

РОЗРОБЛЕННЯ ПРОЦЕДУРИ МУЛЬТИБІОСЕНСОРНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ І ПЕСТИЦИДІВ У ДОВКІЛЛІ

О. О. Солдаткін¹
О. С. Павлюченко²
О. Л. Кукла²
В. М. Архипова^{1,2}
С. В. Дзядевич¹

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

²Інститут фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова
НАН України, Київ

E-mail: alex_sold@yahoo.com, kukla@isp.kiev.ua

У роботі застосовували потенціометричний мультибіосенсор з низкою іммобілізованих ензимів та матриці іоноселективних польових транзисторів як перетворювачів біохімічного сигналу на електричний. Спочатку було перевірено інгібіторний вплив окремих токсикантів та їх сумішей на біоселективні елементи мультибіосенсора. Виходячи з отриманих результатів та використовуючи методи математичної обробки даних, запропонували нову методику мультибіосенсорного аналізу. За цією процедурою проведено ряд експериментів із визначення токсичних речовин у водних зразках різного походження. Проведено порівняння одержаних даних із результатами стандартних традиційних методів аналізу токсичних речовин (атомної абсорбційної спектроскопії, тонкошарової хроматографії та атомно-абсорбційного аналізатора ртуті). Показано кореляцію результатів, отриманих мультибіосенсорним і традиційними методами.

Ключові слова: мультибіосенсор, іоноселективні польові транзистори, ензими, інгібіторний аналіз, пестициди, іони важких металів.

Останнім часом необхідність охорони довкілля та перевірки якості харчових продуктів і питної води потребує дедалі ширшого використання в практиці високочутливих, селективних, швидких та економічних методів аналізу. Поряд з існуючими фізико-хімічними інструментальними методами можна застосовувати новітні біоелектронні аналітичні пристрої — біосенсори, що їх активно розробляють у світі протягом останніх десятиліть.

У багатьох випадках біосенсорний моніторинг токсичних речовин демонструє високу чутливість і може бути основою для відносно простої і дешевої процедури аналізу. Перевагою біосенсорних систем є те, що вони забезпечують аналіз значної кількості зразків у реальному режимі часу і їх можна використовувати в польових умовах. Біосенсорні методи можуть бути рекомендовані також для розробки тестових систем разового використання.

На цей час вже розроблено низку ензимних біосенсорів для аналізу токсикантів у

водних зразках: ацетилхолінестерази (АцХЕ) використовували для визначення пестицидів [1–4] і α -анатоксинів [5, 6], лактатдегідрогеназу — для аналізу пентахлорофенолу [7], целобіаздегідрогеназу — для дослідження фенольних похідних [7], глутатіон-S-трансферазу — для визначення каптану [8], уреазу — ртуті [9], карбоксилестеразу — селену [10]. На додаток до аналізу ртуті уреазу застосовували для визначення міді й кадмію в річковій воді [11]. Інші автори перевіряли систему з розчинною інвертазою та глюкозним амперометричним біосенсором для визначення ртуті в натуральних і стічних водах [12]. Вони показали інгібування інвертази іншими макро- та мікрокомпонентами, які потенціально можуть бути присутні в зразках навколишнього середовища. Також було розроблено оптичний біосенсор на основі АцХЕ для визначення параоксону та каптану у водних зразках [13]. У роботі [14] було описано триензимний емнісний сенсор для визначення іонів важких металів. Низку біосенсорів на основі

ензимного інгібіторного аналізу використовували також для визначення пестицидів в екстрактах ґрунту, включаючи біосенсор на основі АцХЕ [15], карбоксилестерази [10], альдегіддегідрогенази [16] та уреази і глутаматдегідрогенази [17].

Незважаючи на значну активність, спрямовану на розроблення біосенсорів на основі ензимного інгібіторного аналізу, аналітичне застосування їх залишається обмеженим. Це пов'язано з тим, що більшість із розроблених біосенсорів не здатні розрізняти різні токсичні речовини в одному й тому самому зразку. Наприклад, біосенсори на основі холінестераз є чутливими як до пестицидів, так і до іонів важких металів. Відповідно, одночасна присутність іонів важких металів і пестицидів не дає змоги визначати специфічний аналіт з необхідною точністю.

На сьогодні значні зусилля дослідників спрямовані на вирішення цих проблем шляхом створення мультибіосенсорів у поєднанні з методами математичної статистики та штучних нейронних сіток. Ці методи можуть бути ефективними для аналізу складних сумішей із застосуванням певного набору біоселективних елементів мультибіосенсора, які демонструють різні за величиною відгуки до різних аналітів.

У попередніх роботах нами розроблено лабораторний прототип мультибіосенсора для екологічного моніторингу [18, 19]. Було підібрано оптимальні умови для одночасної роботи біоселективних елементів на основі ацетилхолінестерази, уреази, бутирилхолінестерази, глюкозооксидази та триензимної системи — інвертази, мутаротази, глюкозооксидази у складі мультисенсора на основі рН-чутливих польових транзисторів та детально досліджено їхні основні аналітичні характеристики.

Метою цієї роботи є дослідження інгібіторного впливу окремих токсикантів і їх сумішей на ензимні системи у складі мультибіосенсора, проведення математичного аналізу за отриманими експериментальними даними та спроба використання розробленого мультибіосенсора для аналізу реальних водних зразків на наявність у них токсикантів.

Матеріали і методи

Матеріали

У дослідженнях використовували препарати ліофілізованих ензимів: уреазу з бобів сої активністю 31 од.акт./мг фірми Fluka (Швейцарія); ацетилхолінестеразу (АцХЕ)

з електричного вугра (426 од.акт./мг) фірми Sigma-Aldrich Chemie (США); бутирилхолінестеразу (БуХЕ) із сироватки крові коня (13 од. акт./мг) фірми Sigma-Aldrich Chemie (США); глюкозооксидазу (ГОД) із *Penicillium vitale* (130 од. акт/мг) фірми «Діагностикум» (Львів, Україна); інвертазу з пекарських дріжджів (355 од. акт./мг) фірми Sigma-Aldrich Chemie (США); мутаротазу з нирки свині (100 од.акт./мг) фірми Biozyme Laboratories Ltd (Велика Британія). Бичачий сироватковий альбумін (БСА, фракція V) та 50% -й водний розчин глутарового альдегіду (ГА) отримали від фірми Sigma-Aldrich Chemie (США). Як субстрати використовували сечовину, бутирилхолінілхлорид (БуХ), ацетилхолінілхлорид (АцХ), глюкозу та сахарозу, як робочий буфер — фосфатний розчин ($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$). Сполуки для приготування буфера та інші неорганічні сполуки, застосовані в роботі, були вітчизняного виробництва й мали ступінь чистоти «х. ч.» та «ч. д. а.».

Виготовлення біоселективних елементів мультибіосенсора

Для виготовлення робочих біоселективних елементів на основі АцХЕ, БуХЕ, уреазу та ГОД готували розчини із суміші 10% ензиму та 10% БСА, а для триензимної системи — таку суміш: 6% інвертази, 6% мутаротази, 5% глюкозооксидази та 3% БСА (далі — триензимний розчин). Наважки ензимів розчиняли в 40 мМ фосфатному буфері, рН 6,5, з 20% -м гліцеролом. Суміш для референтної мембрани готували так само, але замість ензимів брали тільки БСА, кінцева концентрація якого становила 20%. Перед нанесенням на поверхні перетворювачів приготувані розчини (для референтної і робочих мембран) змішували з 2% -м водним розчином глутарового альдегіду у співвідношенні 1:1. Отримані розчини відразу наносили на робочі частини перетворювачів за допомогою мікропіпетки до повного покриття робочої поверхні транзисторів; об'єм кожної із мембран — близько 0,1 мкл. Усі мембрани мали однаковий загальний вміст протеїну. Після нанесення мембрани висушували протягом 1 год на повітрі за кімнатної температури. Перед початком роботи мембрани відмивали буферним розчином від надлишку нез'язаного ГА.

Мультибіосенсорна лінійка

Загальною топологічною особливістю розроблюваних конструкцій рН-польового транзистора (рН-ПТ), що орієнтовані на ро-

боту в біоаналітичних лабораторіях, є необхідність забезпечення вільного та зручного доступу до активної чутливої (затворної) ділянки сенсорних елементів для нанесення на них біоселективного елемента. Для таких елементів використано рознесення активної ділянки затвора і металевих контактних площин на різні частини кристалу, що забезпечує, з одного боку, зручність доступу до активних ділянок транзисторів, а з другого — надійність ізоляції електричних контактів від розчину. Схематичну конструкцію типової багатоканальної сенсорної лінійки, що складається з 6 рН-чутливих польових транзисторів, подано на рис. 1. Кремнієві лінійки інтегральних рН-ПТ сенсорів були виготовлені на НВО «Квазар», м. Київ.

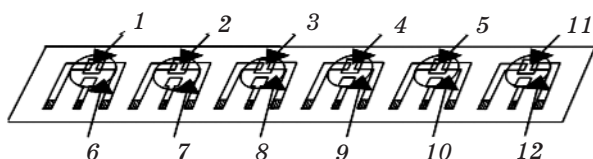


Рис. 1. Сенсорна лінійка з рН-чутливими польовими транзисторами (1–5) з іммобілізованими на поверхнях затворів шарами ензимів (6–10), останнім є референтний транзисторний перетворювач (11) із нейтральним шаром з БСА (12).

Мультисенсорний прилад

Застосовували мультисенсорний прилад з інтегральним сенсорним масивом (12 каналів) на основі іоноселективних (рН-чутливих) польових транзисторів (ІСПТ) (рис. 2).

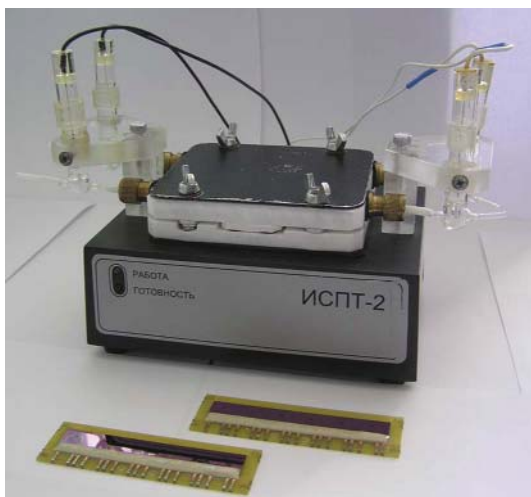


Рис. 2. Зовнішній вигляд мультисенсорного приладу

Робота приладу ґрунтується на формуванні багатовимірного відгуку масиву електрохімічних сенсорів на основі ІСПТ із рН-

чутливим шаром нітриду кремнію. Сигналом відгуку кожного із сенсорів є зміна поверхневого потенціалу на межі розподілу підзатворний діелектрик — електроліт, яка вимірюється за допомогою багатоканального сенсорного перетворювача в режимі підтримки фіксованого струму каналу ІСПТ. Багатовимірний сигнал, отриманий від масиву сенсорів, далі обробляють за допомогою спеціальних математичних методів, при цьому формується унікальний хімічний образ зразка досліджуваної рідини.

Методика вимірювань

Виміри проводили у 2 мМ фосфатному буфері, рН 6,5, за кімнатної температури, з використанням проточної системи вимірювання. Концентрацію субстратів змінювали додаванням до робочого буфера порцій стандартних концентрованих вихідних розчинів субстратів. Інактивацію біоселективних елементів проводили експозицією мультибіосенсорного чипа протягом 20 хв у розчинах водних зразків різного походження. Мультибіосенсорний аналіз реальних зразків здійснювали за вимірювальними протоколами, що їх детально описано далі. Для цього в низці водоймищ м. Києва було відібрано проби води. Крім того, у кілька проб додали певну кількість токсичних речовин. Також для аналізу було взято водні зразки з полігону твердих побутових відходів № 5 в с. Підгірці Обухівського р-ну Київської обл. Усі водні зразки використовували без будь-якої попередньої підготовки.

Зразки було протестовано в Інституті екології та токсикології ім. Л. І. Медведя МОЗ України на наявність токсичних речовин. Дослідження проводили за допомогою традиційних методів визначення токсикантів (атомно-абсорбційна спектроскопія, тонкошарова хроматографія та атомно-абсорбційний аналізатор ртуті).

Мультибіосенсорні дослідження здійснювали щонайменше із 3-кратним повторенням. Неспецифічні зміни вихідного сигналу, пов'язані з коливаннями температури, рН середовища та електричними наводками, усували використовуючи диференційний режим вимірювань.

Результати та обговорення

Першим етапом роботи було дослідження інгібіторного впливу модельних зразків окремих токсикантів та їх сумішей на ензиматичні системи в складі мультибіосенсора. Отримані експериментальні величини

інгібування ензиматичних систем різними концентраціями токсикантів та різноманітними варіантами їх сумішей наведено в табл. 1. Ці дані було проаналізовано за допомогою методів математичної статистики з метою відпрацювання підходів кількісного або напівкількісного визначення токсикантів під час роботи з реальними зразками доквілля.

Використанам в експерименті ензимам притаманна виражена селективність принаймні до деяких з інгібіторів. У табл. 2 наведено умовні рівні афінності цих ензимів до окремих інгібіторів. Зазначені рівні

розділили на три категорії за таким принципом: «++» — значення відгуку біоселективного елемента на 1 мМ інгібітору перевищує 80%; «+» — значення відгуку менше 80%, але більше 20%; «-» — значення відгуку менше 20%.

Як впливає з таблиці, лише два ензими з п'яти інгібуються пестицидами, при цьому БуХЕ чутливіша до пестицидів і слабо інгібується іонами важких металів. Загалом ця селективність виявляється і за дії сумішей інгібіторів — ензими, що мають селективність до пестицидів, демонструють відгуки більшої величини на суміші з більшою концентрацією пестицидів.

Таблиця 1. Інгібіторний вплив токсичних речовин та їх сумішей на біоселективні елементи мультибіосенсора (100% відповідає повному інгібуванню, відносна похибка вимірювань — 8%)

Інгібітор	Ступінь інгібування біоселективних елементів, %				
	Уреаза	БуХЕ	АцХЕ	ГОД	Триензимна система
1	2	3	4	5	6
1 мкМ трихлорфон	0	15	0	0	0
10 мкМ трихлорфон	0	50	5	0	0
50 мкМ трихлорфон	0	70	25	0	0
1 мМ трихлорфон	0	100	85	0	0
10 мМ трихлорфон	0	100	100	0	0
1 мкМ карбофуран	0	25	5	0	0
10 мкМ карбофуран	0	70	25	0	0
100 мкМ карбофуран	0	100	50	0	0
2 мМ карбофуран	0	100	100	0	10
1 мкМ Ag ⁺	0	0	5	15	11
10 мкМ Ag ⁺	0	3	25	60	65
50 мкМ Ag ⁺	10	7	70	100	99
0,2 мкМ Hg ²⁺	0	0	0	0	5
1 мкМ Hg ²⁺	4	0	0	10	22
10 мкМ Hg ²⁺	25	3	10	50	70
50 мкМ Hg ²⁺	65	7	70	90	100
10 мкМ Cu ²⁺	10	0	0	0	0
50 мкМ Cu ²⁺	30	0	0	0	5
200 мкМ Cu ²⁺	70	0	15	10	30
10 мкМ Cd ²⁺	12	0	0	0	5
50 мкМ Cd ²⁺	65	0	15	10	30
200 мкМ Cd ²⁺	100	0	40	40	70
Суміш 1	12	85	80	90	100
Суміш 2	20	100	80	70	75
Суміш 3	0	100	60	40	50
Суміш 4	50	60	30	45	80
Суміш 5	40	80	40	30	55
Суміш 6	0	100	40	5	15
Суміш 7	40	60	7	15	30
Суміш 8	45	5	35	70	70
Суміш 9	30	100	100	100	100

Продовження табл. 1

1	2	3	4	5	6
Суміш 10	0	75	40	30	25
Суміш 11	0	100	40	15	10
Суміш 12	0	60	20	5	5
Суміш 13	0	60	10	0	0
Суміш 14	5	75	20	35	45
Суміш 15	5	50	15	35	50

Примітка. Суміш 1 — 6 мкМ Hg²⁺ + 8 мкМ Ag⁺ + 53 мкМ трихлорфон; суміш 2 — 9 мкМ Cd²⁺ + 12 мкМ Ag⁺ + 50 мкМ карбофуран; суміш 3 — 5 мкМ Ag⁺ + 85 мкМ карбофуран + 13 мкМ трихлорфон; суміш 4 — 23 мкМ Cd²⁺ + 5 мкМ Hg²⁺ + 10 мкМ трихлорфон; суміш 5 — 25 мкМ Cu²⁺ + 5 мкМ Hg²⁺ + 150 мкМ трихлорфон; суміш 6 — 0,5 мкМ Hg²⁺ + 10 мкМ карбофуран + 10 мкМ трихлорфон; суміш 7 — 50 мкМ Cu²⁺ + 1 мкМ Hg²⁺ + 5 мкМ трихлорфон; суміш 8 — 15 мкМ Cd²⁺ + 15 мкМ Cu²⁺ + 15 мкМ Ag⁺; суміш 9 — 25 мкМ Hg²⁺ + 25 мкМ Ag⁺ + 50 мкМ трихлорфон + 50 мкМ карбофуран; суміш 10 — 2 мкМ Cd²⁺ + 2,5 мкМ Ag⁺ + 10 мкМ карбофуран; суміш 11 — 1 мкМ Ag⁺ + 17 мкМ карбофуран + 2,5 мкМ трихлорфон; суміш 12 — 0,25 мкМ Ag⁺ + 4 мкМ карбофуран + 0,75 мкМ трихлорфон; суміш 13 — 0,1 мкМ Hg²⁺ + 2 мкМ карбофуран + 2 мкМ трихлорфон; суміш 14 — 1,25 мкМ Hg²⁺ + 1,25 мкМ Ag⁺ + 2,5 мкМ трихлорфон + 2,5 мкМ карбофуран; суміш 15 — 1,25 мкМ Hg²⁺ + 1,6 мкМ Ag⁺ + 10 мкМ трихлорфон.

Таблиця 2. Умовні рівні афінності використаних ензимних систем до токсикантів

Ензимна система	Трихлорфон	Карбофуран	Ag ⁺	Hg ²⁺	Cu ²⁺	Cd ²⁺
Уреаза	–	–	++	++	++	++
БуХЕ	++	++	+	+	–	–
АХЕ	++	++	++	++	+	++
ГОД	–	–	++	++	+	++
Триензимна система	–	–	++	++	++	++

Для оцінки можливості якісного аналізу невідомих сумішей за допомогою розглянутого набору ензимів дані експерименту було проаналізовано методом головних компонент [20] (рис.3).

На отриманій діаграмі ми спостерігаємо певну кореляцію між розташуванням позначки, що відповідає суміші інгібіторів, і позначок, які відповідають окремим компонентам цієї суміші. Таким чином можна зробити попередній висновок про можливість якісного аналізу складу сумішей інгібіторів за принципом відносного вмісту іонів важких металів або пестицидів («більше-менше») за допомогою даного набору ензимів.

Кількісний аналіз досліджуваних сумішей, проте, є значно важчим завданням, ніж розглянутий вище якісний аналіз. Розглянемо отримані нами відгуки різних каналів мультибіосенсора на окремі токсиканти та їх суміші в різних співвідношеннях (табл. 1). У даному разі нам доводиться мати справу з рядом труднощів, а саме:

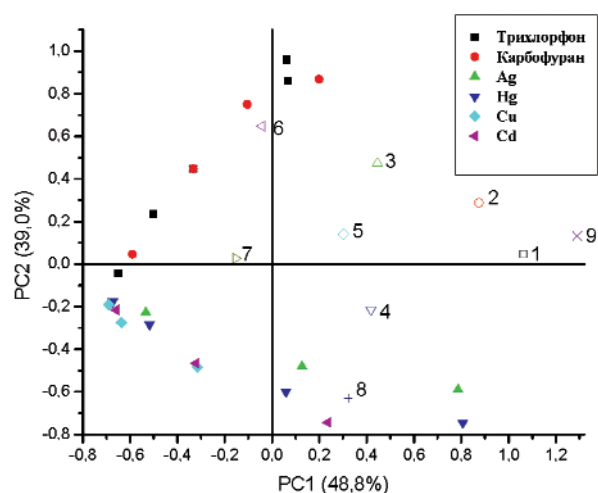


Рис. 3. Графічне подання експериментальних даних на площині двох головних компонент. Цифрами позначено тестові суміші інгібіторів, що їх наведено в табл. 1

– кількість токсичних компонентів у суміші може бути більшою, ніж кількість наявних біоселективних елементів (розглянуто 6 токсикантів і лише 5 датчиків для їх детектування);

– концентраційні залежності мають явно виражену нелінійність із насиченням. Фактично це означає, що якщо відгуки деяких ензимних систем на суміш інгібіторів близькі до 100%, то інформаційна цінність цих відгуків знижується, оскільки немає жодної можливості визначити, яким саме з інгібіторів було спричинено насичення. Якщо близькі до 100% відгуки на яку-небудь суміш інгібіторів мають місце для більшості ензимів, то кількісний аналіз складу такої суміші стає практично неможливим;

– не виконується принцип адитивності для відгуків на суміші інгібіторів, тобто відгуки ензимних систем, нормально не чутливих до пестицидів, мають значно більшу величину відгуків на суміші, що містять як пестициди, так й іони важких металів, що можна було б очікувати за незалежної дії інгібіторів;

– калібрувальні криві концентраційної залежності для відгуків на іони срібла й іони ртуті практично збігаються для більшості використаних ензимів, тобто визначити роздільні концентрації цих інгібіторів за одночасної їх присутності в розчині за допомогою цих ензимів неможливо.

Таким чином, основні труднощі пов'язані насамперед з насиченням відгуків, а також з незадовільним розрізненням (близькістю концентраційних залежностей) відгуків на різні інгібітори. Для часткового усунення цих труднощів та проведення кількісного аналізу необхідно вдаватися до так званих процедур регуляризації, тобто спеціальної обробки вихідних даних. Суть цієї обробки полягає в «розтягуванні» відгуків за допомогою інтерполяції на ділянку більших концентрацій. Замість нелінійної експонентної моделі для формування концентраційних залежностей відгуків було використано лінійну регресію, де відгук кожного ензиму описується залежністю виду: $r = kc$, де c — концентрація інгібітору, k — коефіцієнт, характерний для кожної пари фермент-інгібітор. Формально значення відгуків може бути більше 100%.

Оскільки експериментально визначені концентраційні залежності для іонів срібла і ртуті практично збігалися для чотирьох ензимів із п'яти, ці інгібітори в подальшому аналізі вважали одним аналітом (AgHg); коефіцієнт k для нього було отримано ліній-

ною регресією за всіма наявними відгукими на іони срібла і ртуті. Таку саму процедуру було виконано для пестицидів, які також надалі вважали одним аналітом (PE). Відповідно, простір концентрацій аналітів було скорочено до чотиривимірного.

Для вирішення зворотної задачі (тобто кількісного визначення складу суміші на основі наявних експериментальних відгуків) використовували лінійну модель у припущенні незалежної дії різних інгібіторів у суміші на кожен з ензимів, тобто відгук i -го ензиму визначається як

$$r_{sum,i} = k_{1i}r_{1i} + k_{2i}r_{2i} + \dots + k_{ni}r_{ni},$$

де r_{ji} — відгук i -го ензиму на j -й інгібітор; вагові коефіцієнти k_{ji} визначали з калібрувальних концентраційних залежностей. Для отриманої матриці K коефіцієнтів розраховувалась псевдообернена матриця K^+ методом розкладення за сингулярними числами [21]. Якість отриманого оберненого перетворення оцінювали, визначаючи склад сумішей за наявними відгукими, при цьому формальні значення, більші за 100%, було одержано шляхом розведення тестових сумішей з відповідним масштабуванням отриманих відгуків.

Розрахунок за лінійною моделлю дав позитивні оцінки концентрацій AgHg і PE, однак розрізнення впливів Cu і Cd на відгуки майже не здійснювалося. Тому вихідну кількість компонентів у сумішах було скорочено до таких — AgHg, CdCu та PE. Правило додавання концентрацій було визначено експериментально: $[AgHg] = [Ag] + [Hg]$, $[PE] = [\text{карбофуран}] + [\text{трихлорфон}]$, $[CdCu] = [Cd] + [Cu]/3,32$. Розраховані таким чином очікувані концентрації інгібіторів у модельних сумішах порівнювали з дійсними концентраціями складових сумішей (табл. 3).

Таблиця 3. Порівняння реальних складових сумішей з розрахованими у моделі лінійного змішування

Суміш №	Розрахований склад суміші, мкМ			Реальний склад суміші, мкМ		
	Ag та Hg	Cd та Cu	Пестициди	Ag та Hg	Cd та Cu	Пестициди
1	20	3	47	14	0	53
2	6	19	74	12	9	50
3	3	0	228	5	0	98
4	5	30	11	5	23	10
5	3	25	15	5	7,5	150
6	1	0	57	0,5	0	20
7	1	23	11	1	15	5
8	5	27	1	15	19,5	0
9	75	8	287	50	0	100

Як впливає з наведених у таблиці даних, точність аналізу не дуже висока, оскільки запропонована модель з очевидністю не враховує всіх особливостей взаємодії компонентів суміші з ферментом. Проте навіть такий відносно нескладний аналіз дозволяє робити наближені кількісні оцінки, принаймні це стосується співвідношення концентрацій різних груп інгібіторів у розчині.

Таким чином, проведений математичний аналіз дає змогу зробити висновок, що розроблений мультибіосенсор уможливує проведення принаймні якісного аналізу сумішей інгібіторів невідомого складу. Можливий також кількісний аналіз з прийнятною точністю у разі виконання таких умов:

- одержання формальних значень відгуків, що перевищують 100% інгібування;
- подальше редукування простору аналізованих величин до трьох (Ag та Hg, інші важкі метали, пестициди);
- використання в методиці процедур розведення та фільтрування з повторним проведенням аналізу.

Наступним етапом було розроблення методики проведення досліджень токсичних речовин у реальних зразках лабораторним прототипом мультибіосенсора. Схематичний вигляд алгоритму такого дослідження подано на рис. 4. Методика проведення аналізу починається з відбору зразків із водоймищ, які нас цікавлять. Потім отримують відгуки біоселективних елементів до та після інкубації мультибіосенсора у водному зразку. Якщо жоден з біоселективних елементів не піддався інгібуванню навіть на 5%, то можна вважати, що досліджуваний зразок не має у своєму складі токсичних речовин. В іншому разі потрібно профільтрувати аналізовану речовину, аби позбавитись

можливого механічного впливу великодисперсних частинок зразка на ферментні мембрани (інтерферентний вплив). Після фільтрації знову отримують відгуки біоселективних елементів до та після інкубації мультибіосенсора у фільтрованому зразку. Якщо інгібування не підтверджується, то такий зразок вважається нетоксичним. У разі, коли біоселективні елементи мультибіосенсора інгібуються на 5–90%, результати обробляють за допомогою математичних методів. Якщо ж хоч одна ферментна система мультибіосенсора інгібується більше ніж на 90%, зразок слід розводити, після чого знову отримують відгуки біоселективних елементів до та після інкубації мультибіосенсора у розведеному зразку. Таку процедуру розведення виконують доти, доки результат інгібування не потрапляє в межі від 5 до 90%.

У результаті аналізу, проведеного за розробленою методикою, можна визначити кількісний склад токсикантів у зразку або яка саме група токсичних речовин присутня в зразку, а також, який саме традиційний метод аналізу слід використати для подальшого точного визначення токсикантів.

З метою перевірки роботи розробленого мультибіосенсора було вирішено проаналізувати реальні водні зразки на наявність у них токсичних речовин. Для цього в низці водоймищ м. Києва було відібрано проби води. Окрім того, у кілька проб додали певну кількість токсичних речовин для перевірки, на яку величину збільшаться рівні інгібування біоселективних елементів мультибіосенсора та як це відповідає реальним концентраціям доданих токсикантів. Також було перевірено можливість використання мультибіосенсора в аналізі багатокомпонентних складних зразків. Тому крім згаданих вище зразків для аналізу взяли водні

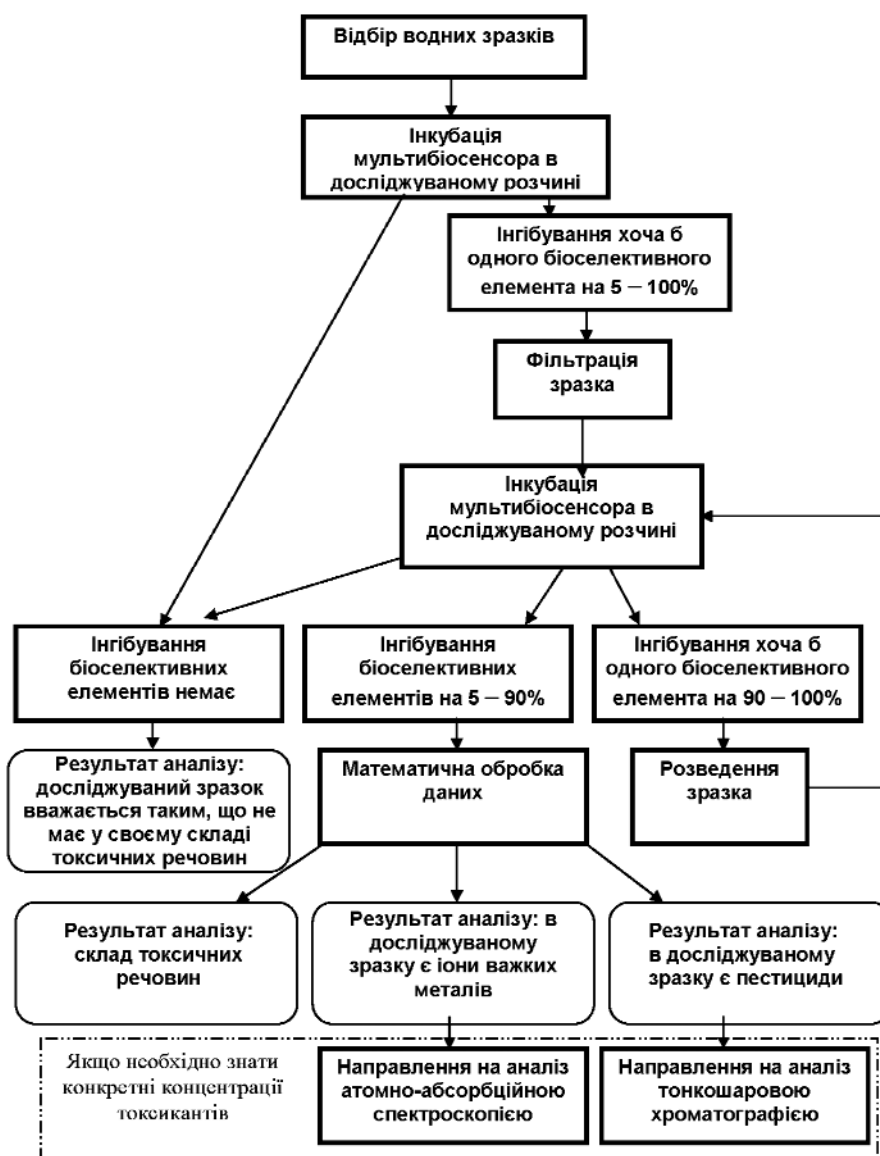


Рис. 4. Схема проведення аналізу водних зразків мультибіосенсором

зразки з полігону твердих побутових відходів № 5 у селі Підгірці Обухівського району Київської області.

Спочатку всі використані в роботі зразки було протестовано в Інституті екогігієни та токсикології ім. Л. І. Медведя МОЗ України на наявність токсичних речовин. Дослідження проводили за допомогою традиційних методів визначення токсикантів (атомно-абсорбційна спектроскопія, тонкошарова хроматографія та атомно-абсорбційний аналізатор ртуті).

Результати порівняння традиційних та мультибіосенсорного методів подано в табл. 4. Аналізуючи дані, отримані за допомогою традиційних методів, можна відзначити високу кореляцію результатів з результатами, отриманими мультибіосенсором. Як і очіку-

валось, перевищення допустимих концентрацій було виявлено в зразках, в які навмисно було додано відповідні аліквоти токсикантів, — це перевищення по ртуті (рядок 2), по міді (рядок 6) та по трихлорфону (рядок 4). В усіх інших зразках з водоймищ м. Києва, як це показано і за допомогою мультибіосенсора, наявності небезпечних концентрацій токсикантів не зафіксовано. Також за допомогою традиційних методів було зареєстровано перевищення ГДК по міді, кобальту, цинку та хрому, і відсутність ртуті та пестицидів (рядок 13), що повністю збігається з даними, одержаними мультибіосенсором.

Результати аналізу всіх розглянутих водних проб, отримані традиційними методами визначення токсикантів, підтверджують і результати, одержані за допомогою мультибіосенсора.

Таблиця 4. Порівняння різних методів аналізу реальних зразків довкілля

№	Місце відбору	Традиційні методи, мг/л			Мультибіосенсорний метод		
		АААНг ²⁺	ААС	ТХ			
1	о. Вирлиця (Позняки, Київ)	–	–	–	–	–	–
2	о. Вирлиця + 400 нМ Нг ²⁺	0,079	–	–	+	–	–
3	р. Дніпро (Осокорки, Київ)	–	–	–	–	–	–
4	р. Дніпро + 10 мкМ трихлорфон	–	–	2,57	–	–	+
5	о. Сонячне (Осокорки, Київ)	–	–	–	–	–	–
6	о. Сонячне + 5 мкМ Сu ⁺²	–	0,321(Cu ²⁺)	–	–	+	–
7	о. Міністерське (Оболонь, Київ)	–	–	–	–	–	–
8	о. Опечень (Оболонь, Київ)	–	–	–	–	–	–
9	о. Опечень нижня (Оболонь, Київ)	–	–	–	–	–	–
10	о. Вербне (Оболонь, Київ)	–	–	–	–	–	–
11	р. Дніпро (затока Оболонь, Київ)	–	–	–	–	–	–
12	р. Дніпро (Оболонь, Київ)	–	–	–	–	–	–
13	Полігон побутових відходів №5, село Підгірці Обухівського р-ну Київської обл.	–	0,317(Cu ²⁺) 0,034(Co ²⁺) 1,471(Zn ²⁺) 0,988(Cr ²⁺)	–	–	++	–

Примітка. АААНг²⁺ — атомно-абсорбційний аналізатор ртуті; ААС — атомно-абсорбційна спектроскопія; ТХ — тонкошарова хроматографія; «+» — перевищення ГДК; «++» — перевищення ГДК на декілька порядків.

Таким чином, досліджено інгібіторний вплив окремих токсикантів та їх сумішей на ензиматичні системи у складі мультибіосенсора та здійснено математичний аналіз і оброблення отриманих експериментальних даних. Проведено низку експериментів із визначення токсикантів у реальних водних зразках з водоймищ м. Києва та полігону побутових відходів № 5. Дослідження виконували за допомогою мультибіосенсора та традиційних методів визначення токсичних речовин. Проведено порівняння отриманих даних та показано високу кореляцію одержаних результатів.

Розроблений варіант мультибіосенсора та запропонована методика визначення токсикантів можуть бути основою під час розроблення та налагодження промислового випуску вимірювальних приладів для визначення певних пестицидів та іонів важких металів.

Автори щиро вдячні співробітникам Інституту екогігієни і токсикології ім. Л. І. Медведя МОЗ України за проведену роботу з дослідження токсичності зразків за допомогою традиційних методів аналізу.

Частину роботи виконано завдяки фінансовій підтримці НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми «Сенсорні системи для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб» та УНТЦ в рамках проекту № 4591 «Development of enzyme multisensor arrays for ecological monitoring of toxins».

ЛІТЕРАТУРА

1. *Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P., Korpan Y. I. et al.* Biosensors based on enzyme field-effect transistors for determination of some substrates and inhibitors // *Anal. Bioanal. Chem.* — 2003. — V. 377, N 3. — P. 496–506.
2. *Jeanty G., Wojciechowska A., Marty J.-L.* Flow-injection amperometric determination of pesticides on the basis of their inhibition of immobilized acetylcholinesterases of different origin // *Ibid.* — 2002. — V. 373, N 8. — P. 691–695.
3. *Bachmann T. T., Leaca B., Vilatte F. et al.* Improved multianalyte detection of organophosphates and carbamates with disposable multielectrode biosensors using recombinant mutants of *Drosophila* acetylcholinesterase and artificial neural networks // *Biosens. Bioelectr.* — 2000. — V. 15, N 3–4. — P. 193–201.
4. *Joshi K. A., Tang J., Haddon R. et al.* A disposable biosensor for organophosphorus nerve agents based on carbon nanotubes modified thick film strip electrode // *Electroanalysis.* — 2005. — V. 17, N 1. — P. 54–58.
5. *Vilatte F., Schulze H., Schmid R. D., Bachmann T. T.* A disposable acetylcholinesterase-based electrode biosensor to detect anatoxin-a(s) in water // *Anal. Bioanal. Chem.* — 2002. — V. 372, N 2. — P. 322–326.
6. *Devic E., Li D., Dauta A. et al.* Detection of anatoxin-a(s) in environmental samples of cyanobacteria by using a biosensor with engineered acetylcholinesterases // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2002. — V. 68, N 8. — P. 4102–4106.
7. *Young, S. J., Hart J. P., Dowman A. A., Cowell D. C.* The nonspecific inhibition of enzymes by environmental pollutants: a study of model system toward the development of electrochemical biosensor arrays // *Biosens. Bioelectr.* — 2001. — V. 16, N 9–12. — P. 887–894.
8. *Choi J.-W., Kim Y.-K., Song S.-Y. et al.* Optical biosensor consisting of glutathione-S-transferase for detection of captan // *Ibid.* — 2003. — V. 18, N 12. — P. 1461–1466.
9. *Krawczynski vel Krawczyk T., Mosszyczynska M., Trojanowicz M.* Inhibitive determination of mercury and other metal ions by potentiometric urea biosensor // *Ibid.* — 2000. — V. 15, N 1–2. — P. 681–691.
10. *Saritha K., Kumar N. V. N.* Qualitative detection of selenium in fortified soil and water samples by a paper chromatographic—carboxyl esterase enzyme inhibition technique // *J. Chromatogr. A.* — 2001. — V. 919, N 1. — P. 223–228.
11. *Tsai H. C., Doong R. A.* Simultaneous determination of pH, urea, acetylcholine and heavy metals using array-based enzymatic optical biosensor // *Biosens. Bioelectr.* — 2005. — V. 20, N 9. — P. 1796–1804.
12. *Trojanowicz M., Compagnone D., Goncalves C. et al.* Limitations in the analytical use of invertase inhibition for the screening of trace mercury content in environmental samples // *Anal. Sci.* — 2004. — V. 20, N 6. — P. 899–904.
13. *Choi J.-W., Kim Y.-K., Lee I.-H. et al.* Optical organophosphorus biosensor consisting acetyl cholinesterase/viologen hetero Langmuir-Blodgett film // *Biosens. Bioelectr.* — 2001. — V. 16. — P. 937–943.
14. *Kukla A. L., Kanjuk N. I., Starodub N. F., Shirshov Yu. M.* Multienzyme electrochemical sensor array for determination of heavy metal ions // *Sens. Actuat. B.* — 1999. — V. 57. — P. 213–218.
15. *Guerrieri A., Monaci L., Quinto M., Palmisano F. A.* Disposable amperometric biosensor for rapid screening of anticholinesterase activity in soil extracts // *Analyst.* — 2002. — V. 127. — P. 5–7.
16. *Noguer T., Balasoiu A. M., Avramescu A., Marty J. L.* Development of disposable biosensor for the detection of metam-sodium and its metabolite MITC // *Anal. Lett.* — 2001. — V. 34, N 4. — P. 513–528.
17. *Rodriguez B. B., Bolbot J. A., Tothill I. E.* Urease-glutamic dehydrogenase biosensor for screening heavy metals in water and soil samples // *Anal. Bioanal. Chem.* — 2004. — V. 380, N 2. — P. 284–292.
18. *Солдаткін О. О., Назаренко О. А., Павлюченко О. С. та ін.* Оптимізація роботи ензимних біоселективних елементів як складових потенціометричного мультибіосенсора // *Біополімери і клітина.* — 2008. — Т. 24, № 1. — С. 41–50.
19. *Солдаткін О. О., Павлюченко О. С., Кукула О. Л. та ін.* Оптимізація роботи мультибіосенсора при інгібіторному аналізі токсинів // *Там само.* — 2008. — Т. 24, № 6. — С. 494–502.
20. *Хайкин С.* Нейронные сети. Полный курс. — 2-е изд., испр.: Пер. с англ. — М.: ООО «И. Д. Вильямс», 2006. — 1104 с.
21. *Банди Б.* Методы оптимизации. Вводный курс: Пер. с англ. — М.: Радио и связь, 1988. — 128 с.

**РАЗРАБОТКА ПРОЦЕДУРЫ
МУЛЬТИБИОСЕНСОРНОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ
И ПЕСТИЦИДОВ
В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ**

*А. А. Солдаткин¹
А. С. Павлюченко²
А. Л. Кукла²
В. Н. Архипова^{1,2}
С. В. Дзядевич¹*

¹Институт молекулярной биологии
и генетики НАН Украины, Киев

²Институт физики полупроводников
им. В. Е. Лашкарева НАН Украины, Киев

*E-mail: alex_sold@yahoo.com,
kukla@isp.kiev.ua*

В работе использовали потенциометрический мультибиосенсор на основе иммобилизованных энзимов и матрицы ионселективных полевых транзисторов в качестве преобразователей биохимического сигнала в электрический. Предварительно было проверено ингибиторное влияние отдельных токсикантов и их смесей на биоселективные элементы мультибиосенсора. Исходя из полученных результатов и используя методы математической обработки данных, предложена процедура проведения мультибиосенсорного анализа. По этой методике был проведен ряд экспериментов по определению токсичных веществ в водных образцах разного происхождения. Осуществлено сравнение полученных данных с результатами стандартных традиционных методов анализа токсических веществ (атомной абсорбционной спектроскопии, тонкослойной хроматографии и атомно-абсорбционного анализатора ртути). Показана корреляция результатов, полученных мультибиосенсорным и традиционными методами.

Ключевые слова: мультибиосенсор, ионселективные полевые транзисторы, энзимы, ингибиторный анализ, пестициды, ионы тяжелых металлов.

**DEVELOPMENT OF PROCEDURE
OF MULTIBIOSENSOR DETECTION
OF HEAVY METALS AND PESTICIDES
IN ENVIRONMENT**

*O. O. Soldatkin¹
O. S. Pavluchenko²
O. L. Kukla²
V. M. Arkhypova^{1,2}
S. V. Dzyadevych¹*

¹Institute of Molecular Biology and Genetics
of National Academy of Sciences of Ukraine,
Kyiv

²Institute of Semiconductor Physics of National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

*E-mail: alex_sold@yahoo.com,
kukla@isp.kiev.ua*

Potentiometric multibiosensor with variety of immobilized enzymes as bioselective elements and a matrix of pH-sensitive field effect transistors as transducers of biochemical signal into an electric one were used in the work. At first inhibition influence of separate toxins and their mixture on bioselective elements of the multibiosensors was studied. The results obtained with the multibiosensors were mathematically processed. A new procedure of multibiosensor analysis was proposed. Using this procedure, the experiments on determination of toxins in water solutions were carried out. Series of experiments of toxic compounds determination in water samples of different origin were done by using developed analyzer. The obtained results were compared with ones obtained by standard traditional methods of toxic agents analysis (atomic absorption spectroscopy, thin-film chromatography, and atomic absorption analyzer of mercury). Correlation of the results obtained with the multibiosensor and traditional methods was shown.

Key words: multibiosensor, pH-sensitive field-effect transistors, enzymes, inhibitory analysis, pesticide, ions of heavy metal.