

# BIOSENSORS

# БІОСЕНСОРИ

---

---

УДК 547.495.9

## ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ОПТИМІЗАЦІЯ ПРОЦЕСУ РЕАКТИВАЦІЇ БУТИРИЛХОЛІНЕСТЕРАЗНОГО БІОСЕНСОРА ПРИ ІНГІБІТОРНОМУ АНАЛІЗІ ПЕСТИЦИДІВ

*Т. П. Величко<sup>1,2</sup>, О. О. Солдаткін<sup>1,2</sup>, О. С. Павлюченко<sup>3</sup>, О. Л. Кукла<sup>3</sup>, О. П. Солдаткін<sup>1,2</sup>,  
С. В. Дзядевич<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, вул. Заболотного 150, Київ, 03680,  
Україна

<sup>2</sup> Київський національний університет імені Тараса Шевченка вул. Володимирська 64, Київ,  
01003, Україна

<sup>3</sup> Інститут фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України, просп. Науки 41, Київ,  
03028, Україна

taras.velychko@gmail.com, alex\_sold@yahoo.com, pavluchenko@isp.kiev.ua, kukla@isp.kiev.ua,  
a\_soldatkin@yahoo.com, dzyad@yahoo.com

## ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ОПТИМІЗАЦІЯ ПРОЦЕСУ РЕАКТИВАЦІЇ БУТИРИЛХОЛІНЕСТЕРАЗНОГО БІОСЕНСОРА ПРИ ІНГІБІТОРНОМУ АНАЛІЗІ ПЕСТИЦИДІВ

*Т. П. Величко, О. О. Солдаткін, О. С. Павлюченко, О. Л. Кукла, О. П. Солдаткін,  
С. В. Дзядевич*

**Анотація.** В роботі представлено дані щодо розробки кондуктометричного біосенсора для визначення пестицидів та вивчення можливості реактивації даного біосенсора після інгібіторного аналізу. В складі біосенсора, як кондуктометричний перетворювач сигналу використувувалась диференційна пара планарних золотих гребінчастих електродів, нанесених на ситалову підкладку. Роль біоселективного елементу відіграла бутирилхолінестераза (БуХЕ), коїмобілізована з бичачим сироватковим альбуміном за рахунок поперечної зшивки глутаровим альдегідом на поверхні перетворювача. В роботі було отримано калібрувальні криві біосенсора на різні концентрації бутирилхоліну (БуХ). Підібрано оптимальну концентрацію субстрату для інгібіторного аналізу. Далі було перевірено чутливість біосенсора до фосфорорганічного пестициду - трихлорфону, побудовано калібрувальну криву. Доведено принципову можливість реактивації біоселективної мембрани розчином реактиватора піридин-2-альдоксиметилїодіда (ПАМ-2) після незворотного інгібування ферменту. Досліджено та підібрано оптимальні умови реактивації біомембрани на основі БуХЕ, а саме проаналізована залежність рівня реактивації біосенсора від концентрації токсиканта, часу реактивації та концентрації реактиватора.

**Ключові слова:** кондуктометричний перетворювач, біосенсор, бутирилхолінестераза, пестициди, інгібіторний аналіз, реактивація ферменту

## INVESTIGATION AND OPTIMIZATION OF REACTIVATION BUTYRYLCHOLINESTERASE-BASED BIOSENSOR FOR INHIBITORY ANALYSIS OF PESTICIDES

*T. P. Velychko, O. O. Soldatkin, O. S. Pavluchenko, O. L. Kukla, A. P. Soldatkin, S. V. Dzyadevych*

**Abstract.** In this manuscript we report development of the conductometric biosensor for the pesticides detection and analyze the possibility of its reactivation after inhibition. A differential pair of planar gold interdigitated electrodes deposited on the sital substrate served as a transducer of the conductometric signal. Butyrylcholinesterase (BuChE) coimmobilized by glutaraldehyde crosslinking with bovine serum albumin on the transducer surface was used as a bioselective element. The biosensor calibration curves were obtained for different concentrations of butyrylcholine (BuCh) and optimal concentration was found. Next, we tested the biosensor sensitivity to organophosphorus pesticide trichlorfon, the calibration curve was plotted. We showed the possibility of the bioselective membrane reactivation after irreversible enzyme inhibition, using the solution of pyridine-2-aldoximemethyl iodide (PAM-2) as a reactivator. The conditions of reactivation of BuChE-based biomembranes, such as dependence on the duration of reactivation and the toxicant and reactivator concentrations, were investigated and optimized.

**Keywords:** conductometric transducer, biosensor, butyrylcholinesterase, pesticides, inhibition analysis, enzyme reactivation

## ИССЛЕДОВАНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА РЕАКТИВАЦИИ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗНОГО БИОСЕНСОРА ПРИ ИНГИБИТОРНОМ АНАЛИЗЕ ПЕСТИЦИДОВ

*Т. П. Величко, О. О. Солдаткин, О. С. Павлюченко, О. Л. Кукла, О. П. Солдаткин,  
С. В. Дзядевич*

В работе представлены данные по разработке кондуктометрического биосенсора для определения пестицидов и изучение возможности реактивации данного биосенсора после ингибиторного анализа. В составе биосенсора, как кондуктометрический преобразователь сигнала использовалась дифференциальная пара планарных золотых гребенчатых электродов, нанесенных на ситаловую подложку. Роль биоселективного элемента играла бутирилхолинэстераза (БуХЭ), коиммобилизована с бычим сыворотковым альбумином поперечной сшивкой глутаровым альдегидом на поверхности преобразователя. В работе были получены калибровочные кривые биосенсора на различные концентрации бутирилхолина (БуХ). Подобрано оптимальную концентрацию субстрата для ингибиторного анализа. Далее было проверено чувствительность биосенсора к фосфорорганическому пестициду - трихлорфону, построено калибровочную кривую. Доказана принципиальная возможность реактивации биоселективной мембраны раствором реактиватора пиридин-2-альдоксиметилйодида (ПАМ-2) после необратимого ингибирования фермента. Исследованы и подобраны оптимальные условия реактивации биомембраны на основе БуХЭ, а именно проанализирована зависимость уровня реактивации биосенсора от концентрации токсиканта, времени реактивации и концентрации реактиваторов.

**Ключевые слова:** кондуктометрический преобразователь, биосенсор, бутирилхолинэстераза, пестициды, ингибиторный анализ, реактивация фермента.

## 1. Вступ

До високотоксичних речовин антропогенного походження, що надходять у навколишнє середовище, належать хімічні засоби боротьби з шкідливими організмами – фосфорорганічні пестициди. Особливо широко органічні сполуки фосфору використовують для боротьби із шкідливими рослинами, тобто в ролі гербіцидів [1]. Дані токсиканти здатні розповсюджуватись з сільськогосподарських угідь у навколишнє середовище завдяки ґрунтовим водам, потокам повітря та тваринним організмам (через ланцюги живлення) на значні території [2]. Також ці хімікати можуть потрапляти у відкриті водойми зі стічними водами підприємств, які їх випускають. Таким чином пестициди можуть потрапляти в організм людини та тварин і накопичуватися там у великих кількостях, що може призводити до погіршення їх здоров'я [3].

Тому, екологічний моніторинг пестицидів у навколишньому середовищі стає все більш актуальною проблемою сучасного суспільства [4]. На даний момент існує багато сучасних загальноприйнятих методів високоточного визначення токсичних речовин, таких як: газова хроматографія, рідинна хроматографія, спектрофотометрія, атомно-абсорбційна спектрометрія та інші. Але для всіх цих методів характерні певні недоліки, а саме: складність попередньої підготовки проби, коштовність аналізу, значні затрати часу та необхідність висококваліфікованого персоналу [5-8]. Альтернативою даним методам є нові біоаналітичні прилади – біосенсори, використання яких в аналізі дасть змогу позбавитись всіх вище перерахованих недоліків.

На даний момент існує низка повідомлень про розробку біосенсорів для моніторингу навколишнього середовища. Частина з них функціонують на основі холінергійної реакції з використанням різноманітних типів перетворювачів: амперометричних, оптичних, кондуктометричних, потенціометричних, спектроскопічних та інших [9-11]. Але всі ці біосенсори мають спільну проблему – фосфорорганічні пестициди інактивують фермент незворотно. Відповідно біосенсори можна використовувати лише одноразово, що унеможлиблює їх калібрування. Варіантом вирі-

шення проблеми незворотного інгібування в біосенсорному аналізі є застосування етапу реактивації іммобілізованого ферменту [12]. Тому головною метою даної роботи є вивчення та оптимізація умов реактивації кондуктометричного біосенсора на основі БуХЕ.

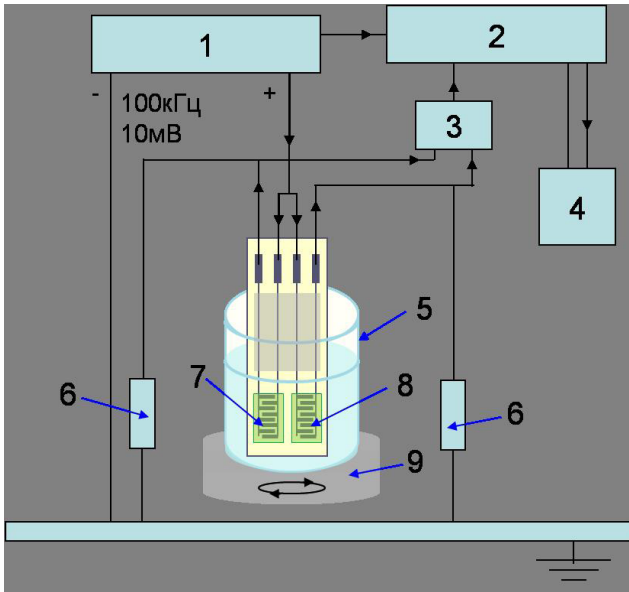
## 2. Матеріали і методи

**Матеріали.** У роботі використовували фермент бутирилхолінергастери (БуХЕ) сироватки крові коня з активністю 13 од. акт/мг фірми Sigma-Aldrich Chemie (Німеччина), сироватковий альбумін бика (БСА, фракція V), 50% водний розчин глутарового альдегіду (ГА) та бутирилхолін (БуХ) фірми Sigma-Aldrich Chemie (Німеччина). В якості інгібітора та реактиватора використовували: фосфорорганічний пестицид (ФОП) – трихлорфон фірми Riedel-de haen (Німеччина) та реактиватор піридин-2-альдоксимметиліодид (ПАМ-2) з фірми Sigma-Aldrich Chemie (Німеччина).

Сполуки для приготування буферів та інші неорганічні речовини, що використовувалися в роботі, були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти „х.ч.“ та „ч.д.а.“.

**Кондуктометричні перетворювачі.** В роботі використовувались кондуктометричні перетворювачі, виготовлені згідно наших рекомендацій в Інституті фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова (м. Київ, Україна). Вони мають розмір 5×30 мм і складаються з двох пар ідентичних золотих гребінчастих електродів, нанесених на ситалову підкладку. Детальний опис конструкції перетворювача та методики його виготовлення та використання приведено в попередній роботі [13, 14].

**Схема експериментальної установки для кондуктометричних вимірювань.** Для вимірювання зміни провідності в приелектродному шарі кондуктометричного перетворювача в нашій експериментальній роботі була використана вимірювальна установка. При роботі цієї кондуктометричної установки, для підвищення чутливості сенсора та мінімізації шумів за рахунок неспецифічних впливів, використовувався диференційний режим. Схема цієї кондуктометричної установки зображена на рис. 1.



**Рис. 1.** Блок-схема вимірювальної установки: 1 – генератор сигналів, 2 – нановольтметр, 3 – диференційний підсилювач, 4 – ресструючий пристрій, 5 – робоча комірка з буферним розчином (2 мл), 6 – опори навантаження, 7, 8 – електроди з нанесеними на них ферментною та референтною мембранами, 9 – магнітний перемішувач.

З низькочастотного генератора сигналів ГЗ-118 змінна напруга з частотою 100 кГц та амплітудою 10 мВ подається на диференційну пару кондуктометричних електродів. В момент виміру ці пари електродів знаходяться в комірці з розчином, що досліджується. Отриманий на електродах сенсора сигнал знімається з опорів навантаження  $R_n = 1 \text{ кОм}$  та поступає через диференційний підсилювач “Unipan-233-6” на селективний нановольтметр “Unipan-233”. Після вольтметра цей сигнал подається на ресструючий пристрій.

**Виготовлення біоселективних елементів.** Для виготовлення робочих біоселективних мембран на основі БуХЕ використовували розчин з вмістом: 5% бутирилхолінестерази, 5% БСА та 10% гліцерин у 20 мМ фосфатному буфері, рН 6,5. Суміш для приготування референтної мембрани готували таким же чином, але замість ферменту брали тільки БСА, кінцева концентрація якого складала еквівалентну кількість білку в мембрані – 10%. Отримані розчини наносили на робочі частини перетворювача за допомогою мікропіпетки до повного

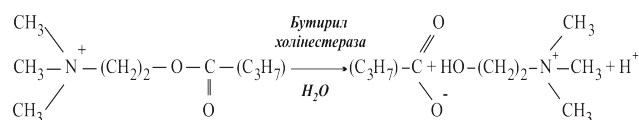
покриття робочої поверхні електродів, об’єм кожної із мембран складав близько 0,08 мкл. Далі перетворювачі з нанесеними мембранами інкубували в насичених парах ГА протягом 25 хвилин. Потім мембрани висушували протягом 5 хвилин на повітрі за кімнатної температури. Після цього їх відмивали робочим буферним розчином від надлишку незв’язаного ГА та інших компонентів мембран протягом 6 хвилин (змінюючи кожні 2 хвилини буфер).

**Методика вимірювання.** Виміри проводились у 5 мМ фосфатному буфері, рН 6,5, за кімнатної температури у відкритій комірці при постійному перемішуванні. Концентрації субстратів в комірці задавали додаванням до робочої комірки аліквот концентрованих розчинів субстратів. Для проведення інгібіторного аналізу, оцінювали відгуки на відповідну концентрацію субстрату до інгібування, а потім проводили інкубацію біосенсора в розчині різних концентрацій трихлорфону протягом 20 хвилин, відмивали від надлишку інгібітора і знову оцінювали відгук на внесення субстрату. Таким чином оцінювали ступінь інгібування ферменту, який і був мірою концентрації токсичної речовини в зразку. Для реактивації, заінгібовані в різній мірі біоселективні елементи біосенсора інкубували в розчині 10 мМ ПАМ-2 протягом 30 хвилин, відмивали від надлишку реактиватора і знову отримували відгук.

Усі дослідження проводились у трьохчотирьох серіях. Неспецифічні зміни вихідного сигналу, пов’язані з коливаннями температури, рН середовища, електричними завадами, усувалися завдяки використанню у роботі диференційного режиму вимірювань.

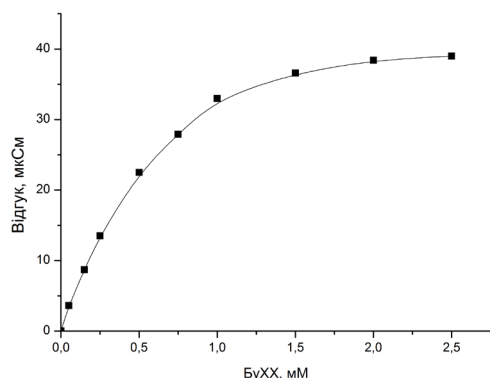
### 3. Результати та обговорення.

**Дослідження основних аналітичних характеристик біосенсора при прямому визначенні субстрату.** В основі роботи біосенсора лежить ферментативна реакція, що відбувається в мембрані з бутирилхолінестеразою, нанесеною на поверхню кондуктометричного перетворювача:



В процесі проходження ферментативної реакції бутирилхолінестераза розщеплює бутирилхолін на холін та бутанову кислоту. Бутанова кислота дисоціює на залишок кислоти і протон, при цьому збільшується локальна концентрація іонів в робочій мембрані [15]. Це, відповідно, приводить до зміни провідності розчину, яка реєструється кондуктометричним перетворювачем.

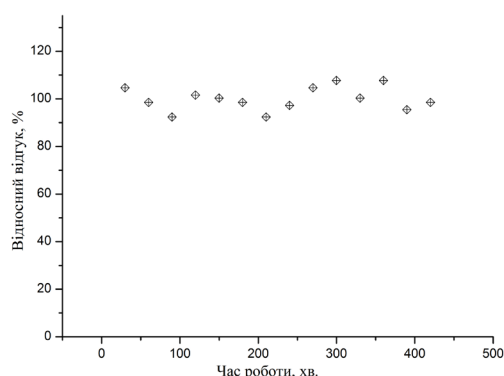
Першою задачею даної роботи було визначити оптимальну концентрацію БуХ, як субстрату, для подальшого проведення інгібіторного аналізу. Для цього необхідно було вибрати таку концентрацію БуХ, за якої чутливість біосенсора до пестициду буде максимальною. Як відомо при незворотному інгібуванні, найбільшої чутливості біосенсорів до токсинів досягають при концентраціях що лежать в межах насичення біосенсора субстратом, саме коли кожна молекула ферменту задіяна в перетворенні цього субстрату. Як видно з графіку насичення спостерігалось після 1,5 мМ БуХ, тому в подальших експериментах було вирішено використовувати саме цю концентрацію субстрату для інгібіторного аналізу.



**Рис. 2.** Залежність величини відгуку біосенсора від концентрації бутирилхолінхлориду в розчині. Вимірювання проводились у 5 мМ фосфатному буфері, рН 6,5.

Далі необхідно було підтвердити, що зменшення біосенсорного відгуку на субстрат, після інкубації його в розчині трихлорфону,

відбувається за рахунок інгібування біоселективного елементу, а не за рахунок самої похибки вимірювання. Тому другим етапом роботи була перевірка операційної стабільності біосенсора та відтворюваності сигналу. Для цього, протягом одного робочого дня, з інтервалом у 30 хв., було отримано відгуки біосенсора на одну й ту саму концентрацію субстрату. З рис. 3 видно, що біосенсор протягом роботи характеризувався достатньо високою відтворюваністю сигналів з середньоквадратичним відхиленням 4.95%.



**Рис. 3.** Відтворюваність сигналів біосенсора на основі БуХЕ протягом одного робочого дня. Вимірювання проводились у 5 мМ фосфатному буфері, рН 6,5.

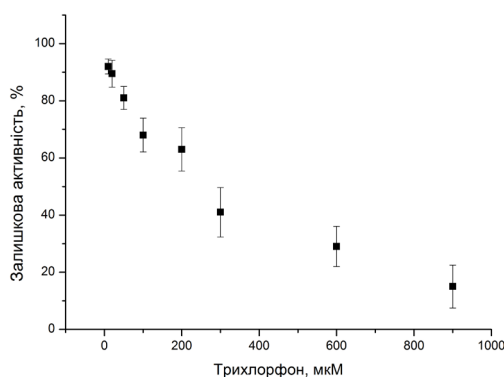
*Дослідження чутливості розроблених біосенсорів до фосфорорганічного пестициду – трихлорфону.* Фосфорорганічні сполуки здатні пригнічувати біологічну активність БуХЕ через фосфорилювання серинових залишків в молекулі ферменту. Дана реакція наведена нижче:



За рахунок протікання реакції при інгібуванні ферменту пестицидами зменшується кількість іонів, утворених в результаті ферментативної реакції перетворення субстрату, що призводить до зменшення відгуку біосенсора. А вже в залежності від зменшення стаціонарного відгуку біосенсора можна визначати концентрацію пестициду в аналізованому розчині [8].



Використовуючи вибрану оптимальну концентрацію БуХ була проведена перевірка чутливості розробленого біосенсора до різних концентрацій трихлорфону. В результаті проведеного експерименту була побудована калібрувальна крива залежності залишкової активності біоселективного елементу на основі БуХЕ від концентрації токсиканта. З рис. 4 видно, що залишкова активність розробленого біосенсора сильно залежить від концентрації трихлорфону.



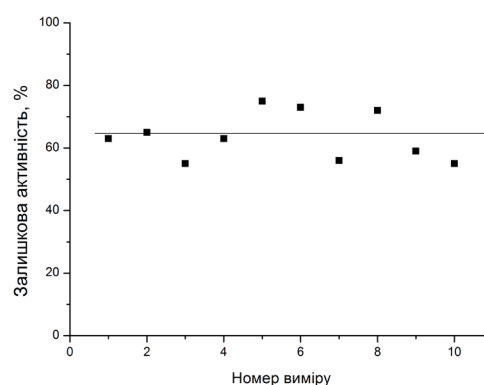
**Рис. 4.** Залежність залишкової активності біоселективного елементу біосенсора на основі БуХЕ від концентрації трихлорфону. Час інгібування біосенсора в розчині трихлорфону - 20 хвилин. Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буфері, рН 6,5.

Також, була досліджена стабільність інгібування біосенсора після його інкубації в розчині трихлорфону. Для цього було отримано відгуки низки біосенсорів на однакову концентрацію трихлорфону після інкубації в однакових умовах. З рис. 5 видно, що розроблені біосенсори характеризувались достатньо стабільною відтворюваністю сигналів на трихлорфон з середньоквадратичним відхиленням 7.59%.

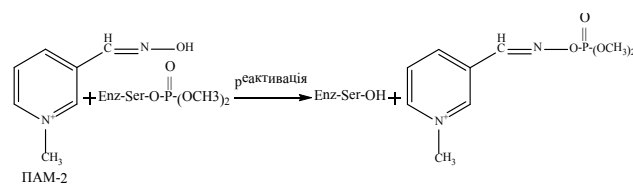
**Дослідження та оптимізація умов реактивації біосенсора за допомогою ПАМ-2.** Як відомо, інгібування БуХЕ фосфорорганічними пестицидами є незворотнім, що призводить до неефективного одноразового використання біосенсора на основі цього ферменту. У нашій роботі ми пропонуємо використати етап реактивації біосенсора для вирішення цієї

проблеми. Тому головним завданням даної роботи було дослідити можливість реактивації розробленого біосенсора після його інактивації токсикантом з метою повторного його використання.

Початкову активність БуХЕ після інгібування можна відновити за допомогою реактиватора ПАМ-2. Він витісняє залишок фосфорила зв'язаний з залишком серину в молекулі холінестерази, відповідно молекула ферменту відновлює свою активність (реактивується) для взаємодії із субстратом [16].



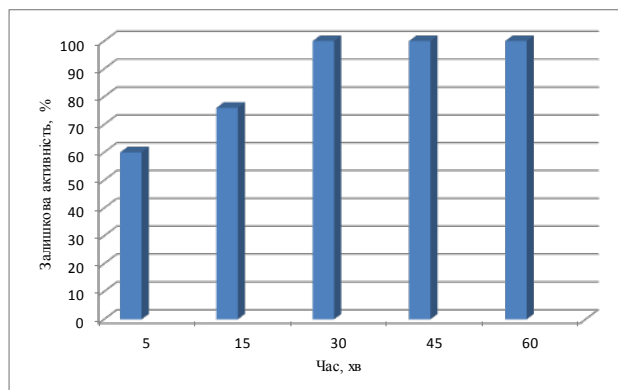
**Рис. 5.** Відтворюваність сигналів біосенсора на основі БуХЕ після 20-ти хвилинного інгібування у розчині трихлорфону концентрацією 200 мкМ. Вимірювання проводились у 5 мМ фосфатному буфері, рН 6,5.



Ефективність реактивації сильно залежить від параметрів цього процесу, таких як час реактивації, концентрація реактиватора, тощо. Тому необхідно було оптимізувати умови реактивації біосенсора за допомогою ПАМ-2. Спочатку ми підбрали оптимальний час інкубації біосенсора в розчині реактиватора, який призводить до повного або максимально можливого відновлення активності ферментної мембрани. На рис. 6 зображена залежність відновлення залишкової активності біосенсора після інгібування в трихлорфоні від часу інкубації біосенсора в розчині реактиватора

ПАМ-2. З рисунку можна зробити висновок, що оптимальний час реактивації складає 30 хв.

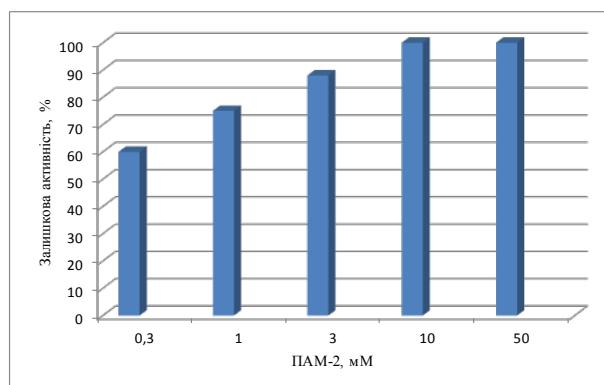
Також була визначена оптимальна концентрація ПАМ-2 для реактивації біосенсора. Для цього було перевірено рівень реактивації біосенсора на основі БуХЕ після інкубації його у розчинах з різною концентрацією ПАМ-2 (0,3мМ, 1мМ, 3мМ, 10мМ). Для кожної серії реактивації біосенсор інгібували в розчині трихлорфону з концентрацією 100 мкМ протягом 20 хв. Далі досліджували, як різні концентрації реактиватора можуть відновити активність фермента. Для цього біосенсор інкубували протягом 30 хв в розчині реактиватора за різних концентрацій. З рис. 7 видно, що при збільшенні концентрації реактиватора зростає рівень залишкової активності біосенсора. Встановлено, що 10 мМ концентрації ПАМ-2 достатньо для повної реактивації БуХЕ біосенсора. Тому для подальших експериментів було обрано саме цю концентрацію.



**Рис.6.** Залежність рівня реактивації біосенсора від часу реактивації в розчині ПАМ-2 після інгібування трихлорфоном. Концентрація трихлорфону – 100 мкМ, а ПАМ-2 – 10 мМ. Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буфері, рН 6,5.

Після оптимізації умови реактивації БуХЕ біосенсора в розчині трихлорфону було перевірено здатність до реактивації біосенсора після інкубації його в розчинах за різних концентрацій трихлорфону. Виявилось, що повністю реактивувати біоселективні елементи на основі БуХЕ можливо із залишковою активністю після інгібування вище чим 68%, що відповідає концентраціям трихлорфону меншим за 100 мкМ. А для біосенсорів, які інкубувалися

при вищих концентраціях пестициду можливо відновити їх активність у значній мірі, але не повністю до 100%. Тому в подальшому, якщо в аналізованих зразках присутні високі концентрації пестицидів, то їх необхідно розводити.



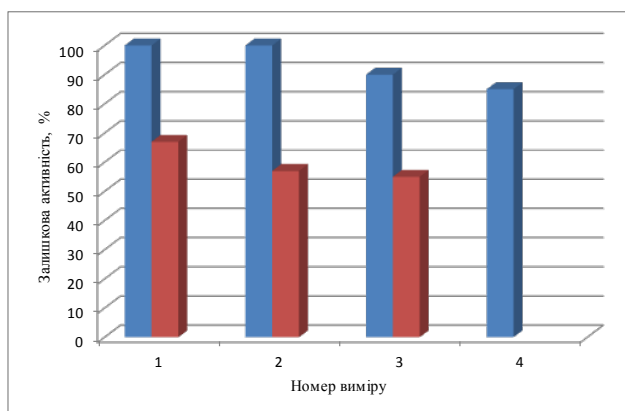
**Рис.7.** Залежність рівня реактивації біосенсора від концентрації реактиватора ПАМ-2 після інгібування трихлорфоном. Концентрація трихлорфону – 100 мкМ. Час реактивації – 30хв. Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буфері, рН 6,5.

Таблиця 1  
**Активність біосенсора при реактивації його після інгібування в розчинах з різними концентраціями трихлорфону**

Концентрація інгібітора (трихлорфон), мкМ	10	20	50	100	200	300	600	900
Залишкова активність БуХЕ після реактивації, %	100	100	100	100	78	64	54	45

**Визначення кількості циклів реактивації біосенсора на основі БуХЕ.** На наступному етапі роботи необхідно було перевірити можливість саме неодноразової реактивації розробленого біосенсора з метою його багаторазового використання при інгібіторному визначенні пестицидів, а саме, продемонструвати, що біосенсор справді можна використовувати декілька разів при роботі з необоротними інгібіторами.

Для цього отримавши відгуки на біосенсори ми приймали їх за 100%. Далі ми їх інкубували в розчині трихлорфону і отримували залишкову активність фермента. Наступним етапом була реактивація біосенсора в розчині ПАМ-2, після чого активність БуХЕ відновлювалась до 100%. Цей цикл повторювався до того часу, поки реактиватор не відновлював активність біоселективної мембрани повністю. З рис. 8 видно, що після інгібування та реактивації активність ферменту відновлюється повністю що найменше ще раз. Наступні цикли інгібування-реактивації не відновлювали повністю активність ферменту, але відновлювали в значній мірі. Відповідно, можна зробити висновок, що з використанням реактивації БуХЕ біосенсор можна використовувати повторно для інгібіторного аналізу декілька разів, а відповідно і калібрувати його при аналізі реальних водних зразків.



**Рис.8.** Дослідження відтворюваності відгуків кондуктометричного біосенсора на основі бутирилхолінестерази після його інгібування трихлорфоном та реактивації за допомогою ПАМ-2. Час інгібування біосенсора в розчині 100 мкМ трихлорфону – 20 хв., час реактивації в розчині 10 мМ ПАМ-2 – 30хв. Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буфері, рН 6,5

#### 4. Висновки

В роботі розроблено та оптимізовано біосенсор на основі БуХЕ для визначення пестицидів. Переверено чутливість біосенсора та побудовано калібрувальні криві для прямого визначення бутирилхоліну та інгібіторного аналізу трихлорфону. Встановлено, що запропонований біосенсор характеризувався гарною відтворюваністю сигналів при визначенні,

як субстрату так і інгібітору. Підтверджено можливість реактивації даного біосенсора після інгібування його пестицидами. Підбрано оптимальні умови процесу реактивації за допомогою ПАМ-2. Визначено, що рівень інгібування ферменту впливає на реактиваційну здатність біосенсора та показано, що застосовуючи етап реактивації, біосенсор на основі БуХЕ можливо використовувати декілька разів в інгібіторному аналізі фосфорорганічних пестицидів.

*Автори вдячні за фінансову підтримку від НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми «Сенсорні прилади для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб: метрологічне забезпечення та дослідна експлуатація».*

#### Список використаної літератури

1. Мельников Н.Н., Пестициды. Химия, технология и применение. – М.: Химия, 710с (1987).
2. Ноймайстер Л., Руководство к действию в области пестицидов. – ПАН Германия, 47с (2003).
3. Степановских А.С., Общая экология: Учебник для вузов - М.: ЮНИТИ, 510 с, (2001).
4. Yatsenko V., Determining the characteristics of water pollutants by neural sensors and pattern recognition methods // Journal of Chromatography A. — Vol. 722. — P. 233–243 (1996).
5. 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. – V.543 – P. 143-149 (2005).
6. Sherma J., Zweig G., Pesticides // Anal. Chem.- V. 55.- P. 57-70 (1983).
7. Солдаткін О.О., Пешкова В.М., Дзядевич С.В. та ін., Кондуктометричний біосенсор на основі триферментної системи для селективного визначення іонів важких металів // Sensor Electronics and Microsystem Technologis. -№ 2. –С. 48-58 (2008).



8. Jaffrezic-Renault, N.; Dzyadevych, S.V. Conductometric Microbiosensors for Environmental Monitoring // *Sensors*, 8, 2569-2588 (2008).
9. Dzydevich S. V., Shul'ga A. A., Soldatkin A. P. et al., Conductometric biosensors based on cholinesterases for sensitive detection of pesticides // *Electroanalysis* 6.9: 752-758 (1994).
10. Ashok Mulchandani, Wilfred Chen, Priti Mulchandani et al., Biosensors for direct determination of organophosphate pesticides // *Biosensors & Bioelectronics* 16 - 225-230 (2001).
11. Tran-Minh C, Pandey PC, Kumaran S., Studies on acetylcholine sensor and its analytical application based on the inhibition of cholinesterase // *Biosensors and Bioelectronics*.; 5(6):461-471 (1990).
12. Tran-Minh C, Immobilised enzyme probes for determining inhibitors // *Ion-Select. Electrode Rev.* -Vol. 7, - P. 41-75 (1985).
13. Мельник В.Г., Дзядевич С.В., Ивашук А.В., та ін., Экспериментальные исследования микроэлектронных датчиков для кондуктометрических биосенсорных систем // *Sensor Electronics and Microsystem Technologies.*- Т.2 (8)б № 3.- С. 81-90 (2011).
14. Степурська, К. В., Солдаткін, О. О., Пешкова, В. М., Дзядевич, С. В., Солдаткін, О. П., Вивчення можливості реактивації біоселективного елементу на основі іммобілізованої ацетилхолінестерази при інгібіторному аналізі пестицидів. // *Сенсорна електроніка і мікросистемні технології.* - 10, № 1. - С. 97-105 (2013).
15. Дзядевич С.В., Кондуктометричні ферментні біосенсори: теорія, технологія, застосування. // *Біополімери і клітина.* - Т.21, -С. 91-106 (2005).

Стаття надійшла до редакції 17.11.2014 р.