

Використання ферментного мультибіосенсора при аналізі токсичності реальних водних зразків різного походження

О. О. Солдаткін¹, О. С. Павлюченко², О. Л. Кукла², І. С. Кучеренко^{1,3},
В. М. Пешкова^{1,3}, В. М. Архипова¹, С. В. Дзядевич¹, О. П. Солдаткін¹,
Г. В. Єльська¹

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, Україна, 03680

²Інститут фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова НАН України
Просп. Науки, 41, Київ, Україна, 03028

³Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Вул. Володимирська, 64, Київ, Україна, 01003

alex_sold@yahoo.com, kukla@isp.kiev.ua

Мета. З використанням розробленого мультибіосенсора зробити аналіз токсичності реальних водних зразків. **Методи.** Застосовано потенціометричний мультибіосенсор з низкою іммобілізованих ферментів та матриці іоноселективних польових транзисторів як перетворювачів біохімічного сигналу в електричний. **Результати.** Біоселективні елементи у складі мультибіосенсора створено на основі ацетилхолінестерази, бутирилхолінестерази, уреазы, глюкозооксидази та триферментної системи (інвертаза, мутаротаза, глюкозооксидаза). За допомогою розробленого аналізатора виконано експерименти з визначення токсичних речовин у водних зразках різного походження. Отримані дані порівняно з результатами, одержаними стандартними традиційними методами аналізу токсичних речовин (атомна абсорбційна спектроскопія, тонкошарова хроматографія та атомно-абсорбційний аналізатор ртуті). **Висновки.** Показано кореляцію результатів, одержаних мультибіосенсорним і традиційними методами.

Ключові слова: Мультибіосенсор, іоноселективні польові транзистори, ферменти, інгібіторний аналіз, пестициди, іони важких металів, токсичні речовини.

Вступ. Великий інтерес, який виявляють до біосенсорів протягом останніх 20 років, зумовлений їхніми певними перевагами у порівнянні з традиційними фізико-хімічними та біохімічними методами аналізу: відносній дешевизні і простоті використання при високій чутливості та специфічності, а також можливості роботи із забарвленими зразками [1, 2]. Біосенсорні прилади можна за-

стосовувати в медичній діагностиці, охороні довкілля та в сільському господарстві [3]. Наразі все більшого розвитку набувають дослідження з розробки біосенсорних систем для визначення токсичних сполук.

На даний момент у світі вже існує низка комерційних біосенсорних приладів на основі ферментів для аналізу глюкози, етанолу, сечовини тощо [4]. Але до сьогодні біосенсорних пристроїв для визначення іонів важких металів і пестицидів не

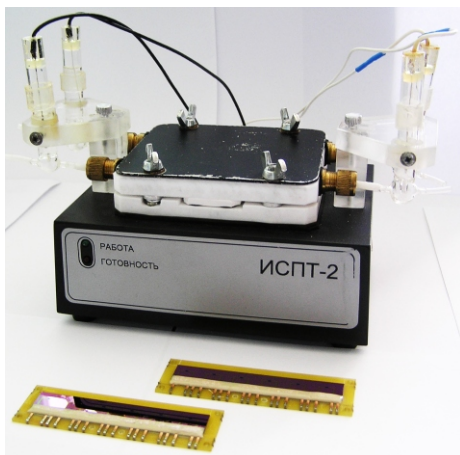


Рис. 1. Зовнішній вигляд мультисенсорного приладу

створено. Тому ми розробили мультібіосенсор для експресного визначення концентрацій токсичних речовин у водних розчинах та виготовили його діючу лабораторну модель [5, 6]. Характеристики останньої вказують на перспективність її застосування. Зазначена модель може стати основою при налагодженні промислового випуску вимірювальних приладів такого типу для інтегрального і селективного визначення токсичних речовин.

Крім того, порівняно з існуючими стандартними методами аналізу запропонована мультібіосенсорна система має низку суттєвих переваг [7, 8]:

- можливість проведення вимірювання без попередньої обробки водних зразків;
- час, необхідний для проведення аналізу, не перевищує 40 хв;
- надзвичайно низький рівень витрати реагентів і мала вартість робочих елементів при масовому виробництві;
- процедура визначення проста і не вимагає наявності кваліфікованого персоналу.

Мета даної роботи полягала у порівнянні результатів дослідження токсичності реальних водних зразків різного походження, отриманих за допомогою розробленого мультібіосенсора і традиційних методів аналізу.

Матеріали і методи. У дослідженнях використано препарати ліофілізованих ферментів: уреаза з бобів сої активністю 31 од. акт/мг фірми «Fluka» (ФРН); ацетилхолінестераза (АцХЕ) з електричного вугра активністю 426 од. акт/мг («Sigma-Aldrich Chemie», США); бутирилхолінестераза (БуХЕ) із

сироватки крові коня активністю 13 од. акт/мг («Sigma-Aldrich Chemie»); глюкозооксидаза (ГОД) з *Penicillium vitale* активністю 130 од. акт/мг («Діагностикум», Україна); інвертаза з пекарських дріжджів активністю 355 од. акт/мг («Sigma-Aldrich Chemie»); мутаротаза з нирки свині активністю 100 од. акт/мг («Biozyme Laboratories Ltd», Велика Британія). Бичачий сироватковий альбумін (БСА, фракція V) та 50 %-й водний розчин глютарового альдегіду (ГА) отримано від фірми «Sigma-Aldrich Chemie».

Як субстрати використано сечовину, бутирилхолінхлорид (БуХ), ацетилхолінхлорид (АцХ), глюкозу та цукрозу. Робочим буфером слугував фосфатний розчин ($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$). Сполуки для приготування буфера та інші неорганічні речовини, використані в роботі, були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти «х. ч.» та «ч. д. а.».

Мультисенсорний прилад. Зовнішній вигляд мультисенсорного приладу з інтегральним сенсорним масивом (12 каналів) на основі іоноселективних (рН-чутливих) польових транзисторів (ІСПТ) представлено на рис. 1.

Робота приладу ґрунтується на формуванні багатовимірного відгуку масиву електрохімічних сенсорів на основі ІСПТ з рН-чутливим шаром нітриду кремнію. Функція мультисенсора полягає у вимірюванні зміни поверхневого потенціалу на межі розподілу електроліт–затвор транзистора для кожного сенсорного елемента масиву одночасно з наступною обробкою одержаного масиву даних за допомогою спеціальних математичних методів і формування унікального хімічного образу зразка досліджуваної рідини.

Методика вимірювання. Експерименти 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. Біоселективні елементи інактивували, експонуючи мультібіосенсорний чіп протягом 20 хв у розчинах водних зразків різного походження. Результати аналізів мультібіосенсором токсичності зразків порівнювали з даними, отриманими традиційними методами аналізу (атомно-абсорбцій-

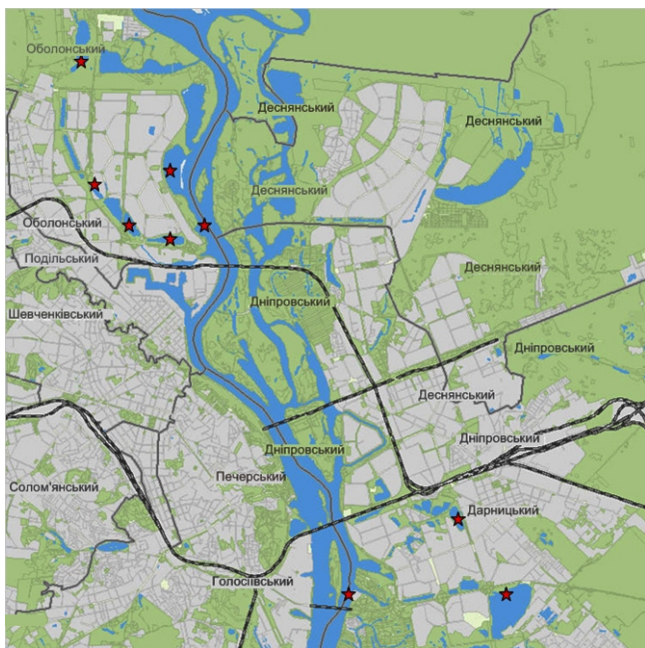


Рис. 2. Частина карти міста Києва з місцями відбору проб (відмічено зірочками)

ною спектроскопією, тонкошаровою хроматографією та абсорбційним аналізатором ртуті). Мультибіосенсорні дослідження проводили щонайменше з триразовим повторенням. Неспецифічні зміни вихідного сигналу, пов'язані з коливаннями температури, рН середовища та електричними наводками, усували, використовуючи диференційний режим вимірювань.

Результати і обговорення. Для перевірки відповідності розробленого мультибіосенсора поставленій меті вирішено було провести аналіз природних водних зразків на наявність у них токсичних речовин. Для цього в деяких водоймах міста Києва відбирали проби води. Робили це в місцях найрозповсюдженіших контактів населення з водою, а саме – на міських пляжах двох районів (Оболонського і Дарницького). На рис. 2 представлено частину карти міста Києва з відміченими водоймищами, з яких брали воду для аналізу.

До переліку зразків, що перевіряли, входили проби з озер «Вирлиця», «Сонячне», «Міністерське», «Опечень», «Опечень нижня», з річки Дніпро біля Московського і Південного мостів та затоки «Оболонь». Крім того, до кількох проб додали відому кількість токсичних речовин, щоб перевірити, наскільки збільшаться рівні інгібування біоселек-

тивних елементів мультибіосенсора і як це відповідає реальним значенням концентрацій токсичних речовин.

Також було перевірено можливість використання мультибіосенсора при аналізі багатокомпонентних складних зразків. Тому, крім згаданих вище, для аналізу взяли водні проби з полігону твердих побутових відходів № 5 у селі Підгірці Обухівського району Київської області.

Аналіз водних зразків мультибіосенсором. При проведенні аналізу відібраних зразків мультибіосенсором встановлено, що жоден біоселективний елемент мультибіосенсора не втрачав активності при контакті з водою з водоймищ м. Києва (табл. 1). Це свідчить про відсутність у пробах пестицидів та іонів важких металів у небезпечних для людини концентраціях. Щоб підтвердити придатність мультибіосенсора для аналізу реальних зразків, до проб з водоймищ додали певну кількість токсичних речовин. Як видно з даних табл. 1, відповідні біоселективні елементи у складі мультибіосенсора одразу ж відреагували на наявність доданих токсинів. Результат, отриманий у ході експерименту, засвідчив можливість використання розробленого мультибіосенсора для визначення токсичності водних зразків. Таким чином, у разі присутності у водоймах токсичних речовин у небезпечних концентраціях наявність їх підтвердив би мультибіосенсор.

Складніша ситуація виникла при проведенні інгібіторного аналізу зразка з полігону твердих побутових відходів № 5. Після інкубації мультибіосенсора в зразку з полігону чутливі елементи мультибіосенсора повністю втрачали здатність відповідати на внесення відповідних субстратів. Причиною цього могло бути або 100 %-ве інгібування всіх використаних ферментів, або/та блокування пор біоселективних елементів колоїдними частинками, присутніми в зразку. Для перевірки цього припущення необхідно було позбутися великих дисперсних частинок фільтрацією або центрифугуванням зразка, щоб уникнути механічного впливу (блокування пор мембрани, яке призводить до значного зменшення проникності) значних за розміром часток на біоселективні елементи мультибіосенсора.

У табл. 2 представлено дані із зменшення інтерферентного впливу колоїдних частинок на біоселек-

Таблиця 1

Інгібування біоселективних елементів мультибіосенсора водними зразками різного походження (100 % – повне інгібування)

Місце відбору зразків	Уреаза, %	БуХЕ, %	АцХЕ, %	ГОД, %	Триферментна система, %
оз. Вирлиця (Позняки)	0	0	0	0	0
оз. Вирлиця (Позняки) +400 нМ Hg ⁺²	0	0	0	5	10
р. Дніпро (Осокорки)	0	0	0	0	0
р. Дніпро (Осокорки) +10 мкМ трихлорфон	0	50	5	0	0
оз. Сонячне (Осокорки)	0	0	0	0	0
оз. Сонячне (Осокорки) + 5 мкМ Cu ²⁺	7	0	0	0	0
оз. Міністерське (Оболонь)	0	0	0	0	0
оз. Опечень (Оболонь)	0	0	0	0	0
оз. Опечень нижнє (Оболонь)	0	0	0	0	0
оз. Вербне (Оболонь)	0	0	0	0	0
р. Дніпро, затока Оболонь (Оболонь)	0	0	0	0	0
р. Дніпро біля Московського мосту (Оболонь)	0	0	0	0	0
Полігон побутових відходів № 5	100	100	100	100	100

лективні елементи за рахунок використання центрифугування та кількох варіантів фільтрації (за допомогою простого фільтрувального паперу та двох стандартних фільтрів «Sartorius» з діаметром пор 20 і 45 мкм). Виявилось, що найрезультативнішою є фільтрація зразка через фільтр «Sartorius» з розміром пор 20 мкм. За отриманими результатами зроблено висновок, що, дійсно, без попередньої обробки зразка великодисперсні частинки впливають на проникність біоселективних мембран. А залишкова інгібіторна активність зразка є наслідком наявності в ньому токсичних речовин. Отримані рівні інгібування біоселективних елементів свідчать про присутність іонів важких металів у зразку, що демонструє саме інгібування біоселективних елементів на основі уреаз, ГОД та триферментної системи [6].

Контрольний аналіз водних зразків на вміст токсинів за допомогою традиційних аналітичних методів. Наступним етапом роботи стало тестування отриманих мультибіосенсорним методом даних. Усі використані в роботі зразки протестовано в Інституті екогігієни та токсикології ім. Л. І. Медведя на наявність токсичних речовин. Дослідження здійснювали традиційними методами аналізу (табл. 3).

Вміст пестицидів у зразку з полігону № 5 та в зразках водоймищ Києва реєстрували методом тонкошарової хроматографії відповідно до методичними вказівок [9]. Пестицидів у досліджуваних зразках не виявлено.

Концентрацію ртуті встановлювали на атомно-абсорбційному аналізаторі ртуті «Юлія-2». Для визначення іонів інших важких металів в аналізованих зразках їх по черзі вмішували в тигель і спалювали в муфельній печі. Залишок у тигелі, отриманий після спалювання, розчиняли в азотній кислоті і в отриманому розчині визначали важкі метали методом атомно-абсорбційної спектроскопії на приладі Z-8000 («Hitachi», Японія).

Аналізуючи дані, одержані з використанням традиційних методів визначення (табл. 3), видно, що вони корелюють з результатами, отриманими мультибіосенсором. Як і очікувалося, перевищення допустимих концентрацій виявлено в зразках, у які навмисно додавали відповідні аліквоти токсикантів. Це перевищення по ртуті, міді і трихлорфону. В усіх інших зразках з водойм м. Києва, як і показано за допомогою мультибіосенсора, токсичних речовин у небезпечних концентраціях не знайдено.

Таблиця 2

Інгібування біоселективних елементів мультибіосенсора зразками з полігону побутових відходів після різних процедур попередньої підготовки проби (100 % – повне інгібування)

Процедура підготовки проби	Уреаза, %	БуХЕ, %	АцХЕ, %	ГОД, %	Триферментна система, %
Без підготовки	100	100	100	100	100
Центрифугування	75	45	50	70	75
Фільтрація через фільтрувальний папір	60	20	30	55	60
Фільтрація через стандартний фільтр «Sartorius», d = 45 мкм	45	5	8	30	40
Фільтрація через стандартний фільтр «Sartorius» d = 20 мкм	40	3	8	20	30

Таблиця 3

Вміст токсичних речовин у відібраних зразках води

Місце відбору	Ртуть, мг/л	Мідь, мг/л	Кадмій, мг/л	Кобальт, мг/л	Цинк, мг/л	Хром, мг/л	Пестициди, мкМ
оз. Вирлиця (Позняки)	Н. в.	Н. в.	0,007	Н. в.	0,044	Н. в.	Н. в.
оз. Вирлиця (Позняки) + 400 нМ Hg²⁺	0,079	Н. в.	0,007	Н. в.	0,044	Н. в.	Н. в.
р. Дніпро (Осокорки)	Н. в.	Н. в.	0,001	Н. в.	0,035	0,014	Н. в.
р. Дніпро (Осокорки) + 10 мкМ трихлорфон	Н. в.	Н. в.	0,001	Н. в.	0,035	0,014	10
о. Сонячне (Осокорки)	Н. в.	Н. в.	0,007	Н. в.	0,011	0,016	Н. в.
оз. Сонячне (Осокорки) + 5 мкМ Cu²	Н. в.	0,321	0,007	Н. в.	0,011	0,016	Н. в.
оз. Міністерське (Оболонь)	Н. в.	0,005	0,006	Н. в.	0,021	0,043	Н. в.
оз. Опечень (Оболонь)	Н. в.	Н. в.	0,003	Н. в.	Н. в.	0,016	Н. в.
оз. Опечень нижнє (Оболонь)	Н. в.	Н. в.	0,010	Н. в.	0,019	0,008	Н. в.
о. Вербне (Оболонь)	Н. в.	Н. в.	0,004	Н. в.	0,041	Н. в.	Н. в.
р. Дніпро, затока Оболонь (Оболонь)	Н. в.	Н. в.	0,008	Н. в.	0,040	0,058	Н. в.
р. Дніпро, біля Московського мосту (Оболонь)	Н. в.	Н. в.	0,021	Н. в.	Н. в.	0,011	Н. в.
Полігон побутових відходів № 5	Н. в.	0,317	Н. в.	0,034	1,471	0,988	Н. в.

Крім того, з використанням традиційних методів зареєстровано перевищення ГДК по міді, кобальту, цинку та хрому, а також показано відсутність ртуті та пестицидів, що певною мірою збігається з даними, отриманими мультибіосенсором.

Таким чином, результати аналізу всіх водних проб, одержані традиційними методами визначення токсичних речовин, підтверджують дані, отримані із застосуванням мультибіосенсора.

Висновки. У роботі здійснено низку експериментів з визначення токсичності водних зразків із водоймищ міста Києва та полігону побутових

відходів № 5. Дослідження проводили за допомогою мультибіосенсора та традиційних методів визначення токсичних речовин. Отримані дані порівняно та показано кореляцію результатів. Таким чином, експериментально підтверджено можливість використання розробленої мультибіосенсорної системи як експресного аналізатора токсичності водних зразків. Розроблений мультибіосенсор за польових умов дозволяє швидко визначати, чи є зразок токсичним та які саме вид або група токсичних речовин присутні в ньому, а також який саме традиційний метод аналізу необхідно вико-

ристати для подальшого точнішого визначення токсичних речовин.

Автори щиро вдячні співробітникам Інституту екології та токсикології ім. Л. І. Медведя МОЗ України за проведену роботу з дослідження токсичності зразків за допомогою традиційних методів аналізу. Автори також висловлюють подяку за фінансову підтримку НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми «Сенсорні системи для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб» та проекту УНТЦ № 4591 «Development of enzyme multisensor arrays for ecological monitoring of toxins».

O. O. Soldatkin, O. S. Pavluchenko, O. L. Kukla, I. S. Kucherenko, V. M. Peshkova, V. M. Arkhipova, S. V. Dzyadevych, A. P. Soldatkin, A. V. El'skaya

Application of enzyme multibiosensor for toxicity analysis of real water samples of different origin

Summary

Aim. The analysis of toxicity of different water samples with the multibiosensor developed earlier. **Methods.** The potentiometric multibiosensor with several immobilized enzymes as bioselective elements and the matrix of pH-sensitive field effect transistors as transducers of the biochemical signal into the electric one was applied for the analysis. **Results.** The bioselective elements of the multibiosensor were developed using acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, urease, glucose oxidase, and three-enzyme system (invertase, mutarotase, glucose oxidase). The measurement of toxic compounds in water samples of different origin was performed using the constructed sensor. The results obtained were compared with those obtained by the conventional methods of toxic agent's analysis (atomic absorption spectrometry, thin-film chromatography, and atomic absorber analyser of mercury). **Conclusion.** A strong conformity between the results obtained with the multibiosensor and traditional methods has been shown.

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

A. A. Солдаткин, О. С. Павлюченко, О. Л. Кукла, И. С. Кучеренко, В. М. Пешкова, В. М. Архипова, С. В. Дзядевич, А. П. Солдаткин, А. В. Ельская

Использование ферментного мультибиосенсора при анализе токсичности реальных водных образцов разного происхождения

Резюме

Цель. С использованием разработанного мультибиосенсора провести анализ токсичности реальных водных образцов. **Методы.** Применен потенциометрический мультибиосенсор с рядом иммобилизованных ферментов и матрицы ионоселективных полевых транзисторов как преобразователей биохимического сигнала в электрический. **Результаты.** Биоселективные элементы в составе мультибиосенсора со-

зданы на основе ацетилхолинэстеразы, бутирилхолинэстеразы, уреазы, глюкозооксидазы и трехферментной системы (инвертаза, мутаротаза, глюкозооксидаза). С помощью разработанного анализатора выполнен ряд экспериментов по определению токсичных веществ в водных образцах разного происхождения. Собственные данные сравнивали с результатами, полученными стандартными традиционными методами анализа токсичных веществ (атомная абсорбционная спектроскопия, тонкослойная хроматография и атомно-абсорбционный анализатор ртути). **Выводы.** Показана корреляция результатов, полученных мультибиосенсорным и традиционными методами.

Ключевые слова: мультибиосенсор, ионоселективные полевые транзисторы, ферменты, ингибиторный анализ, пестициды, ионы тяжелых металлов, токсические вещества.

PERELIK LITERATURY

1. Coulet P. R. What is a biosensor // Biosensor principles and application / Eds L. J. Blum, P. R. Coulet.—New York: Marcel Dekker, 1991.—P. 1–6.
2. Thevenot D. R., Toth K., Durst R. A., Wilson G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification (Technical report) // Pure Appl. Chem.—1999.—71.—P. 2333–2348.
3. Hall E. A. H. Recent progress in biosensor development // Int. J. Biochem.—1988.—20, № 4.—P. 357–362.
4. Scheller F. W., Pfeiffer D. Commercial Devices based on amperometric biosensors // Handbook of biosensors and electronic noses: medicine, food, and environment / Ed. E. Kress-Rogers.—New York: CRC press, 1997.—P. 245–256.
5. Soldatkin O. O., Pavluchenko O. S., Kukla O. L., Arkhipova V. M., Dzyadevych S. V., Soldatkin O. P., El'skaya A. V. Optimization of enzymatic bioselective elements as components of potentiometric multibiosensor // Biopolymers and Cell.—2008.—24, N 1.—P. 42–50.
6. Soldatkin O. O., Pavluchenko O. S., Kukla O. L., Arkhipova V. M., Dzyadevych S. V., Soldatkin O. P., El'skaya A. V. Optimization of multibiosensor operation for inhibitory analysis of toxins // Biopolymers and Cell.—2008.—24, N 6.—P. 494–502.
7. Sherma J., Zweig G. Pesticides // Anal. Chem.—1983.—55.—P. 57.
8. Tran-Minh C., Pandey P. C., Kumaran S. Studies on acetylcholine sensor and its analytical application based on the inhibition of cholinesterase // Biosensors and Bioelectronics.—1990.—5.—P. 461–471.
9. Metodicheskie ukazaniya po opredeleniyu pestizidov v vode, produktach, kormach i tabachnykh izdeliyach metodom chromatografii v tonkom sloe № 2142-80 ot 28.01.1980 g.

УДК 577.151.4:544.475:543.554.2
Надійшла до редакції 10.10.08