

МЕТОДИ

УДК 577.151.4+543.555+544.475

ОПТИМІЗАЦІЯ КОНДУКТОМЕТРИЧНОГО ТРИЕНЗИМНОГО БІОСЕНСОРА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

І. С. Кучеренко^{1, 2}

*О. О. Солдаткін*¹

В. М. Пешкова^{1, 2}

*С. В. Дзядевич*¹

*О. П. Солдаткін*¹

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка

E-mail: alex_sold@yahoo.com

Наведено дані щодо оптимізації роботи кондуктометричного біосенсора для визначення іонів важких металів у реальних зразках. Як кондуктометричний перетворювач використовували диференційну пару планарних золотих гребінчастих електродів, нанесених на ситалову підкладку. Роль біоселективного елемента відіграла триензимна система (інвертаза, мутаротаза, глюкозооксидаза), іммобілізована на поверхню перетворювача. Розроблений біосенсор характеризувався високою відтворюваністю сигналу. Оптимальна концентрація сахарози для інгібіторного аналізу — 1,25 мМ, час інкубації в досліджуваному розчині становив 10–20 хв. Біосенсор характеризувався найбільшою чутливістю до іонів Hg^{2+} та Ag^+ . Показано принципову можливість реактивації біосенсора розчином ЕДТА після інгібування іонами срібла або розчином цистеїну після інгібування іонами ртуті. Отримані за допомогою біосенсора результати аналізу реальних водних зразків добре корелювали з результатами, одержаними традиційними методами визначення токсикантів.

Ключові слова: біосенсор, важкі метали, інгібіторний аналіз, ензими, кондуктометричний перетворювач.

Упродовж ХХ ст у світі, в тому числі й в Україні, бурхливо розвивались хімічна промисловість та металургія. Проте такий динамічний розвиток промисловості призвів до формування регіонів зі значним ступенем забруднення навколишнього середовища [1, 2]. Крім того, велика кількість хімічних підприємств та заводів в Україні оснащені застарілим обладнанням, виробничі процеси часто не відповідають сучасним санітарним вимогам. Тому зараз екологічна ситуація в Україні близька до критичної, а в деяких регіонах взагалі катастрофічна [3].

До найбільш небезпечних забруднювальних речовин належать важкі метали [4–6]. Більшість їхніх сполук добре розчиняються в атмосферних опадах і здатні адсорбуватися ґрунтами [7]. Фонові концентрації цих елементів невеликі (менше 0,02 мг/л), однак у разі забруднення зростають у десятки або навіть тисячі разів [4]. Окрім того, іони важких металів, потрапивши у повітря, здатні переноситись разом з атмосферними опадами, тим самим забруднюючи великі тери-

торії [8, 9]. Одним із найбільш токсичних іонів важких металів є ртуть. Її застосовують у виробництві кварцових та ламп денного світла, для виготовлення термометрів та барометрів, під час проявлення фотознімків. Металічну ртуть також використовують для заповнення вакуумних насосів, у процесі електродлітичного отримання хлору та їдко-го натру (ртутні катоди), оксид ртуті інколи застосовують для виготовлення сухих елементів (ртутно-цинкових); великі викиди ртуті відбуваються внаслідок перероблення та спалювання кам'яного вугілля й антрацитів, що мають підвищений вміст цього металу [1].

В організм людини та рослиноїдних тварин важкі метали потрапляють переважно з рослинною їжею, а до рослин, у свою чергу, — з ґрунту [5, 10]. Механізм шкідливої дії важких металів полягає в утворенні ковалентних зв'язків з радикалами біологічно активних молекул, зокрема у зв'язуванні з сульфгідрильними (-SH) групами залишків амінокислот, що входять до складу ак-

тивних центрів ензимів [1, 11]. Унаслідок цього порушується тривимірна структура ензиму, що призводить до зменшення його активності (незворотне інгібування). Особливу небезпеку для організму людини становить здатність важких металів до акумуляції в органах та тканинах, зокрема мідь нагромаджується в печінці, цинк — у скелетних м'язах, кістках і печінці, кадмій та свинець — у кістках [12]. Важкі метали негативно впливають на фізіологічні функції організму, порушують кислотно-лужну рівновагу крові, змінюють активність ензимів, ускладнюють перебіг хвороб тощо [13, 14].

Таким чином, щоб запобігти отруєнню важкими металами потрібен постійний контроль вмісту їх у ґрунтах, ґрунтових та поверхневих водах, у тваринних кормах та продуктах тваринництва тощо. Основними методами визначення вмісту важких металів у різних речовинах є газова та рідинна хроматографія, спектрофотометрія, мас-спектрометрія, атомно-абсорбційна спектроскопія та інші фізичні методи, що потребують складного й дорогого обладнання, кваліфікованого персоналу, трудомісткої попередньої підготовки проб, а отже — великих затрат часу та коштів [16–18]. Тому розроблення простих, швидких та дешевих приладів для екологічного моніторингу — біосенсорів — є актуальним завданням сучасних біотехнологічних розробок [15].

Матеріали і методи

Матеріали. У роботі використовували такі ензими: глюкозооксидазу (ГОД) із *Penicillium vitale* (ЕС 1.1.3.4) з активністю 130 од/мг фірми «Діагностикум»; інвертазу (ЕС 3.2.1.26) із пекарських дріжджів з активністю 355 од/мг фірми Sigma-Aldrich Chemie (Німеччина); мутаротазу (ЕС 5.1.3.3) з активністю 100 од/мг фірми Bioenzyme Laboratories Ltd (Великобританія). Бічачий сироватковий альбумін (БСА) фракція V, 50% -й водний розчин глютарового альдегіду (ГА), цистеїн та етилендіамінтетраацетат (ЕДТА) отримали від фірми Sigma-Aldrich Chemie (Німеччина). Як субстрати використовували сахарозу та глюкозу вітчизняного виробництва. Інгібіторами слугували водні розчини нітратів важких металів вітчизняного виробництва. Сполуки для приготування буфера та інші неорганічні сполуки, що їх використовували в роботі, були вітчизняного виробництва і мали ступінь чистоти «х. ч.» та «ч. д. а.».

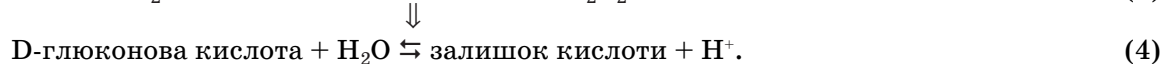
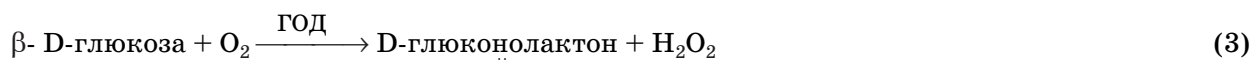
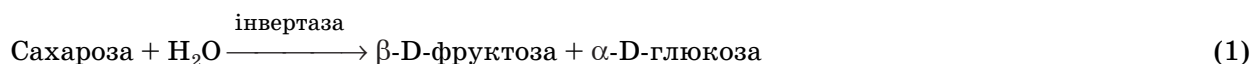
Кондуктометричні перетворювачі. У роботі застосовували кондуктометричні перетворювачі, виготовлені згідно з нашими рекомендаціями в Інституті фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова (Київ, Україна). Вони мають розмір 5×30 мм і складаються з двох ідентичних золотих гребінчастих електродів, нанесених на керамічну основу. Кожна така система складається із 20 пар растрових електродів, що мають ширину та зазор між ними 20 мкм із загальною площею чутливої поверхні близько 2 мм². Кондуктометричні перетворювачі під'єднували до вимірювальної установки, яку детально описано в попередніх роботах [16–19].

Виготовлення біоселективних елементів. Для виготовлення робочих біоселективних мембран використовували розчин: 5% інвертази, 6% мутаротазу, 5% глюкозооксидази та 4% БСА, у 40 мМ фосфатному буфері, рН 6,5, з 20% -м гліцеролом. Суміш для приготування референтної мембрани готували так само, але замість ензимів брали лише БСА з кінцевою концентрацією 20%. Перед нанесенням на поверхні перетворювачів розчини для референтної та робочої мембран змішували з 2% -м водним розчином глютарового альдегіду у пропорції 1:1. Одразу після цього суміші наносили на робочі поверхні кондуктометричних гребінчастих електродів та висушували протягом 45 хв на повітрі при кімнатній температурі. Після висихання мембран перетворювачі занурювали у робочий буфер на 30 хв для вимивання надлишку глютарового альдегіду.

Методика вимірювання. Виміри проводили у 5 мМ фосфатному буфері з рН 6,5 при кімнатній температурі у відкритій комірці об'ємом 2 мл за постійного перемішування. Концентрації субстратів у комірці задавали, додаючи до робочої комірки концентровані розчини субстратів. Інгібування ензимів проводили експозицією біосенсора протягом 10–20 хв у розчинах іонів важких металів за різних концентрацій. При реактивації біосенсор вміщували в розчин з 5 мМ ЕДТА або з 10 мМ цистеїном на 45 хв. Усі дослідження здійснювали у двох-трьох серіях. Неспецифічні зміни вихідного сигналу, пов'язані з коливаннями температури, рН середовища, електричними завадами, пригнічували використовуючи диференційний режим вимірювань.

Результати та обговорення

В основі роботи біосенсора лежить каскад ензиматичних реакцій, що відбуваються у мембрані, нанесеній на поверхню гребінчастих електродів:



Інвертаза, мутаротаза та глюкозооксидаза поступово розщеплюють сахарозу до D-глюконолактону, який спонтанно гідролізується до D-глюконової кислоти. Остання дисоціює на залишок кислоти та протон, що зумовлює зміну провідності розчину, яка реєструється кондуктометричним перетворювачем [20].

Під час інгібування відбувається взаємодія іонів важких металів із сульфгідрильними групами ензимів [21, 22]. Перебіг реакції інгібування супроводжується зниженням активності ензимів, що, відповідно, призводить до зменшення кількості протонів, утворених під час ензиматичного розпаду сахарози.

Така взаємодія сульфгідрильних груп ензимів з іонами важких металів може бути зворотною. Відокремлення іонів важких металів відбувається за наявності в реакційній суміші сильних хелатних домішок, таких, наприклад, як ЕДТА. Зокрема, при реактивації ензимної системи від іонів срібла можна використовувати ЕДТА, що взаємодіє з чотирма іонами Ag^+ , відриваючи їх від інактивованого ензиму [23].

Завданням першого етапу роботи було підтвердити, що зменшення сигналу біосенсора на сахарозу після його інкубації в досліджуваному розчині відбувається через інгібування біоселективного елемента, а не за рахунок похибки вимірювання. Тому було перевірено одну з найважливіших характеристик біосенсора — операційну стабільність сигналу. Для цього упродовж двох робочих днів отримували відгуки на 3 концентрації сахарози — 0,25; 0,5 та 1 мМ з інтервалом у 15–20 хв, при цьому сенсор весь час між вимірюваннями залишався у буфері за постійного перемішування. Вибрані концентрації сахарози фіксували на різних відрізках калібрувальної кривої біосенсора для забезпечення більш повної інформації щодо стабільності сенсора. Під час роботи сенсор характеризувався достатньо високою відтворюваністю за різних концентрацій сахарози (рис. 1).

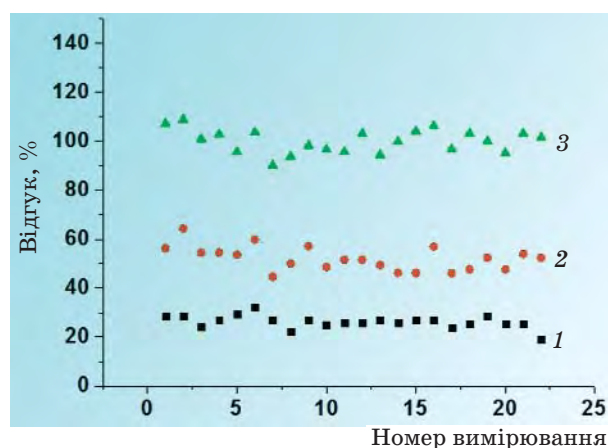


Рис. 1. Операційна стабільність сигналу кондуктометричного біосенсора на основі трьох ензимів.

Концентрація сахарози — 0,25 мМ (1), 0,5 мМ (2), 1 мМ (3). Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буфері, рН 6,5

Наступним завданням було визначити необхідну концентрацію сахарози як субстрату в інгібіторному аналізі. Для цього потрібно вибрати таку концентрацію сахарози, за якої чутливість біосенсора до іонів важких металів буде максимальною. Теоретично оптимальна концентрація субстрату має бути в ділянці насичення ензиму субстратом, коли кожна з молекул ензимів максимально задіяна у процесах перетворення субстрату до кінцевого продукту, що спричинює зміну провідності й генерує максимальний відгук. Проте на різних ділянках калібрувальної кривої може спостерігатися різний рівень інгібування, що також слід враховувати. Таким чином, для визначення оптимальної концентрації субстрату в інгібіторному аналізі було проведено дослідження залежності величини відгуків біосенсора від концентрації сахарози до і після інгібування його 50 мкМ розчином Hg^{2+} (рис. 2, а). У разі збільшення концентрації сахарози до 1,0 мМ маємо класичний випадок зростання відгуку та незалежність рівня інгібування від концентрації субстрату. З подальшим збільшенням концентрації субстрату від 1,0 мМ

до 1,5 мМ відгук продовжує зростати, виходячи на насичення, але при цьому починає зменшуватись рівень інгібування (рис. 2, б). Тому в подальших експериментах було вирішено використовувати концентрацію субстрату 1,25 мМ сахарози, за якої спостерігається найбільший відгук біосенсора на сахарозу та залишається ще досить високий рівень інгібування (чутливість до іонів важких металів).

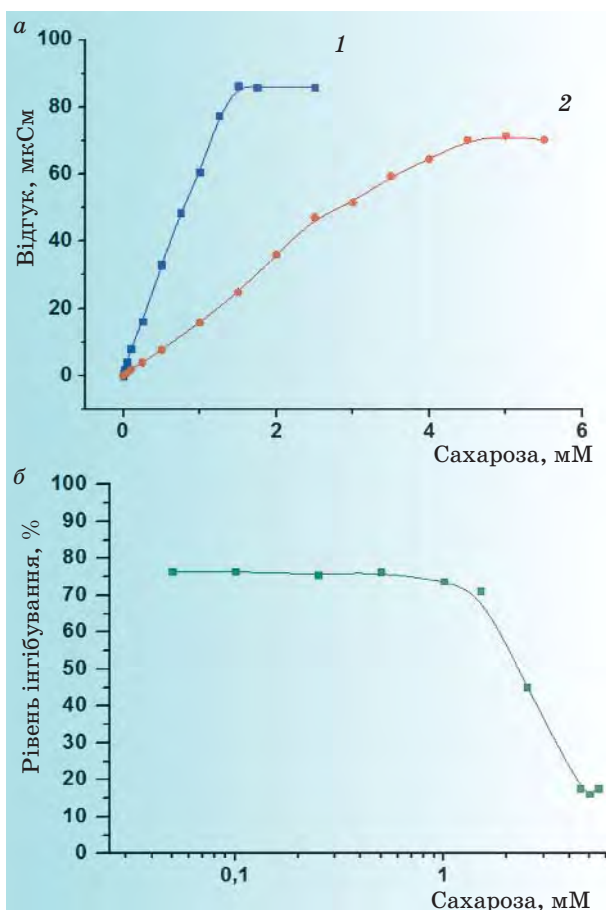


Рис. 2. Залежність величин відгуків біосенсора до інкубації в розчині 50 мкМ ртуті (1) і після (2) від концентрації сахарози (а) та крива рівня інгібування триензимної системи біоселективного елемента (б).

Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буфері, рН 6,5, час інгібування 30 хв

Ще однією важливою характеристикою роботи біосенсора в інгібіторному аналізі є час його інкубації в аналізованому розчині. Результати дослідження залишкової активності біоселективного елемента на основі триензимної системи залежно від часу інгібування наведено на рис. 3. Для проведення експерименту було вибрано чотири концентрації ртуті (10, 25, 50 та 100 мкМ). Залежність від часу інкубації також була різною для різних концентрацій токсикан-

та. Крім того, для досягнення найбільшої чутливості біосенсора до токсиканта потрібно збільшувати час інкубації, а відповідно і загальний час проведення аналізу. Отже, оптимальний час інгібування варіюватиме залежно від концентрації ртуті в діапазоні 10–20 хв.

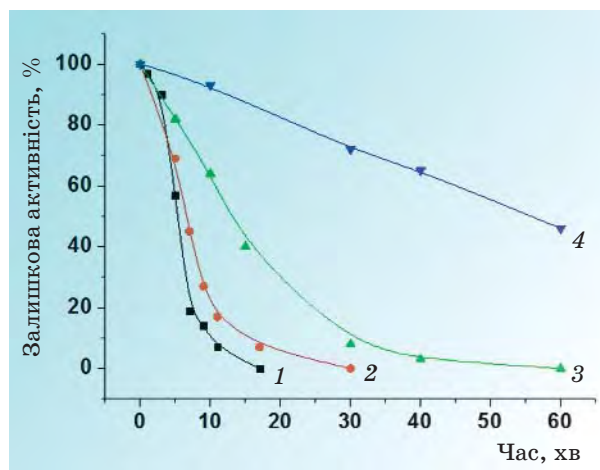


Рис. 3. Залежність залишкової активності триензимної системи біосенсора від часу інкубації біосенсора в 10 мкМ (1), 25 мкМ (2), 50 мкМ (3) та 100 мкМ (4) розчинах ртуті.

Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буфері, рН 6,5, концентрація субстрату — 1,25 мМ сахарози

Наступним завданням було дослідження залежності залишкової активності триензимної системи біосенсора від концентрації різних іонів важких металів. Калібрувальні криві біосенсора щодо різних важких металів подано на рис. 4. Найбільший вплив на активність ензимів мали іони Ag^+ та Hg^{2+} , інші важкі метали за концентрацій до 100 мкМ лише незначною мірою впливали на роботу біосенсора. Аналізуючи отримані криві, можна зробити висновок, що триензимний біосенсор на основі глюкозооксидази, інвертази та мутаротази може бути ефективним для селективного аналізу іонів ртуті та срібла або для визначення токсичності аналізованого зразка.

Інгібування біоселективного елемента іонами важких металів у нашому випадку є незворотним, що робить одноразове використання біосенсора неефективним. Тому було вирішено спробувати реактивувати біосенсор після інактивації з метою повторного його використання.

Відомо, що реактиваторами ензимних систем біосенсорів для визначення іонів важких металів часто слугують розчини

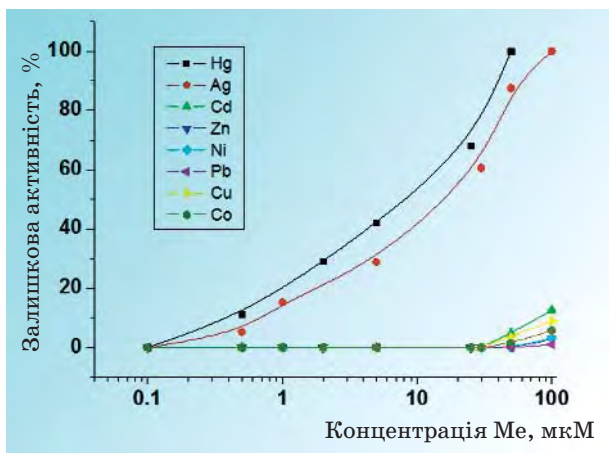


Рис. 4. Залежність рівня інгібування триензимної системи біосенсора від концентрації іонів різних металів.

Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буфері, рН 6,5, концентрація сахарози — 1,5 мМ, час інгібування — 20 хв

ЕДТА або цистеїну [11], тому для перевірки можливості реактивації розробленого біосенсора використовували розчини 10 мМ цистеїну та 5 мМ ЕДТА зі значеннями рН, доведеними до нейтрального рівня. Щоб краще зрозуміти процеси інгібування певного ензиму відповідним іоном важкого металу, а потім і процеси реактивації всієї триензимної системи, було вирішено впродовж усього дослідження отримувати відгуки біосенсора і на глюкозу, і на сахарозу. Можна вважати, що величина відгуку на глюкозу прямо пропорційна активності глюкозооксидази в триензимній системі, а на сахарозу — дорівнює сумарній активності ензимів біоселективного елемента біосенсора. Тому під час експерименту спочатку отримували 2–3 відгуки біосенсора на додавання у вимірювальну комірку аліквот глюкози та сахарози, далі біосенсор протягом 10–20 хв, залежно від концентрації інгібіторів, обробляли розчином ртуті чи срібла (найбільша чутливість розробленого біосенсора була саме до цих металів). Після цього знову отримували 2–3 відгуки на ті самі концентрації субстратів (глюкози та сахарози). Якщо відгук ставав помітно меншим, проводили процедуру реактивації. Одержані результати наведено в табл. 1 і 2. Інгібування біосенсора іонами ртуті призвело до зменшення відгуку на сахарозу, тимчасом як величина відгуку на глюкозу майже не змінилася. Отже, інактивувалися більшою мірою інвертаза та, можливо, мутаротаза. Інгібування біосенсора іонами срібла спричинило зменшення відгуків як на сахарозу, так і на глюкозу, а це

свідчить про те, що інактивувалася переважно глюкозооксидаза.

Після інгібування біосенсор вміщували в розчин ЕДТА або цистеїну на 45 хв за інтенсивного перемішування. Виявилось, що ЕДТА практично не реактивував ензими після інгібування іонами ртуті, але значно ефективнішою була реактивація біосенсора розчином ЕДТА після інгібування іонами срібла. Цистеїн же, навпаки, показав слабку реактивацію ензимів після інгібування іонами срібла та ефективну реактивацію після інгібування іонами ртуті. Одержані дані реактивації триензимного біосенсора від іонів срібла та ртуті подано в табл. 1 та 2, відповідно.

Таблиця 1. Реактивація триензимного біосенсора після інгібування іонами срібла

Залишкова активність біоселективного елемента біосенсора, %			
Після інгібування		Після реактивації в 5 мМ ЕДТА 45 хв	
Відгук на сахарозу	Відгук на глюкозу	Відгук на сахарозу	Відгук на глюкозу
80	100	100	100
70	100	100	100
64	68	95	100
63	85	90	100
40	64	85	100
3	12	3	65
2	12	7	62

Таблиця 2. Реактивація триензимного біосенсора після інгібування іонами ртуті

Залишкова активність біоселективного елемента біосенсора, %			
Після інгібування		Після реактивації в 10 мМ цистеїні 45 хв	
Відгук на сахарозу	Відгук на глюкозу	Відгук на сахарозу	Відгук на глюкозу
81	92	100	100
73	100	100	100
40	95	100	100
0	92	83	100
0	93	84	98

За результатами реактивації біосенсора ЕДТА та цистеїном можна зробити висновок, що реактивація різними комплексонами окрім відновлення активності біоселективної мембрани дозволяє визначити, який саме із металів (ртуть чи срібло) присутній в аналізованому зразку.

Наступним етапом роботи була апробація розробленого біосенсора на основі трьох ензимів, а саме дослідження водоймищ м. Києва на наявність у них іонів важких металів. Воду для аналізу відбирали на міських пляжах Оболонського та Дарницького районів, а пробу з полігону твердих побутових відходів № 5 — у селі Підгірці Обухівського району Київської області. На рис. 5 зображена частина карти м. Києва з відзначеними водоймищами, з яких було відібрано проби для аналізу. До списку зразків, які підлягали перевірці, входили водні зразки з озер Вирлиця, Сонячне, Міністерське, Опечень, Опечень нижня, з річки Дніпро біля Московського і Південного мостів та затоки Оболонь. Окрім того, у кілька проб було додано певну кількість відповідних іонів важких металів для перевірки, наскільки збільшаться рівні інгібування триензимного біосенсора.

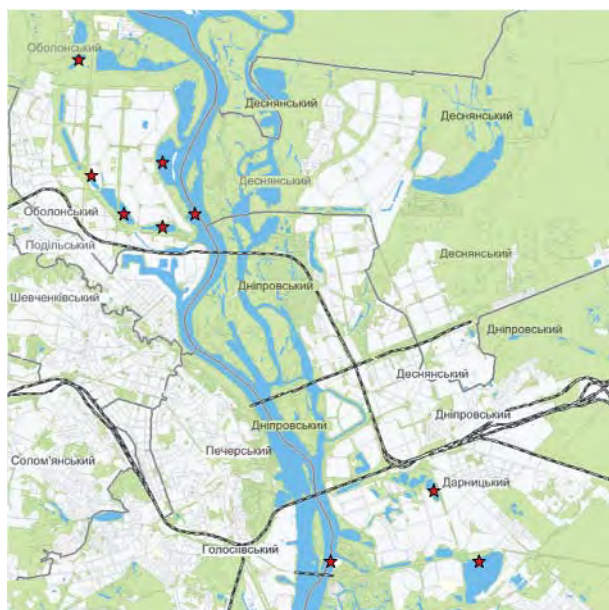


Рис. 5. Частина карти міста Києва з місцями відбору проб (позначені зірочками)

Результати проведення екологічного моніторингу відібраних зразків за допомогою атомно-абсорбційного аналізатора ртуті, атомно-абсорбційної спектроскопії (ААС) та триензимного кондуктометричного біосенсора наведено у табл. 3. Як і очікували, перевищення допустимих концентрацій було виявлено у зразках, в які додавали відповідні аліквоти токсикантів. У всіх інших зразках із водоймищ м. Києва, як показали всі методи визначення, небезпечних концентрацій токсикантів не спостерігалось. Також за допомогою ААС було зареєстровано переви-

щення гранично допустимих концентрацій (ГДК) по міді, кобальту, цинку та хрому для зразка з полігону побутових відходів №5, що збігається з даними, отриманими за допомогою біосенсора.

Таблиця 3. Дані щодо перевищення ГДК в реальних зразках довкілля, отримані за допомогою різних методів аналізу

Місце відбору	АААНg ²⁺ , мкМ	ААС, мкМ	Біосенсор, мкМ
о. Вирлиця (Позняки, Київ)	0	0	0
Вирлиця + 400 нМ Hg ²⁺	0,405 (Hg ²⁺)	0	+
р. Дніпро (Осокорки, Київ)	0	0	0
о. Сонячне (Осокорки, Київ)	0	0	0
о. Сонячне + 25 мкМ Ag ⁺	0	24,87 (Ag ⁺)	+
о. Міністерське (Оболонь, Київ)	0	0	0
о. Опечень (Оболонь, Київ)	0	0	0
о. Опечень нижня (Оболонь, Київ)	0	0	0
о. Вербне (Оболонь, Київ)	0	0	0
р. Дніпро, затока «Оболонь», Київ	0	0	0
р. Дніпро (Оболонь, Київ)	0	0	0
Полігон побутових відходів №5, с. Підгірці Обухівського району Київської області	0	0 4,99 (Cu ²⁺) 0,576 (Co ²⁺) 22,5 (Zn ²⁺) 19 (Cr ²⁺)	++

Примітка. АААНg²⁺ — атомно-абсорбційний аналізатор ртуті; ААС — атомно-абсорбційна спектроскопія; «+» — перевищення ГДК; «++» — перевищення ГДК на декілька порядків.

Таким чином, підібрано оптимальні умови роботи кондуктометричного біосенсора на основі триензимної системи (інвертаза, мутаротаза, глюкозооксидаза) та визначено його основні характеристики у разі використання в інгібіторному аналізі водних розчинів. Показано принципову можливість реактивації біосенсора розчином ЕДТА або цистеїну. Досліджено чутливість біосенсора щодо

різних іонів важких металів. Триензимний біосенсор виявився найбільш чутливим до Ag^+ та Hg^{+2} і може бути використаний для селективного аналізу цих речовин або для визначення токсичності аналізованого зразка.

Проведено низку експериментів з визначення іонів важких металів у водних зразках з водоймищ м. Києва та полігона побутових відходів № 5 і виявлено позитивну кореляцію результатів, отриманих за допомогою біосенсора та традиційних методів визначення токсичних речовин.

Експериментально підтверджено можливість застосування розробленої біосенсорної системи як експресного аналізатора наяв-

ності іонів важких металів у водних зразках.

Автори щиро вдячні співробітникам Інституту екологієни та токсикології ім. Л. І. Медведя 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 (проект № 4591 «Development of enzyme multisensor arrays for ecological monitoring of toxins»).

ЛІТЕРАТУРА

1. Горлицкий Б. А., Шкандрий Б. О., Лебедев С. Ю. К вопросу об экологической опасности ртутных загрязнений // Экол. промышл. — 2007. — № 2. — С. 23–31.
2. Кучерявий В. М. Екологія. — Львів: Світ, 2000. — 499 с.
3. Сытник К. М., Брайон А. В., Гордецкий А. В. и др. Словарь-справочник по экологии. — К.: Наук. думка, 1994. — 667 с.
4. Голованова И. Л. Влияние тяжелых металлов на физико-биохимический статус рыб и водных беспозвоночных // Биол. внутр. вод. — 2008. — № 1. — С. 99 — 108.
5. Хоботова Е. В., Уханьова М. І., Трохименко О. В. та ін. Дослідження вмісту важких металів в ґрунтах поблизу підприємства «Балцем» (м. Балаклея Харківської обл.) // Екологія и промышленность. — 2007. — № 3. — С. 32 — 36.
6. Заець І. Є., Козировська Н. О. Вплив консорціуму бактерій на розвиток окисного стресу у рослин сої при забрудненні ґрунту кадмієм // Біополімери і клітина. — 2008. — Т. 24, № 3. — С. 246 — 253.
7. Солдаткін О. О., Назаренко О. А., Павлюченко О. С. та ін. Оптимізація роботи ферментних біоселективних елементів як складових потенціометричного мультибіосенсора // Там само. — 2008. — Т. 24, № 1. — С. 41–50.
8. Дудик А. М., Селяков С. Ю. Экологическое состояние биосферы Донбасса по данным комплексных эколого-геохимических исследований // Экологическая геохимия, М.: ИМГРЭ, 2001. — С. 427 — 432.
9. Петрова Л. О. Ртуть в гіпергенному і техногенному циклі міграції // Геол. журн. — 2003. — № 1. — С. 104 — 109.
10. Засекін Д. А. Моніторинг важких металів у довкіллі та способи зниження їх надлишку в організмі тварин: Автореф. дис. ... д-ра вет. наук.: 16.00.06 / Нац. аграрн. ун-т, 2002. — 40 с.
11. Amine A., Mohammadi H., Bourais I. et al. Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring // Biosens. Bioelectr. — 2006. — V. 21. — P. 1405–1423.
12. Розпутній О. І. Трансформація важких металів у біотехнологічних системах з виробництва яловичини і свинини: Автореф. дис. ... д-ра с.-г. наук: 03.00.20 / Білоцерківський держ. аграрний ун-т, 1999. — 35 с.
13. Мур Дж., Рамамурти С. Тяжелые металлы в природных водах. — М.: Мир, 1987. — 286 с.
14. Горобец П. Ю., Ильченко И. Н., Ляпунов С. М. и др. Распространенность экологически зависимых нарушений нервно-психического развития у детей в возрасте 4–7 лет при хроническом воздействии тяжелых металлов в малых дозах // Профил. забол. и укрепл. здоров. — 2005. — № 1. — С. 14–20.
15. Tran-Minh C., Pandev P. C., Kumaran S. Studies on acetylcholine sensor and its analytical application based on the inhibition of cholinesterase // Biosens. Bioelectr. — 1990. — V. 5. — P. 46–471.
16. Mohammadi H., Amine A., Cosnier S. et al. Mercury-enzyme inhibition assays with an amperometric sucrose biosensor based on a trienzymatic-clay matrix // Anal. Chim. Acta. — 2005. — V. 543. — P. 143–149.
17. Bertocchi P., Ciranni E., Compagnone D. et al. Flow injection analysis of mercury(II) in pharmaceuticals based on enzyme inhibition and biosensor detection // J. Pharm. Biomed. Anal. — 1999. — V. 20. — P. 263–269.
18. Дзядевич С. В., Шульга А. А., Пацковский С. В. и др. Тонкопленочные кондуктометрические датчики для ферментативных биосенсоров // Электрохимия. — 1994. — Т. 30, № 8. — С. 982–987.
19. Солдаткін О. О., Сосовська О. Ф., Бенілова І. В. та ін. Ензимний кондуктометричний сенсор для визначення концентрації

- формальдегіду у модельних зразках // Біополімери і клітина. — 2005. — Т. 21, № 5. — С. 425–432.
20. Дзядевич С. В. Кондуктометричні ферментні біосенсори: теорія, технологія, застосування // Там само. — 2005. — Т. 21, № 2. — С. 91–106.
21. Zhylyak G. A., Dzyadevich S. V., Korpan Y. I. et al. Application of urease conductometric biosensor for heavy-metal ion determination // Sens. Actuators B. — 1995. — V.24. — P. 145–148.
22. Volotovskiy V., Kim N. EDTA determination by urease-based inhibition biosensor // Electroanalysis. — 1998. — V. 10, N1. — P. 61–63.
23. Saran L., Cavaleiro E., Neves E. A. New aspects of the reaction of silver (I) cations with the ethylenediaminetetraacetate ion // Talanta. — 1995. — V. 42. — P. 2027–2032.

ОПТИМИЗАЦИЯ КОНДУКТОМЕТРИЧЕСКОГО ТРЕХЭНЗИМНОГО БИОСЕНСОРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

И. С. Кучеренко^{1,2}
*А. А. Солдаткин*¹
В. Н. Пешкова^{1,2}
*С. В. Дзядевич*¹
*А. П. Солдаткин*¹

¹Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

²Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко

E-mail: alex_sold@yahoo.com

В работе представлены данные по оптимизации работы кондуктометрического биосенсора для определения ионов тяжелых металлов в реальных образцах. В качестве кондуктометрического преобразователя использовали дифференциальную пару планарных золотых гребенчатых электродов, нанесенных на ситалловую подкладку. Роль биоселективного элемента выполняла трехэнзимная система (инвертаза, мутаротаза, глюкозооксидаза), иммобилизованная на поверхность преобразователя. Разработанный биосенсор характеризовался высокой воспроизводимостью сигнала. Оптимальная концентрация сахарозы для ингибиторного анализа — 1,25 мМ, время инкубации в исследуемом растворе составляло 10–20 мин. Биосенсор характеризовался наибольшей чувствительностью к ионам Hg²⁺ и Ag⁺. Показана принципиальная возможность реактивации биосенсора раствором ЭДТА после ингибирования ионами серебра или раствором цистеина после ингибирования ионами ртути. Результаты анализа реальных водных образцов положительно коррелировали с результатами традиционных методов определения токсикантов.

Ключевые слова: биосенсор, тяжелые металлы, ингибиторный анализ, энзимы, кондуктометрический преобразователь.

OPTIMISATION OF CONDUCTOMETRIC THREEENZYMES BIOSENSOR FOR HEAVY METAL DETECTION

I. S. Kucherenko^{1,2}
*O. O. Soldatkin*¹
V. M. Peshkova^{1,2}
*S. V. Dzyadevych*¹
*O. P. Soldatkin*¹

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

²Taras Shevchenko National University of Kyiv

E-mail: alex_sold@yahoo.com

Data of conductometric biosensor optimization work for heavy metal ions determining in the real samples are presented. A differential pair of the planar gold electrodes deposited on the pyroceramic substrate was used as a conductometric transducer. Threeenzymes system (invertase, mutarotase, glucoseoxidase) immobilized on a transducer's surface was used as a bioselective element. Developed biosensor demonstrated a good reproducibility of signal. Optimal concentration of sucrose for inhibition analysis was 1.25 mM and incubation time in investigated solution amounted to 10–20 min. Developed biosensor demonstrated the best sensitivity towards ions Hg²⁺ и Ag⁺. Principal capability of biosensor reactivation by EDTA solution after inhibition by silver ions or cysteine solution after inhibition by mercury ions was shown. Results of biosensor analysis of toxicants in real water samples have a positive correlation with the results obtained by traditional methods.

Key words: biosensor, heavy metals, inhibitory analysis, enzymes, conductometric transducer.