

МИНИСТЕРСТВО РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ОБЩЕМУ И ПРОФЕССИО-
НАЛЬНОМУ ОБРАЗОВАНИЮ

КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

РИЗАЕВА Елена Петровна

БИОХИМИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА
ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

03.00.16 - Экология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

КАЗАНЬ - 1998

Работа выполнена на кафедре прикладной экологии экологического факультета Казанского государственного университета.

Научный руководитель:	кандидат химических наук, доцент Евтюгин Г.А.
Научный консультант	доктор химических наук, профессор Латыпова В.З.
Официальные оппоненты:	доктор химических наук, доцент Евгеньев М.И. кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Зобов В.В.
Ведущая организация:	Институт проблем прикладной экологии и природопользования, г.Уфа

Защита состоится "___" _____ 1998 г. в ___ часов на заседании Специализированного ученого совета К 053.29.24 при Казанском государственном университете по адресу: 420008, г.Казань, ул. Кремлевская, 18, Казанский государственный университет, Ученый совет.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке КГУ.

Автореферат разослан "___" _____ 1998 г.

Ученый секретарь
Специализированного совета К 053.29.24,
кандидат химических наук

Евтюгин Г.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Экспресс-оценка загрязнения объектов окружающей среды является необходимым компонентом экологических исследований, включая нормирование сбросов и выбросов загрязняющих веществ и оценку экологических последствий загрязнения. Учитывая постоянно растущий перечень загрязняющих веществ, поступающих в окружающую среду, а также ужесточение гигиенических показателей их нормирования, полный химический анализ загрязнения вод, почв, растительности представляет собой очень сложную и дорогостоящую задачу. Поэтому возрастающее внимание уделяется экспресс методам контроля, ориентированным на детектирование опасных уровней загрязнения и оценку совокупного воздействия токсикантов на окружающую среду. В этой связи актуальной является задача разработки методов биохимической диагностики загрязнения, сочетающих чувствительность методов биотестирования и операционные характеристики химических сенсоров. Практическое внедрение таких биосенсорных устройств позволит расширить сферу экологического мониторинга, снизить риск опасного загрязнения биосферы, в том числе среды обитания человека.

Диссертация выполнена в рамках основного научного направления кафедры прикладной экологии Казанского государственного университета "Развитие теоретических и прикладных основ экологического мониторинга (рег.№ 0/980006937) при поддержке грантов РФФИ № 97-03-33210 "Разработка тестовых методов определения ингибиторов гидролитических ферментов с помощью электрохимических биосенсоров", Санкт-Петербург-ского конкурсного центра № 97-0-9.5-238 "Методы групповой оценки загрязнителей окружающей среды на основе биохимических тестов и биосенсоров" и программы ФЦНТП РФ "Новые принципы и методы получения химических веществ и материалов", тема 30.05 "Теоретические и практические основы изменения избирательности биоспецифических методов анализа для решения конкретных аналитических задач".

Целью настоящего исследования явилось изучение аналитических и операционных характеристик холинэстеразного биосенсора для контроля объектов окружающей среды, выявление экспериментальных факторов, определяющих чувствительность определения специфических ингибиторов в многокомпонентных средах, включая реальные объекты окружающей среды, а также разработка экспертной системы для оценки загрязненности (токсичности) сточных вод на

основе обобщенных показателей, включающих антихолинэстеразную активность образца.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- выявить механизм формирования отклика биосенсора к ингибитору, в том числе изучить влияние носителя фермента, сорбции веществ на мембране на аналитические характеристики определения загрязнителей окружающей среды - ингибиторов различного механизма действия;

- установить влияние макрокомпонентов тестируемого образца, таких как органические растворители, поверхностно-активные вещества, ингибиторы обратимого механизма действия, на чувствительность определения специфических ингибиторов, определить способы дифференциации и интерпретации отклика биосенсора при совместном присутствии в анализируемом растворе ингибиторов различного механизма действия;

- произвести скрининг антихолинэстеразной активности промышленных сточных вод и на этой основе разработать экспертную систему производственного типа для оценки характера загрязненности (токсичности) вод, базирующейся на результатах биохимического тестирования с привлечением других обобщенных физико-химических показателей, оценить эффективность методов математической классификации, использованных для построения экспертных систем.

Научная новизна и практическая значимость работы заключается в том, что она углубляет представления о закономерностях функционирования биосенсоров для определения ингибиторов в многокомпонентных средах, а также расширяет сферу применения биохимических средств диагностики в экологическом мониторинге. Впервые на основе изучения влияния экспериментальных факторов (условия измерения, присутствие поверхностно-активных веществ и органического растворителя, материал мембраны) установлен вклад поверхностных процессов (сорбция, массоперенос реагентов) в формирование отклика холинэстеразного биосенсора к ингибиторам различного механизма действия, показана возможность расчета кинетических параметров ингибирования. На этой основе определены пути регулирования чувствительности и селективности определения ингибиторов путем изменения гидрофобности ферментсодержащих мембран и подавления защитного эффекта обратимых ингибиторов холинэстераз. Впервые построена экспертная система оценки загрязненности сточных вод на основе обобщенных показателей, включающих биохимическое тестирование, и прове-

дена сравнительная оценка методов построения экспертной системы с помощью традиционных (дискриминантный анализ) и нетрадиционных (нейронные сети прямого распространения и Fuzzy ART Map) статистических методов.

Часть экспериментальных результатов и выводы на их основе использованы в учебном процессе Казанского государственного университета при чтении общего курса "Экологический мониторинг".

Апробация работы. Результаты исследований докладывались на Международном симпозиуме "Применение биосенсоров для прямого определения загрязнителей окружающей среды в полевых условиях" (Смоленице, Словакия, 1997), Международном симпозиуме "Применение биосенсоров для анализа загрязнителей окружающей среды" (Коимбра, Португалия, 1998), 9 Европейской конференции по химическим сенсорам и трансдьюсерам (Варшава, 1997), 9 Европейской конференции по электроаналитической химии (Коимбра, Португалия, 1998), на научных конференциях Казанского государственного университета в 1997, 1998 гг.

Основные результаты изложены в 2 статьях и 4 тезисах докладов.

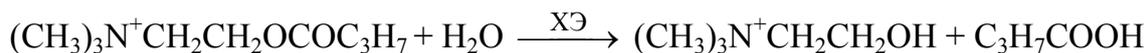
Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 157 страницах машинописного текста, включает 23 рисунка и 26 таблиц и состоит из введения, четырех глав, выводов, списка литературы (151 источник) и приложения.

Во Введении обоснована актуальность работы, ее новизна и практическая значимость, сформулированы цель исследования и основные задачи. Первая глава посвящена обзору литературы по определению загрязнителей окружающей среды с помощью биосенсоров. Во второй главе приведено описание методов исследования. Основные результаты экспериментальных исследований и их обсуждение приведено в главах 3-4.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. В исследованиях использовали промышленно выпускаемые препараты бутирилхолинэстеразы (ХЭ) из сыворотки крови лошади, КФ 3.1.1.8, производства НПО "Биомед", Пермь, с удельной активностью 4.2 ± 0.5 Е/мг. Субстратами ферментативной реакции служили бутирилхолин иодид (БХИ), ацетилхолин иодид (АХИ) и хлорид. Измерения проводили в 0.002 М. фосфатном или трис-буферных растворах, содержащих для постоянства ионной силы 0.1 моль/л хлорида натрия.

Иммобилизацию ХЭ проводили путем кросс-сшивки глутаровым альдегидом на поверхности кальки чертежной (ТУ 89289), нитратцеллюлозной (SM 11303, Sartorius) или нейлоновой (Hybond, Amersham) мембран. Мембраны фиксировали на поверхность плоского рН-метрического стеклянного электрода. Откликом служил максимальный сдвиг потенциала биосенсора после добавления субстрата, обусловленный выделяющейся в мембране в результате ферментативного процесса масляной или уксусной кислотой.



Измерения проводили относительно идентичного рН-электрода без мембраны с помощью иономера И-130 (Гомель, Беларусь).

Характеристики ферментсодержащих мембран и биосенсора на их основе приведены в табл.1.

Таблица 1

Характеристики ферментсодержащих мембран и отклика биосенсоров

Параметр	Материал мембраны		
	бумага	нейлон	нитрат целлюлозы
Удельная активность ХЭ, Е/см ²	0.010±0.003	1.8±0.3	1.4±0.2
Сохранение активности при иммобилизации, %	0.1	13	10
Продолжительность хранения в сухом состоянии при 4°С, месяцев	до 15	1-2	2-3
Отклик, мВ ^{а)}	55	70	65
Время отклика, мин	8	11	7

Примечание. а). Концентрация БХИ 0.002 моль/л

В качестве модельных ингибиторов ХЭ были изучены фосфорорганические пестициды - диазинон {О-(2-изопропил-4-метилпиримидил-6)-О,О-диэтилтиофосфат; фозалон {О,О-диэтил-S-(6-хлор-2-оксобензоксазолинил-3-метил)-дифосфат; метафос {О,О-диметил-О(4-нитрофенил)тиофосфат}; корал {О,О-диэтил-О-(3-хлор-4-метилкумаринил)тиофосфат}, а также соли меди(II), алюминия(III), кадмия(II), фторид натрия, гидразониевые соли диалкилдифосфатов и диалкилфосфитов:

A-1	$[o\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}=\text{N}-\text{N}(\text{CH}_3)_2]$ $[(\text{CH}_3\text{O})_2\text{PHO}]$
A-2	$[o\text{-ClC}_6\text{H}_4\text{CH}=\text{N}-\text{N}(\text{CH}_3)_2]$ $[(\text{CH}_3\text{O})_2\text{PHO}]$
B-1	$[m\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}=\text{N}-\text{NH}(\text{CH}_3)_2]^+$ $[\text{S}_2\text{P}(\text{OC}_2\text{H}_5)_2]^-$
B-2	$[m\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}=\text{N}-\text{NH}(\text{CH}_3)_2]^+$ $[\text{S}_2\text{P}(\text{OC}_3\text{H}_7)_2]^-$
B-3	$[m\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}=\text{N}-\text{NH}(\text{CH}_3)_2]^+$ $[\text{S}_2\text{P}(\text{OC}_3\text{H}_7\text{-i})_2]^-$
C-1	$[o\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}=\text{CHCH}=\text{N}-\text{NH}(\text{CH}_3)_2]^+$ $[\text{S}_2\text{P}(\text{OC}_2\text{H}_5)_2]^-$
C-2	$[o\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}=\text{CHCH}=\text{N}-\text{NH}(\text{CH}_3)_2]^+$ $[\text{S}_2\text{P}(\text{OC}_3\text{H}_7)_2]^-$
C-3	$[o\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}=\text{CHCH}=\text{N}-\text{NH}(\text{CH}_3)_2]^+$ $[\text{S}_2\text{P}(\text{OC}_3\text{H}_7\text{-i})_2]^-$

Определение ингибиторов в модельных водных растворах. В табл.2 приведены аналитические характеристики определения пестицидов из модельных водных растворов.

Таблица 2

Аналитические характеристики определения необратимых ингибиторов с помощью холинэстеразного биосенсора (n=7, P=0.95)

Пестицид ^{а)}	Мембрана	I (%) = a + b lg (C ₁ , моль/л)				Диапазон определяемых концентраций, моль/л
		a	b	r ²	ПО	
Диазинон (8·10 ⁻⁹)	Бумага	268±10	30±2	0.990	1.2·10 ⁻⁹	2·10 ⁻⁹ -6·10 ⁻⁷
	Нейлон	257±7	29±2	0.988	2·10 ⁻⁹	3·10 ⁻⁹ -6·10 ⁻⁷
	НЦ ^{б)}	145±6	15±3	0.992	1·10 ⁻⁹	1.5·10 ⁻⁹ -5·10 ⁻⁷
Фозалон (2·10 ⁻⁸)	Бумага	201±10	22±2	0.987	2·10 ⁻⁹	3·10 ⁻⁹ -1·10 ⁻⁶
	Нейлон	215±20	25±3	0.978	4·10 ⁻⁹	7·10 ⁻⁹ -4·10 ⁻⁷
	НЦ	388±41	42±7	0.965	7·10 ⁻¹⁰	1·10 ⁻⁹ -1·10 ⁻⁷
Метафос (3·10 ⁻⁸)	Бумага	318±14	40±3	0.985	1·10 ⁻⁸	2·10 ⁻⁸ -2·10 ⁻⁶
	Нейлон	338±13	45±3	0.990	2·10 ⁻⁸	3·10 ⁻⁸ -6·10 ⁻⁶
	НЦ	420±21	50±6	0.980	5·10 ⁻⁹	9·10 ⁻⁹ -1·10 ⁻⁷
Корал (5·10 ⁻⁹)	Бумага	310±46	31±7	0.925	1·10 ⁻¹⁰	3·10 ⁻¹⁰ -1·10 ⁻⁸
	Нейлон	927±78	96±10	0.975	2·10 ⁻¹⁰	3·10 ⁻¹⁰ -2·10 ⁻⁹
	НЦ	730±65	74±4	0.987	1·10 ⁻¹⁰	2·10 ⁻¹⁰ -3·10 ⁻⁹

Примечание: а). В скобках приведены значения предела обнаружения (ПО), полученные в тех же условиях с помощью нативной ХЭ; инкубирование 10 мин. б). Нитрат целлюлозы (Sartorius)

Для повышения чувствительности определения тионовые фосфорорганические пестициды предварительно окисляли до кислородных аналогов. Чувствительность определения не зависит от природы субстрата и рН буферного раство-

ра в диапазоне 6.0-8.0. Биосенсор позволяет надежно детектировать присутствие остаточных количеств изученных пестицидов на уровне 0.1-0.01 ПДК, причем нативная ХЭ в тех же условиях показала более высокие пределы обнаружения пестицидов. Для изучения режима функционирования биосенсора и определения кинетических параметров ингибирования предложено использовать анаморфозу градуировочных графиков определения необратимых ингибиторов в координатах $C_1 - \ln \frac{100}{100-I}$, где C_1 - концентрат ингибитора, моль/л, а $I, \%$ - степень ингибирования. Угол наклона зависимости равен проведению биомолекулярной константы ингибирования (k_{II}) на время инкубирования. Рассчитанные значения k_{II} приведены в табл.3.

Таблица 3

Расчетные значения бимолекулярной константы ингибирования ХЭ фосфорорганическими пестицидами

Пестицид	Мембрана	k_{II} , $\text{мин}^{-1} \cdot (\text{моль/л})^{-1}$	Диапазон концентраций C_1 , моль/л, использовавшийся для расчетов
Диазинон	(а)	$2 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^{-9} - 8 \cdot 10^{-8}$
	Бумага	$4 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^{-8}$
	Нейлон	$1 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^{-8}$
	НЦ	$5 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^{-9} - 2.5 \cdot 10^{-8}$
Фозалон	(а)	$3 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^{-8}$
	Бумага	$5 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^{-9} - 2 \cdot 10^{-8}$
	Нейлон	$7 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^{-9} - 2 \cdot 10^{-8}$
	НЦ	$3 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^{-9} - 8 \cdot 10^{-9}$
Метафос	(а)	$3 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^{-8} - 9 \cdot 10^{-8}$
	Бумага	$7 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-7}$
	Нейлон	$2 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^{-8} - 5 \cdot 10^{-7}$
	НЦ	$3 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^{-8}$
Корал	(а)	$7.5 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^{-8} - 8 \cdot 10^{-8}$
	Бумага	$5 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^{-10} - 1 \cdot 10^{-9}$
	Нейлон	$1.5 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^{-10} - 7 \cdot 10^{-10}$
	НЦ	$2 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^{-10} - 6 \cdot 10^{-10}$

Примечание. (а). Нативный фермент

Рассчитанные значения константы ингибирования согласуются с данными, полученными с нативной ХЭ. Это позволяет предположить отсутствие кинетического торможения реагирования вследствие замедленности массопереноса

субстрата в мембрану. Завышенные значения k_{II} по сравнению с характеристиками нативного фермента, обнаруженные при использовании в качестве носителя нитрата целлюлозы, могут быть обусловлены сорбционным накоплением ингибитора в мембране. Для проверки этого было изучено влияние неионогенных СПАВ на характеристики определения пестицидов.

Предварительно было показано, что все изученные СПАВ не оказывают влияния на активность нативной ХЭ в диапазоне концентраций 0.001-0.5 % и не меняют отклика биосенсора в диапазоне концентраций 0.001-0.01%. При дальнейшем увеличении содержания СПАВ, наблюдается плохо воспроизводимое снижение величины отклика на 10-50%, сопровождаемое уменьшением времени жизни мембраны до 2-5 дней.

Неионогенные СПАВ повышают ингибирующее действие пестицидов. В качестве примера на рис.1 представлены градуировочные зависимости, полученные на бумажных мембранах.

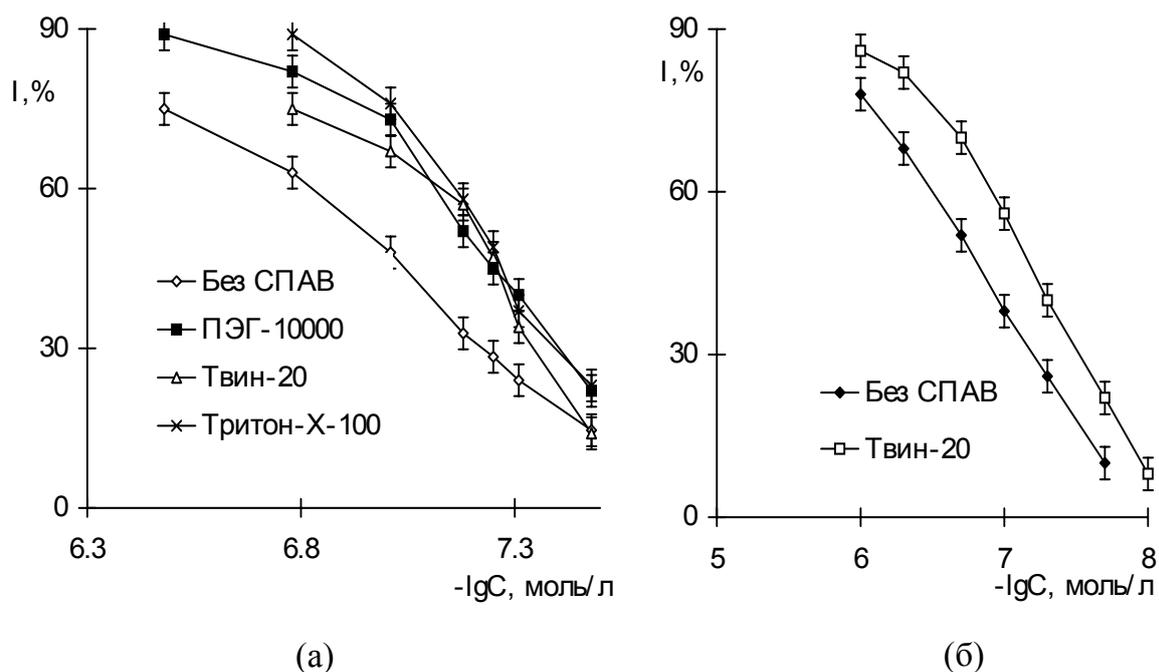


Рис.1. Влияние СПАВ на необратимое ингибирующее действие диазинона (а) и метафоса (б). ХЭ иммобилизована на бумаге. Фосфатный 0.002 М. буферный раствор + 0.1 моль/л NaCl, pH 7.9. Субстрат БХИ 0.002 моль/л. Инкубирование 10 мин. Концентрация СПАВ 0.01%.

Чувствительность определения пестицидов в присутствии СПАВ в среднем в 1.5-2 раза выше, а пределы обнаружения - в 2-8 раз ниже, чем в отсутствии СПАВ. При этом поверхностно-активные вещества нивелируют различия в ана-

литических характеристиках определения, полученных для различных носителей фермента: минимальные значения пределов обнаружения (биосенсоры с нитратцеллюлозной мембраной) меняются при добавке СПАВ меньше, максимальные (биосенсоры с бумажной и нейлоновой мембранами) - больше. По-видимому, поверхностно-активные вещества подавляют неспецифическую сорбцию ингибитора, увеличивая его подвижность в мембране, и гидрофобизируют сам носитель, увеличивая коэффициент распределения пестицида между мембраной и водой. В подтверждение этого ингибирующее действие фторид-ионов или ионов металлов в присутствии СПАВ либо не меняется, либо подавляется (рис.2), причем как и при определении пестицидов, наибольший эффект наблюдается в тех случаях, когда гидрофобные свойства носителя и ингибитора максимально различны (пестициды - бумажные мембраны, фториды - нитрат целлюлозы).

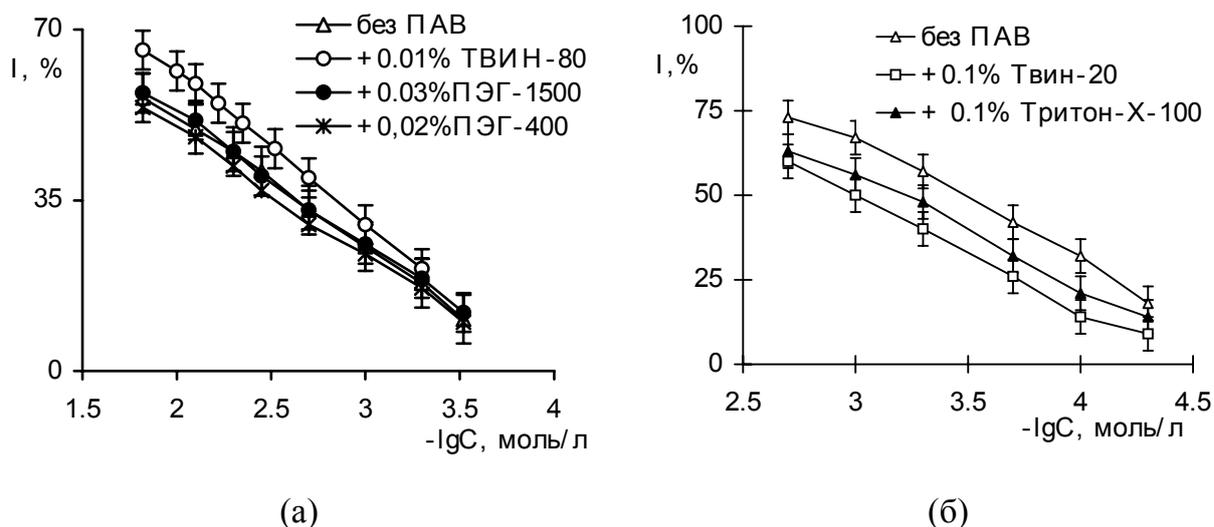


Рис.2. Градуировочные кривые определения фторид-ионов в присутствии СПАВ. ХЭ иммобилизована на бумаге (а) и нитрате целлюлозы (б). Трис-буферный 0.002 М. раствор + 0.1 моль/л NaCl, pH 7.9. Субстрат БХИ 0.002 моль/л. Инкубирование 10 мин. Концентрация СПАВ 0.01%.

О том, что влияние СПАВ связано с гидрофобными свойствами носителя и ингибитора, а не с механизмом их действия, свидетельствуют результаты, полученные с прозеринном. Являясь необратимым ингибитором ХЭ, прозерин хорошо растворим в воде, и для него было обнаружено незначительное снижение ингибирующей способности в присутствии СПАВ.

Другая возможная причина расхождения результатов определения ингибиторов с помощью нативной и иммобилизованной ХЭ может состоять в нерав-

номерности распределения ингибитора в мембране. Для проверки этой возможности нами был использован биосенсор с двумя слоями мембраны. Удвоение толщины мембраны приводит к значительному снижению отклика биосенсора. При этом за счет торможения переноса субстрата в мембрану необратимое ингибирующее действие пестицидов снижается. Однако снижение активности ХЭ, измеренное в каждом отдельном слое, оказалось одинаковым, что говорит о равномерном распределении ингибитора в мембране. Это подтверждается результатами измерения обратимого ингибирующего действия ионов металлов и фторидов: оно проводится в стационарных условиях и не зависит от числа слоев (толщины) мембраны (рис.3).

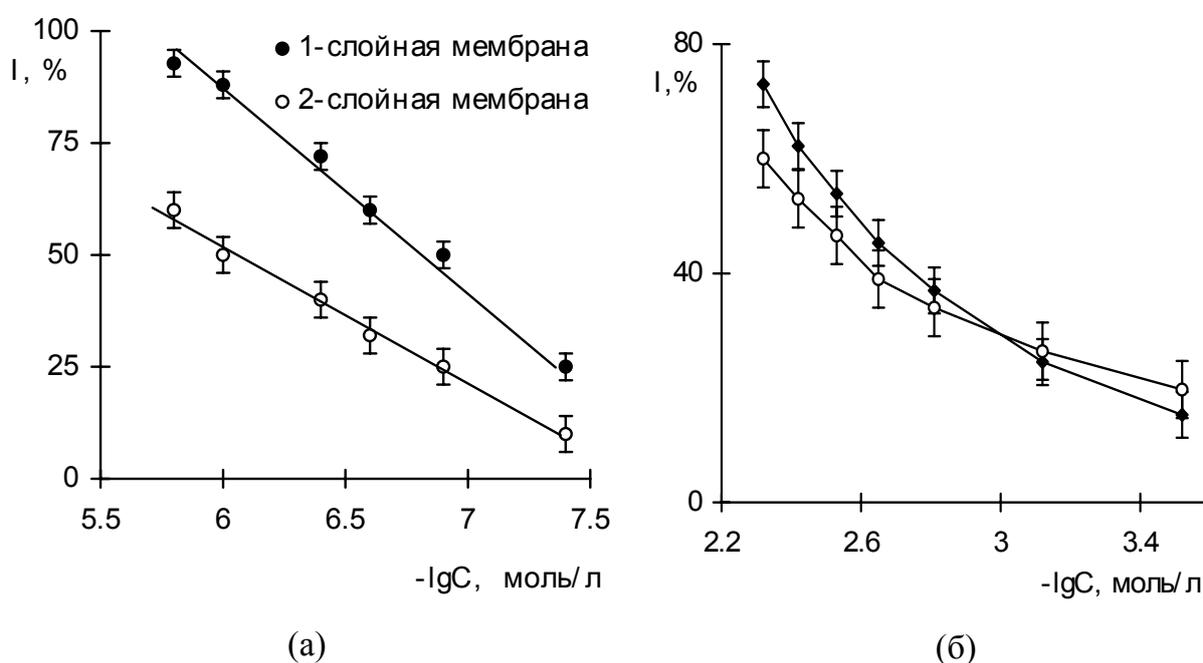


Рис.3. Градуировочные зависимости метафоса (а, фосфатный буферный раствор, рН 7.9, инкубирование 10 мин, субстрат БХИ 0.002 моль/л) и CuCl_2 (б, трис-буферный раствор, рН 6.0, без инкубирования, субстрат ацетилхолин хлорид 0.002 моль/л)

Поведение холинэстеразного биосенсора в многокомпонентных растворах. Присутствие обратимых эффекторов фермента подавляет необратимое ингибирующее действие фосфорорганических пестицидов независимо от того, активатором (соли алюминия) или ингибитором (соли меди, фториды) является эффектор в отношении нативной ХЭ. Относительное снижение степени ингибирования определяется природой эффектора и его устойчивостью в водном растворе. Ионы металлов, ингибирующее действие которых зависит от накопления

гидроксо-формы MeOH^{H^+} , проявляют слабое защитное действие с максимум в слабощелочной области. Напротив, фторид-ионы, устойчивые в широком диапазоне рН, в наибольшей степени подавляют ингибирование фосфорорганических пестицидов (рис.4).

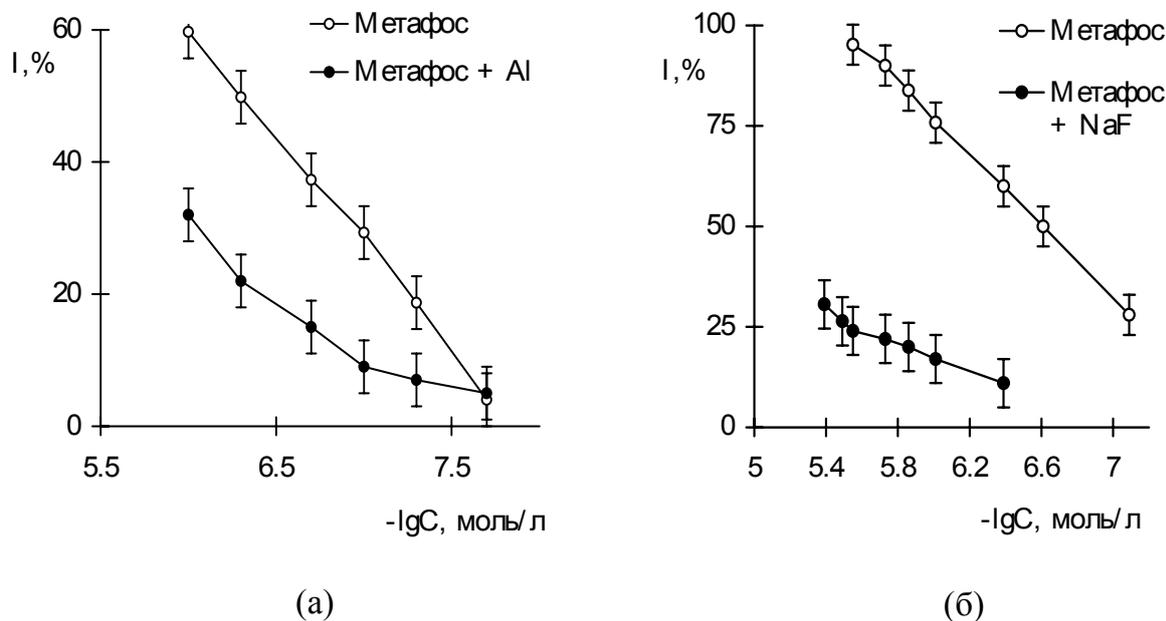


Рис.4. Защитное действие эффекторов ХЭ при определении метафоса: а). Влияние 0.002 М. $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$. Трис-буферный раствор, рН 6.5. ХЭ иммобилизована на бумаге. Субстрат ацетилхолин хлорид 0.002 моль/л; б). Влияние $3 \dots 10^{-4}$ моль/л NaF. Фосфатный буферный раствор, рН 7.9, субстрат БХИ 0.002 моль/л

В тех случаях, когда молекула ингибитора имеет несколько центров связывания с ферментом, защитный эффект может проявляться и в отсутствие эффекторов фермента. Так, гидразониевые соли диалкилфосфитов и диалкилдитиофосфатов проявляют слабое обратимое ингибирующее действие с максимумом в слабокислой области (рН 6.0-6.5). Ингибирующее действие солей уменьшается с увеличением объема радикала при атоме фосфора: $\text{C}_2\text{H}_5 > \text{n-C}_3\text{H}_7 > \text{i-C}_3\text{H}_7$. С переходом от гидразониевых производных бензальдегида (В-1, В-2, В-3) к производным коричневого альдегида (С-1, С-2, С-3) обратимое ингибирующее действие усиливается. Электрохимическое окисление дитиофосфатного фрагмента до фосфорильного аналога увеличивает общее ингибирующее действие и наклоны градуировочных графиков, особенно для производных бензальдегида. Соответствующие пределы обнаружения составляют $n \cdot (10^{-4} - 10^{-5})$ моль/л. При этом было обнаружено явление "памяти" биосенсора: если после инкубирования биосенсора в

растворе гидразониевой соли провести измерение отклика, промыть мембрану и повторить измерение отклика без дополнительного инкубирования, наблюдается дополнительное уменьшение отклика: гидразониевый катион выступает как эффектор, защищая активный центр ХЭ от фосфорилирования. Промывка удаляет подвижный катион из мембраны, в результате чего необратимое ингибирующее действие усиливается (рис.5).

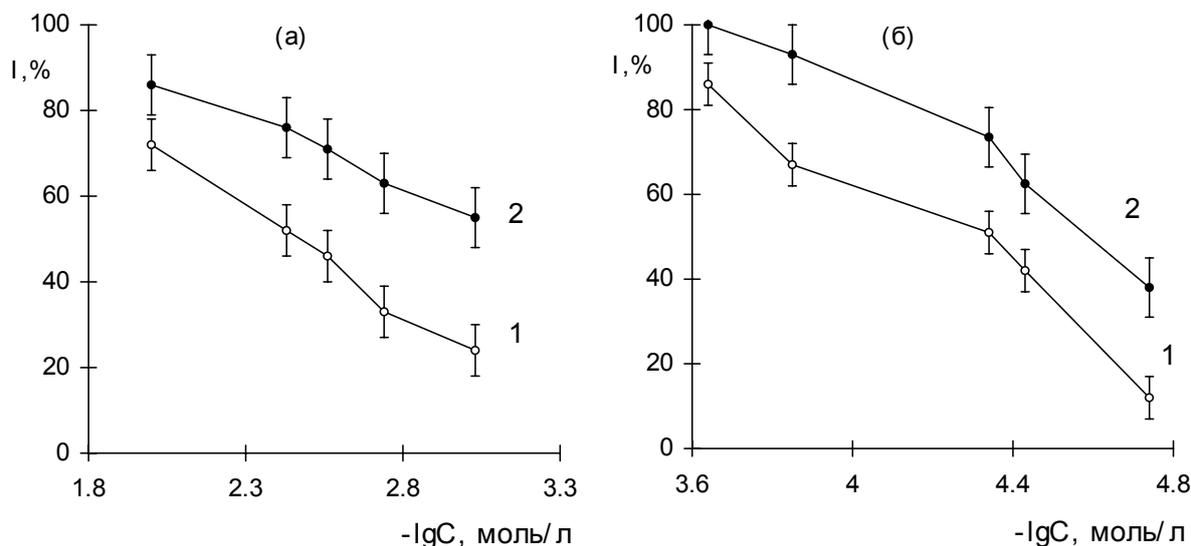


Рис.5. Ингибирующее действие С-2 (а) и С-3 (б) до (1) и после (2) отмывки биосенсора после инкубирования. Фосфатный 0.002 М. буферный раствор, рН 6.0. Субстрат БХИ 0.002 моль/л

Иммобилизация ХЭ повышает ее устойчивость в отношении органических растворителей. В растворе ХЭ полностью инактивируется в присутствии 20% этанола и ацетона, при иммобилизации на бумаге и нейлоне активность фермента сохраняется при содержании растворителей до 30%, причем присутствие до 25% органических растворителей не влияет на градуировочные графики фосфорорганических пестицидов. Это позволяет определять остаточные количества пестицидов в растительном материале после их экстракции без удаления органического растворителя. Исключение составляет тетрахлорид углерода. В его присутствии чувствительность определения пестицидов несколько увеличивается, а фторидов - снижается. При этом резко сокращается время жизни ферментсодержащей мембраны и эффективность реактивации фермента после ингибирования (рис.6).

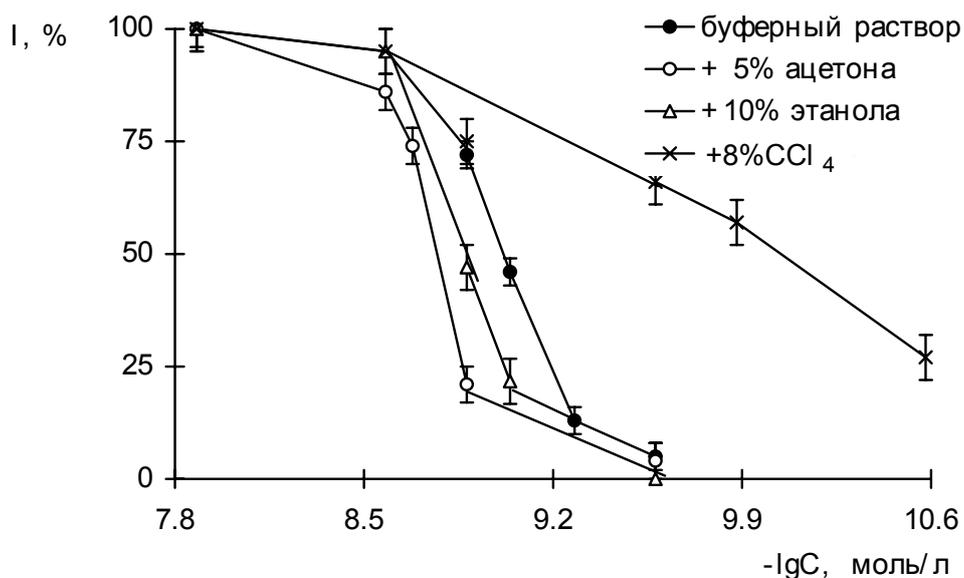


Рис.6. Влияние органических растворителей на ингибирующее действие корала. ХЭ иммобилизована на нейлоне. Фосфатный буферный раствор, рН 7.9. Субстрат БХИ 0.002 моль/л. Инкубирование 10 мин.

Напротив, действие ингибирующее действие фторидов в присутствии 20-25% этанола незначительно снижается при сохранении наклона градуировочного графика. По-видимому, указанные изменения также связаны с гидрофильно-гидрофобными свойствами мембраны и ингибиторов.

Экспертная оценка загрязненности сточных вод. Многообразие факторов, определяющих отклик холинэстеразного биосенсора позволяет предложить его для оценки общей загрязненности тестируемого образца аналогично другим методам биотестирования. Совместно с сектором биотестирования Центральной специализированной инспекции аналитического контроля Минприроды РТ нами был проведен скрининг антихолинэстеразной активности промышленных сточных вод г.Казани и приказанского региона. Несмотря на отсутствие в пробах пестицидов, более 70% всех проб показали ингибирующее действие, связанное, по-видимому, с присутствием обратимых органических и неорганических ингибиторов ХЭ. Сравнение с результатами определения острой токсичности вод для равноресничных инфузорий *Paramecium caudatum* (экспозиция 1 ч.) позволило разделить все воды на три условные группы. Сточные воды предприятий машиностроительного комплекса, кожевенного объединения и др., содержащие большие количества солей тяжелых металлов, показывают умеренное ингибирование ХЭ (до 60%) и смертность парамеций (40-80%). Небольшая часть проб показала

токсичность для парамеций при отсутствии или незначительном (менее 20%) ингибировании отклика биосенсора. Это сточные воды небольших муниципальных предприятий, мясокомбината, завода по переработке шерсти и других предприятий, загрязненные преимущественно органическими соединениями, в том числе нефтепродуктами и жирами. Третью группу составили сточные воды, для которых наблюдалась умеренная антихолинэстеразная активность (ингибирование до 40%), но отсутствовала токсичность для парамеций (ливневой сток в сельской местности, сточные воды сельскохозяйственных предприятий и предприятий химической промышленности).

По результатам предварительных испытаний была предложена экспертная система продукционного типа для оценки источника сточных вод по трем классам - преимущественное загрязнение вод тяжелыми металлами, устойчивыми органическими соединениями и лабильными органическими соединениями и биогенными элементами.

Классификацию сточных вод проводили на выборке из 175 элементов (проб сточных вод) по пяти независимым переменным, включающим показатели БПК₅, ХПК, антихолинэстеразную активность до и после электрохимической обработки вод, токсичность для парамеций. Внутригрупповой статистический анализ показал отсутствие корреляций между данными показателями и нормальное распределение всех независимых переменных. Для построения экспертной системы использовали три метода - дискриминантный анализ, нейронные сети прямого распространения и нейронные сети, основанные на теории адаптивного резонанса (Fuzzy ART Map).

Дискриминантный анализ не позволил осуществить классификацию выборки. При построении дискриминантных функций на всей выборке успешный прогноз класса достигается лишь в 48% случаев при априорной вероятности 33%, причем третий класс вообще не выделяется. При объединении второго и третьего класса (органическое загрязнение вод) успешный прогноз составил 59% при априорной вероятности 50%. Одна из причин низкой эффективности линейных регрессионных методов явилась большая разнородность исходных данных, что в сочетании с небольшим размером выборки не позволяет однозначно решить задачу классификации выборки. Для получения нелинейных классифицирующих функций была использована искусственная нейронная сеть прямого распространения, состоящая из пяти входных нейронов, двух невидимых слоев по 9 и 5 нейронов соответственно и трех (двух) выходных нейронов. Результаты

классификации при обучении нейронной сети на полной выборке (175 элементов) приведена в табл.4.

Таблица 4

Классификация элементов выборки по трем классам методом нейронных сетей прямого распространения

Реальный класс	Предсказанный класс, %		
	1	2	3
1	77	21	2
2	24	70	6
3	27	17	56

В целом по всей выборке успешный прогноз реализуется в 79% случаев и 83% - при делении выборки на два класса (неорганическое и органическое загрязнение). При этом проверка производилась на тех же элементах, что и обучение нейронной сети.

Учитывая высокую разнородность данных, для проверки предсказательной способности экспертной системы был использован более эффективный для малых выборок вариант искусственных нейронных сетей Fuzzy ART Map, основанный на теории адаптивного резонанса. Первоначально случайным образом было проведено разделение исходной выборки на обучающую (150 элементов) и контрольную (25 элементов), после чего проведено обучение нейронной сети на обучающей выборке и оценка успешности прогноза на контрольной. Результаты обучения зависели от способа генерирования выборок, что явилось следствием небольшого объема исходной выборки. В табл.5 приведена сравнительная характеристика результатов классификации (оценка успешности прогноза на независимой выборке) по всем трем методам. Как видно, в равных условиях Fuzzy ART Map демонстрирует в большинстве обучающих выборок лучшие результаты по сравнению с другими методами классификации. Оценка успешного прогноза не менее чем на 20% выше, чем в дискриминантном методе и на 4-12 % выше, чем при использовании нейронной сети прямого распространения. Кроме того, даже при близкой эффективности Fuzzy ART Map и нейронной сети прямого распространения в последней успешность прогноза достигается за счет диагностики загрязнения тяжелыми металлами (1 класс), а 3 класс практически не определяется. Так, вероятность правильного определения 3 класса в выборках №2-5,8,12,17 равна 0%, в выборках 1,6,11,14,17 - менее 25%.

Таблица 5

Оценка эффективности экспертных систем классификации сточных вод на три класса загрязненности различными статистическими методами

№ выборки	Оценка успешного прогноза, %		
	Fuzzy ART Map	нейронная сеть прямого распространения	дискриминантный анализ
1	68	68	48
2	72	60	48
3	64	68	32
4	68	68	56
5	76	52	44
6	76	64	36
7	68	60	36
8	64	68	36
9	72	68	48
10	64	64	40
11	64	60	48
12	68	64	28
13	64	56	52
14	68	64	36
15	64	64	20
16	64	72	48
17	64	64	48
18	64	68	52
19	64	56	52

ВЫВОДЫ

1. Разработан биосенсор на основе плоского стеклянного рН-метрического электрода и бутирилхолинэстеразы, иммобилизованной на бумажной, нитратцеллюлозной и нейлоновых сменных мембранах, который позволяет детектировать присутствие фосфорорганических пестицидов на уровне $n \cdot (10^{-1} - 10^{-2})$ ПДК. Достигнутые пределы обнаружения составили $1 \cdot 10^{-8} \div 1 \cdot 10^{-10}$ моль/л.
2. Чувствительность определения ингибиторов холинэстераз определяется гидрофобностью носителя фермента. Добавки неионогенных поверхностно-активных веществ (ПЭГ, Тритон-Х-100, Твин) оказывают дифференцирующее действие на поведение биосенсора в многокомпонентных растворах: в их присутствии необратимое ингибирующее действие пестицидов усиливается, тогда как обратимое ингибирующее действие ионов металлов, фторидов остается неизменным или снижается. Присутствие $n \cdot 10^{-2}\%$ СПАВ подавляет защитное действие обратимых ингибиторов, снижающих чувствительность определения пестицидов.
3. Иммобилизация холинэстеразы повышает устойчивость фермента к полярным органическим растворителям. Присутствие 10-25% этанола и ацетона оказывает незначительное влияние на аналитические характеристики определения обратимых и необратимых ингибиторов холинэстеразы, присутствие 8% тетрагидрохлорида углерода снижает пределы обнаружения необратимых ингибиторов при постоянстве аналитических характеристик определения обратимых ингибиторов.
4. Разработана методика определения кинетических параметров необратимого ингибирования и оценки влияния поверхностных факторов (сорбция, массоперенос компонентов ферментативной реакции).
5. Скрининг токсичности промышленных сточных вод г. Казани и прикамского региона показал антихолинэстеразную активность у более чем 70% проб и токсичность для *Paramecium caudatum* у 20-30% проб. Проведен анализ показателей токсичности вод в зависимости от содержания загрязняющих веществ и основных гидрохимических показателей вод.
6. Разработана система экспертной оценки загрязненности сточных вод по показателям антихолинэстеразной активности, токсичности для парameций, БПК и ХПК, выявляющая позволяющая определить характер загрязнения вод (соли тяжелых металлов, устойчивые и неустойчивые органические загрязнители).
6. Проведена сравнительная оценка методов построения системы экспертной оценки загрязненности вод по характеру загрязнения методами дискриминантного анализа, искусственных нейронных сетей прямого распространения и Fuzzy

ART Map. Показано, что применение нейрокомпьютерных технологий позволяет достичь 80% вероятности успешного прогноза характера загрязнения по обобщенным показателям.

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:

1. Evtugyn G.A., Rizaeva E.P. The application of inhibitor biosensors in local programmes of environmental monitoring./ NATO Advanced Research Workshop "Biosensors for direct monitoring of environmental pollutants in field", Smolenice, Slovakia, 1997, P. 69.
2. Evtugyn G.A., Rizaeva E.P., Stepanova N.Ju., Petrov A.M. Preliminary testing of waste and sewage waters based on cholinesterase biosensor.// Environ. Radiology Applied Ecology. 1997. V.3. №1. P.7-12.
3. Evtugyn G.A., Rizaeva E.P., Stoikova E.E., Budnikov H.C. The application of cholinesterase potentiometric biosensor for preliminary screening of the toxicity of waste waters. // Electroanalysis. 1997. V.9. N 14. 1124-1128.
4. Evtugyn G.A., Rizaeva E.P., Petrov A.M., Stepanova N.Ju. Cholinesterase based biosensors for preliminary testing of waste waters./ ACS Annual Meeting "Biosensors in Environmental Monitoring" San-Francisco, April 1997. P.G-07.
5. Евтюгин Г.А., Ризаева Е.П., Петров А.М., Степанова Н.Ю. Экспресс-диагностика загрязнения сточных вод г.Казани с помощью ферментного биосенсора./ "Актуальные экологические проблемы РТ" Тез.докл.респ. конф. г.Казань, 1997. С.288-289.
6. Evtugyn G.A., Saveliev A.A., Rizaeva E.P., Budnikov H.C. Non-selective potentiometric biosensors for the control of waste waters: artificial neural network approach./ ESEAC'98. 7th European Conference of Electroanalysis. Book of Abstr. Coimbra 1998. P.189.