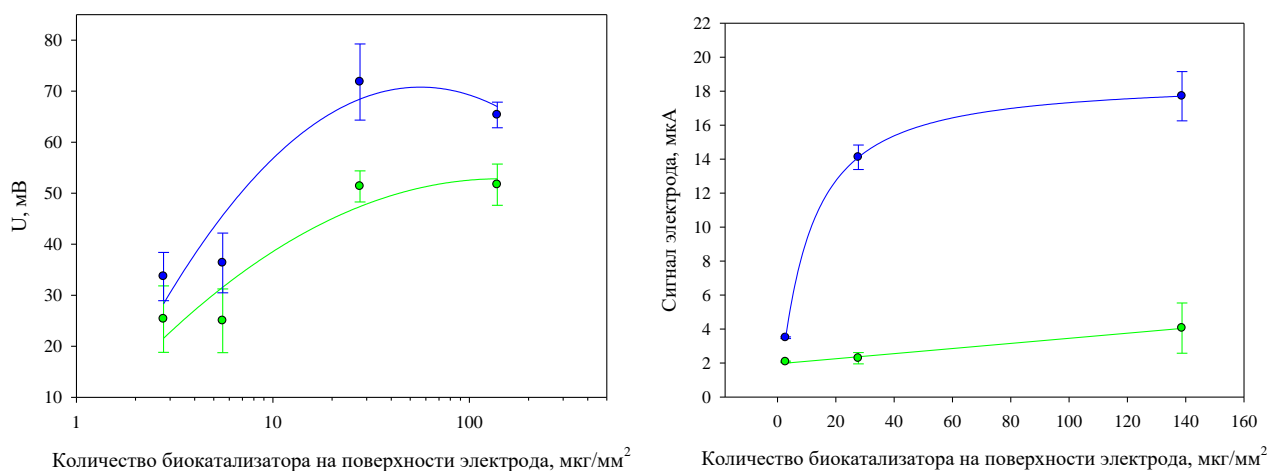


Рис. 34. Сравнение активности клеток и мембранных фракций по амплитуде сигнала на введение 10 мМ этанола в присутствии медиаторов при разном количестве биокатализатора на поверхности электрода. Слева представлены хронопотенциометрические сигналы, справа – хроноамперометрические. Синим цветом показаны данные для МФ, зеленым – для клеток.

В дальнейшем была проведена сравнительная характеристика БТЭ на основе трех различных биокатализаторов (фермент глюкозооксидаза, мембранные фракции клеток и целые клетки микроорганизмов) в присутствии медиаторов электронного транспорта. На рисунке 35 представлены зависимости амперометрических сигналов на введение субстрата (10 мМ глюкоза) для трех видов различных биокатализаторов. Как видно из графиков, уровень сигнала на введение субстрата для электродов на основе ферментов и мембранных фракций в 2 раза выше, чем для электрода на основе целых клеток микроорганизмов, что объясняется простотой доступа субстрата к ферменту в этих композициях, в то время как в целых клетках ферментные комплексы скрыты от внешней среды оболочкой, на преодоление которой субстрату требуется время.

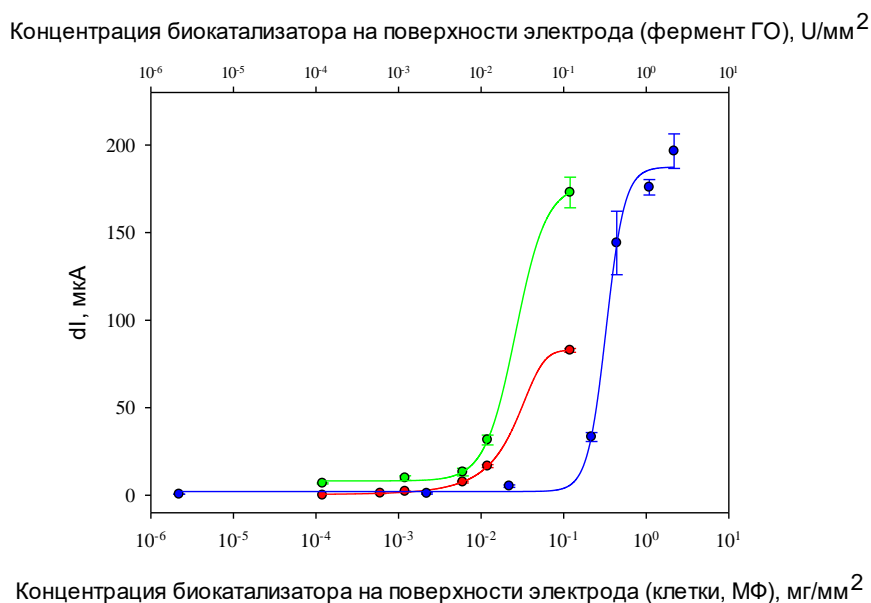


Рис. 35. Зависимость сигналов электрода от концентрации биокатализатора на поверхности электрода: красным цветом показан электрод, в котором в качестве биокатализатора использованы клетки, зеленым – мембранные фракции, синим – фермент глюкозооксидаза.

На рисунке 36 показаны вычисленные из вольтамперных характеристик мощностные характеристики электродов, модифицированных различными видами биокатализаторов (целыми бактериальными клетками *G. oxydans*, их мембранными фракциями и чистым ферментом – глюкозооксидазой) во всем диапазоне подаваемых потенциалов. Показаны изменения этих характеристик при изменении концентрации биокатализатора.

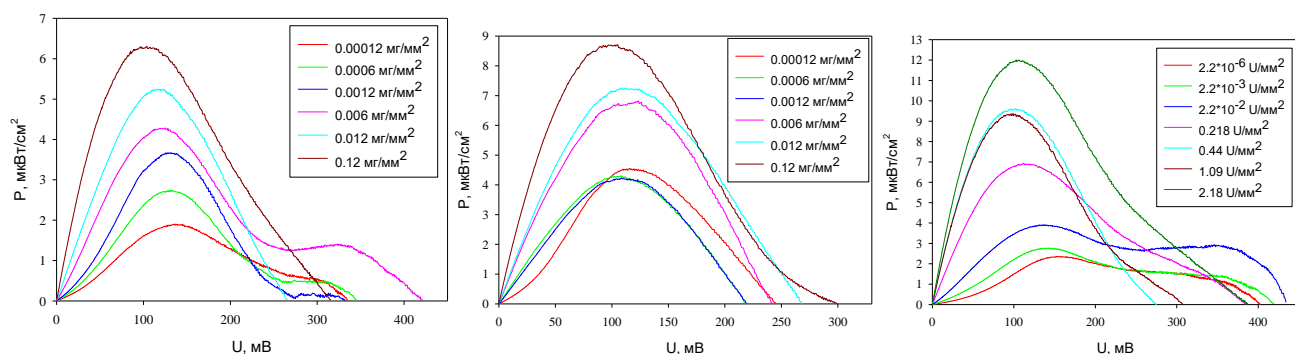


Рис. 36. Зависимость мощностных характеристик БТЭ после введения субстрата (глюкоза, 10 мМ) от концентрации иммобилизованных клеток *G. oxydans* (слева), мембранных фракций *G. oxydans* (в центре) и глюкозооксидазы (справа) на поверхности анода.

Из мощностных характеристик можно сделать вывод, что мощность всех трех типов БТЭ прямо пропорциональна концентрации используемого биокатализатора (при одинаковом количестве субстрата, 10 мМ глюкозы), и достигает максимальной мощности при максимальном увеличении концентрации биокатализатора. При этом наибольшей удельной мощностью обладают БТЭ на основе фермента – 12 мкВт/см^2 , чуть меньшей – на основе мембранных фракций и целых клеток *G. oxydans*, $8,6 \text{ мкВт/см}^2$ и $6,4 \text{ мкВт/см}^2$ соответственно.

Воспроизводимость измерений биоанодов на основе МФ и целых клеток. В таблице 22 показаны электрохимические параметры трех биоанодов на основе СГЭ, полученных в одинаковых условиях. Все характеристики электродов получены при использовании двухэлектродной схемы измерения.

Таблица 22. Значения электрохимических параметров для трех биоанодов на основе спектрального графитового электрода и мембранных фракций

Электрод	$R_{вн}$, Ом см^2	$P_{уд}$, мкВт/ см^2	R_A при $U=0$ мВ, Ом см^2	ΔU , мВ
1	2543,8	6,7	2560,2	32,1
2	3189,1	6,2	3172,6	27,4
3	2469,2	7,1	2995,3	36,4
Среднее по 3 электродам	$2734,0 \pm 395,9$; 14,5 %	$6,7 \pm 0,6$; 9,7 %	$2909,4 \pm 315,1$; 10,8 %	$32,0 \pm 4,5$; 14,1 %

Примечание: приведены средние значения параметров по 3 измерениям, стандартное отклонение от среднего значения и ошибка измерения в процентах.

В таблице 23 показаны электрохимические параметры трех биоанодов на основе СГЭ, полученных в одинаковых условиях. Все характеристики электродов получены при использовании двухэлектродной схемы измерения.

Таблица 23. Значения электрохимических параметров для трех биоанодов на основе спектрального графитового электрода и целых клеток *G. oxydans*

Электрод	$R_{вн}$, Ом $см^2$	$P_{уд}$, мкВт/ $см^2$	R_A при $U=0$ мВ, Ом $см^2$	ΔU , мВ
1	2890,7	5,7	3445,7	13,1
2	3931,2	5,1	2845,8	7,1
3	2623,1	6,9	3162,1	7,4
Среднее по 3 электродам	$3101,0 \pm 689,7$; 22,2 %	$5,9 \pm 0,7$; 12,6 %	$3119,1 \pm 332,0$; 10,6 %	$10,5 \pm 4,7$; 45,0 %

Примечание: приведены средние значения параметров по 3 измерениям, стандартное отклонение от среднего значения и ошибка измерения в процентах.

В таблице 24 показаны электрохимические параметры анода на основе СГЭ и мембранных фракций, полученные в течение трех месяцев при хранении электрода при 4 °С. Все характеристики электрода получены при использовании двухэлектродной схемы измерения. На рис. 37 показано изменение таких параметров как амплитуда сигнала на введение субстрата, удельная мощность БТЭ, сопротивление анода при коротком замыкании при хранении анода при 4 °С.

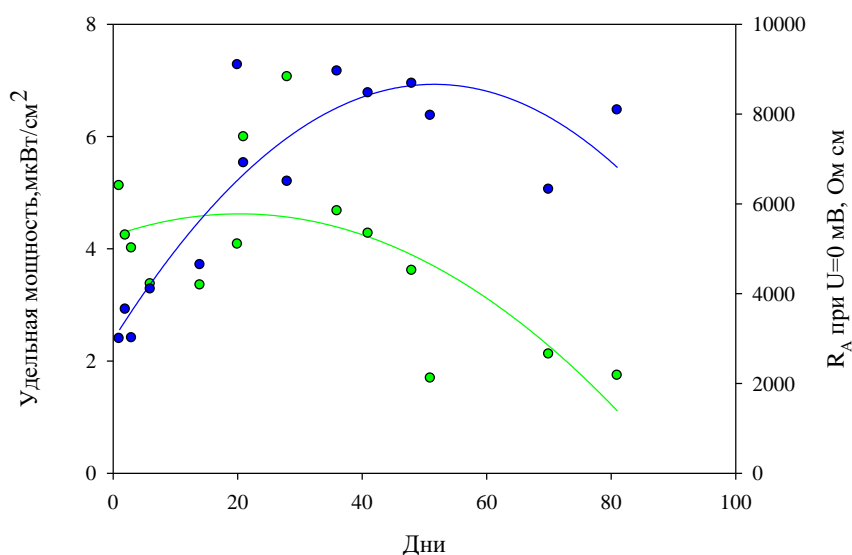


Рис. 37. Воспроизводимость сигналов анода из СГ при хранении при 4°С по 2-х электродной схеме при добавлении медиаторов. Синим цветом показаны данные по R_A при $U=0$ мВ; зеленым цветом - по мощности.

Как видно из графиков, значительное ухудшение всех характеристик биоанода происходит после 45 дней хранения анода. Падение мощности БТЭ на основе мембранных фракций на 81-й день составило 66% по сравнению с начальным уровнем мощности; внутреннее сопротивление анода увеличилось в 2,7 раза, а общее внутреннее сопротивление БТЭ – в 2,5 раза. Тем не менее, мембранные фракции сохраняют свою окислительную активность по отношению к этиловому спирту по крайней мере в течение 3 месяцев и могут быть использованы в качестве биокатализатора БТЭ.

Таблица 24. Значения электрохимических параметров биоанода на основе спектрального графитового электрода и мембранных фракций при хранении

День	$R_{вн}$, Ом см ²	$P_{уд}$, мкВт/см ²	R_A при $U=0$ мВ, Ом см ²	ΔU , мВ
1	2469	5,12	2995	36,44
2	3317	4,24	3648	23,28
3	3676	4,01	3011	35,59
6	4893	3,37	4097	21,14
14	4509	3,35	4639	39,69
20	8258	4,08	9092	33,82
21	5444	5,99	6909	30,31
28	4576	7,06	6495	54,32
36	4994	4,67	8951	27,87
41	6680	4,27	8466	15,85
48	8465	3,61	8678	17,65
51	4977	1,69	7965	30,0
70	6838	2,12	6318	29,24
81	6185	1,74	8084	15,03

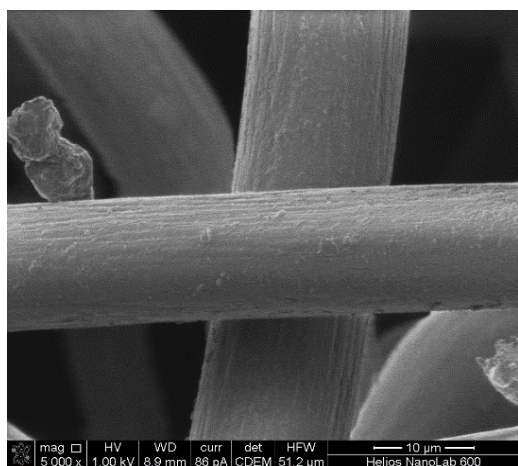
Примечание: приведены средние значения параметров по 3 измерениям.

Таким образом, показана возможность использования мембранных фракций бактериальных клеток в качестве биокатализатора БТЭ. Биоаноды с использованием мембранных фракций демонстрируют хорошую стабильность при хранении (активность до 3 месяцев) и обеспечивают повышенную мощность работы БТЭ. БТЭ на основе мембранных фракций не превосходят по мощности ферментные аналоги, однако являются более дешевыми и надежными в эксплуатации.

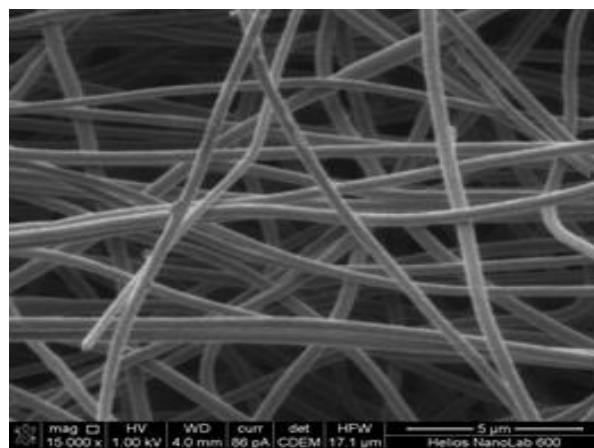
3.2.6. Углеродные высокодисперсные материалы в качестве анода БТЭ

Важнейшим параметром БТЭ является не только тип используемого биокатализатора, но и тип материала электродов БТЭ. Перспективными в плане возможного использования в БТЭ являются электроды из углеродных высокодисперсных материалов (УВМ). УВМ относятся к материалам, позволяющим производить регулировку электрической проводимости в процессе их синтеза. Такая возможность может оказаться полезной при создании биоэлектродов. От УВМ, как и от ряда других графитовых материалов, можно ожидать биологическую нейтральность в отношении биоматериала. Ко всему прочему УВМ обладают более высокой степенью механической гибкости по сравнению с таким материалом, как графит, что немаловажно для конструкции БТЭ. Иммунизация микробных клеток на УВМ ранее не изучалась, поэтому в данной работе были исследованы особенности использования УВМ в качестве биоэлектродов микробного БТЭ на основе клеток *G. oxydans*.

В первую очередь, были изучены 3 типа УВМ, различающиеся степенью карбонизации вследствие изменения условий синтеза. 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, отличающимися диаметром волокон, температурой синтеза и количественным элементным составом. Вид исходного углеродного материала и полученных в процессе обработки УВМ представлен на рисунке 38.



(a)



(б)

Рис. 38. СЭМ-фотографии исходного коммерческого материала (а) и УВМ № 3; карбонизированного при температуре 1000 °С (б). Средний диаметр волокна для исходного материала составлял 15 мкм, для УВМ №2 – 490 нм, УВМ №3 – 430 нм.

Определение механических характеристик образцов нетканых волокнистых материалов проводили с использованием разрывной машины Инстрон-5965 (Instron®, США) при температуре 23 °С, относительной влажности 60%, скорости растяжения 15 мм/мин, рабочей длине и ширине образца соответственно 20 и 5 мм. Исследование механических свойств карбонизированных образцов и результаты количественного элементного анализа органических соединений представлены в таблицах 25 и 26. На основании полученных данных можно ожидать, что среди всех образцов наименьшим электрическим сопротивлением обладает образец № 3 в связи с наименьшим содержанием кислорода и с отсутствием азота в составе образца.

Таблица 25. Механические свойства образцов УВМ

№ Образца	Прочность, $a \pm s$, МПа	Относительное удлинение, $a \pm s$, %
1	1,7±0,4	50±4
2	11,0±0,1	2±0,4
3	10,3±0,7	7±2

Примечание: a – средний результат ($n = 3$), s – стандартное отклонение

Таблица 26. Данные количественного элементного анализа органических соединений образцов УВМ

№ образца	Атомное соотношение химических элементов, %		
	С	N	О
1	76,53	15,02	8,45
2	77,26	17,19	5,55
3	97,36	-	2,64

На рис. 39 представлены виды хроноамперометрических сигналов электродов из трех материалов с нанесенным биоматериалом. Измерения проводили по трехэлектродной схеме. Стрелками указано введение медиатора (2,6 – ДХФИФ, 42 мМ) и субстрата (этиловый спирт, 5 мМ).

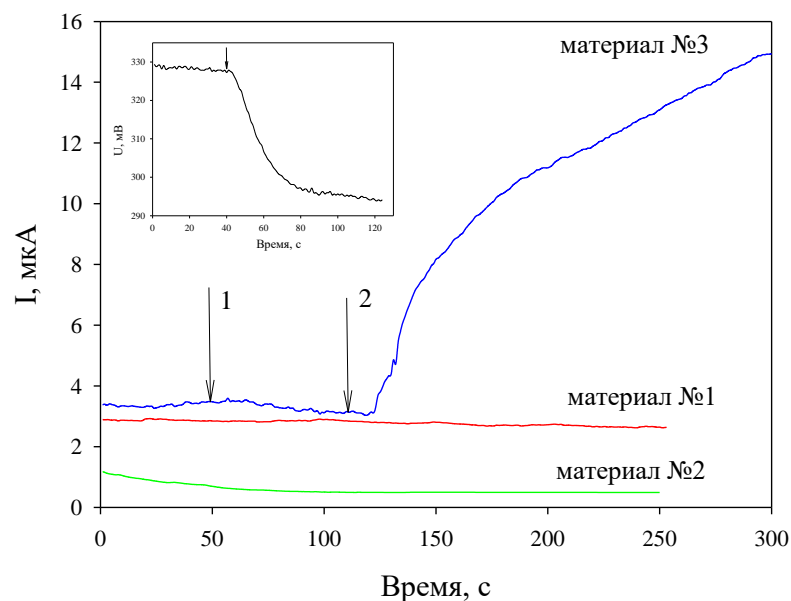


Рис. 39. Виды сигналов электродов, как реакция на введение субстрата. Стрелкой 1 показано введение медиатора, стрелкой 2 – субстрата. На вставке показан хронопотенциометрический сигнал для электрода из материала № 3 на введение субстрата.

Как видно из рисунка 39, только для электрода, изготовленного из материала №3, иммобилизованными в геле хитозана бактериальными клетками, наблюдали генерацию тока и потенциала при введении этилового спирта в присутствии медиатора. На электродах из материалов №1 и №2 такие сигналы отсутствовали. Возможной причиной отсутствия сигналов для материалов №1, 2 является их высокое сопротивление и низкое значение тока, которое невозможно было зарегистрировать гальванопотенциостатом. При введении в измерительную кювету этилового спирта в отсутствие медиатора электрод из материала №3 не давал сигналов, что говорит об отсутствии прямого переноса электронов от бактерий к электроду.

Для измерения импедансных спектров электродов из УВМ использовали двухэлектродную схему измерения, в которой рабочим электродом был электрод из исследуемого материала, а в качестве противоэлектрода применялся электрод из спектрального графита. Для обработки импедансных частотных характеристик использовали эквивалентную схему, представленную на вставке рисунка 40. Так как в различных опытах химический состав растворов в ячейках не изменялся, сопротивление электролита было одинаковым и не изменялось при изменении материала электродов. Во всех измерениях этой серии использовался один и тот же катод, поэтому значения емкости и сопротивления для этого электрода при измерениях не изменялись. Для изучения электрохимических свойств материалов были выбраны такие параметры как величина сопротивления переноса заряда через анод (R_A) и его электрическая

емкость (C_A). Все измерения производились в диапазоне частот от 40 кГц до 0,01 Гц с амплитудой в 10 мВ при нулевом постоянном потенциале. Из импедансных характеристик, приведенных на рис. 40 видно, что материалы №1, 2 во всем диапазоне использованных частот имеют сопротивление, превышающее сопротивление материала №3. Эти данные подтверждают полученный нами ранее результат о величине сопротивлений материалов.

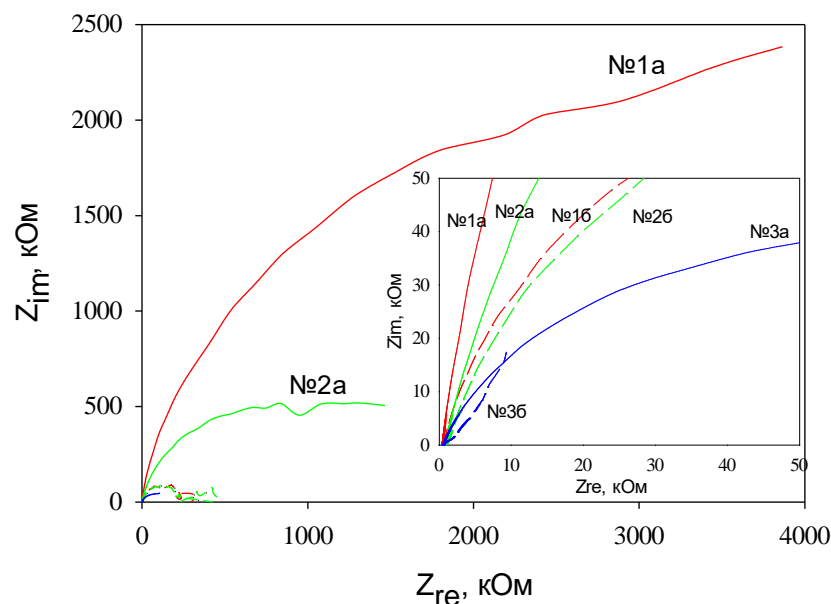


Рис. 40. Импедансные характеристики электродов из материалов №1-3 с нанесенным биоматериалом (кривые №1б-3б) и без него (кривые №1а-3а). На вставке показаны начальные участки импедансных характеристик электродов из 3-х материалов с нанесенным биоматериалом и без него.

В таблице 27 представлены полученные данные импедансные характеристики электродов из УВМ до и после нанесения на их поверхность смеси «клетки *G. oxydans* – хитозан».

Таблица 27. Импедансные характеристики электродов

Электрод	R_A , кОм/см ²	C_A , мкФ/см ²
УВМ № 1	1329,0	0,072
Электрод из УВМ № 1 с иммобилизованными клетками при добавлении медиатора и субстрата	44,7	0,51
УВМ № 2	630,0	0,084
Электрод из УВМ № 2 с иммобилизованными клетками при добавлении медиатора и субстрата	57,9	0,58
УВМ № 3	39,6	2,3

Электрод из УВМ № 3 с иммобилизованными клетками	7,3	137,4
Электрод из УВМ № 3 с иммобилизованными клетками при добавлении медиатора и субстрата	2,9	195,9

Примечание: Приведены средние значения параметров для пяти измерений

Как видно из полученных данных, УВМ № 1 и 2 отличались высокими значениями сопротивлений переноса заряда. При нанесении на их поверхность клеток, сопротивления этих материалов снижались на порядок, но всё еще оставались слишком высокими для использования их в качестве рабочих электродов биосенсоров или анодов биотопливных элементов.

Электрод из УВМ № 3 до нанесения клеток имел сопротивление в ~15 раз ниже, чем электрод из УВМ № 2 и в ~35 раз ниже, чем электрод из УВМ № 1. При иммобилизации клеток на поверхность данного электрода сопротивление снижалось ориентировочно в 5 раз и его значение оставалось на порядок ниже, чем значения сопротивлений электродов из УВМ № 1 и № 2 с нанесенными клетками. При добавлении в измерительную ячейку медиатора электронного транспорта и субстрата для клеток *G. oxydans* удельное сопротивление анода уменьшалось с 39,6 кОм/см² до 2,9 кОм/см². УВМ № 3 был использован для создания БТЭ на его основе. В анодное отделение в качестве медиатора был добавлен ДХФИФ, в катодное – ГЦФ. Максимальная мощность элемента составила 9,48 мкВт/см², общее внутреннее сопротивление БТЭ составило 1,75 кОм/см². Полученное значение мощности превышает значение, полученное для БТЭ на основе графитовых стержней и сопоставимо с параметрами биотопливных элементов на основе СГЭ, модифицированных такими наноматериалами, как ФМНТ или оксид графена.

В дальнейшем, было синтезировано 3 модификации материала №3, отличающиеся по скорости и температуре карбонизации, получившие условные обозначения УВМ 3.1, УВМ 3.2 и УВМ 3.3. Электрохимические параметры материалов с иммобилизованными бактериальными клетками *G. oxydans* представлены в таблице 28.

Таблица 28. Электрохимические характеристики биоэлектродов из УВМ с иммобилизованными клетками *G. oxydans*, полученные по двух- и трехэлектродным схемам.

Схема измерения	Трехэлектродная, U=200 мВ		Двухэлектродная, U=-150 мВ
Материал электрода	R _A до добавления субстрата, Ом см ²	R _A после добавления субстрата, Ом см ²	R _A после добавления субстрата, Ом см ²

УВМ 3	6809	1158	1503
УВМ 3.1	18880	1385	1556
УВМ 3.2	11050	1814	2188
УВМ 3.3	7387	674	601

Примечание: приведены средние значения параметров по 3 измерениям.

Как видно из таблицы, во всех четырех случаях введение субстрата в ячейку вызывало резкое падение сопротивление в 6-10 раз. Наименьшее сопротивление, как по двухэлектродной, так и по трехэлектродной схеме, продемонстрировал биоэлектрод на основе УВМ3.3, в то время как наибольшее сопротивление было у электрода УВМ 3.2.

Важным представлялось проверить сохранение полученных закономерностей при изменении типа биоматериала, поэтому вместо клеток в следующем опыте использовались мембранные фракции *G. oxydans*. Значения сопротивлений для биоэлектродов представлены в таблице 29.

Таблица 29. Электрохимические характеристики биоэлектродов из УВМ с иммобилизованными мембранными фракциями *G. oxydans*, полученные по двух- и трехэлектродным схемам.

Схема измерения	Трехэлектродная, U=200 мВ		Двухэлектродная, U=-150 мВ
Материал электрода	R _A до добавления субстрата, Ом см ²	R _A после добавления субстрата, Ом см ²	R _A после добавления субстрата, Ом см ²
УВМ 3	13170	1621	2629
УВМ 3.1	4350	495	928
УВМ 3.2	8298	631	2467
УВМ 3.3	5476	655	2791

Примечание: приведены средние значения параметров по 3 измерениям.

В первую очередь, следует отметить общее уменьшение значений сопротивления анода при переходе от целых клеток к мембранным фракциям еще до добавления субстрата, что можно связать с меньшим размером биообъекта и с нарушением его клеточных мембран, обладающих высоким сопротивлением. Тенденция уменьшения сопротивления сохранилась для всех электродов (кроме УВМ 3) и при добавлении субстрата, однако при переходе к двухэлектродной схеме 3 из 4 электродов показали сильно увеличенные значения сопротивления анода, что можно связать с малой устойчивостью УВМ под воздействием жидкости. В результате лишь УВМ 3.1

смог показать стабильно низкое сопротивление как по трехэлектродной схеме, так и в составе целого БТЭ.

В результате, как наиболее удачные модификации можно выделить УВМ 3.1 и УВМ 3.3, в то время как УВМ 3.2 и УВМ 3 не показали стабильно низких сопротивлений, что делает их менее пригодными к использованию в условиях БТЭ как на основе целых клеток бактерий, так и на основе их мембранных фракций.

Вычисленные на основе ЦВА мощностные характеристики электродов показаны на рис. 41. Максимальная мощность наблюдается для материала 3.1 (8 мкВт/см^2), минимальная для материала 3 ($2,4 \text{ мкВт/см}^2$).

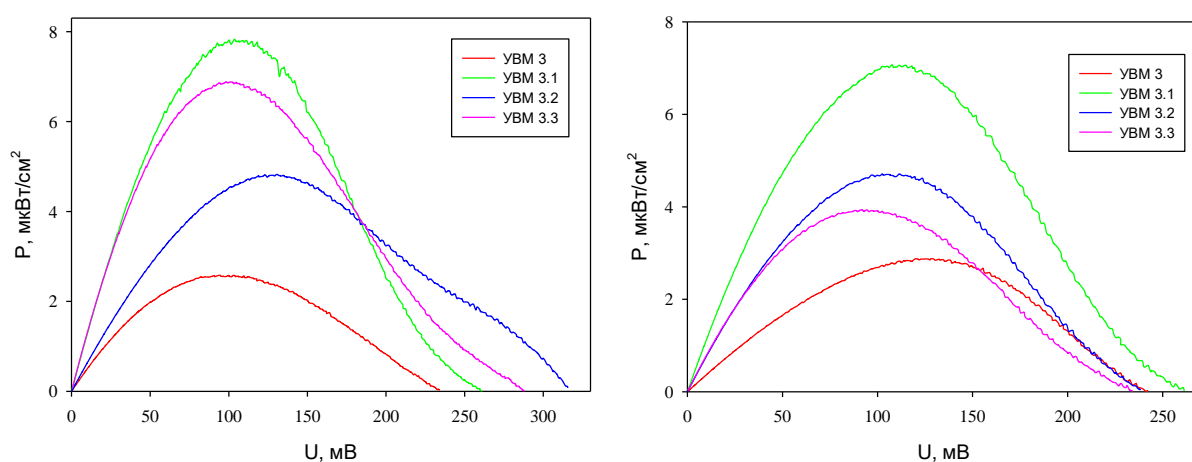


Рис. 41. Мощностные характеристики электродов на основе УВМ. В качестве биоматериала использованы бактериальные клетки (слева) и мембранные фракции клеток (справа), в качестве субстрата - этанол (10 мМ).

Таким образом, изучены возможности использования углеродных высокодисперсных материалов в составе микробных БТЭ и БТЭ на основе мембранных фракций клеток. Был подобран образец УВМ с наиболее подходящим элементным составом для использования в качестве электрода, а также изучено несколько его модификаций. Лучшие параметры были получены для материала, карбонизацию которого проводили при температуре 1000°C и при замедленной скорости набора температуры. При этом данный материал позволяет создать БТЭ с мощностью 8 мкВт/см^2 , что превосходит мощность аналогичных традиционных микробных БТЭ на основе СГЭ электродов.

3.3. Регистрации разрушения клеток и их мембран методом ЭИС

Для выполнения задачи было поставлено две серии экспериментов, в одной из которых нашей задачей была фиксация процесса полного разрушения клеток под действием препарата

лизоамидазы (ЛА), а в другом – регистрация возникновения пор в клеточных мембранах под действием электрического тока. В теории фрагменты клеток обладают различной проницаемостью для электрического тока. Цитоплазма отличается высокой электропроводностью, в то время как клеточная мембрана при обычных условиях плохо проводит электрический ток. Поэтому при нарушении структуры клеточных мембран общая проводимость системы должна увеличиваться. Это правило действует в случае прикладывания переменного тока низкой частоты (ниже 50 кГц), т.к. при высоких частотах колебания структуры клетки позволяют току проходить сквозь мембрану даже без её разрушения. Методом ЭИС возможна регистрация сразу нескольких параметров (таких, как электрическая емкость или сопротивление электролита), изменяющихся при нарушении целостности бактериальных клеток.

3.3.1. Воздействие лизоамидазы на бактериальные клетки

Для начальной проверки возможности использования метода было исследовано 3 суспензии различных микроорганизмов (*Staphylococcus aureus* 209P, *Micrococcus luteus* В1819 и *Glucanobacter oxydans* sbsp. *industrius* ВКМ В-1280) и эти же растворы после воздействия разрушающего агента – лизоамидазы. По результатам опытов для всех 3 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 в ячейку заливалась суспензия бактерий, а затем после установления равновесия подавалась лизоамидаза. Преимущество метода спектрального импеданса в том, что в зависимости от выбранного наблюдаемого параметра и от прикладываемой частоты исследуются разные части спектра системы. В данном случае в качестве наблюдаемого параметра была выбрана емкость двойного электрического слоя (ДЭС). В теории, чем толще слой клеток, находящийся на поверхности электрода, тем выше данная емкость. Соответственно, при разрушении клеток лизоамидазой значение емкости должно было понижаться. На рисунке 42 представлены графики изменения модуля емкости системы с клетками *Micrococcus luteus* и *Staphylococcus aureus* при добавлении в систему лизоамидазы под воздействием тока с частотой 100 Гц.

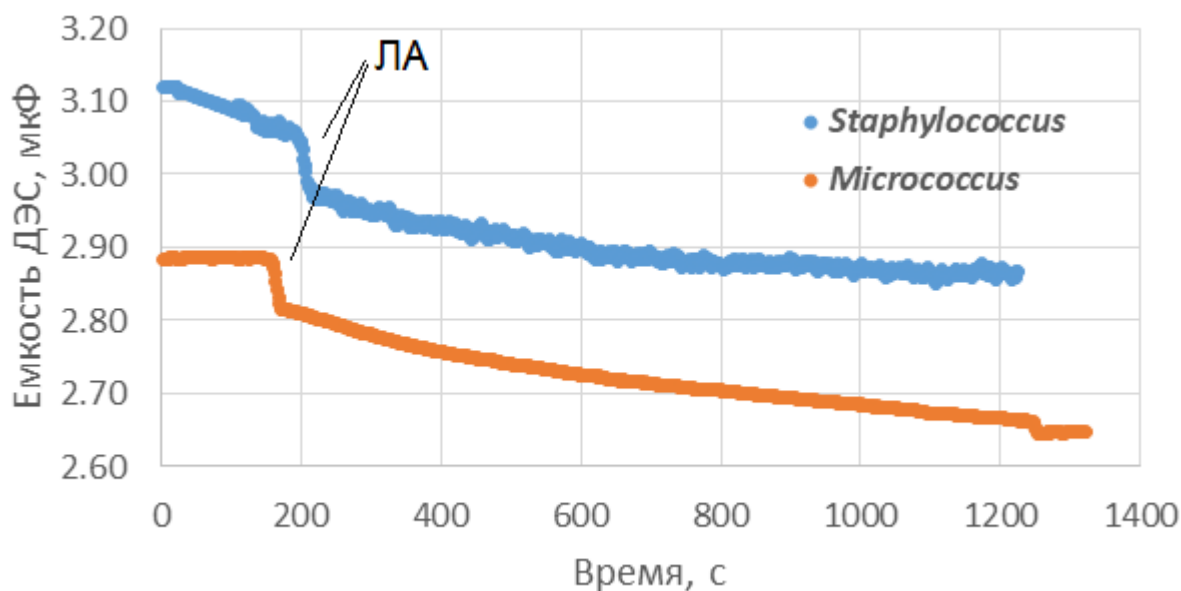


Рис. 42. График изменения модуля емкости от времени для бактериальных клеток при добавлении лизоамидазы на 180-й секунде измерения

Как видно из графиков, в случае с грамположительными бактериями емкость ДЭС действительно уменьшалась после добавления препарата лизоамидазы в суспензию клеток, что показывает теоретическую возможность использования данного метода регистрации для мониторинга процессов бактериального лизиса. Однако, при использовании грамотрицательных бактерий (на примере *Gluconobacter 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.

В связи с выявленными недостатками, в дальнейшем представлялось целесообразным оценить, как изменяется импеданс системы в зависимости от концентрации клеток и насколько лучше разрушение клеток детектируется при их иммобилизации. Для этого измеряли импеданс 2 электродов: с иммобилизованными в гель хитозана целыми клетками *G. oxydans* и с заранее разрушенными ультразвуком клетками. Сопротивление системы после разрушения клеток резко увеличивается. Если в опыте с суспензией клеток сопротивление раствора после разрушения клеток *G. oxydans* уменьшилось с 2 МОм до 1,4 МОм, то при иммобилизации биоматериала произошло увеличение от 30 кОм до 1,5 МОм, что делает данный способ намного более чувствительным. Подобная же картина наблюдалась и для клеток рода *Staphylococcus*, но изменение было намного менее выражено – от 90 кОм до 200 кОм.

Данный эффект можно объяснить тем, что сам по себе иммобилизующий агент – хитозан – является практически непроводящим полимером. При иммобилизации микроорганизмов в структуре геля появляются «каналы» для тока. Хотя клетки сами по себе тоже проводят ток плохо, их проводимость всё равно является выше, чем у хитозана. При иммобилизации разрушенных клеток в гель хитозана подобных проводящих «каналов» не создавалось, и из-за этого резко увеличивалось общее сопротивление системы.

Было показано не только то, что метод ЭИС может определять не только наличие и отсутствие целых клеток в системе по изменению общего сопротивления системы, но и продемонстрирована зависимость общего импеданса системы от концентрации живых бактериальных клеток в растворе. На рис. 43 представлены 5 спектральных импедансных характеристик, каждой из которых соответствует определенная концентрация клеток *G. oxydans*. Наименьшее общее сопротивление соответствует системе с наибольшей концентрацией клеток, что коррелирует с результатами предыдущего опыта.

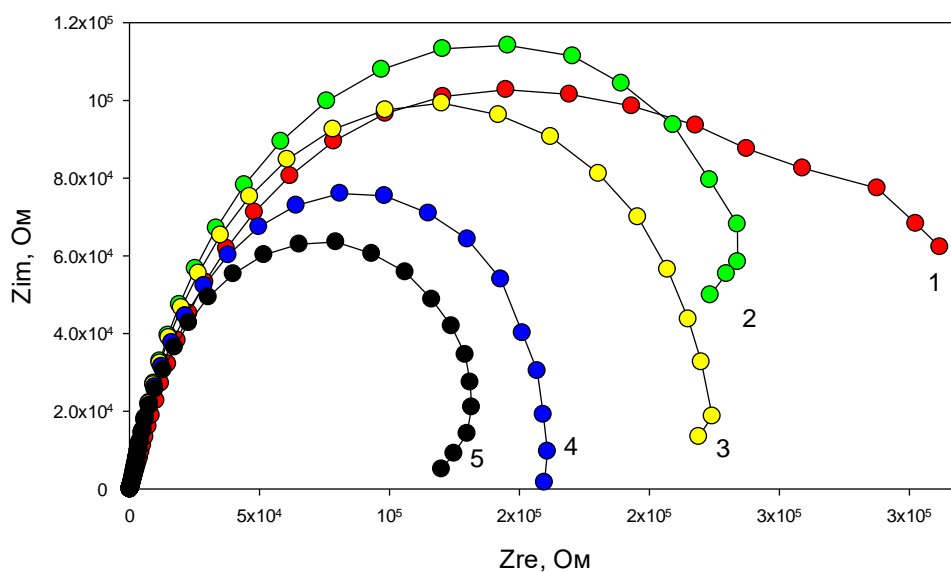


Рис. 43. Диаграммы Найквиста для суспензий с разным содержанием клеток *G. oxydans* (1 – 0 мг/мл клеток; 2 – 10 мг/мл; 3 – 20 мг/мл; 4 – 30 мг/мл; 5 – 50 мг/мл).

Для более подробного изучения влияние действия лизоамидазы на клетки было проведено измерение проводимости раствора суспензии клеток в процессе воздействия на нее препарата лизоамидазы. Для этого нами изучался лишь высокочастотный спектр импедансных характеристик, который соответствует сопротивлению электролита в системе. Данный параметр был выбран для изучения потому, что он наиболее точно может быть измерен сразу после изменения состава исследуемого раствора, и на его значение не влияет отсутствие полной

стационарности системы. Для проверки правильности выбора регистрируемого параметра было измерено сопротивление чистого электрода без содержания биомассы в трис-буфере (рН 8,0) до и после добавления лизоамидазы. Сопротивление электролита после добавления препарата уменьшилось с $1,22 \pm 0,11$ кОм до $1,01 \pm 0,09$ кОм. В дальнейшем необходимо было проверить, как изменяется сопротивление электролита непосредственно при разрушении клеток лизоамидазой.

Измеряли изменение сопротивления электролита в системе непосредственно в процессе действия лизоамидазы на суспензию клеток *Staphylococcus aureus*. На рисунке 44 кривая №1 отражает сопротивление электролита до начала реакции в суспензии клеток (915 Ом), кривая №2 показывает значение сопротивления через 5 минут, сразу после добавления лизоамидазы появился резкий скачок до 850 Ом. Через 10 минут (кривая №3) наблюдали небольшое смещение сопротивления до 842 Ом; после окончания реакции (через 30 минут) получена кривая №4, 825 Ом.

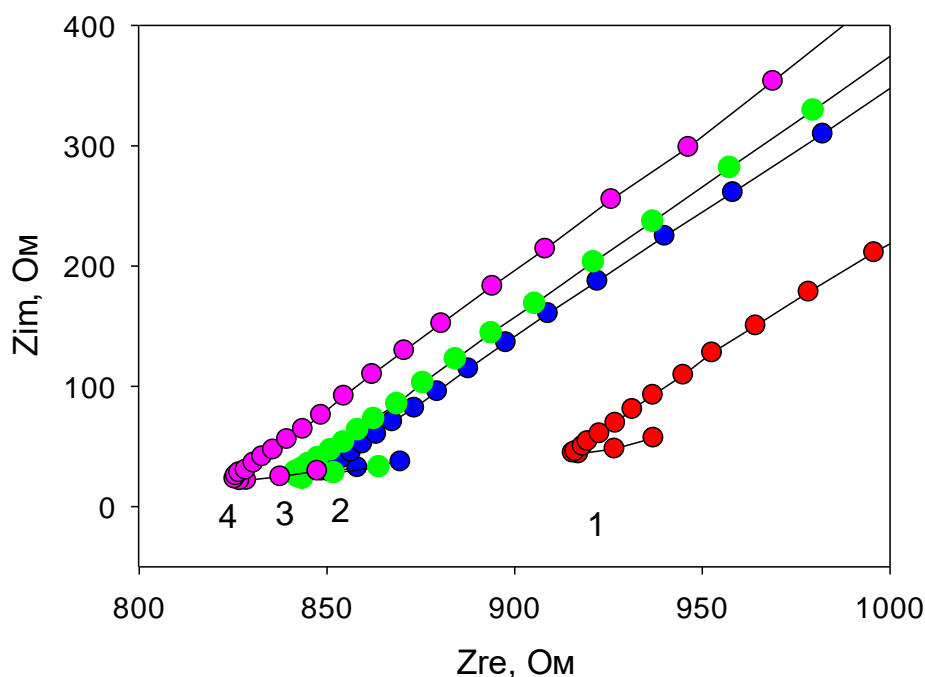


Рис. 44. Начальный участок диаграмм Найквиста для суспензии клеток *S. aureus* (1) и после добавления 50 мкл 1 мг/мл раствора лизоамидазы через 5 (2), 10 (3) и 30 (4) минут.

Добавление лизоамидазы в раствор вызывает уменьшение сопротивления электролита, при этом разрушение клеток *Staphylococcus* также уменьшает сопротивление электролита, но на меньшую величину. Таким образом, можно сделать вывод, что в изменение сопротивления раствора после биологического лизиса бактерий вносят вклад как ионы ЛА, так и непосредственное разрушение клеток под её действием. Чтобы оценить влияние лизоамидазы на

изменение сопротивления буфера, измерили разницу в сопротивлениях раствора до и после добавления ЛА для буферов с разной молярностью. Результаты представлены в табл. 30.

Таблица 30. Изменение сопротивления буфера при добавлении лизоамидазы.

Молярность буфера, мМ	ΔR при добавлении 25 мкл ЛА, Ом
10	46
12,5	37
25	25
50	10
75	3
100	0,5

Для работы лизоамидазы нежелательно применение буфера с молярностью выше 50 мМ (Степная и др., 1992), в то время, как влияние лизоамидазы на сопротивление электролита полностью исчезает лишь при использовании 100 мМ буфера. Следовательно, необходимо уменьшение концентрации лизоамидазы. При использовании 25 мМ буфера и уменьшении концентрации ЛА в 5 раз влияние лизоамидазы снижается до приемлемого (1-2 Ом), но при разрушение одинакового количества бактериальных клеток происходит в 5 раз дольше, т.е. 75 минут вместо 15.

Таким образом, нами было показано, что метод ЭИС может быть использован для регистрации процессов разрушения клеток с помощью измерения сопротивления электролита. Однако, использованный в работе лизирующий агент – препарат лизоамидаза – является электроактивным и сильно изменяет сопротивление электролита в первые секунды после добавления в систему, что затрудняет использование данного метода.

3.3.2. Пермеабилзация клеточной мембраны дрожжей

Метод ЭИС был применен при регистрации процессов, происходящих при нарушениях клеточной мембраны, то есть в отсутствии полного разрушения клеток. В качестве действующего агента был выбран метод электропорации, т.к. это позволило избежать эффектов, подобных тем, что наблюдались в случае использования лизоамидазы. В качестве объекта исследования были выбран штамм *Saccharomyces cerevisiae* ВКМ У-1173. Данный штамм обладает относительно высокой внутриклеточной ионной силой раствора, поэтому после воздействия электрического тока внутриклеточная жидкость через образовавшиеся в клеточной стенке поры должна выйти во внешний раствор и изменить его проводимость. Для проверки возможности детекции ионов, вытекающих в раствор в процессе электропорации клеток, были построены калибровочные кривые методом ЭИС с зависимостью сопротивления раствора от содержания в нем ионов калия

и контрольная калибровочная кривая с использованием калиевого электрода. Калибровочные кривые представлены на рисунке 45. Показано, что метод ЭИС предлагает чуть более высокую чувствительность при концентрации клеток 33 мг/мл, поэтому в качестве контрольного образца была использована суспензия дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* ВКМ У-1173 с данной концентрацией.

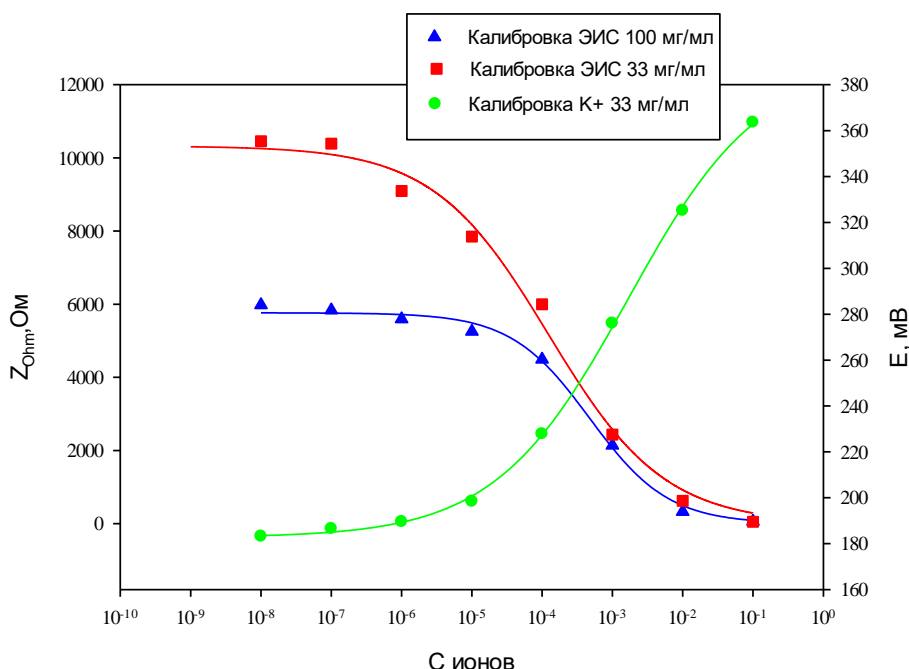


Рис. 45. Калибровочные кривые, полученные методом ЭИС и калиевым электродом. Красная кривая – зависимость сопротивления раствора от концентрации ионов калия на фоне 33 мг/мл клеток, синяя – на фоне 100 мг/мл клеток; зеленая кривая – зависимость потенциала от концентрации ионов, измеренная калиевым электродом.

Реальный образец суспензии клеток *Saccharomyces cerevisiae* в концентрации 33 мг/мл исследовался при температуре 4°C калиевым электродом и методом ЭИС одновременно. Получены следующие содержания 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 содержание калия составляло 70,6%.

Таким образом, метод ЭИС позволяет определить выход ионов из клеток во внешнюю среду, что может быть использовано для экспресс-определения эффективности работы различных препаратов, направленных на разрушение клеток или их мембран. При снятии импедансного спектра суспензии клеток до и после действия препарата по изменению сопротивления электролита можно определить, происходит ли нарушение клеточной мембраны или нет. Однако, данный метод имеет 2 недостатка: 1) точно работает только в том случае, если

сам разрушающий агент не электроактивен; 2) разрушение клеток желательно проводить в той же ячейке, где и будет проводиться измерение импедансного спектра, т.к. иначе не удастся получить кинетику первых секунд разрушения мембраны и выхода раствора из цитоплазмы клеток во внешнюю среду.

В результате проведенных исследований показано, что метод ЭИС позволяет регистрировать изменение количества клеток в исследуемом образце по изменению общего импеданса системы. Кроме того, 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 с помощью этого оценивать влияние различных агентов на структуру клеток по выходу общего количества ионов во внешнюю среду. Данный метод, в частности, может использоваться для экспресс-анализа эффективности воздействия фунгицидных препаратов на клеточные мембраны низших грибов.

3.4. Практическое применение микробных БТЭ

3.4.1. Конвертерное накопление электроэнергии от микробных БТЭ

Для практического применения БТЭ как источников питания малой мощности необходимо повышение их реальной мощности. Все эксперименты, представленные в работе, в конечном итоге были поставлены именно для этой цели. Один из вариантов увеличения эффективности работы БТЭ – соединение нескольких ячеек друг с другом для совместной работы. В работе ячейки БТЭ с объемом кювет 5 мл соединяли последовательно или параллельно. Регистрировали ЦВА и рассчитывали мощность для каждого типа соединения. На рис. 46 приведены мощностные зависимости для одиночного БТЭ и для двух БТЭ при последовательном и параллельном соединении.

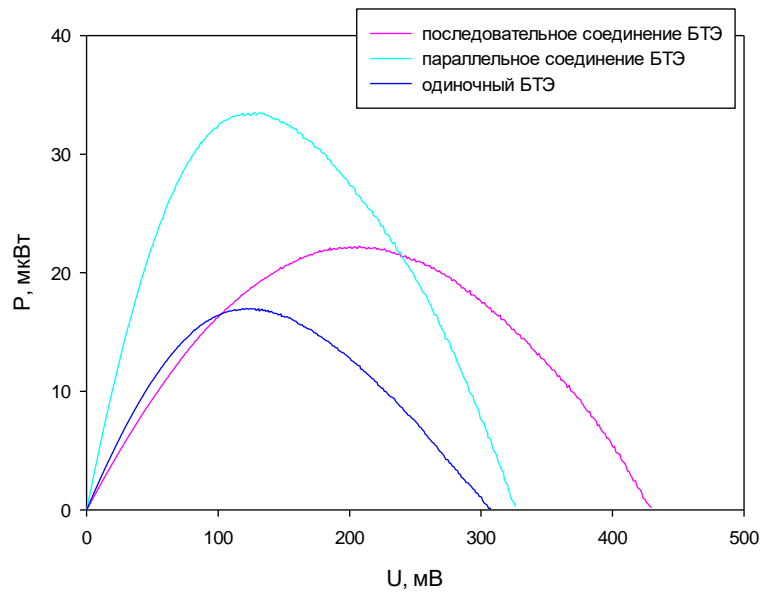


Рис. 46. Мощностные зависимости для одиночного БТЭ и для двух БТЭ при последовательном и параллельном соединении.

Как следует из рис. 46, максимальная мощность была получена при параллельном соединении ячеек, но при этом снижается выходное напряжение БТЭ (~300 мВ). При последовательном соединении мощность в 1,4 раза ниже, но при этом не снижается выходное напряжение БТЭ (~400 мВ). Для трех типов соединений были сняты импедансные зависимости в диапазоне частот от 40кГц до 0,1кГц. Зависимости снимались при потенциале 200 мВ с амплитудой в 10мВ. Диаграммы Найквиста для трех систем приведены на рис. 47.

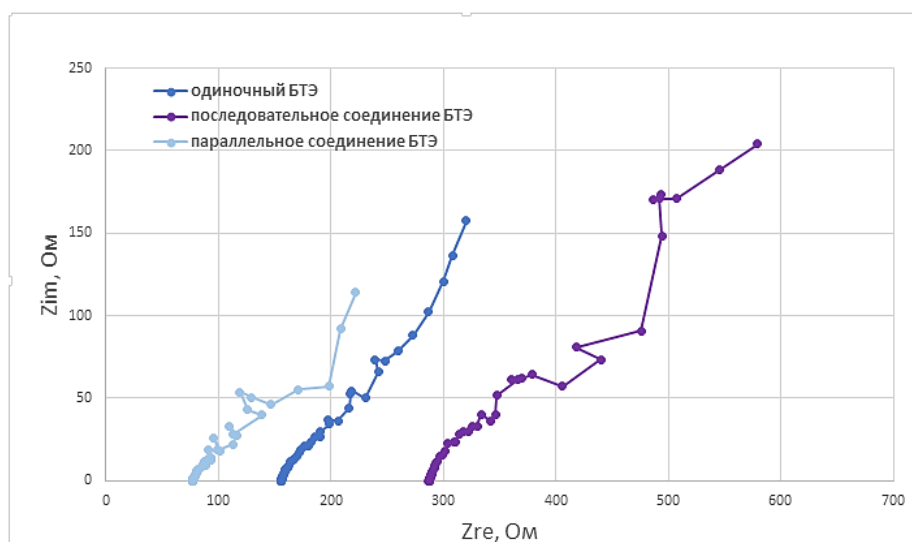


Рис. 47. Диаграммы Найквиста для одиночного БТЭ и для двух БТЭ при последовательном и параллельном соединении.

Для нахождения значений сопротивлений для БТЭ использовали стандартную эквивалентную электрическую схему, представленную на рисунке 9. Полученные значения сопротивлений для трех типов соединений БТЭ представлены в таблице 31.

Таблица 31. Значения сопротивлений, полученные после обработки диаграмм Найквиста для трех типов соединения БТЭ.

Тип соединения БТЭ	R_A , Ом	R_K , Ом	$R_Э$, Ом	$R_{ВН}$, Ом	Мощность, мкВт	НХХ, мВ
Одиночный БТЭ	64	274	159	470	16	300
Последовательное	108	377	294	779	22	400
Параллельное	31	159	78	268	33	300

Примечание: приведены средние значения параметров по 5 измерениям.

Как видно из полученных данных, минимальное значение внутреннего сопротивление наблюдается при параллельном соединении ячеек (что соответствует максимальной мощности). Значение внутреннего сопротивления при последовательном соединении ячеек в 3 раза больше, чем при параллельном соединении. Для дальнейших экспериментов с конвертерным накоплением энергии использовали последовательное подключение, так как при этом не снижается выходное напряжение БТЭ, которое должно быть достаточно высоким (от 0,3 В и выше) для подключения конвертера.

Для изучения конвертерного метода преобразования и накопления электроэнергии от маломощного микробного БТЭ в работе разработан лабораторный стенд, функциональная схема которого представлена на рис. 48. Система включала в себя два микробных БТЭ на основе СГЭ с иммобилизованными в гель хитозана бактериальными клетками *G. oxydans*, подключенных последовательно; конвертер на основе микросхемы bq25504; стенд с конденсаторами емкостью 1000 и 6800 мкФ, а также ионистором емкостью 1 Ф; различные типы нагрузок (электродвигатель, светодиод и биосенсор на основе кислородного электрода типа Кларка). Для накопления энергии биотопливного элемента использовали конвертер на основе микросхемы BQ25504 (Texas Instruments, США), производящей трансформацию постоянного тока.

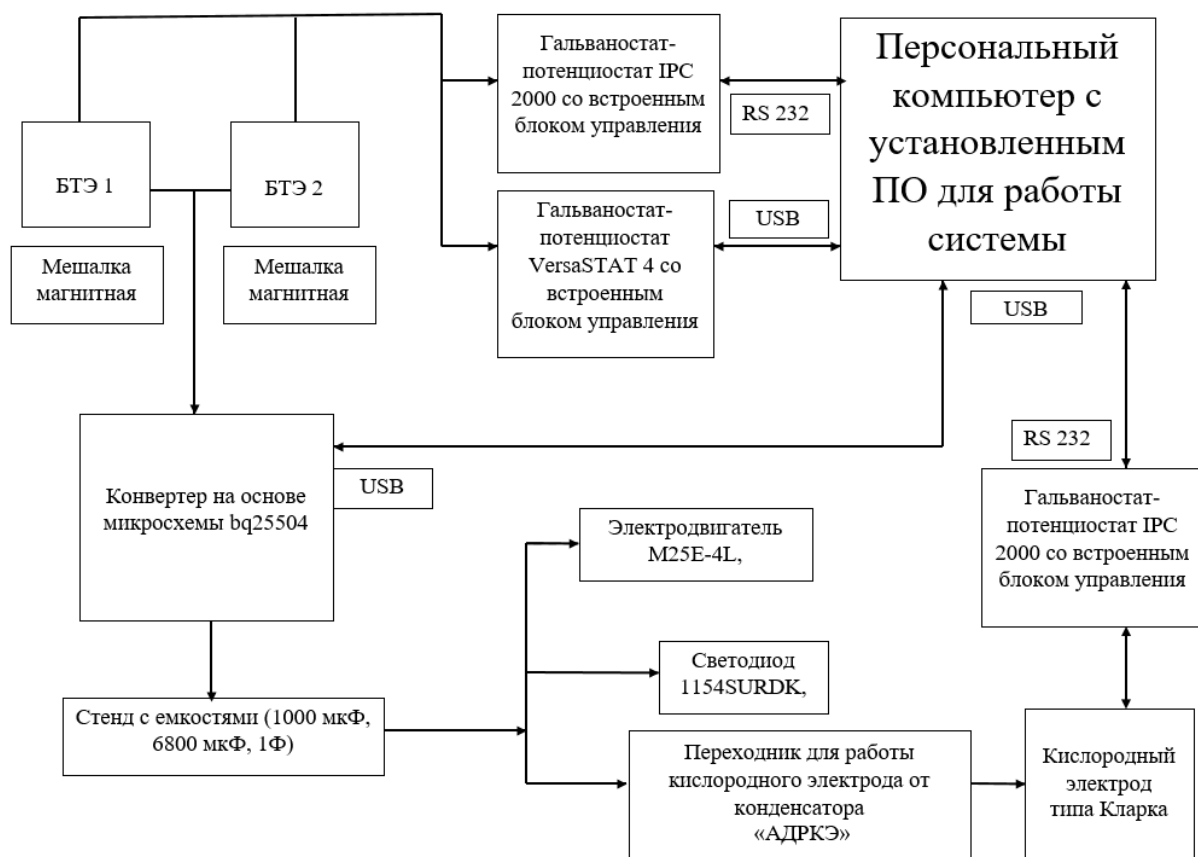


Рис. 48. Функциональная схема лабораторного стенда для изучения конвертерного метода преобразования и накопления электроэнергии от БТЭ

Режим накопления исследовали с использованием двух различных конфигураций БТЭ. Один из элементов был основан на чистых СГЭ, биоаноды второго элемента были модифицированными наноматериалом – МУНТ Таунит-М. На рисунке 49 представлены мощностные зависимости БТЭ, использованных для заряда емкостей с помощью конвертера. Как видно из мощностных зависимостей, модификация рабочих электродов МУНТ увеличивает мощность как одного БТЭ, так и двух БТЭ, подключенных последовательно. Следует отметить, что после 24 часов работы эффективность работы двух БТЭ не уменьшается. На рисунке 50 представлен график заряда конденсатора емкостью 6800 мкФ двумя БТЭ, модифицированными МУНТ. Заряд происходил через 2 суток непрерывной работы БТЭ.

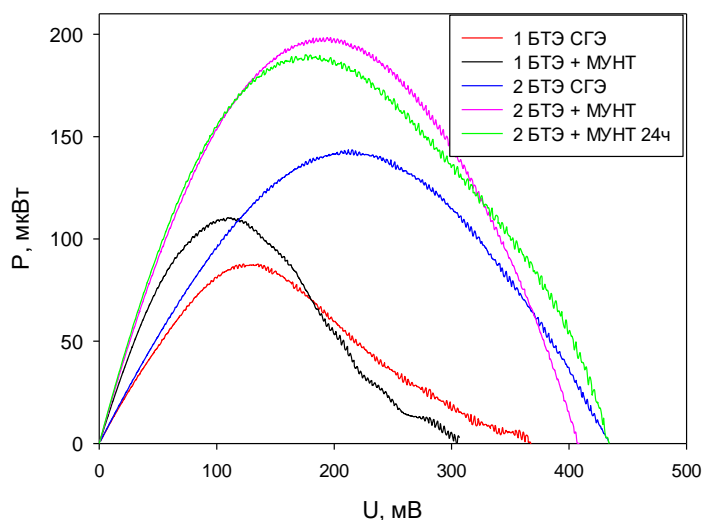


Рис. 49. Мощностные зависимости микробных БТЭ на основе чистых СГЭ и на основе электродов, модифицированных МУНТ

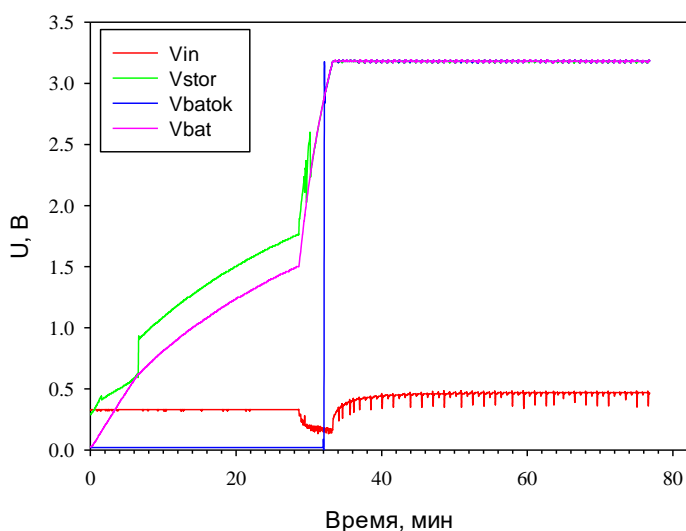


Рис. 50. Накопление электроэнергии на емкости 6800 мкФ с помощью двух БТЭ, модифицированных МУНТ. V_{in} – входное напряжение, поступающее на конвертер; V_{stor} – напряжение заряда; V_{bat} – напряжение на накопительной емкости; V_{batok} – напряжение, сигнализирующее о достижении установленного уровня напряжения заряда

Характеристики систем, использованных для конвертерного накопления электричества, представлены в таблице 32. Работа БТЭ изучалась методами вольтамперметрии и ЭИС. В качестве приемника использовался конденсатор емкостью 6800 мкФ. Внутреннее сопротивление элемента определялось методом ЭИС при приложенном потенциале, соответствующем минимальному внутреннему сопротивлению (-130 мВ для одиночных БТЭ и -220 мВ для

последовательно соединенных БТЭ). Из представленных данных видно, что одиночным БТЭ не хватает генерируемого напряжения для того, чтобы эффективно заряжать конденсатор в 6800 мкФ (особенность используемой микросхемы bq25504, требующей напряжения от 300 мВ). Последовательное соединение БТЭ на уменьшает внутреннее сопротивление элементов, однако это не мешает увеличению общей мощности системы при соединении двух элементов. Стоит отметить, что 2 последовательно соединенных модифицированных БТЭ эффективно заряжали конденсатор в 6800 мкФ после 2 суток непрерывной работы, при этом время заряда уменьшалось более чем в 2 раза по сравнению с двумя не модифицированными МУНТ элементами.

Таблица 32. 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.

. Заряженный таким образом конденсатор 6800 мкФ содержал заряд 21×10^{-3} Кл, обеспечивающий накопленную энергию в 32,7 мДж, что позволяло в кратковременном режиме (~ 1 мин) поддерживать свечение светодиода L-1154SURDK (Kingbright; 2,0 В, 20 мА) или получать кратковременное вращение ротора электродвигателя M25E-4L (MITSUMI; 3,0 В, 100 мА). Полученные результаты создают основу для реализации практического использования конвертерного накопления энергии, например, в имплантированном БТЭ.

3.4.2. Генерация электроэнергии микробным БТЭ от эндогенной глюкозы травяной лягушки

За последние 5 лет в литературе описаны биотопливные элементы, имплантированные в различные виды беспозвоночных животных, например, членистоногих. Эти беспозвоночные обладают незамкнутой системой циркуляции жидкости, играющей роль крови, что позволяет сравнительно просто имплантировать компоненты биотопливной ячейки в такой организм, не вызывая повреждений у животного. Описанные ранее аноды биотопливных элементов были основаны на использовании ферментов, в частности, PQQ-зависимой дегидрогеназы. В работах описаны биотопливные элементы, в которых электроды были изготовлены из мультистенных углеродных нанотрубок с иммобилизованными на них ферментами, лакказой и PQQ-зависимой дегидрогеназой, имплантированные в лобстера *Homarus americanus* (MacVittie et al., 2013), моллюска *Mercenaria mercenaria* (Szczipak et al., 2012), улитку *Neohelix albolabris* (Halamkova et al., 2012) и таракана *Blaberus discoidalis* (Schröder, 2012). Особенностью последнего исследования было использование медиатора электронного транспорта, иммобилизованного на аноде и катоде, служащего для переноса электронов, и размещение катода вне тела животного для решения проблемы поступления кислорода к катоду.

В работе была поставлена задача разработать микробный биотопливный элемент, имплантированный в организм живой травяной лягушки *Rana temporaria* и работающий на глюкозе, вырабатываемой в организме этого представителя класса земноводных. В качестве материала для электродов был выбран терморасширенный графит (ТРГ), так как физические свойства данного материала позволяли создать электроды, обладающие достаточной площадью для иммобилизации значительного количества биоматериала, но при этом не травмирующие животных при имплантации. Один из электродов (анод) содержал водонерастворимый медиатор диметилферроцен и иммобилизованные в геле хитозана клетки *Gluconobacter oxydans* ВКМ В-1280. На рисунке 51 представлены микрофотографии поверхности электрода из ТРГ, полученные методом СЭМ. Как видно из представленных фотографий, ТРГ обладает достаточно развитой поверхностью, при этом обеспечивается надежная иммобилизация достаточного количества микробных клеток в геле хитозана. Использование водонерастворимого медиатора позволило решить проблему попадания токсичных соединений в организм изучаемого объекта. Измерения проводили по двухэлектродной схеме, представленной на рисунке 52.

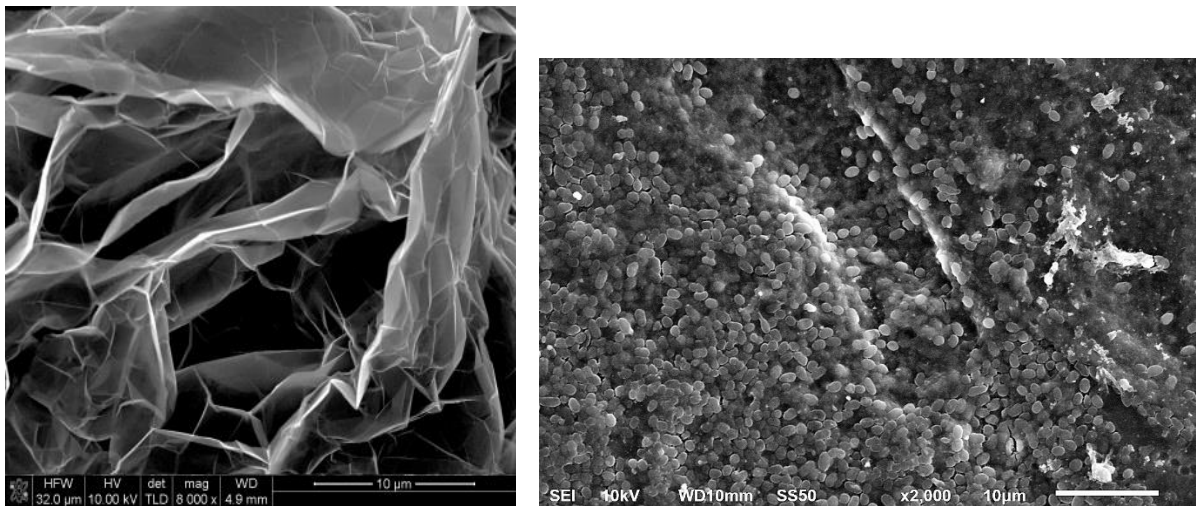


Рис.51. СЭМ-фотографии поверхности электрода из ТРГ в чистом виде (слева) и покрытого суспензией клеток *G. oxydans* в хитозане

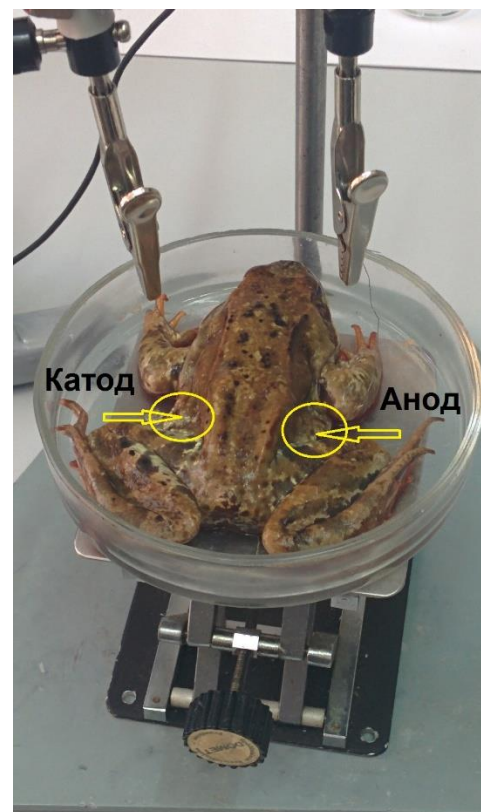
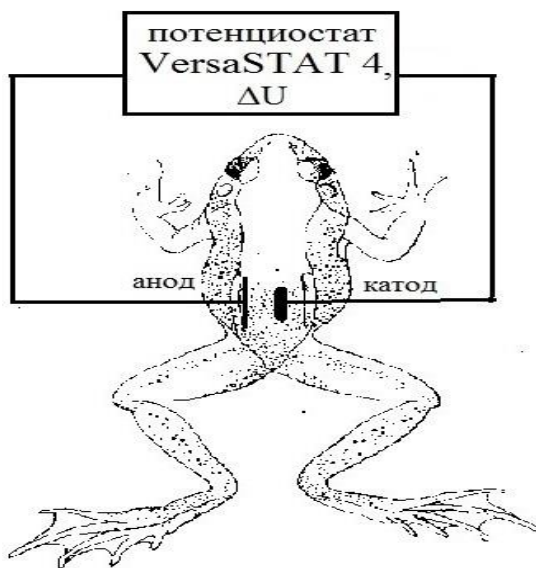


Рис. 52. Схема подключения микробного БТЭ, встроенного в организм травяной лягушки и фотография лягушки с подключенной к ней системой регистрации. Проекция имплантированных со стороны брюшной части лимфатической пазухи животного электродов (анода и катода) обозначена кружками.

Генерация потенциала микробным БТЭ начиналась с небольшой задержкой после введения электрода, замыкающего электрическую цепь и содержащего биоматериал – иммобилизованные клетки *G. oxydans*. Результаты измерения приведены на рис. 53, на котором

дана типичная зависимость генерации разности потенциалов ΔU . В данном примере ΔU составляла величину порядка 50 мВ. Рост разности потенциалов достигал стационарного значения за время ~ 800 с. На рисунке 53 показан также тест по введению дополнительной порции глюкозы в зону анода. Добавление глюкозы (5 мкл, 50 мМ) вызывало появление добавочной разности потенциалов. Точное значение концентрации введенной глюкозы у поверхности анода указать невозможно.

Биосенсорное измерение концентрации глюкозы позволило получить следующие значения. В исходном состоянии, до начала опыта, фоновая концентрация глюкозы у различных животных варьировала в диапазоне от 40 до 60 мМ. Эти данные согласуются с литературными (MacDonald et al., 2009), а разброс можно связать с постепенным истощением внутренних запасов глюкозы у животных в процессе зимовки. Фоновая концентрация глюкозы в значительной мере зависит не только от времени года, но также и от условий хранения животных и точно предсказать ее величину достаточно сложно.

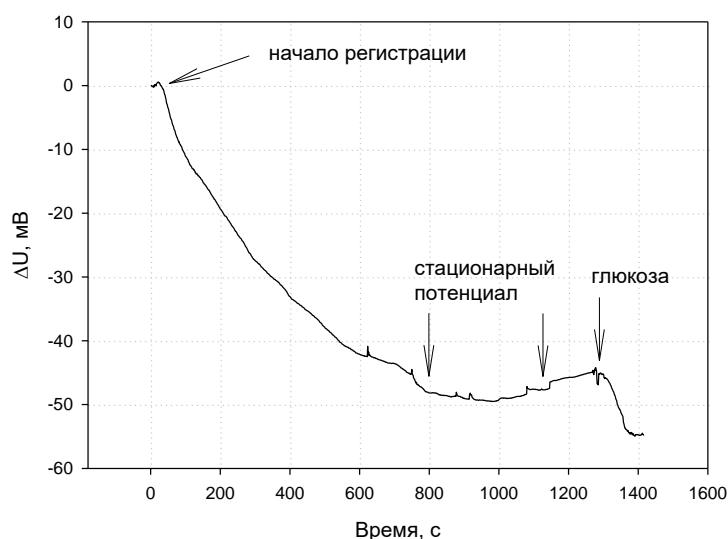


Рис. 53. Генерация разности потенциалов при окислении эндогенной глюкозы организма травяной лягушки *Rana temporaria* встроенным биотопливным элементом.

На рисунке 54 представлены импедансные спектры имплантированного в тело травяной лягушки БТЭ в виде диаграмм Найквиста. Как видно из диаграмм Найквиста, сопротивление электролита до и после окончания генерации потенциалов остается неизменным (начальная точка кривых), в то время как общее внутреннее сопротивление ячейки и сопротивление переноса заряда увеличивается с течением времени. Это явление связано с уменьшением концентрации глюкозы во внутриволожковой 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.

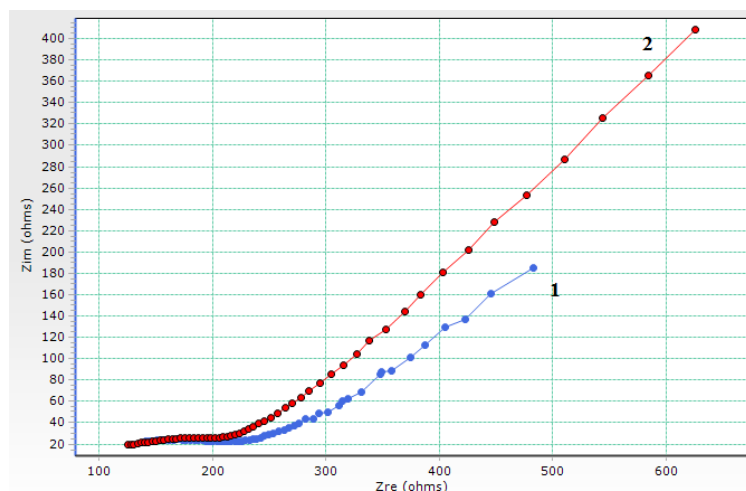


Рис.54. Диаграммы Найквиста для имплантированного в лягушку БТЭ при максимальной концентрации глюкозы во внутрисполостной жидкости лягушки (1) и после окончания генерации потенциала (2)

Известно, что использование БТЭ, содержащего клетки микроорганизмов в составе анода представляется достаточно опасным с точки зрения их попадания в организм. В данном исследовании авторы не предпринимали специальных мер, чтобы предотвратить десорбцию бактерий. Вместе с тем, современное развитие технологий, в частности, технологии создания биологических микро электромеханических систем, позволяет применять соответствующие устройства-ловушки, делающие безопасным применение микробных БТЭ даже при имплантации в организм.

Таким образом, в работе впервые показана имплантация микробного БТЭ в тело земноводного на примере травяной лягушки *Rana Temporaria*, и впервые для изучения характеристик имплантированного БТЭ применен метод ЭИС. Показана возможность работы микробного БТЭ от эндогенной глюкозы, содержащейся в организме травяной лягушки. В качестве электродов использованы электроды из наноматериала – ТРГ, свойства которого могут быть полезны при дальнейшем изучении возможности создания различных имплантируемых топливных элементов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в диссертационной работе рассмотрены особенности применения метода электрохимической импедансной спектроскопии к биологическим объектам, таким как микроорганизмы и их фрагменты, а также к электрохимическим устройствам на их основе. Были созданы лабораторные макеты биосенсоров с импедансометрическим преобразователем, использующиеся для определения глюкозы и этанола. Данные вещества были выбраны из-за того, что биосенсоры для их определения смогут применяться сразу в нескольких областях: в клинической практике, в пищевой промышленности и для контроля биотехнологических процессов. В качестве подложки для биосенсоров использованы дешевые графитовые печатные электроды, т.к. в литературе до сегодняшнего дня не были описаны импедансометрические сенсоры для определения спиртов и сахаров на базе коммерчески доступных серийных электродов. Для создания глюкозного биосенсора был использован фермент глюкозооксидаза, сравнивались 4 медиатора электронного транспорта для выбора наиболее подходящей комбинации. Импедансометрический сенсор для определения этанола был создан на основе комбинации ферментов «алкогольоксидаза – пероксидаза хрена». Было проведено сравнение амперометрического сенсора с использованием берлинской лазури и импедансометрических сенсоров с использованием редокс-медиаторов. Был создан макет микробного импедансометрического сенсора на основе клеток *G. oxydans* и оценены плюсы и минусы использования данного сенсора по сравнению с ферментными сенсорами.

Метод ЭИС был использован для улучшения характеристик микробных БТЭ. Данный метод позволял одновременно оценить влияние каждого из компонентов БТЭ на его общую производительность. Показано влияние количества электродов, ионной силы буферного раствора, площади протонпроницаемой мембраны, температуры и концентраций субстрата и медиаторов на сопротивление и мощность микробного БТЭ на основе клеток *G. oxydans*. В настоящее время набирает популярность использование наноматериалов для улучшения электрических свойств топливных элементов, поэтому в работе была проведена масштабная оценка влияния 8 углеродных наноматериалов на производительность биоанодов БТЭ. Показано, что модификация биоанодов ФМНТ и оксидом графена позволяет добиться увеличения мощности БТЭ. Изучены различные комбинации наноматериала и иммобилизующего агента, используемых для модификации БТЭ. С помощью использования комбинации «хитозан-ФМНТ» удалось добиться повышения мощности микробного БТЭ до уровня в 10 мкВт/см².

Метод ЭИС был использован при поиске новых биокатализаторов и новых материалов электрода для использования в БТЭ. В качестве биокатализатора были использованы

мембранные фракции клеток, являющиеся частями клеточной мембраны и содержащие в себе различные клеточные мембранные структуры, в том числе мембранные PQQ-зависимые дегидрогеназы. Показано увеличение сигналов БТЭ и стабильности электродов при замене целых клеток *G. oxydans* на их мембранные фракции на биоаноде БТЭ. Изучена возможность использования углеродных высокодисперсных материалов в качестве электродов БТЭ. Показана зависимость электрохимических свойств УВМ от их элементного состава и условий получения, а также выбрана наиболее подходящая модификация УВМ для использования в составе микробных БТЭ и БТЭ на основе мембранных фракций клеток.

Регистрировали процессы биологического лизиса грамположительных и грамотрицательных бактерий с помощью препарата лизоамидазы. Было показано, что метод ЭИС способен регистрировать изменение общего сопротивления системы с целыми клетками после разрушения, а также регистрировать изменение емкости системы при действии лизоамидазы на грамположительные бактерии в реальном времени. Продемонстрирована способность метода ЭИС определять концентрацию бактериальных клеток в растворе по общему импедансу системы, а также разрушение клеток по изменению сопротивления электролита. Метод ЭИС был применен для регистрации процессов, происходящих при нарушениях клеточной мембраны. Показано, что с помощью измерения проводимости суспензии дрожжей можно оценивать эффективность препаратов, временно или перманентно разрушающих клеточную мембрану.

Полученные данные были использованы для поиска новых возможностей практического применения микробных БТЭ. В частности, композиция из двух последовательно соединенных микробных БТЭ успешно применена для конвертерного накопления электроэнергии. Показана эффективность МУНТ при использовании в реальных условиях – БТЭ с модифицированными наноматериалом электродами позволяли заряжать конденсаторы с мощностью 6800 мкФ в 2 раза быстрее, чем стандартные немодифицированные БТЭ. Полученные результаты создают основу для реализации практического использования конвертерного накопления энергии, например, в имплантированных БТЭ.

Возможности имплантации микробных БТЭ показаны на примере травяной лягушки *Rana Temporaria*. Впервые микробный БТЭ с электродами из наноматериала был имплантирован в тело земноводного, и впервые метод ЭИС был применен для характеристики имплантированного БТЭ. Продемонстрирована генерация электроэнергии микробным БТЭ с использованием эндогенного субстрата, без внесения в организм животного дополнительных реагентов.

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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Akyilmaz E., Erdoğan A., Öztürk R., Yaşa İ. Sensitive determination of l-lysine with a new amperometric microbial biosensor based on *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells // *Biosens. Bioelectron.* – 2007. – V.22. – №6. – P. 1055-1060.
2. Alfonta L., Bardea A., Khersonsky O., Katz E., Willner I. Chronopotentiometry and Faradaic impedance spectroscopy as signal transduction methods for the biocatalytic precipitation of an insoluble product on electrode supports: routes for enzyme sensors, immunosensors and DNA sensors. // *Biosens. Bioelectron.* – 2001. – V.16. – №9. – P. 675-687.
3. Alfonta L., Katz E., Willner I. Sensing of acetylcholine by a tricomponent-enzyme layered electrode using faradaic impedance spectroscopy, cyclic voltammetry, and microgravimetric quartz crystal microbalance transduction methods. // *Anal Chem.* – 2000. – V.72. – №5. – P. 927-935.
4. Arechederra R., Minter S.D. Organelle-based biofuel cells: Immobilized mitochondria on carbon paper electrodes. // *Electrochim. Acta.* – 2008. – V.53. – №1. – P. 6698-6703.
5. Arlyapov V., Kamanin S., Ponamoreva O., Reshetilov A. Biosensor analyzer for BOD index express control on the basis of the yeast microorganisms *Candida maltosa*, *Candida blankii*, and *Debaryomyces hansenii*. // *Enzyme and Microbial Technology.* – 2012. – V. 50. – №4-5. – P. 215-220.
6. Arora P., Sindhu A., Dilbaghi N., Chaudhury A. Biosensors as innovative tools for the detection of food borne pathogens. // *Biosens. Bioelectron.* – 2011. – V.28. – №1. – P. 1-12.
7. Atanassov P., Apblett C., Banta S., Brozik S., Barton S. C., Cooney M. Enzymatic Biofuel Cells. // *Electrochemical Society Interface.* – 2007. – V.16. – №2. – P. 28-31.
8. Azevedo A.M., Miguel D., Prazeres F., Cabral J.M.S., Fonseca L.P. Ethanol biosensors based on alcohol oxidase. // *Biosens. Bioelectron.* – 2005. – V.21. – №2. – P. 235-247.
9. Bahadir E.B., Sezginurk M.K. A review on impedimetric biosensors. // *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol.* – 2014. – V.44. – №1. – P. 248-262.
10. Bajracharya S., Sharma M., Mohanakrishna G., Benneton X.D., Strik D.P.B.T.B., Sarma P.M., Pant D. An overview on emerging bioelectrochemical systems (BESs): Technology for sustainable electricity, waste remediation, resource recovery, chemical production and beyond // *Renew Energy* – 2016. – V.98. – P. 153-170.
11. Bakker E., Pretsch E. Potentiometric sensors for trace-level analysis. // *Trends Analyt Chem.* – 2005. V.24. – №3. – P. 199–207.
12. Bandodkar A. J., Wang, J. Wearable Biofuel Cells: A Review. // *Electroanalysis.* – 2016. – V.28. – №6. – P. 1188-1200.

13. Banerjee P., Bhunia A.K. Mammalian cell-based biosensors for pathogens and toxins. // *Trends Biotechnol.* – 2009. – V.27. – №3. – P. 179-188.
14. Banica G.F. Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and Applications. / John Wiley & Sons, 2012. – 576 p.
15. Barbir F. PEM Fuel Cells: Theory and Practice. / Academic Press, 2012. – 444 p.
16. Bard, A., Faulkner, L. Electrochemical Methods. Fundamentals and Application, 2-nd ed. / Wiley, New York, 2001. – P. 368 - 414.
17. Barriere F., Kavanagh P., Leech D. A laccase-glucose oxidase biofuel cell prototype operating in a physiological buffer. // *Electrochim. Acta.* – 2006. – V.51. – P.5187-5192.
18. Bartlett Ph. N. Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications. / John Wiley & Sons, 2008 – 494 p.
19. Bertokova A., Bertok T., Filip J., Tkáč J. *Gluconobacter* sp. cells for manufacturing of effective electrochemical biosensors and biofuel cells. *Chemical Papers.* – 2015. – V.69. – №1. – P. 27-41.
20. Bhattacharya R., Mukherjee P. Biological properties of “naked” metal nanoparticles. // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2008. – V.60. – №11. – P. 1289-1306.
21. Bonanni A., del Valle M. Use of nanomaterials for impedimetric DNA sensors: A review. // *Anal. Chim. Acta.* – 2010. – V.678. – №1. – P. 7-17.
22. Bonanni A., Esplandiú M.J., Pividori M.I., Alegret S., del Valle M. Impedimetric genosensors for the detection of DNA hybridization. // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2006. – V.385. – №7. – P.1195-1201.
23. Bonanni A., Fernández-Cuesta I., Borrísé X., Pérez-Murano F., Alegret S., del Valle M. DNA hybridization detection by electrochemical impedance spectroscopy using interdigitated gold nanoelectrodes // *Microchim. Acta* – 2010. – V.170. – №3-4. – P. 275–281.
24. Bond D.R., Holmes D.E., Tender L.M., Lovley D.R. Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments. // *Science* – 2002. – V.295. – №5554. – P. 483-485.
25. Bora U., Sett A., Singh D. Nucleic acid based biosensors for clinical applications. // *Biosens J.* – 2013. – V.2. – №1. – P. 104.
26. Borgmann, S., Schulte, A., Neugebauer, S., Schuhmann, W. Amperometric Biosensors. In: *Advances in Electrochemical Science and Engineering: Bioelectrochemistry, Volume 13* / Alkire R. C., Kolb D. M., Lipkowski J., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. – 2011. – P. 1-83.
27. Bouyahia N., Hamlaoui M.L., Hnaïen M., Lagarde F., Jaffrezic-Renault N. Impedance spectroscopy and conductometric biosensing for probing catalase reaction with cyanide as ligand and inhibitor // *Bioelectrochemistry.* – 2011. – V.80. – №2. – P. 155-161.

28. Bullen R.A., Arnot T.C., Lakeman J.B., Walsh F.C. Biofuel cells and their development. // *Biosens. Bioelectron.* – 2006. – V. 21. – №11. – P. 2015-2045.
29. Carrette L., Friedrich K.A., Stimming U. Fuel cells: principles, types, fuels, and applications. // *Chem Phys Chem.* – 2000. – V.1. – №4. – P. 162-193.
30. Chang B.Y., Park S.M. Electrochemical impedance spectroscopy. // *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* – 2010. – V.3. – №26. – P. 207-229.
31. Chang Y.T., Huang J.-H., Tu M.C., Chang P., Yew T.-R. Flexible direct-growth CNT biosensors. // *Biosens. Bioelectron.* – 2013. – V. 41. – P. 898-902.
32. Chaubey A., Malhotra B.D. Mediated biosensors. // *Biosens. Bioelectron.* – 2002. – V. 17. – №6-7. – P. 441-456.
33. Chenevier P., Mugerli L., Darbe S., Darchy L., DiManno S., Tran P.D., Valentino F., Iannello M., Volbeda A., Cavazza C., Artero, V. Hydrogenase enzymes: application in biofuel cells and inspiration for the design of noble-metal free catalysts for H₂ oxidation. // *C.R. Chimie.* – 2013. – V.16. – №5. – P. 491-505.
34. Cheng X.R., Hau B.Y.H., Endo T., Kerman K. Au nanoparticle-modified DNA sensor based on simultaneous electrochemical impedance spectroscopy and localized surface plasmon resonance. // *Biosens. Bioelectron.* – 2014. – V.53. – P. 513-518.
35. Chouteau C., Dzyadevych S., Chovelon J.M., Durrieu C. Development of novel conductometric biosensors based on immobilised whole cell *Chlorella vulgaris* microalgae. // *Biosens. Bioelectron.* – 2004. – V.19. – №9. – P. 1089–1096.
36. Cinquin P., Gondran C., Giroud F., Mazabrard S., Pellissier A. A glucose biofuel cell implanted in rats // *J. PLoS ONE.* – 2010. – V.5. – №5. – e:10476.
37. Clark L.C., Lyons C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. // *Annals of the New York Academy of Sciences* – 1962. – V.102. – №1. – P. 29-45.
38. Clemente F., Arpaia P., Manna C. Characterization of human skin impedance after electrical treatment for transdermal drug delivery. // *Measurement* – 2013. – V.46. – №9. – P. 3494-3501.
39. Cortina M., Esplandiu M.J., Alegret S., del Valle M. Urea impedimetric biosensor based on polymer degradation onto interdigitated electrodes // *Sens Actuators B* – 2016. – V.118. – №1-2 – P. 84-89.
40. Cosnier S., Le Goff A., Holzinger A. Towards glucose biofuel cells implanted in human body for powering artificial organs: Review. // *Electrochemistry Communications.* – 2014. – V.38. – P. 19-23.

41. Cracknell J.A., Vincent K.A., Fraser A. Enzymes as Working or Inspirational Electrocatalysts for Fuel Cells and Electrolysis. // *Armstrong Chemical Reviews* – 2008. – V.108. – №7. – P. 2439-2461.
42. Curioni M., Scenini F., Monetta T., Bellucci F. Correlation between electrochemical impedance measurements and corrosion rate of magnesium investigated by real-time hydrogen measurement and optical imaging. // *Electrochim. Acta.* – 2015. – V.166. – P. 372-384.
43. Daniels J. S., Pourmand N. Label-free impedance biosensors: Opportunities and challenges. // *Electroanalysis* – 2007. – V.19. – №12. – P. 1239-1257.
44. de Dios A.S., Diaz-Garcia M.E. Multifunctional nanoparticles: Analytical prospects. // *Anal. Chim. Acta.* – 2010. – V. 666. – №1-2. – P. 1-22.
45. De Muyneck C., Pereira C.S.S., Naessens M., Parmentier S., Soetaert W., Vandamme, E.J. The genus *Gluconobacter oxydans*: Comprehensive overview of biochemistry and biotechnological applications. // *Critical Reviews in Biotechnology* – 2007 – V.27. – №3 – P. 147-171.
46. Deng S., Jian G., Lei J., Hu Z., Ju H. A glucose biosensor based on direct electrochemistry of glucose oxidase immobilized on nitrogen-doped carbon nanotubes. // *Biosens. Bioelectron.* – 2009. – V.25. – №2. – P. 373-377.
47. Dharuman V., Grunwald T., Nebling E., Albers J., Blohm L., Hintsche R. Label-free impedance detection of oligonucleotide hybridisation on interdigitated ultramicroelectrodes using electrochemical redox probes. // *Biosens. Bioelectron.* – 2005. – V.21. – №4. – P. 645-654.
48. Ding C., Li H., Hu K., Lin J.-M. Electrochemical immunoassay of hepatitis B surface antigen by the amplification of gold nanoparticles based on the nanoporous gold electrode // *Talanta.* – 2010. – V. 80. – №3. – P. 1385-1391.
49. Dominguez-Benetton X., Sevda S., Vanbroekhoven K., Pant D. The accurate use of impedance analysis for the study of microbial electrochemical systems. // *Chem Soc Rev* – 2012. – V.41. – №21. – P. 7228-7246.
50. D'Orazio P. Biosensors in clinical chemistry. // *Clinica Chimica Acta* – 2003. – V.334. – №1-2. – P. 41-69.
51. Du E., Ha S., Diez-Silva M., Dao M., Suresh S., Chandrakasan A.P. Electric impedance microflow cytometry for characterization of cell disease states // *Lab Chip.* – 2013. – V.13. – №19. – P. 3903-3909.
52. Eggins B.R. Chemical sensors and biosensors. / John Wiley & Sons, 2002. – 300 p.
53. Electrochemical DNA biosensors / M.S. Ozsoz ed. CRC Press, 2012. – 400 p.
54. Falk M., Blum Z., Shleev S. Direct electron transfer based enzymatic fuel cells. // *Electrochim. Acta.* – 2012. – V.82. – P. 191-202.

55. Falk M., Narváez Villarubia C.W., Babanova S., Atanassov P., Shleev S. Biofuel Cells for Biomedical Applications: Colonizing the Animal Kingdom. // *Chem Phys Chem.* – 2013. – V.14. – P. 2045-2058.
56. Fang A.P., Ng H. T., Li S. F. A high-performance glucose biosensor based on monomolecular layer of glucose oxidase covalently immobilised on indium-tin oxide surface. // *Biosens. Bioelectron.* – 2003. – V.19. – №1. – P. 43-49.
57. Fayazfar H., Afshar A., Dolati M., Dolati A. DNA impedance biosensor for detection of cancer, TP53 gene mutation, based on gold nanoparticles/aligned carbon nanotubes modified electrode. // *Anal. Chim. Acta.* – 2014. – V.836. – №26. – P. 34-44.
58. Feng Y., Yang T., Zhang W., Jiang C., Jiao. K. Enhanced sensitivity for deoxyribonucleic acid electrochemical impedance sensor: gold nanoparticle/polyaniline nanotube membranes. // *Anal Chim Acta.* – 2008. – V.616. – №2. – P. 144-151.
59. Filip J., Tkac J. Is graphene worth using in biofuel cells? // *Electrochim. Acta.* – 2014. – V.136. – P. 340-354.
60. Fowler J.M, Wong D.K.Y., Halsall H.B., Heineman W.R. Recent developments in electrochemical immunoassays and immunosensors. In: *Electrochemical Sensors, Biosensors and Their Biomedical Applications* / Zhang X., Ju H., Wang J., Eds.; Elsevier, San Diego – 2008. – P. 115-140.
61. Franks A.E., Nevin K. P. Microbial Fuel Cells, a Current Review. // *Energies* – 2010. – V.3. – P. 899-919.
62. Fredj H.B., Helali S., Esseghaier C., Vonna L., Vidal L., Abdelghani A. Labeled magnetic nanoparticles assembly on polypyrrole film for biosensor applications. // *Talanta* – 2008. – V.75. – №3. – P. 740-747.
63. Gambhir S.S., Dai H., Liu Z., De La Z.A. Enhanced Sensitivity Carbon Nanotubes as targeted Photoacoustic Molecular Imaging Agents. // *US Patent App.* – 2009. – 20,100/074,845.
64. García-Aljaro C., Muñoz-Berbel X., Muñoz F.J. On-chip impedimetric detection of bacteriophages in dairy samples. // *Biosens. Bioelectron.* – 2009. – V.24. – №6. – P. 1712-1716.
65. Ghasemi M., Wan Daud W.R., Hassan S., Eun Oh S., Ismail M. Nano-structured carbon as electrode material in microbial fuel cells: A comprehensive review. // *Journal of Alloys and Compounds* – 2013. – V.580. – P. 245-255.
66. Ghindilis A. L. Direct electron transfer catalysed by enzymes: application for biosensor development. // *Biochem Soc Trans.* – 2000. – V.28. – №2. – P. 84-89.
67. Ghindilis A.L., Atanasov P., Wilkins E. Enzyme-catalyzed direct electron transfer: Fundamentals and analytical applications. // *Electroanalysis.* – 1997. – V.9. – №9. – P. 661-674.

68. Grieshaber D., MacKenzie R., Vörös J., Reimhult, E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. // *Sensors* – 2008. – V.8. – №3. – P. 1400-1458.
69. Gupta A., Singh V. K., Qazi G.N., Kumar A. *Gluconobacter oxydans*: Its Biotechnological applications. // *J Mol. Microbiol. Biotechnol.* – 2001. – V.3. – №3. – P. 445-456.
70. Habib O., Demirkol D. O., Timur S. Sol-gel/chitosan/gold nanoparticle-modified electrode in mediated bacterial biosensor. // *Food Anal. Methods.* – 2012. – V.5. – P. 188–194.
71. Halamkova L., Halámek J., Bocharova V. Implanted biofuel cell operating in a living snail // *J. Am. Chem. Soc.* – 2012. – V.134. – №11. – P. 5040—5043.
72. Hamelers H.V., Ter Heijne A., Sleutels T.H., Jeremiasse A.W., Strik D.P., Buisman C.J. New applications and performance of bioelectrochemical systems. // *Appl Microbiol Biotechnol* – 2010. – V.85. – №6. – P. 1673-1685.
73. Hammond J., Formisano N., Estrela P., Carrara S., Tkac J. Electrochemical Biosensors and Nanobiosensors. // *Essays Biochem.* – 2016. – V.60. – №1. – P. 69–80.
74. Harish K., Neelam R. Enzyme-based electrochemical biosensors for food safety: a review. // *Nanobiosensors in Disease Diagnosis* – 2016. – V.5. – P. 29-39.
75. Harris J. M., Reyes C., Lopez G. P. Common causes of glucose oxidase instability in *in vivo* biosensing: a brief review. // *J. Diabetes Sci. Technol.* – 2013. – V.7. – №4. – P. 1030–1038.
76. He Z., Huang Y., Manohar A.K., Mansfeld F. Effect of electrolyte pH on the rate of the anodic and cathodic reactions in an air-cathode microbial fuel cell. // *Bioelectrochem* – 2008. – V.74. – №1. – P. 78-82.
77. He Z., Mansfeld F. Exploring the use of electrochemical impedance spectroscopy (EIS) in microbial fuel cell studies // *Energy Environ. Sci.* – 2009. – V.2. – P. 215-219.
78. He Z., Wagner N., Minteer S. D., Angenent L. T. An upflow microbial fuel cell with an interior cathode: assessment of the internal resistance by impedance spectroscopy. // *Environ. Sci. Technol.* – 2006. – V.40. – №17. – P. 5212-5217.
79. Heaviside O. The Electrician. P. 212; 23 July 1886 reprinted as Electrical Papers, p64, AMS Bookstore.
80. Hirschorn B., Orazem M. E., Tribollet B., Vivier V., Frateu I., Musiani M. Constant-Phase-Element Behavior Caused by Resistivity Distributions in Films. // *J. Electrochem Soc.* – 2010. – V.157. – №12. – P. 452-457.
81. Hnaïen M., Lagarde F., Bausells J., Errachid A., Jaffrezic-Renault N. A new bacterial biosensor for trichloroethylene detection based on a three-dimensional carbon nanotubes bioarchitecture. // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2011. – V.400. – №4. – P. 1083-1092.

82. Hosseini M.G., Ahadzadeh I. Electrochemical impedance study on methyl orange and methyl red as power enhancing electron mediators in glucose fed microbial fuel cell. // *J Taiwan Inst Chem Eng.* – 2013. – V.44. – №4. – P. 617-621.
83. Hsin Y.L., Hwang K.C., Yeh C.T. Poly(vinylpyrrolidone)-Modified Graphite Carbon Nanofibers as Promising Supports for PtRu Catalysts in Direct Methanol Fuel Cells. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2007. – V.129. – №32. – P.9999–10010.
84. Impedance Spectroscopy. Theory, Experiment and Applications. / Barsoukov E., Macdonald R.J. (Eds.); N.Y., Wiley, 2005 – 595 p.
85. Indzhgiya E., Ponamoreva O., Alferov V., Reshetilov A., Gorton, Lo. Interaction of ferrocene mediators with *Gluconobacter oxydans* immobilized whole cells and membrane fractions in oxidation of ethanol // *Electroanalysis.* – 2012. – V. 24. – № 4. – P. 924 -930.
86. Jacobs C.B., Peairs M.J., Venton B.J. Review: Carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules. // *Anal. Chim. Acta.* – 2010. – V. 662. – №2 – P. 105-127.
87. Jordan J., Ciolkosz M.K. Enzymatic mechanisms and electrontransfer mediation in chronoamperometric biosensors. // *J. Sol. Chem.* – 1991. – V.20. – №10. – P. 995-1000.
88. Kafka J., Pänke O., Abendroth B., Lisdat F. A label-free DNA sensor based on impedance spectroscopy. // *Electrochim. Acta* – 2008. – V.53. – P. 7467-7474.
89. Kahn K, Plaxco K.W. Principles of Biomolecular Recognition. In: *Recognition receptors in biosensors* / Ed: Zourob M.; Springer, New York, 2010. – P. 3-46.
90. Kang X., Wang J., Wu H., Aksay I. A., Liu J., and Lin Y. Glucose oxidase-graphene-chitosan modified electrode for direct electrochemistry and glucose sensing. // *Biosens. Bioelectron.* – 2009. – V.25. – №4. – P. 901-905.
91. Kannan A. M., Renugopalakrishnan V., Filipek S., Li P., Audette G. F., Munukutla L. Bio-Batteries and Bio-Fuel Cells: Leveraging on Electronic Charge Transfer Proteins. // *J Nanosci Nanotechnol.* – 2009. – V.9. – №3. – P. 1665-1678.
92. Karimi A., Othman A., Uzunoglu A., Stanciu L., Andreescu S. Graphene Based enzymatic bioelectrodes and biofuel cells. // *Nanoscale.* – 2015. – V.7. – №16. – P. 6909-6923.
93. Karyakin A. A., Gitelmacher O. V., Karyakina E. E. A high-sensitive glucose amperometric biosensor based on Prussian Blue modified electrodes // *Anal. Lett.* – 1994. – V.27. – №15. – P. 2861-2869.
94. Kashyap D., Dwivedi P.K., Pandey J.K., Kim Y.H., Kim G.M., Sharma A., Goel S. Application of electrochemical impedance spectroscopy in bio-fuel cell characterization: A review. // *Int J Hydrogen Energy* – 2014. – V.39. – №35. – P. 20159-20170.

95. Katrlík J., Vostiar I., Sefcovicová J., Tkac J., Mastihuba V., Valach M., Stefuca V., Gemeiner P. A novel microbial biosensor based on cells of *Gluconobacter oxydans* for the selective determination of 1,3-propanediol in the presence of glycerol and its application to bioprocess monitoring. // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2007. – V.388. – №1. – P. 287-295.
96. Katrlík J., Vostiar I., Sefcovicová J., Tkác J., Mastihuba V., Valach M., Stefuca V., Gemeiner P. Novel microbial biosensor based on cells of *Gluconobacter oxydans* for the selective determination of 1,3-propanediol in the presence of glycerol and its application to bioprocess monitoring. // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2011. – V.388. – P. 287-295.
97. Katz E., Willner I. A biofuel cell with electrochemically switchable and tunable power output. // *J Am Chem Soc.* – 2003. – V.125. – №22. – P. 6803-6813.
98. Katz E., Willner I. Probing Biomolecular Interactions at Conductive and Semiconductive Surfaces by Impedance Spectroscopy: Routes to Impedimetric Immunosensors, DNA-Sensors, and Enzyme Biosensors. // *Electroanalysis.* – 2003. – V.15. – №11. – P. 913-947.
99. Kelly R.G., Scully J.R., Shoesmith D., Buchheit R.G. Electrochemical techniques in corrosion science and engineering (1st edn.). CRC Press, 2002 – 440 p.
100. Kim J., Parkey J., Rhodes C., Gonzalez-Martin A. Development of a biofuel cell using glucose-oxidase- and bilirubin-oxidase-based electrodes. // *J. Solid State Electrochem.* – 2009. – V.13. – №7. – P. 1043-1050.
101. Kim J.R., Premier G.C., Hawkes F.R., Dinsdale R.M., Guwy A.J. Development of a tubular microbial fuel cell (MFC) employing a membrane electrode assembly cathode. // *J Power Sour* – 2009. – V.187. – №2. – P. 393-399.
102. Kim M., Hyun M. S., Gadd G. M., Kim H. J. A novel biomonitoring system using microbial fuel cells. // *J Environ Monit.* – 2007. – V.9. – №12. – P. 1323-1328.
103. Kim T., Kang J., Lee J.-H., Yoon J. Influence of attached bacteria and biofilm on double-layer capacitance during biofilm monitoring by electrochemical impedance spectroscopy. // *Water Res.* – 2011. – V.45. – №15. – P. 4615-4622.
104. Kim T., Kang J., Lee J.H., Yoon J. Influence of attached bacteria and biofilm on double-layer capacitance during biofilm monitoring by electrochemical impedance spectroscopy. // *Water Res.* – 2011. – V.45. – №15. – P. 4615-4622.
105. Kim T.H., Lee S.H., Lee J., Song H.S., Oh E.H., Park T.H., Hong S. Single-Carbon-Atomic-Resolution Detection of Odorant Molecules using a Human Olfactory Receptor-based Bioelectronic Nose // *Advanced Materials.* – 2009. – V.21. – №1. – P. 91-94.

106. Kim Y., Shin S.J., Chang I.S., Moon S.-H. Characterization of uncharged and sul sulfonated porous poly(vinylidene fluoride) membranes and their performance in microbial fuel cells. // *J Membr. Sci.* – 2014. – V.463. – P. 205-214.
107. Kumar S., Acharya S.K. 2,6-Dichloro-phenol indophenol prevents switch-over of electrons between the cyanide-sensitive and –insensitive pathway of the mitochondrial electron transport chain in the presence of inhibitors. // *Anal. Biochem.* – 1999. – V.268. – №1. – P. 89-93.
108. Kuznetsov B.A., Shumakovich G. P., Koroleva O. V., Yaropolov A. I. On applicability of laccase as label in the mediated and mediatorless electroimmunoassay: effect of distance on the direct electron transfer between laccase and electrode. // *Biosens. Bioelectron.* – 2001. – V.16. – №1-2. – P. 73-84.
109. Kyle U.G., Bosaeus I., De Lorenzo A.D., Deurenberg P., Elia M., Gómez J.M., Heitmann B.L., Kent-Smith L., Melchior J.-C., Pirlich M., Scharfetter H., Schols A. M., Pichard C.. Bioelectrical impedance analysis—part I: review of principles and methods // *Clinical Nutrition.* — 2004. — V. 23. – №5. — P. 1226–43.
110. Lasia A. Electrochemical impedance spectroscopy and its applications. In: *Modern Aspects of Electrochemistry. Volume 32.* / Conway B.E., Bockris J., White R.E., Eds.; Kluwer Academic/Plenum Pub., New York, 1999, – P. 143-248.
111. Laurent F., Grosogeat B., Reclaru L., Dalard F., Lissac M. Comparison of corrosion behaviour in presence of oral bacteria. // *Biomaterials* – 2001. – V.22 – №16. – P. 2273-2282.
112. Leca-Bouvier B.D., Blum L.J. Enzyme for Biosensing Applications. In: *Recognition receptors in biosensors* / Ed: Zourob M.; Springer, New York, 2010. – P. 177-220.
113. Lei Y., Chen W., Mulchandani, A. Microbial biosensors. // *Anal. Chim. Acta.* – 2006. – V.568. – P. 200-210.
114. Lepage G., Albernaz F.O., Perrier G., Merlin G. Characterization of a microbial fuel cell with reticulated carbon foam electrodes. // *Bioresour Technol* – 2008. – V.124. – P. 199-207.
115. Lewis J.E., Tannenbaum S.L., Gao J., Melillo A.B., Long E.G., Alonso Y., Konefal J., Woolger J.M., Leonard S., Singh P.K., Chen L., Tiozzo E. Comparing the Accuracy of ES-BC, EIS-GS, and ES Oxi on Body Composition, Autonomic Nervous System Activity, and Cardiac Output to Standardized Assessments. // *Med Devices (Aukcl).* – 2011. – V.4. – №26. – P. 169-177.
116. Li R.D., Wang Q., Yin B.C., Ye B.C. Enzyme-free detection of sequence-specific microRNAs based on nanoparticle-assisted signal amplification strategy. // *Biosens. Bioelectron.* – 2016. – V.77. – P. 995-1000.

117. Li W.W., Sheng G.P., Liu X.W., Cai P.J., Sun M., Xiao X., Wang Y.K., Tong Z.H., Dong F., Yu H.Q. Impact of a static magnetic field on the electricity production of shewanella-inoculated microbial fuel cells. // *Biosens. Bioelectron.* – 2011. – V.26. – №10. – P. 3987-3992.
118. Li Y., Chen S.M., Sarawathi R. Membraneless enzymatic biofuel cells based on multi-walled carbon nanotubes. // *Int. J. Electrochem. Sci.* – 2011. – V.6. – №26. – P. 3776-3788.
119. Lim J.W., Ha D., Lee J., Lee S.K., Kim T. Review of micro/nanotechnologies for microbial biosensors. // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2015. – 3:61.
120. Lin J., He C., Zhang L., Zhang S. Sensitive amperometric immunosensor for a-fetoprotein based on carbon nanotube/gold nanoparticle doped chitosan film. // *Anal. Biochem.* – 2009. – V. 384. – №1 – P. 130-135.
121. Lin Y., Tanaka S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2006. – V.69. – №6. – P. 627-642.
122. Liu A., Wang K., Weng S., Lei Y., Lin L., Chen W., Lin X. Development of electrochemical DNA biosensors. // *Trends Anal. Chem.* – 2012. – V.37. – №26. – P. 101-111.
123. Liu H., Cheng S.A., Logan B.E. Power generation in fed-batch microbial fuel cells as a function of ionic strength, temperature, and reactor configuration. // *Environ Sci Technol* – 2005. – V.39. – №14. – P. 5488-5493.
124. Liu H., Song C., Zhang L., Zhang J., Wang H., Wilkinson D.P. A review of anode catalysis in the direct methanol fuel cell. // *Journal of Power Sources* – 2006. – V.155. – №2. – P. 95-110.
125. Liu J.J., Li H., Zhang F., Li X., Wang L., Chen Y. Online impedance monitoring of yeast cell culture behaviours // *Microel. Eng.* – 2011. – V.88. – №8. – P. 1711-1713.
126. Liu Y., Zhao Y., Sun B., Chen C. Understanding the toxicity of carbon nanotubes. // *Acc Chem Res.* – 2013. – V.46. – №3. – P. 702-713.
127. Logan B.E. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2009. – V.7. – №5. – P. 375-381.
128. Logan B.E., Hamelers B., Rozendal R., Schröder U., Keller J., Freguia S., Aelterman P., Verstraete W., Rabaey K. Microbial fuel cells: methodology and technology. // *Environ Sci Technol.* – 2006. – V.40. – №17. – P. 5181-5192.
129. Logan B.E., Regan J.M. Microbial fuel cells--challenges and applications. *Environ Sci Technol* – 2008. – V.40. – P. 5172-5180.
130. Lowe C.R. Biosensors. // *Trends Biotechnol.* – 1984. – V.2. – №3. – P. 59-65.
131. Lowe R.S. Overview of Biosensor and Bioarray Technologies. In: *Handbook of Biosensors and Biochips* / Marks R.S., Lowe C.R., Cullen D.C., Weetall H.H., Karube I., Eds.; John Wiley & Sons, Weinheim – 2007. – P. 7-22.

132. Luz R. A. S., Pereira A. R., de Souza J. C. P., Sales F. C. P. F., Crespilho F. N. Enzyme Biofuel Cells: Thermodynamics, Kinetics and Challenges in Applicability. // *ChemElectroChem*. – 2008. – V.1. – P. 1751-1777.
133. Macauley S., McNeil B., Harvey L.M. The Genus *Gluconobacter* and Its Applications in Biotechnology // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 2001. – V.21. – №1. – P. 1-25.
134. Macdonald D.D. A Brief History of Electrochemical Impedance Spectroscopy. // *Elec. Soc. S.* – 2002. – P. 72-88.
135. Macdonald D.D. Reflections on the history of electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochim. Acta* – 2006. – V.51. – №8-9. – P. 1376-1388.
136. MacDonald J. A., Degenhardt T., Baynes J. W., Storey K. B. Glycation of wood frog (*Rana sylvatica*) hemoglobin and blood proteins: In vivo and in vitro studies // *Cryobiology*. – 2009. – V.59. – №2. – P. 223-225.
137. Macdonald J. R. Impedance Spectroscopy. // *Ann Biomed Eng.* – 1992. – V.20. – №3. – P. 289-305.
138. MacVittie K., Halamek J., Halamkova L., Southcott M., Jemison W.D., Lobel R., Katz E. From “cyborg” lobsters to a pacemaker powered by implantable biofuel cells. // *Energy Environ. Sci.* – 2013. – V.6. – P. 81-86.
139. Makarychev-Mikhailov S., Shvarev A., Bakker A. New trends in ion-selective electrodes. In: *Electrochemical sensors, Biosensors and their biomedical applications* / Zhang X., Ju H., Wang J., Eds.; Elsevier: San Diego. – 2008. – P. 71-109.
140. Manohar A., Bretschger O., Nealon K., Mansfeld F. The use of electrochemical impedance spectroscopy (EIS) in the evaluation of the electrochemical properties of a microbial fuel cell. // *Bioelectrochem.* – 2008. – V.72. – №2. – P. 149-154.
141. Mansfeld F. The interaction of bacteria and metal surfaces. // *Electrochim. Acta* – 2007. – V.52. – №27. – P. 7670-7680.
142. Marsili E., Baron D.B., Shikhare I.D., Coursolle D., Gralnick J.A., Bond D.R. Shewanella secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. // *Proc Natl Acad Sci U S A* – 2008. – V.105. – №10. – P. 3968-3973.
143. Martin E., Tartakovsky B., Savadogo O. Cathode materials evaluation in microbial fuel cells: A comparison of carbon, Mn₂O₃, Fe₂O₃ and platinum materials. // *Electrochim. Acta* – 2011. – V.58. – P. 58-66.
144. Mateo C., Palomo J.M., Fernandez-Lorente G., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. // *Enzym. Microb. Technol.* – 2007. – V.40. – P. 1451–1463.

145. Meredith M.T., Minter S. D. Biofuel cells: enhanced enzymatic bioelectrocatalysis. // *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* – 2012. – V.5. – P. 157-179.
146. Mohamed Sikkander A. Electrochemical biosensors-A Review. // *Annalen der Chemischen Forschung*. – 2014. –V.2. – №1. – P. 36-40.
147. Mohanakrishna G., Krishna Mohan S., Venkata Mohan S. Carbon based nanotubes and nanopowder as impregnated electrode structures for enhanced power generation: evaluation with real field wastewater. // *Appl Energy* – 2012. – V.95. – P. 31-37.
148. Mohanty S.P., Kougianos E. Biosensors: A tutorial review. // *IEEE Potentials*. – 2006. – V.25. – P. 35-40.
149. Mokhtarian N., Ramli D., Rahimnejad M., Najafpour G.D. Bioelectricity generation in biological fuel cell with and without mediators. // *World Appl. Sci. J.* – 2012. – V.18. – №4. – P. 559-567.
150. Mondal S., Sangaranarayanan M.V. Novel non-enzymatic sensor for urea using a polypyrrole-coated platinum electrode. // *Sens Actuators B* – 2013. – V.177. – P. 478-486.
151. Moreno-Garrido J. Microalgal immobilization methods. // *Methods Mol Biol.* – 2013. – V.1051. – P. 327-347.
152. Moreno-Hagelsieb L., Foutier B., Laurent G., Pampin R., Remacle J., Raskin J.P., Flandre D. // *Biosens. Bioelectron.* – 2007. – V.22. – №9-10. – P. 2199-2207.
153. Muñoz-Berbel X., Godino N., Laczka O., Baldrich E., Xavier M.F., Javier D.C.F. Impedance-Based Biosensors for Pathogen Detection. In: *Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems* / Zourob M., Elwary S., Turner A., Eds; Springer, New York, 2008. – P. 341-370.
154. Myler S., Collyer S.D., Davis F., Gornall D.D., Higson S.P. Sonochemically fabricated microelectrode arrays for biosensors. Part III. AC impedimetric study of aerobic and anaerobic response of alcohol oxidase within polyaniline. // *Biosens. Bioelectron.* – 2005. – V.21. – №4. – P. 666-671.
155. Nelson D. L., Cox M. M. Lehninger Principles of Biochemistry. W. H. Freeman; 4th edition, 2004. – 1100 p.
156. Newman J. D., Turner, A. P. F. Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. // *Biosens. Bioelectron.* – 2005. –V.20. – №. 12. – P. 2435-2453.
157. Newman J., Setford S. Enzymatic biosensors. // *Molecular Biotechnology*. – 2006. – V. 32. – №3. – P. 249-268.
158. Okuda J., Sode K. PQQ glucose dehydrogenase with novel electron transfer ability // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2004. – V.314. – №3. – P. 793-797.

159. Oliveira M.D., Andrade C.A., Correia M.T., Coelho L.C., Singh P.R., Zeng X. Impedimetric biosensor based on self-assembled hybrid cystein-gold nanoparticles and CramoLL lectin for bacterial lipopolysaccharide recognition. // *J Colloid Interface Sci.* – 2011. – V.362. – №1. – P. 194-201.
160. Orazem M.E., Tribollet B. *Electrochemical Impedance Spectroscopy*, 2nd edition. John Wiley & Sons Inc, 2017, – 673 p.
161. Padmaraj D., Pande R., Miller J.H., Wosik J., Zagozdzon-Wosik W. Mitochondrial Membrane Studies Using Impedance Spectroscopy with Parallel pH Monitoring. // *PLoS ONE* – 2014. – V.9. – №7. – e101793.
162. Park M., Tsai S.L., Chen W. Microbial Biosensors: Engineered Microorganisms as the Sensing Machinery. // *Sensors.* – 2013. – V.13. – №5. – P. 5777-5795.
163. Park S.-M., Yoo J.-S. Electrochemical impedance spectroscopy for better electrochemical measurements. // *Anal. Chem.* – 2003. – V.75. – №21. – P. 455-461
164. Pei X., Zhang B., Tang J., Liu B., Lai W., Tang D. Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: A review. // *Anal. Chim. Acta.* – 2013. - V. 758. – P. 1-18.
165. Pejcic B., De Marco R. Impedance spectroscopy: over 35 years of electrochemical sensor optimization. // *Electrochim. Acta* – 2006. – V.51. – P. 6217–6229
166. Peng H., Soeller C., Cannell M.B., Bowmaker G.A., Cooney R.P., Travas-Sejdic J. Electrochemical detection of DNA hybridization amplified by nanoparticles. // *Biosens. Bioelectron.* – 2006. – V.21. – №9. – P. 1727-1736.
167. Perumal V., Hashim U. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. // *Journal of Applied Biomedicine* – 2014. – V.12. – №1. – P. 1-15.
168. Pethig R., Markx G.H. Applications of dielectrophoresis in biotechnology. // *Trends Biotechnol.* – 1997. – V.15. – №10 – P. 426–432.
169. Potter M. On the difference of potential due to the vital activity of microorganisms // *Proc. Univ. Durham Phil.* – 1910. – V.3. – P.245-249.
170. Pourmand N., Karhanek M., Persson H. H. J., Webb C. D., Lee T. H., Zahradnikova A., Davis R. W. Direct electrical detection of DNA synthesis. // *PNAS* – 2006. – V.103. – №17. – P. 6466-6470.
171. Prodromidis M.I. Impedimetric immunosensors: A review. // *Electrochim. Acta* – 2010. – V.55. – P. 4227-4233.
172. Qi P., Zhang D., Wan Y. Determination of sulfate-reducing bacteria with chemical conversion from ZnO nanorods arrays to ZnS arrays // *Sens Actuators B.* – 2013. – V.181. – P. 274-279.

173. Rabaey K. Biofuel Cells Select for Microbial Consortia That Self-Mediate Electron Transfer. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – V.70. – №9. – P. 5373-5382.
174. Rahimnejad M., Adhami A., Darvari S., Zirepour A., Oh S.-E. Microbial fuel cell as new technology for bioelectricity generation: A review. // *Alexandria Eng. J.* – 2015. – V.54. – №3. – P. 745-756.
175. Rahman M.M., Saleh Ahammad A. J., Jin J.H., Ahn S.J., Lee J.J. A Comprehensive Review of Glucose Biosensors Based on Nanostructured Metal-Oxides. // *Sensors* – 2010. – V.10. – №5. – P. 4855-4886.
176. Ramasamy R.P., Gadhamshetty V., Nadeau L.J., Johnson G.R. Impedance spectroscopy as a tool for non-intrusive detection of extracellular mediators in microbial fuel cells. // *Biotechnol Bioeng.* – 2009. – V.104. – №5. – P. 882-891.
177. Ren Z., Ramasamy R.P., Cloud-Owen S.R., Yan H., Mench M.M. Time-course correlation of biofilm properties and electrochemical performance in single-chamber microbial fuel cells. // *Bioresour Technol.* – 2011. – V.102. – №1. – P. 416-421.
178. Reshetilov A.N. Microbial, enzymatic, and immune biosensors for ecological monitoring and control of biotechnological processes. // *Applied Biochemistry and Microbiology* – 2005. – V.41. – №5. – P. 442-449.
179. Ricelli A., Baruzzi F., Solfrizzo M., Morea M., Fanizzi F. P. Biotransformation of patulin by *Gluconobacter oxydans*. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. – V.77. – P. 785-792.
180. Rodrigues R.C., Ortiz C., Berenguer-Murcia A., Torres R., Fernández-Lafuente, R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. // *Chem. Soc. Rev.* – 2013. – V.42. – №15. – P. 6290–6307.
181. Rother C., Nidetzky B. Enzyme Immobilization by Microencapsulation: Methods, Materials, and Technological Applications. In: *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*. / John Wiley & Sons, 2010. – P. 1–21.
182. Roy J.N., Luckarift H.R., Lau C., Falase A., Garcia K.E. A study of the flavin response by *Shewanella* cultures in carbon-limited environments. // *RSC Advances* – 2012. – V.2. – №26. – P. 10020-10027.
183. Ruiz G.A, Felice C.J. Electrochemical-Fractal Model versus Randles Model: A Discussion about Diffusion Process. // *Int. J. Electrochem. Sci.* – 2015. – V.10. – P. 8484-8496.
184. Rutkove S.B. Electrical impedance myography: background, current state, and future directions. // *Muscle Nerve* – 2009. – V.40. – №6. – P. 936–946.

185. Sahebamei H., Abdolmaleki P., Ghanati F. Effects of magnetic field on the antioxidant enzyme activities of suspensioncultured tobacco cells. // *Bioelectromagnetics*. – 2007. – V.28. – №1. – P. 42-47.
186. Sayed E.T., Saito Y., Tsujiguchi T., Nakagawa N. Catalytic activity of yeast extract in biofuel cell. // *J. of Bioscience and Bioengineering* – 2012. – V.115. – №5. – P. 521-525.
187. Schröder U. From In Vitro to In Vivo-Biofuel Cells Are Maturing // *Angewandte Chem. Int. Ed.* – 2012. – V.5. – P. 7370-7372.
188. Sefcovicová J., Tkac J. Application of nanomaterials in microbial-cell biosensor constructions. // *Chemical Papers*. – 2015. – V.69. – №1. – P. 42-53.
189. Sekar N., Ramasamy R.P. Electrochemical Impedance Spectroscopy for Microbial Fuel Cell Characterization. // *J Microb Biochem Technol* – 2013. – V.6. – №2.
190. Shamsipur M., Asgari M., Maragheh M.G., Moosavi-Movahedi A.A. A novel impedimetric nanobiosensor for low-level determination of hydrogen peroxide based on biocatalysis of catalase // *Bioelectrochemistry*. – 2012. – V.83. – №26. – P. 31-37.
191. Shan D., Zhang J., Xue H.-G., Ding S.-N., Cosnier S. Colloidal laponite nanoparticles: extended application in direct electrochemistry of glucose oxidase and reagentless glucose biosensing. // *Biosens. Bioelectron.* – 2010. – V.25. – P. 1427-1433.
192. Sheldon R.A. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. // *Adv. Synth. Catal.* – 2007. – V.349. – P. 1289–1307.
193. Shen H., Zhang .L, Liu M., Zhang Z. Biomedical Applications of Graphene. // *Theranostics*. – 2012. – V.2. – №3. – P.283-294.
194. Shervedani, R.K.; Mehrjardi, A.H.; Zamiri, N. A Novel Method for Glucose Determination Based On Electrochemical Impedance Spectroscopy Using Glucose Oxidase Self-Assembled Biosensor. *Bioelectrochemistry* 2006, 69, 201–208.
195. Sievers M. Swings J. *Gluconobacter*. In: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. / John Wiley & Sons, 2015. P. 1-9.
196. Smart S., Cassady A., Lu G., Martin D. The biocompatibility of carbon nanotubes. // *Carbon* – 2006. – V.44. – №6. – P. 1034-1047.
197. Srikanth S., Marsili E., Flickinger M.C., Bond D.R. Electrochemical characterization of geobacter sulfurreducens cells immobilized on graphite paper electrodes. // *Biotechnol Bioeng* – 2008. – V.99. – №5. – P. 1065-1073
198. Stein N. E., Hamelers H. M. V., van Straten G., Keesman K. J. On-line detection of toxic components using a microbial fuel cell-based biosensor // *Journal of Process Control*. – 2012. – V. 22. – №9. – P. 1755-1761.

199. Su L., Jia W., Hou C., Lei Y. Microbial biosensors: A review. // *Biosens. Bioelectron.* – 2011. – V.26. – №5. – P. 1788-1799.
200. Sun J., Li W., Li Y., Hu Y., Zhang Y. Redox mediator enhanced simultaneous decolorization of azo dye and bioelectricity generation in air-cathode microbial fuel cell. // *Bioresour Technol.* – 2013. – V.142. – P. 407-414.
201. Sun J.-Z., Kingori G.P., Si R.W., Zhai D.D., Liao Z.H. Sun D.Z., Zheng T., Yong Y.C. Microbial fuel cells-based biosensors for environmental monitoring: a review. // *Water Sci Technol.* – 2015. – V.71. – №6. – P. 801-809.
202. Švitel J., Tkáč J., Voštiar I., Navrátil M., Štefuca V., Bučko M., Gemeiner P. *Gluconobacter* in biosensors: applications of whole cells and enzymes isolated from *Gluconobacter* and *Acetobacter* to biosensor construction // *Biotechnology Letters.* – 2006. – V. 28. – №24. – P. 2003-2010.
203. Švitel J., Tkáč J., Voštiar I., Navrátil M., Štefuca V., Bučko M., Gemeiner P. *Gluconobacter* in biosensors: applications of whole cells and enzymes isolated from *Gluconobacter* and *Acetobacter* to biosensor construction. // *Biotechnology Letters.* – 2006. – V. 28. – №24. – P. 2003-2010.
204. Szczupak A., Halamek J., Halamkova L., Bocharova V., Alfonta L., Katz E. Living battery – biofuel cells operating in vivo in clams. // *Energy Environ. Sci.* – 2012. – V.5. – P. 8891-8895.
205. Tersch C., Lisdat F. Label-free detection of protein–DNA interactions using electrochemical impedance spectroscopy // *Electrochim. Acta.* – 2011. – V.56. – №22. – P. 7673-7679.
206. Tkac J., Svitel J., Vostiar I., Navratil M., Gemeiner P. Membrane-bound dehydrogenases from *Gluconobacter sp.*: Interfacial electrochemistry and direct bioelectrocatalysis. // *Bioelectrochemistry* – 2009. – V.76. – P. 53-62.
207. Turner, A. P. F. Biosensors: sense and sensibility. // *Chem. Soc. Rev.* – 2013. V. 42. – P. 3184-3196.
208. Vashist S. K., Luong J. H. T. Recent advances in electrochemical biosensing schemes using graphene and graphene-based nanocomposites // *Carbon.* – 2015. – V. 84. – P. 519-550.
209. Vasilyeva N.V., Tsfasman I.M., Kudryakova I.V., Suzina N.E., Shishkova N.A., Kulaev I.S., Stepnaya O.A. The role of membrane vesicles in secretion of *Lysobacter sp.* bacteriolytic enzymes // *J Mol Microbiol Biotechnol.* – 2013. – V.23. – № 1 – 2. – p.142 – 151.
210. Vielstich W. Cyclic voltammetry. In: *Handbook of fuel cells.* John Wiley & Sons, Ltd, 2010.
211. Virdis B., Freguia S., Rozendal R.A., Rabaey K., Yuan Z., Keller J. Microbial Fuel Cells. In: *Treatise on water science* / Ed: P.A. Wilderer, Elsevier Science, Amsterdam, Netherlands, 2011 – P. 641-665.
212. von Stetten F., Kerzenmacher S., Lorenz A., Chokkalingam V., Miyakawa N., Zengerle R., Ducreé J.. A One-Compartment, Direct Glucose Fuel Cell For Powering Long-Term Medical Implants. //

- Proc. 19th IEEE Int'l Conf. Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 06)*. – 2006. – IEEE Press. – P. 934–937.
213. Wang J. Electrochemical glucose biosensors. // *Chem. Rev.* – 2008. – V.108. – №2. – P. 814–825.
214. Wang J., Zheng Y., Jia H., Zhang H. Bioelectricity generation in an integrated system combining microbial fuel cell and tubular membrane reactor: Effects of operation parameters performing a microbial fuel cell-based biosensor for tubular membrane bioreactor // *Bioresource Technology*. – 2014. – V. 170. – P. 483-490.
215. Wang P, Liu Q. Cell-based biosensors: Principles and Applications. // Artech House, Norwood – 2010. – 271 p.
216. Wang Y., Xu H., Zhang J., Li G. Electrochemical Sensors for Clinic Analysis. // *Sensors* – 2008. – V.8. – №26. – P. 2043-2081.
217. Wen D., Eychmüller A. Enzymatic Biofuel Cells on Porous Nanostructures. // *Small*. – 2016. – V.12. – №34. – P. 4649-4661.
218. Witte C., Lisdat F. Direct Detection of DNA and DNA-Ligand Interaction by Impedance Spectroscopy // *Electroanalysis*. – 2011. – V.23. – №2. – P. 339-346.
219. Wrighton K.C., Thrash J.C., Melnyk R.A., Coates J.D. Evidence for Direct Electron Transfer by a Gram-Positive Bacterium Isolated from a Microbial Fuel Cell. // *Appl Environ Microbiol.* – 2011. – V.77. – №21. – P. 7633-7639.
220. Wu Y., Hu S. Biosensors based on direct electron transfer in redox proteins. // *Microchim Acta* – 2007. – V.159. – P. 1-17.
221. Xu X., Ying Y. Microbial biosensors for environmental monitoring and food analysis. // *Food Reviews International*. – 2011. – V.27. – №3. – P. 300-329.
222. Yang L., Bashir R. Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. // *Biotechnology Advances* – 2008. – V. 26. – №2. – P. 135-150.
223. Yin Y., Huang G., Tong Y., Liu Y., Zhang L. Electricity production and electrochemical impedance modeling of microbial fuel cells under static magnetic field. // *J Power Sources* – 2013. – V.237. – P. 58-63.
224. Yin Y., Lu Y., Wu P., Cai C. Direct Electrochemistry of Redox Proteins and Enzymes Promoted by Carbon Nanotubes. // *Sensors (Basel)*. – 2005. – V.5. – №4. – P. 220-234.
225. Yoo E.H., Lee S.Y. Glucose biosensors: an overview of use in clinical practice. // *Sensors* – 2011. – V.10. – №5. – P. 4558 – 4576.
226. You S., Zhao Q., Zhang J., Liu H., Jiang J., Zhao S. Increased sustainable electricity generation in up-flow air-cathode microbial fuel cells. // *Biosens Bioelectron* – 2008. – V.23. – №7. – P. 1157-1160.

227. Yuan Y., Zhou S., Liu Y., Tang J. Nanostructured macroporous bioanode based on polyaniline-modified natural loofah sponge for high-performance microbial fuel cells. // *Environ Sci Technol.* – 2013. – V.47. – №24. – P. 14525-14532
228. Yuhashi N., Tomiyama M., Okuda J. Development of a novel glucose enzyme fuel cell system employing protein engineered PQQ glucose dehydrogenase // *Biosens. Bioelectron.* – 2005. – V.20. – №10. – P. 2145-2150.
229. Zebda A., Cosnier S., Alcaraz J.-P., Holzinger M., Le Goff A., Gondran C., Cinquin P. Single Glucose Biofuel Cells Implanted in Rats Power Electronic Devices. // *Sci Rep.* – 2013. – V.3. – P. 1516.
230. Zhang Y., Sun J., Hou B., Hu Y. Performance improvement of air-cathode single-chamber microbial fuel cell using a mesoporous carbon modified anode. // *J Power Sources* – 2011. – V.196. – №18. – P. 7458-7464.
231. Zhang Y., Sun J., Hu Y., Li S., Xu Q. Bio-cathode materials evaluation in microbial fuel cells: A comparison of graphite felt, carbon paper and stainless steel mesh materials. // *Int J Hydrogen Energy* – 2012. – V.37. – №22. – P. 16935-16942.
232. Zhao C., Gai P., Song R., Chen Y., Zhang J., Zhu J.-J. Nanostructured material-based biofuel cells: recent advances and future prospects // *Chem. Soc. Rev.* – 2017. – V.46. – №5. – P. 1545-1564.
233. Zhao F., Harnisch F., Schröder U., Scholz F., Bogdanoff P., Herrmann I. Application of pyrolysed iron (II) phthalocyanine and CoTMPP based oxygen reduction catalysts as cathode materials in microbial fuel cells. // *Electrochem. Comm.* – 2005. – V.7. – P. 1405-1410.
234. Zhao F., Slade R. C., Varcoe J.R. Techniques for the study and development of microbial fuel cells: an electrochemical perspective. // *Chem Soc Rev.* – 2009. – V.38. – №7. – P. 1926-1939.
235. Zhao X.S., Bao X.Y., Guo W., Lee F.Y. Immobilizing catalysts on porous materials. // *Materials Today.* – 2006. – V.9. – №3 – P. 32-39.
236. Zhou M., Chi M., Luo J., He H., Jin T. An overview of electrode materials in microbial fuel cells. // *J Power Sources* – 2011. – V.196. – №10. – P. 4427-4435.
237. Алферов В.А., Василов Р.Г., Решетилов А.Н. Биотопливные элементы на основе наноуглеродных материалов // *РЭНСИТ.* – 2014. – Т.6. – №2. – С.187-208.
238. Понаморева О.Н., Решетилов А.Н., Алферов В.А. Биосенсоры. Принципы функционирования и практическое применение. / Тула: Издательство Тульского государственного университета, 2007. – 255 с.
239. Понаморева О.Н., Решетилов А.Н., Алферов В.А., Арляпов В.А., Бабкина Е.Е., Алферов С.В. Биосенсоры и биотопливные элементы. Учебное пособие для студентов. / Тула: Издательство Тульского государственного университета, 2012. – 207 с.: ил.

240. Решетилов А.Н., Емец В.В., Ключев А.Н., Решетилова Т.А., Васильев Р.Г. Электрохимическая импедансная спектроскопия в применении к исследованиям микробных биотопливных элементов. // *Вестник биотехнологии*. – 2013. – Т.9. – №4. – С.52-59.
241. Решетилов А.Н., Китова А.Е., Мачулин М.В., Тарасов С.Е., Гуторов М.А., Алферов С.В., Колесов В.В., Готовцев П.М., Васильев Р.Г. Биосенсор на основе клеток *Gluconobacter* и терморасширенного графита // *Сенсорные системы*. – 2016. – Т.30. – №4. – С. 351-354.
242. Решетилов А.Н., Плеханова Ю.В., Тарасов С.Е., Китова А.Е., Колесов В.В., Утешев В.К., Васильев Р.Г. Живая батарея – микробный биотопливный элемент, функционирующий в организме травяной лягушки *Rana temporaria* // *Вестник биотехнологии*. – 2015. – Т.11. – №2. – С. 5-10.
243. Решетилов А.Н., Плеханова Ю.В., Тарасов С.Е., Арляпов В.А., Колесов В.В., Гуторов М.А., Готовцев П.М., Васильев Р.Г. Влияние некоторых углеродных наноматериалов на окисление этилового спирта бактериальными клетками *Gluconobacter oxydans*. // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2017а. – Т.53. – №1. – С. 1-8.
244. Решетилов А.Н., Плеханова Ю.В., Тарасов С.Е., Быков А.Г., Гуторов М.А., Алферов С.В., Тенчурин Т.Х., Чвалун С. Н., Орехов А. С., Шепелев А.Д. Готовцев П.М., Васильев Р.Г. Оценка свойств биоэлектродов на основе углеродных высокодисперсных материалов, содержащих модельные микроорганизмы *Gluconobacter*. // *Российские нанотехнологии*. – 2017б. – Т.12. – №1-2. – С. 83-89.
245. Степная О.А., Кудрявцева А.И., Северин А.И., Крупянко В.И., Козловский А.Г., Кулаев И.С. Ферменты бактериолитического препарата лизоамидаза. Некоторые свойства бактериолитической протеиназы Л2. // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 1992. – Т.28. – №5. – С.666-672.
246. Стойнов З.Б., Графов Б.М., Савова-Стойнова Б., Елкин В.В. Электрохимический импеданс. / М.: Наука, 1991. – 336 с.
247. Тарасов С.Е., Емец В.В., Гуторов М.А., Решетилов А.Н. Импедансная спектроскопия в современных электрохимических ДНК-биосенсорах // *Вестник биотехнологии*. – 2014. – Т.10. – №3. – С. 43-49.
248. Тарасов С.Е., Плеханова Ю.В., Быков А.Г., Васильева Н.В., Кудрякова И.В., Валиахметов А.Я., Решетилов А.Н. Регистрация процессов разрушения клеток и их мембран методом импедансной спектроскопии. // *Известия ТулГУ. Естественные науки*. – 2017а. – Т.3. – С. 12-22.

249. Тарасов С.Е., Плеханова Ю.В., Решетиллов А.Н. Применение импедансной спектроскопии для исследования характеристик биосенсоров и биотопливных элементов. // *Вестник биотехнологии*. – 2017б. – Т.13. – №1. – С. 63-71.
250. Э. Тёрнер, И. Карубе, Дж. Уилсон. Биосенсоры. Основы и приложения. / Москва: Мир, 1992. – 615 с.
251. Электроаналитические методы. Теория и практика. / под ред. Ф. Шольца. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2006. – 326 с.