Санкт-Петербургский государственный университет

На правах рукописи

ЗАДОРОЖНАЯ ОЛЕСЯ АНАТОЛЬЕВНА

ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИЕ МУЛЬТИСЕНСОРНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ВОДНЫХ СРЕД В ШКАЛАХ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

Специальность 02.00.02 – АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель –
Доктор химических наук, профессор
Кирсанов Дмитрий Олегович

Санкт-Петербург
2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ…….…...5

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ……...9

1.1.МЕТОДЫ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНТЕГРАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ВОДНЫХ СРЕД……9

1.2. ВЕЩЕСТВА, ЗАГРЯЗНЯЮЩИЕ ВОДНЫЕ СРЕДЫ…….....14

1.2.1. Источники загрязняющих веществ…….…….14

1.2.2. Пестициды…….....15

1.2.3. Канцерогены…….....18

1.2.4. Поверхностно-активные вещества……...19

1.2.5. Тяжелые металлы…….....21

1.2.6. Фенолы……...22

1.3. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О ХИМИЧЕСКИХ СЕНСОРАХ…….....24

1.4. МУЛЬТИСЕНСОРНЫЕ СИСТЕМЫ……31

1.5. МЕТОДЫ АНАЛИЗА МНОГОМЕРНЫХ ДАННЫХ…….38

ГЛАВА 2. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЪЕКТОВ И МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ……..43

2.1. АППАРАТУРА……...43

2.2. РЕАГЕНТЫ…….51

2.3. ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ……...51

2.4.ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ ОБРАЗЦОВ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДИК БИОТЕСТИРОВАНИЯ…….....55

2.4.1. Методика биотестирования с использованием *Daphnia magna*……...55

2.4.2. Методика биотестирования с использованием *Paramecium caudatum*…...57

2.4.3. Методика биотестирования с использованием *Chlorella vulgaris*…….....58

2.4.4. Методика биотестирования с использованием *Vibrio fischeri*…….59

2.5. ИССЛЕДОВАНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ СЕНСОРОВ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ И ВЕЩЕСТВ, ОТНОСЯЩИХСЯ К КЛАССУ ФЕНОЛОВ…….....…….61

2.6. ИССЛЕДОВАНИЕ МОДЕЛЬНЫХ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ТОКСИКАНТОВ И РЕАЛЬНЫХ ВОДНЫХ ОБРАЗЦОВ С ПОМОЩЬЮ ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОЙ МУЛЬТИСЕНСОРНОЙ СИСТЕМЫ…….62

2.7. ПРИМЕНЕНИЕ ХЕМОМЕТРИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ОБРАБОТКИ ДАННЫХ, ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИСЕНСОРНЫХ СИСТЕМЫ…….....63

2.7.1. Метод главных компонент…….63

2.7.2. Метод проекции на латентные структуры…….65

2.7.3. Метод случайных лесов……...68

2.7.4. Метод случайного выбора *k*-ближайших соседей…….69

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ СЕНСОРОВ К ИНДИВИДУАЛЬНЫМ ТОКСИКАНТАМ И ФОРМИРОВАНИЕ МУЛЬТИСЕСНСОРНОЙ СИСТЕМЫ…...……71

3.1. СТРАТЕГИЯ ВЫБОРА СЕНСОРОВ В СОСТАВ МУЛЬТИСЕНСОРНОЙ СИСТЕМЫ……..……...71

3.2. ИССЛЕДОВАНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИНДВИДУАЛЬНЫХ СЕНСОРОВ В РАСТВОРАХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ……...74

3.3. ИССЛЕДОВАНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ СЕНСОРОВ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ ВЕЩЕСТВ КЛАССА ФЕНОЛОВ……77

ГЛАВА 4. КЛАССИФИКАЦИЯ ВОДНЫХ ОБРАЗЦОВ ПО ТОКСИЧНОСТИ……81

4.1. ПОЛУЧЕНИЕ РЕФЕРЕНТНЫХ ДАННЫХ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДИК БИОТЕСТИРОВАНИЯ НА ОСНОВЕ *Daphnia magna, Paramecium caudatum, Chlorella vulgaris* и *Vibrio fischeri*…….81

4.2. КЛАССФИКАЦИЯ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ТОКСИКАНТОВ ПО ТОКСИЧНОСТИ…….83

4.3. КЛАССИФИКАЦИЯ РЕАЛЬНЫХ ВОДНЫХ ОБРАЗЦОВ ПО ТОКСИЧНОСТИ.....85

ГЛАВА 5. ЧИСЛЕННАЯ ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ ВОДНЫХ ОБРАЗЦОВ С ПОМОЩЬЮ ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОЙ МУЛЬТИСЕНСОРНОЙ СИСТЕМЫ……..90

5.1. ЧИСЛЕННАЯ ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ТОКСИКАНТОВ С ПОМОЩЬЮ ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОЙ МУЛЬТИСЕНСОРНОЙ СИСТЕМЫ……...90

5.2. ЧИСЛЕННАЯ ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ РЕАЛЬНЫХ ВОДНЫХ ОБРАЗЦОВ С ПОМОЩЬЮ ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОЙ МУЛЬТИСЕНСОРНОЙ СИСТЕМЫ……..93

5.2.1. Образцы, отобранные на территории Санкт-Петербурга…….93

5.2.2. Образцы, отобранные в различных округах Испании……..96

ЗАКЛЮЧЕНИЕ……101

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ И ТЕРМИНЫ…….103

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ……...104

ПРИЛОЖЕНИЕ 1……..117

ПРИЛОЖЕНИЕ 2……..118

ПРИЛОЖЕНИЕ 3……..120

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

Загрязнение природных вод является крайне острой проблемой. Для своевременного выявления загрязнений необходимо развитие методов оперативного мониторинга водных объектов. Веществ, являющихся потенциальными загрязнителями, сейчас насчитывается свыше 70000, и это число постоянно увеличивается. Например, только используемых пестицидов известно сейчас более 800, среди них есть соединения, представляющие серьезную угрозу здоровью человека. В такой ситуации индивидуальное определение всех потенциальных загрязнителей в каждой пробе воды не представляется возможным. В связи с этим особое значение приобретают аналитические методы группового определения различных загрязнителей, а также методы интегральной оценки качества воды. Среди последних наибольшее распространение в настоящее время получили методы оценки токсичности с помощью биотестирования – изучения реакций различных живых организмов, помещенных в исследуемую пробу. В качестве биологических реакций могут выступать, например, выживаемость дафний, плодовитость водорослей, хемотаксис инфузорий. Биотестирование не предоставляет информации о наличии и концентрациях индивидуальных токсикантов, однако, дает интегральную оценку качества воды и степени ее опасности для живых организмов, что делает его удобным методом мониторинга. Тем не менее, методы биотестирования обладают рядом существенных недостатков: необходимость использования живых организмов, которые должны культивироваться и поддерживаться в рабочем состоянии в определенных условиях; длительное время анализа (в некоторых случаях до 96 часов). Также серьёзной проблемой представляется отсутствие универсальных биотестов, характеризующихся надёжностью и широким диапазоном применимости. Это связано, во-первых, с видовой избирательностью действия токсикантов, и, во-вторых, с непрерывным ростом количества загрязняющих окружающую среду веществ. Инструментальное определение

токсичности без использования живых организмов явилось бы крайне востребованной альтернативой традиционным методам биотестирования.

В качестве такой альтернативы могут быть рассмотрены мультисенсорные системы. Такие системы представляют собой массив химических сенсоров, обладающих различной перекрестной чувствительностью, т.е. чувствительностью одновременно к нескольким компонентам исследуемого раствора. Отклик массива в исследуемых образцах обрабатывается с помощью методов хемометрики, что позволяет получать качественную и количественную информацию. Наибольшее распространение получили потенциометрические мультисенсорные системы, которые позволяют надежно определять ряд интегральных характеристик образцов, таких, например, как вкусовые параметры. В работах такого рода референтными методами, относительно которых проводится многомерная градуировка массива сенсоров, являются оценки людей-дегустаторов, а в случае лекарственных препаратов – биологические реакции крыс. Логичной представляется попытка расширить круг биологических объектов, реакции которых моделируются мультисенсорными системами, на ряд тест-объектов, применяемых в биотестировании. Достоинством такого подхода к оценке токсичности может стать экспрессность анализа, так как длительность потенциометрических измерений составляет всего 3-5 минут, что может позволить в дальнейшем разработать on-line систему комплексной оценки состояния гидросферы. Кроме того, важным преимуществом подобной системы стало бы отсутствие сложностей, связанных с использованием живых организмов, которые в этом случае применяются только для градуировки массива сенсоров.

Цель работы: исследование возможности применения потенциометрических мультисенсорных систем для оценки токсичности водных сред в шкалах биотестирования.

В ходе работы решались следующие задачи:

1. Оценка чувствительности потенциометрических сенсоров к ряду распространенных индивидуальных токсикантов, по отношению к которым отклик используемых в работе мультисенсорных массивов ранее не

изучался, а именно соединений, относящихся к классу фенолов: фенолу, *о*-нитрофенолу и *п*-крезолу, а также поверхностно-активных веществ: додецилсульфату натрия и цетилтриметиламмоний бромиду.

2. Изучение возможности оценки токсичности водных растворов индивидуальных токсикантов с помощью мультисенсорной системы в шкалах метода биотестирования, основанного на реакции *Vibrio fischeri.*
3. Изучение возможности оценки токсичности реальных образцов, полученных при заборе проб из различных водоёмов, в шкалах нескольких различных методов биотестирования, использующих *Daphnia magna*, *Paramecium caudatum*, *Chlorella vulgaris* и *Vibrio fischeri* в качестве тест-объектов.

Научная новизна:

Показано, что использование мультисенсорных систем с последующей обработкой результатов измерений методами хемометрики позволяет определять токсичность водных сред, природных поверхностных вод, сточных вод, а также водных растворов индивидуальных токсикантов.

Выявлено наличие корреляций между откликами потенциометрической мультисенсорной системы и четырьмя методами биотестирования, оценивающими токсичность водных образцов путем измерения смертности рачков *Daphnia magna*, оптической плотности культуры водорослей *Chlorella vulgaris*, хемотаксиса инфузорий *Paramecium caudatum*, а также люминесценции бактерий *Vibrio fischeri*.

Практическая значимость работы:

Предложен способ оценки токсичности водных образцов с помощью потенциометрической мультисенсорной системы в шкалах отклика различных живых тест-объектов – от простейших одноклеточных, таких как бактерии (*Vibrio fischeri*), до многоклеточных организмов, например, ракообразных (*Daphnia magna*).

Результаты работы открывают возможность применения мультисенсорных систем для определения токсичности природных и сбросных вод сложного состава. В этом случае живые организмы используются только для градуировки массива сенсоров. Предлагаемый подход позволяет значительно снизить время оценки качества воды, с 48-96 часов, необходимых для проведения методов биотестирования, до 3-5 минут, и получить значения токсичности с погрешностью не более 25%.

Положения, выносимые на защиту

1. Результаты оценки чувствительности потенциометрических мультисенсорных систем к фенолу, *о*-нитрофенолу, *п*-крезолу, додецилсульфату натрия и цетилтриметиламмоний бромиду.
2. Доказательство возможности оценки интегральной токсичности индивидуальных водных растворов токсикантов с помощью мультисенсорной системы в шкалах методов биотестирования.
3. Обоснование возможности оценки интегральной токсичности природных и промышленных вод с помощью мультисенсорной системы в шкалах методов биотестирования.
4. Результаты применения методов обработки многомерных данных (*k*-ближайших соседей, случайных лесов и проекций на латентные структуры) для нахождения корреляции между реакцией живых тест-объектов на токсичность водных сред и откликам потенциометрической мультисенсорной системы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ

1.1. Методы биотестирования для определения интегральной токсичности водных сред

Свойство химических веществ причинять вред живым организмам, а иногда и приводить к летальному исходу, называется *токсичностью*. Вещество, которое представляет опасность для любого биологического вида, определяют как *токсикант*, процесс воздействия на организм – *токсикация*, также принято отдельно выделять понятие *токсификация*, т.е. процесс воздействие токсиканта на экосистему в целом. Под токсичностью водной среды обычно подразумевают токсичность не только самой воды, но и донных осадков для живых организмов. Причины возникновения опасности могут быть как природными, так и антропогенными, например, загрязнение сточными водами, токсическими атмосферными осадками и т.д. [1].

В качестве стандартных методов мониторинга состояния водных сред широко используются методы водной токсикологии в сочетании с дальнейшим установлением значений предельно допустимых концентраций веществ, используя современные методы аналитической химии.

Оценка состояния окружающей среды кроме того ведётся по превышению принятых государством нормативов предельно-допустимой концентрации (ПДК), а также предельно-допустимого уровня загрязнения (ПДУ). ПДК – концентрация химических элементов в окружающей среде, которая при постоянном влиянии на организм человека не вызывает патологических изменений или заболеваний. ПДУ – законодательно установленная верхняя граница величины какого-либо воздействующего фактора, в данном случае концентрации веществ.

Однако подход, использующий упомянутые выше нормативы, не даёт информации о состоянии среды в целом в тех случаях, когда эти данные необходимы. Метод биотестирования представляется идеальным для решения задач такого рода. Впервые биотестирование стало использоваться в начале

20 века, когда в практику вошло применение так называемой «рыбной пробы» [2], в дальнейшем стали разрабатываться методики, использующие дафний, простейших, червей и т.д. Но, несмотря на то, что разработка методов на основе живых организмов осуществлялась во многих научных группах и институтах, необходимость применения биотестирования для интегральной оценки качества вод была признана только в конце 80-х годов двадцатого века.

Проведение биотестирования требует наличия хорошо оснащенных лабораторий, происхождение анализируемых вод в этом случае неважно, это могут быть как природные воды, так и образцы сточных вод, а также водные вытяжки из различных материалов [3].

Метод биотестирования подразумевает установление токсичности объектов окружающей среды на основе исследования реакций биологических объектов – тест-объектов – на изменения в среде. Такая процедура проводится, как правило, до химического анализа. Этот метод позволяет оценить состояние окружающей среды, выявить источники загрязнения и области их скопления, а уже после этого аналитическим путём установить причины загрязнения, вид токсикантов, их концентрацию. Состав анализируемых образцов сложен и редко точно известен, поэтому тестирование с использованием биообъектов играет значительную роль уже на ранних стадиях проведения исследования.

Метод биотестирования используют для решения широкого круга задач:

- оценка токсичности различных водных сред от сточных вод промышленных предприятий до природных вод; выявление наличия или отсутствия загрязнения;
- контроль аварийных сбросов высокотоксичных вод;
- проведение оценки степени токсичности сточных вод при строительстве очистных сооружений;
- определение уровня разбавления сточных вод, необходимого для их последующего сброса и отсутствия неблагоприятного воздействия на живые организмы;

- проведение оценки экологической чистоты новых материалов, производств, строящихся сооружений [4];
- оценка токсичности воды, использующейся в синтезе фармацевтических препаратов, производстве косметики;
- определение токсичности препаратов бытовой химии.

Как уже упоминалось выше, в основе метода биотестирования лежит исследование реакции живого организма или сообщества организмов, которые также могут называться тест-объектами, биосенсорами или биообъектами, на окружающую его воду.

Отклик живых организмов может быть связан с влиянием какого-либо одного фактора, то есть быть специфическим. Если же разные типы воздействия вызывают одну и ту же реакцию, то такой отклик принято определять как неспецифический. Кроме того, среди биообъектов можно различить чувствительные, те, которые реагируют на изменения в окружающей среде резким и сразу заметным отклонением их жизненных показателей от нормы, и кумулятивные: в этом случае видимых изменений в состоянии организма нет, но накапливание воздействия происходит [5].

Почти в любом биологическом сообществе – от растительного до животного – можно найти организм, подходящий для использования его в качестве тест-объекта. В частности, наиболее используемыми биообъектами считаются различные микроорганизмы (водоросли, бактерии), так как их реакция на изменения окружающей среды наиболее быстрая, что позволяет проводить эксперименты, связанные с оценкой качества воды, а также изучением эффекта отдельных загрязнителей на живой организм.

При контроле качества воды на территории РФ много внимания уделяется методам, основанным на изучении реакции дафний, инфузорий, раков, рыб и других гидробионтов; некоторые из них включены в государственные нормативные документы. Например, тест на дафниях применяется при установлении предельно-допустимых концентраций загрязняющих веществ в

воде рыбных хозяйств. Некоторые методики, такие как методика по контролю качества воды с помощью пресноводных рыб, являются международными стандартами ИСО [6, 7].

Самыми изученными и чаще всего используемыми, тест-объектами на настоящий момент считаются дафнии (*Daphnia magna, Daphnia pulex*), а также несколько видов зелёных водорослей (*Chlorella*) и рыб [8].

Для характеристики реакции биообъекта на действие исследуемого образца оценивают тест-функцию, т.е. изменение какого-либо показателя живого объекта под воздействием токсикантов, присутствующих в окружающей среде.

Тест-функции в зависимости от используемого биосенсора различны, это могут быть биологические показатели, такие как:

- процент выживших, либо погибших особей - для ракообразных, инфузорий, эмбриональных стадий моллюсков, насекомых и некоторых видов рыб;
- уровень рождаемости новых особей, правильное развитие организмов на ранних стадиях – для ракообразных, рыб и моллюсков;
- прирост или спад численности клеток в культуре, скорость и степень её роста - для культур одноклеточных водорослей и инфузорий.

Кроме того, в качестве тест-функций могут использоваться физиологические характеристики организма, например:

- скорость прорастания семян, длина первичного корня – для растений;
- подвижность организмов относительно градиента химических веществ (хемотаксис) – для инфузорий [9];
- изменение интенсивности люминесценции – для бактерий.

Важно помнить, что реакция биообъекта на изменение качества среды должна быть чётко выражена и либо заметна визуально, например, подвижность организмов; либо с использованием дополнительного оборудования, как в случае с изменением люминесценции.

Как и у любого метода, у метода биотестирования есть свои достоинства и недостатки.

К преимуществам относится возможность проведения комплексной оценки состояния водной биоты – учитывается влияние всех без исключения биологически важных факторов, отражается общее состояние окружающей среды; фиксируется скорость происходящих изменений; указываются места скоплений загрязняющих веществ. Явным достоинством метода также является высокая чувствительность тест-объектов к малейшим изменениям в окружающей среде, минимальным концентрациям токсикантов [10].

К проблемам методов биотестирования можно отнести сложности, связанные с поддержанием биообъектов в рабочем состоянии, это касается правильного кормления гидробионтов, условий культивации, неизменности соответствующих условий среды обитания. Явным недостатком метода также является продолжительность анализа, среднее время проведения биотестирования около 48 часов, за исключением ограниченного числа методик. Вследствие перечисленных выше факторов, стоимость каждого измерения оказывается достаточной высокой.

Кроме того, не существует универсальных биотестов, характеризующихся надёжностью и широким диапазоном применимости, это связано с видовой избирательностью действия потенциальных токсикантов [11], а также с постоянным ростом количества загрязняющих веществ. Можно, конечно, вводить дополнительные объекты, для усовершенствования метода, но делать это бесконечно не представляется возможным.

Количество реально применяемых на практике методик биотестирования довольно велико и зависит от конкретной поставленной задачи, но в этой работе будут рассматриваться несколько методик, которые широко используются в настоящее время для определения интегральной токсичности воды и подробно описываются в литературе.

1.2. Вещества, загрязняющие водные среды

В последние годы можно наблюдать значительный рост количества загрязняющих воду веществ, ухудшение общего состояния водной среды в целом. Причины этого просты и заключаются в непрерывном появлении новых промышленных предприятий, фабрик и заводов, в постоянном развитии агропромышленного производства, транспорта и т.д.

1.2.1. Источники загрязняющих веществ

Источники загрязнений можно разделить на *точечные*, такие как отдельно взятые трубы, через которые происходит сброс сточных вод с очистных станций; и *неточечные*, примером которых могут быть поля, обработанные пестицидами, смываемые с потоком дождевой воды [12]. Также различают *природные* источники загрязнений, и *антропогенные* – любые источники так или иначе связанные с деятельностью человека.

Большинство источников загрязнителей водной среды широко известны. Примерно 50% всех загрязнений воды связаны с аграрным сектором [13], исходя из этого, наиболее распространенными токсикантами можно назвать ионы аммония (NH_4^+) [14] и нитрат-ионы (NO_3^-) [15], различные фосфорсодержащие вещества [16], источником которых обычно являются пестициды различных типов, удобрения. Значительный вклад этих веществ в загрязнение водной среды объясняется тем фактом, что, например, нитрат-ионы довольно быстро вымываются с поверхностей почв: до 40% всех использующихся в сельском хозяйстве нитратов поступают в природные воды. Фосфаты, как правило, абсорбируются или связываются с почвами, однако, несмотря на это, около 20-25% общего количества применяемых фосфорсодержащих веществ оказываются в водной среде.

Неизменным источником загрязнений можно назвать и различные отходы, как те, что сбрасываются в окружающую среду различными промышленными

предприятиями по всему миру; так и те, что простые люди оставляют после себя каждый день. Такие отходы могут содержать множество токсикантов, например, органические вещества разной химической природы [17, 18], тяжелые металлы [19, 20], различные лекарственные препараты [21].

Далее рассмотрим подробнее наиболее широко распространенные группы загрязняющих веществ.

1.2.2. Пестициды

Сложно представить современный аграрный сектор без применения различных типов пестицидов, не вызывает сомнения тот факт, что роль этих химических веществ «благородна» и заключается в защите растений, животных, сельскохозяйственных угодий от вредителей различных типов, таких как насекомые, сорняки, бактерии, грибы и т.п. В зависимости от того, на какие вредные организмы пестициды оказывают воздействие, можно выделить несколько основных групп:

- ✓ **Инсектициды** – для борьбы с вредными насекомыми;
- ✓ **Бактерициды** – для борьбы с бактериями, возбуждающими болезни растений, животных, даже человека;
- ✓ **Гербициды** – для борьбы с сорными растениями;
- ✓ **Фунгициды** – для борьбы со спорами грибов.
- ✓ **Зооциды** – для борьбы с грызунами [22-24].

Однако, несмотря на требования, предъявляемые к пестицидам: как можно более низкое значение острой и хронической токсичности этих веществ, отсутствие любых мутагенных последствий и т.д. – эти соединения представляют масштабную угрозу для любых живых организмов, в том числе и для людей. Опасность пестицидов связана с их способностью кумулировать в различных слоях биосферы и живых организмах. Накопление пестицидных препаратов происходит в первую очередь в почве, из которой они попадают в водные среды.

В воде они уже способны нанести вред как экологическому состоянию среды, так и обитающим в ней живым существам, а впоследствии и людям (рисунок 1).

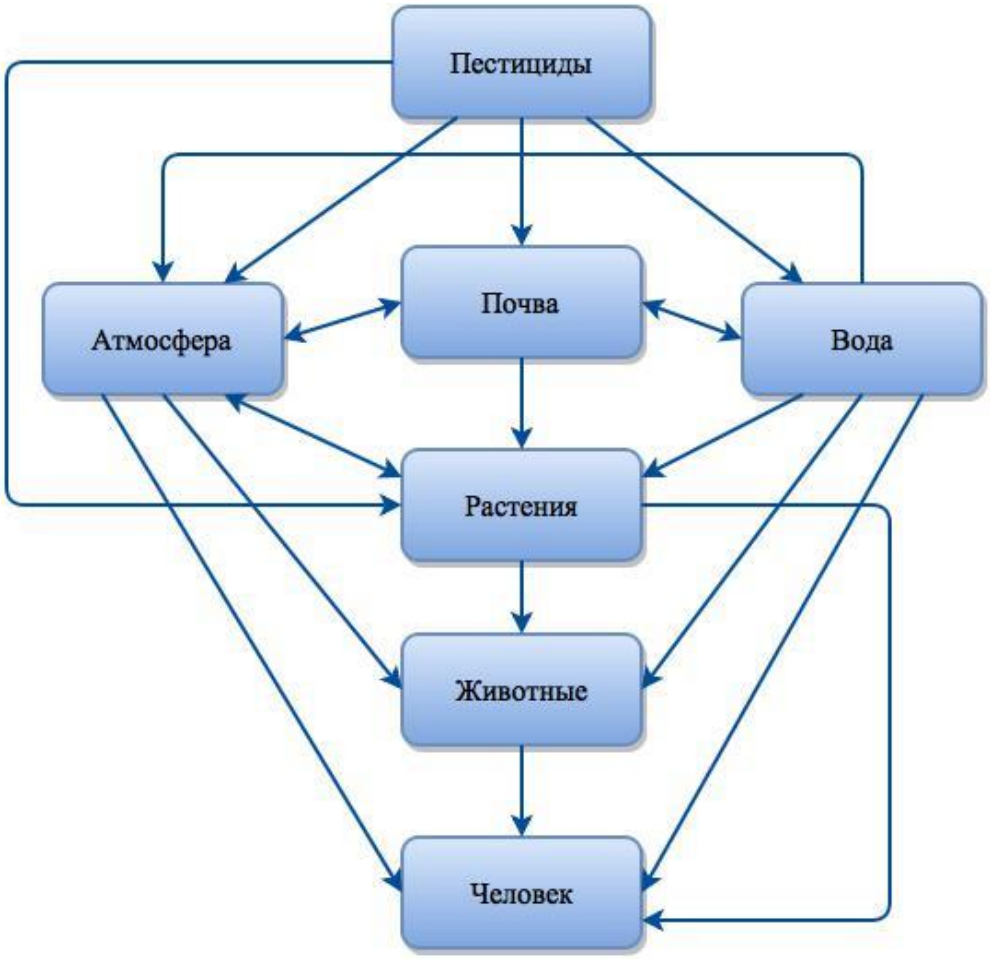


Рисунок 1. Схема распределения пестицидов в окружающей среде.

В последние годы ситуация, связанная с опасностью пестицидов, только усугубляется, это объясняется необходимостью поиска все новых препаратов, эффективность которых выше по сравнению с предыдущим поколением веществ. Это означает, что токсичность новых соединений, а значит их пагубное влияние на людей и окружающую среду, со временем только возрастает [25, 26].

По токсичности пестициды можно разделить на четыре группы:

- **Высокотоксичные** – среднелетальная концентрация ($ЛК_{50}$) ≈ 50 мг/кг веса животного;
- **Токсичные** – $ЛК_{50}$ находится в пределах 50 - 200 мг/кг веса животного;

- **Среднетоксичные** – $ЛК_{50}$ составляет примерно 200 - 1000мг/кг веса животного;
- **Малотоксичные** – значение $ЛК_{50}$ выше, чем 100 мг/кг веса животного.

Кроме того, существует разделение пестицидов по их химическому строению:

- **Хлорорганические** соединения (1,2 - дихлорметан, гексахлорбутадиен) могут применяться как инсектициды, акарициды, фумиганты, плохо растворяются в воде и являются высокоустойчивыми, что делает их опасными глобальными загрязнителями;
- **Фосфорсодержащие** пестициды (*фалон* – трис(2,4–дихлорфеноксиэтил) фосфит, *альетт* – трис(этилфосфит) алюминия), один из самых распространенных типов пестицидов, плохо растворяются в воде, не накапливаются так интенсивно как хлорорганические препараты, однако обладают кумулятивными свойствами из-за суммирования токсических эффектов;
- **Производные карбаминовой кислоты** (*карбарил* – α-Нафтил-N-метилкарбамат) относятся к средне- и высокоустойчивым веществам, поэтому почти все они относятся либо к умереннотоксичным, либо к сильнотоксичным пестицидам;
- **Неорганические** пестициды (*сольбар* – полисульфид бария, борная кислота) характеризуются высокой эффективность, а, следовательно, токсичностью, стабильны и долго сохраняются в окружающей среде;
- **Пиретроиды** (*аллетрин* - 3-аллил-2-метил-4-оксоциклопент-2-енил(1R,3R)–2,2-диметил-3-(2-метилпроп-1-енил)циклопропан-карбоксилат, *перметрин* - 3-Феноксибензиловый эфир 3-(2,2-дихлорэтенил)-2,2-диметилциклопропанкарбоновой кислоты) широко распространенные инсектициды, почти не растворяющиеся в воде, однако они быстро расщепляются на свету и за счет этого обладают пониженной биологической активностью;

- **Органические соединения ртути** (этилмеркурхлорид, *МЭМХ* – метоксиэтилмеркурхлорид) применяются ограничено из-за своей высокой токсичности, только для защиты от грибковых и бактериальных заболеваний.

1.2.3. Канцерогены

Под канцерогенами понимают вещества, которые способствуют развитию доброкачественных новообразований или злокачественных опухолей [27]. Опасность канцерогенов заключается в том, что они могут накапливаться в течение долгого периода времени, а их эффект может проявиться через десятки лет, поэтому эти химические соединения представляют угрозу в любых концентрациях.

По происхождению канцерогены подразделяются на две группы:

- **Экзогенные** – это могут быть продукты табака, выбросы транспортных средств, дым промышленных предприятий и т.д.
- **Эндогенные**, такие как холестерин, некоторые виды гормонов.

В настоящее время количество потенциальных канцерогенных веществ приближается к нескольким тысячам. Однако, сравнительно немного химических соединений достоверно определяется, как канцерогенные, это связано с тем, что корреляцию между их воздействием на человека и возникновением у него ракового заболевания установить достаточно сложно, так как подобные эксперименты требуют продолжительного непрерывного наблюдения за пациентом. Такие исследования обычно проводят на животных в течение 2-3 лет, а это не всегда возможно осуществить: трудности связаны с необходимостью наличия квалифицированного и опытного персонала, дорогостоящего оборудования [28, 29].

Обычно вещества, канцерогенные свойства которых доказаны, являются органическими соединениями; некоторые вещества из класса пестицидов также могут способствовать появлению новообразований, например, хлорорганические пестицидные препараты, такие как ДДТ (дихлордифенил трихлорметилметан), в

настоящее время запрещенный к использованию на территории большинства стран.

1.2.4. Поверхностно-активные вещества

Поверхностно-активные вещества (ПАВ) – вещества, молекулы которых содержат одну или несколько гидрофильных групп и один или несколько гидрофобных радикалов, такая структура позволяет этим соединениям концентрироваться на межфазных поверхностях раздела [30]. Основываясь на их химической структуре, можно выделить четырех основных класса ПАВ:

- **Анионактивные**, диссоциирующие в водном растворе с образованием отрицательно заряженных органических ионов, например, соли карбоновых кислот;
- **Катионоактивные**, которые диссоциируют с образованием поверхностно-активного катиона, к этому типу ПАВ можно отнести азотосодержащие вещества;
- **Неионогенные**, т.е. соединения, которые не диссоциируются на ионы, такие как алкилглюкозиды;
- **Амфолитные (амфотерные),** т.е. вещества, содержащие в молекуле гидрофильный радикал, который в зависимости от значения pH способен быть акцептором или донором протона (алкиламинокарбоновые кислоты) [31].

Поверхностно-активные вещества в настоящее время относятся к одним из наиболее распространенных загрязнителей водной среды. Они поступают в водоемы при использовании синтетических моющих средств в быту, с промышленными (текстильная, нефтяная химическая промышленность) стоками, со стоком с сельскохозяйственных территорий, так как поверхностно-активные вещества часто входят в состав гербицидов, инсектицидов, где играют роль эмульгаторов [32]. Токсичность ПАВ, как и ранее описанных токсикантов, объясняется тем фактом, что эти вещества практически не разлагаются и имеют

свойство накапливаться в живых организмах, тем самым нанося большой вред. Кроме того, в присутствии поверхностно-активных веществ может усиливаться воздействие других загрязняющих веществ и их опасность.

В этой работе два поверхностно-активных вещества использовались как индивидуальные токсиканты, ниже представлены некоторые свойства этих соединений.

Додецилсульфат натрия (рисунок 2):

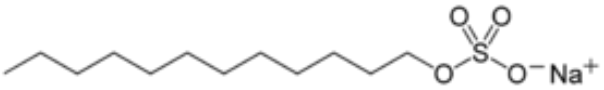


Рисунок 2. Структурная формула додецилсульфата натрия (ДСН).

Амфолитное вещество, применяют в промышленности в качестве чистящего средства при производстве косметических и моющих средств, так как додецилсульфат натрия обеспечивает эффективное пенообразование. Хорошо растворяется в воде (200000 мг/л), метаноле и хлороформе.

Додецилсульфат натрия является токсичным для водных организмов соединением, однако, для животных и человека, вещество умеренно токсично, $ЛД_{50}$ острая оральная для крыс составляет около 1288 мг/кг.

ПДК в водоёмах составляет 0,5 мг/л.

Цетилтриметиламмоний бромида (рисунок 3):

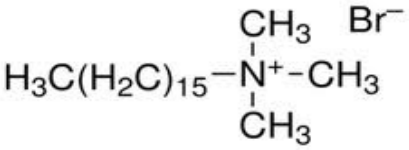


Рисунок 3. Структурная формула цетилтриметиламмоний бромида (ЦТАБ).

Обладает хорошими антисептическими свойствами, применяется в качестве биоцида, т.е. вещества необходимого для борьбы с бактериями, часто используется при изготовлении различных бытовых продуктов, таких как

шампуни и косметика. Хорошо растворяется в воде (100000 мг/л), в спиртах, таких как этанол и метанол, однако практически нерастворим в эфирах и бензоле.

Цетилтриметиламмоний бромид высокотоксичен для рыб и беспозвоночных, однако, $ЛД_{50}$ острая оральная для крыс составляет 410 мг/кг, таким образом, вещество можно считать умеренно токсичным для млекопитающих.

ПДК в водоёмах составляет 0,5 мг/л.

1.2.5.Тяжелые металлы

В группу тяжелых металлов обычно выделяют металлы, плотность которых свыше 5 мг/см^3, такие как свинец, ртуть, кадмий, медь, никель, хром, цинк и т.д. [33, 34] Обычно соединения этих металлов являются продуктами выхлопов транспортных средств, результатами работы машиностроительных, металлообрабатывающих и металлургических предприятий. Снижение концентрации этих элементов в два раза, а значит, и уменьшение их опасности происходит для некоторых элементов за десятки лет, например, для Zn; а для других – сотни и даже тысячи лет, например, Cu и Pb.

Почти во всех химических формах токсичны 12 из всех тяжелых металлов – это Be, Cr, As, Se, Ag, Cd, Sn, Sb, Ba, Hg, Te, Pb, даже самые низкие концентрации содержания этих элементов проявляют сильные токсические свойства. Это связано с высокой способностью тяжелых металлов к биологической кумуляции. К наиболее опасным и токсичным веществам обычно относят соединения ртути, кадмия и свинца (таблица 1).

Таблица 1. Самые опасные тяжелые металлы

Элемент	Источники загрязнения	ПДК в воде
Ртуть (Hg)	Производство электродов, электрического оборудования, красок, ртутных приборов,	$5*10^{-5}$ мг/л

Элемент	Источники загрязнения	ПДК в воде
	агрохимикатов. Получение детонаторов, катализаторов.	
Кадмий (Cd)	Выбросы предприятий, использующих кадмий, производство пластмасс, красителей, растворителей, удобрения.	0,001 мг/л
Свинец (Pd)	Выплавка свинца, добыча свинца на рудниках, использование удобрений, пестицидов, свинцовых труб.	0,03 мг/л

1.2.6. Фенолы

Большое количество органических соединений, многие из которых обладают токсическими свойствами, содержат в своем составе кислород. В общем случае кислородосодержащие органические соединение можно классифицировать в зависимости от степени их насыщения кислородом, расположения кислорода, наличия ненасыщенных связей в структуре углеводородов, а также наличия или отсутствия ароматических колец [35].

Фенолы представляют собой органические соединения ароматического ряда, в которых гидроксильные группы OH- связаны с ароматической углеводородной частью молекулы.

Практически все вещества, относящиеся к классу фенолов, обладают схожими токсикологическими эффектами. Фенолы относят к протоплазматическим ядам, т.е. соединениям, повреждающим все виды клеток. Одноатомные фенолы в основном являются сильными нейротоксинами, кроме того, поражают печень и почки. Многоатомные фенолы при длительном воздействии на организм нарушают ферментативные процессы.

В этой работе вещества, относящиеся к классам фенолов, использовались как индивидуальные токсиканты, ниже представлены некоторые свойства этих соединений.

Фенол.

Простейший представитель класса фенолов. Используется при производстве эпоксидных и фенолформальдегидных смол, поверхностно-активных веществ, лекарственных препаратов и пестицидов. Кроме того, находит применение в нефтепереработке, например, на этапе очистки масел от смолистых веществ. Фенол растворим в воде (60000 мг/л), в спиртах, бензоле и ацетоне.

Вещество высокотоксично для беспозвоночных и рыб; умеренно токсично для млекопитающих и человека. $ЛД_{50}$ острая оральная для крыс составляет 512 мг/кг.

ПДК в водоёмах составляет 0,001 мг/л.

о-нитрофенол.

Вещество применяют в промышленности в синтезе красителей, а также кислотно-основных индикаторов, при создании пластмасс и производстве пестицидов. *о*-Нитрофенол умеренно растворяется в воде (2100 мг/л), кроме того, хорошо растворяется в спиртах, например, этаноле.

Вещество токсично для водных организмов; однако, для млекопитающих и человека соединение можно отнести к умеренно токсичным, $ЛД_{50}$ острая оральная для крыс составляет 2080 мг/кг.

ПДК в водоёмах составляет 1 мг/л.

п-крезол.

Соединение используется в химической промышленности, в том числе и в качестве растворителя при органическом синтезе. Кроме того, применяется при производстве различных типов пестицидов, медицинских препаратов. 4-

Метилфенол хорошо растворим в воде (19000 мг/л), в этаноле, бензоле, хлороформе и т.д.

Соединение токсично для гидробионтов и рыб; для млекопитающих и человека токсичность *п*-крезола определяется как умеренная, $ЛД_{50}$ острая оральная для крыс составляет около 440 мг/кг.

ПДК в водоёмах составляет 0,004 мг/л.

Непрерывный рост количества потенциальных загрязнителей водных сред и соединений, представляющих опасность для всех живых организмов, приводит к необходимости постоянного контроля качества гидросферы. К сожалению, ряд недостатков современных методов биотестирования, таких как трудоёмкость поддержания живых тест-объектов в рабочем состоянии, продолжительность анализа, не позволяют использовать методы на основе реакций живых организмов в качестве универсальных методов интегральной оценки токсичности, характеризующихся надёжностью и широким диапазоном применимости.

Инструментальный метод интегральной оценки качества воды, лишенный перечисленных недостатков, был бы крайне востребован в сфере экологического мониторинга. В качестве платформы для создания такого метода могут быть рассмотрены различные химические сенсоры и мультисенсорные системы.

1.3. Общие сведения о химических сенсорах

Обычно к химическим сенсорам относят устройство, избирательно реагирующее на изменения свойств окружающей их внешней среды и переводящее этот отклик в электрический или оптический сигнал.

Любой химический сенсор состоит из двух основных частей: во-первых, **чувствительный слой**, реагирующий на выбранное свойство окружающей среды; во-вторых, физический преобразователь - **трансдьюсер**, который, собственно, и преобразует энергию в электрический или световой сигнал. Полученный сигнал впоследствии регистрируется с помощью

светочувствительного или электронного устройства и называется аналитическим, так как даёт прямую информацию о составе среды.

По типу преобразователя все химические сенсоры можно разделить на следующие группы.

1. **Электрохимические.** Это могут быть как потенциометрические (ионоселективные электроды (ИСЭ), ионоселективные полевые транзисторы (ИСПТ)), так и вольт-, амперометрические, кулонометрические сенсоры, включая твёрдые электролитические газовые сенсоры. Полупроводниковые газовые сенсоры также могут быть включены в эту категорию, хотя механизм их действия не включает химическую реакцию.

2. **Оптические.** В таких сенсорах может изучаться поглощение света, отражение или люминесценция, зависящие от проходящей химической реакции.

3. **Масс-чувствительные.** Этот тип сенсоров основан на использовании пьезоэлектрического эффекта, т.е. возникновении поляризации диэлектрика под действием давления. К этой группе можно отнести, например, акустоволновые поверхностные сенсоры (ПАВ-сенсоры), особенно полезные в качестве газовых сенсоров.

4. **Теплочувствительные** или калориметрические. В данном случае с помощью преобразователя (это может быть трансмистор или платиновый термометр) регистрируется тепловой эффект реакции, в которой принимает участие определяемый аналит.

Из этого ряда выделяют, обычно, **биосенсоры**, хотя многие из них имеют механизм отклика, идентичный или близкий к химическим сенсорам. Чувствительный слой такого сенсора основан на различных биологических материалах, таких как ферменты, белки, бактерии и т.п.

Многие химические сенсоры, особенно в последние годы, получают или модернизируют на основе микроэлектронной технологии [36-38].

В настоящее время во многих работах, посвященных исследованиям применимости мультисенсорных систем в различных областях химии, используются массивы, состоящие из потенциометрических химических

сенсоров, что объясняется сравнительно несложным проведением анализа и возможностью осуществления измерений в реальном времени. Важнейшим параметром потенциометрических сенсоров является изменение потенциала, образующегося на границе раствора и селективного слоя (рисунок 4).

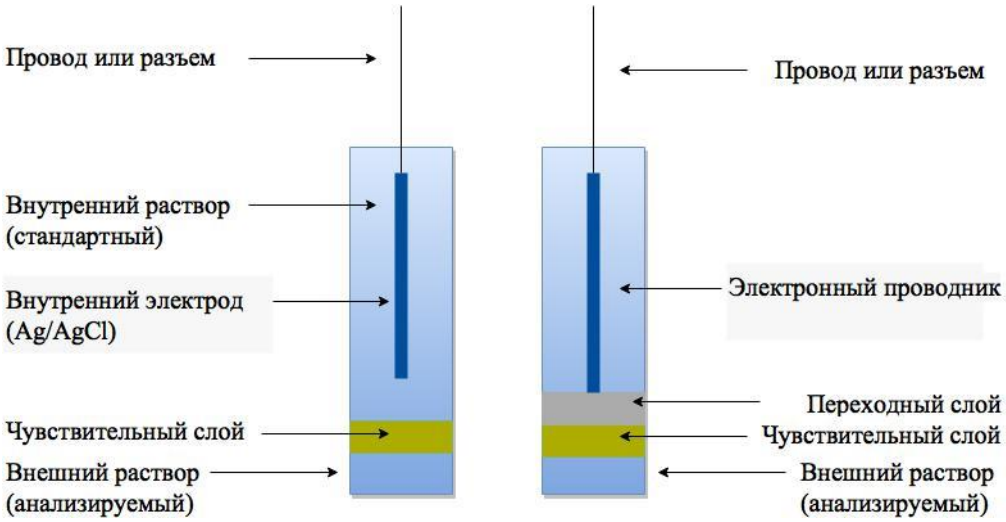


Рисунок 4. Схема потенциометрических сенсоров с жидким (слева) и твердым (справа) контактом [39].

Чувствительный слой, в данном случае, представляет собой полупроницаемую мембрану, т.е. мембрану проницаемую не для всех присутствующих в растворе ионов. Проницаемость мембраны для ионов связана с наличием в них ионогенных групп – функциональных групп, способствующих ионному обмену в растворах электролитов.

Каждый потенциометрический химический сенсор обладает рядом важнейших характеристик:

- **электродная функция**, характеризуемая протяжённостью линейного участка зависимости E_M от a_i с наклоном (RT/z_iF).

E_M - мембранный потенциал; z_i - заряд потенциалопределяющего иона; a_i - активность потенциалопределяющего иона; R - универсальная газовая постоянная; F – постоянная Фарадея; T – абсолютная температура.

Величина наклона функции для одновалентного катиона будет равна +59,1 мВ/дек, для двухвалентного катиона +29,6 мВ/дек; соответственно, -59,1 мВ/дек для одновалентного аниона и -29,6 мВ/дек для двухвалентного аниона. Это означает, что ионоселективные электроды наиболее чувствительны по отношению к одновалентным ионам. Они не очень чувствительны по отношению к трёхвалентным ионам, поскольку наклон в этом случае составляет всего лишь +19,7 или 19,7 мВ/дек на порядок величины активности в зависимости от того, является ли ион катионом или анионом. Линейный участок зависимости или нернстовская область обычно наблюдается в интервале активностей между 10^{-5} и 10^{-1} М. Значение активности, при котором линейная зависимость перестает соблюдаться, называют пределом обнаружения, установить его возможно экстраполировав два прямолинейных участка зависимости E - $\ln a_i$. Отклонения от линейности в концентрированных растворах возникают вследствие проникновения в мембрану ионов противоположных по знаку к определяемым. Отклонения в разбавленных растворах обусловлены влиянием собственных ионов мембраны, появляющихся из-за выщелачивания мембраны [38].

- **селективность**, характеризуется величиной K_{ij}^{pot}, называемой потенциометрическим коэффициентом селективности.

Величина коэффициента селективности характеризует способность ионоселективного электрода чувствовать ион A^+ в присутствии ионов B^+, если он меньше 1, то говорят, что электрод селективен к иону A^+. Для хороших мембран $K_{A/B}$ может достигать порядка 10^{-12}.

Существует несколько экспериментальных методов определения коэффициентов селективности. Наиболее известными из них являются метод смешанных растворов (МСР) и метод биионных потенциалов (БИП).

В основе **метода БИП** или метода отдельных растворов лежит измерение потенциалов мембранного электрода в чистых растворах основного и мешающего иона. Коэффициент селективности можно вычислить по следующей формуле:

$$\lg K_{A/B} = \frac{(E_2 - E_1) z_A F}{2{,}303RT} + \left(1 - \frac{z_A}{z_B}\right) \lg a_A \quad (1)$$

Метод смешанных растворов (метод постоянной активности мешающего иона) является более надежным при оценке электродной селективности. Определение потенциалов в смешанных растворах с постоянным содержанием постороннего иона B^+ и переменной концентрацией основного иона A^+ позволяет проводить оценку коэффициента селективности. Спад активности основного иона приводит к усилению влияния мешающего иона, в этом случае кривая зависимости $E = f(\lg a_A)$ становится горизонтальной, т.е. E остаётся постоянным при дальнейшем изменении α_A, т.е. электрод в присутствии постороннего иона B^+ теряет функцию основного иона A^+. Если прямую, соответствующую A-функции сенсора, продолжить до пересечения с горизонтальной прямой, то в точке пересечения потенциалы, создаваемые мешающим и основным ионом, будут равны (рисунок 5).

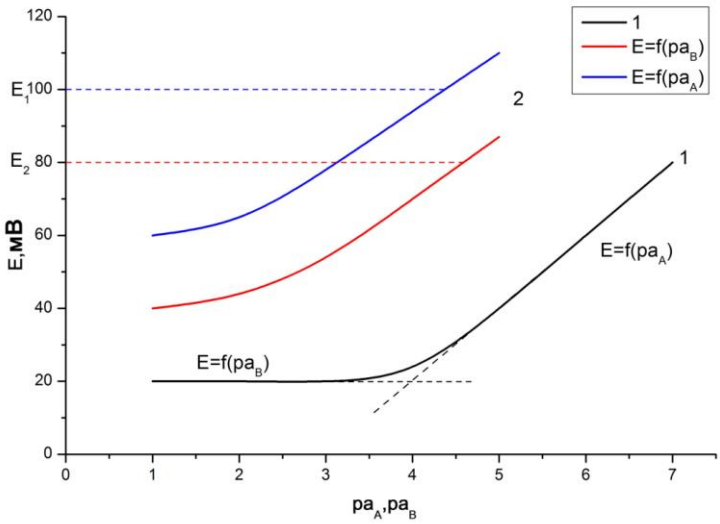


Рисунок 5. Определение коэффициента селективности методом смешанных растворов (1) и методом БИП (2).

Коэффициент селективности в методе смешанных растворов вычисляется по формуле:

$$K_{A/B} = a_A / a_B \quad (2),$$

где a_A и a_B – активности основного и мешающего ионов в точке пересечения *A* - и *B*-функций сенсора [40].

Существует несколько классификаций потенциометрических сенсоров:

- ✓ по типу определяемых частиц: электроны, ионы, молекулы;
- ✓ по типу используемой мембраны: жидкая или твёрдая, гомогенная или гетерогенная;
- ✓ по структуре материала мембраны: стеклянная, кристаллическая, пластифицированная;
- ✓ по типу устройства внутренней системы перехода от ионной проводимости к электронной (жидкий или твёрдый контакт).

Рассмотрим подробнее некоторые типы сенсоров:

1. **Сенсоры с кристаллической мембраной.** Монокристаллическое (LaF_3 для фтор-селективных мембран) или поликристаллическое (обычно смесь Ag_2S с низко растворимыми сульфидами металлов или солями серебра, например PbS и AgBr соответственно) вещество, малорастворимое в воде, с ионным типом электрической проводимости является основой для создания сенсоров этого типа. В кристаллических мембранах один из двух образующих соль ионов способен перемещаться по дефектам кристаллической решетки.

2. **Сенсоры со стеклянными мембранами.** Можно сказать, что такие мембраны в таких электродах представляют собой промежуточное состояние между твердыми и жидкими. Суть сенсоров такого типа заключается в том, что при кондиционировании в водном растворе определенного состава на внешних и внутренних поверхностях стеклянной мембраны образуется гелеобразный слой, в котором протекают все ионообменные процессы. Сенсоры обычно изготавливаются из специального стекла, в состав которого входят оксиды

алюминия, бора, натрия, калия, и отличаются хорошей воспроизводимостью потенциалов, возможностью использования в широком температурном интервале и в течение длительного срока.

3. **Сенсоры с жидкими мембранами.** Жидкая мембрана, в этом случае, это раствор ионофора в органическом неполярном или слабополярном растворителе. Особенность таких мембран состоит в подвижности органофильных ионофоров в жидкой мембранной фазе, в то время как, например, в твердой мембране движения компонентов в пространстве не наблюдается. Однако, стоит заметить, что в настоящее время электроды с жидкими мембранами практически не используются.

4. **Сенсоры с пластифицированными мембранами**, близкими по свойствам к жидким мембранам. Современные пленочные мембраны состоят, обычно, из полимерной матрицы, растворителя – пластификатора, мембраноактивных компонентов (МАК) различной природы и ионных добавок. В качестве полимерной матрицы чаще всего применятся поливинилхлорид (ПВХ), реже используются другие полимеры, например, полиуретан или силиконовая резина.

Растворитель-пластификатор существенно влияет на поведение плёночных мембранных электродов, он придаёт полимерной матрице эластичность и механическую прочность, поэтому следует учитывать, что для получения гомогенной органической фазы мембранный растворитель должен быть физически совместим с полимером. Кроме того, растворители способны сольватировать либо анионы, либо катионы, в связи с этим существует необходимость подбора растворителя для каждого типа пластифицированных мембран в зависимости от поставленной задачи. Поэтому, исследование свойств сенсоров зачастую проводится с использованием нескольких различных растворителей-пластификаторов, которые способны по-разному влиять на важнейшие характеристики изучаемых сенсоров.

Практически установлено, что даже фоновые мембраны, те, в состав которых входит только полимерная матрица и пластификатор, обладают

чувствительностью к анионам или катионам, присутствующим в растворе, таким образом, можно сделать вывод, что любой растворитель нельзя назвать абсолютно инертным.

Стандартный состав мембраны, используемой в ионоселективных электродах, содержит приблизительно 33 % полимера и 66% мембранного растворителя (по массе). Большое количество пластификатора гарантирует высокую подвижность веществ в мембране, а также поддержание оптимальных физических свойств. Исследования показали, что уменьшение количества пластификатора от 67 до 20 % по массе приводит к быстрому росту удельного сопротивления мембраны приблизительно от 108 до 1013 Ω, связанного со снижением подвижности ионов в ней [41].

Одним из важнейших компонентов полимерных мембран ионоселективных электродов является ионообменная добавка, необходимая для оптимизации электродных свойств мембраны [42]. В случае мембран, содержащих нейтральный ионофор, ионообменными добавками становятся соли липофильного иона, имеющего знак противоположный знаку исследуемого иона. Это гарантирует, что значительное количество аналита будет экстрагировано в мембрану, в то время как противоионы останутся в растворе; кроме того ионообменные добавки компенсируют заряд липофильных ионов, переходящих из анализируемого раствора в объём мембраны. В противном случае, нескомпенсированый заряд ионов в органической фазе может вызывать мешающее влияние ионов, что, в свою очередь, отразится на значениях равновесного потенциала. Еще одним важным достоинством присутствия ионных добавок в мембране является снижение электрического сопротивления электрода, позволяющее упростить используемую в измерениях аппаратуру.

1.4. Мультисенсорные системы

Мультисенсорная система - это массив химических сенсоров, а также устройство, позволяющее регистрировать полученный аналитический сигнал [43].

Концепция объединения нескольких химических сенсоров в один массив была впервые предложена несколько десятилетий назад и, в первую очередь, коснулась газового анализа, а затем, в дальнейшем, анализа жидкостей. Предпосылок к созданию устройства на основе однотипных электродов можно назвать несколько: во-первых, селективность отдельно взятого сенсора при изучении образцов сложного состава ограничена; во-вторых, быстрое развитие компьютерных технологий позволило использовать более сложные математические методы обработки результатов, необходимые при работе с массивами сенсоров.

В мультисенсорные системы могут входить любые типы сенсоров, независимо от вида преобразователя и чувствительного слоя, которые используются при их создании.

Так, например, при создании первых мультисенсорных систем использовались потенциометрические сенсоры [44, 45]. Однако позже различные авторы применяли и вольтамперометрические мультисенсорные системы [46, 47] и даже сенсоры, имитирующие вкусовые рецепторы.

Тем не менее, особенно часто находят применение именно мультисенсорные системы на основе метода потенциометрии, прежде всего, это связано с практической возможностью создания новых и усовершенствования уже имеющихся сенсорных материалов. В течение долгого времени большинство исследований, связанных с использованием потенциометрических мультисенсорных систем, было посвящено работам с уже готовыми электродами, и разработка сенсорных материалов практически не велась. Впрочем, в дальнейшем стало очевидно, что для изменения диапазона чувствительности электродов, а также развития области применения массивов сенсоров, требуются новые материалы, которые можно было бы использовать для получения аналитического сигнала.

Необходимость варьирования сенсорных свойств, а значит, и структуры мембраноактивных веществ, также объясняет популярность в настоящее время пластифицированных полимерных мембран [48-50], которые пришли на смену

халькогенидным стеклам, а также поликристаллическим мембранам на основе солей металлов.

Работа с массивом сенсоров (мультисенсорной системой) схожа с исследованиями потенциалов отдельных электродов, проводится измерение электродвижущей силы (Э.Д.С.) электрохимической ячейки [51], состоящей из массива и электрода сравнения. Для измерения используют многоканальные вольтметры с высоким входным сопротивлением. Вся система подключена к персональному компьютеру, необходимому для сбора полученных данных и последующей их обработки (рисунок 6).

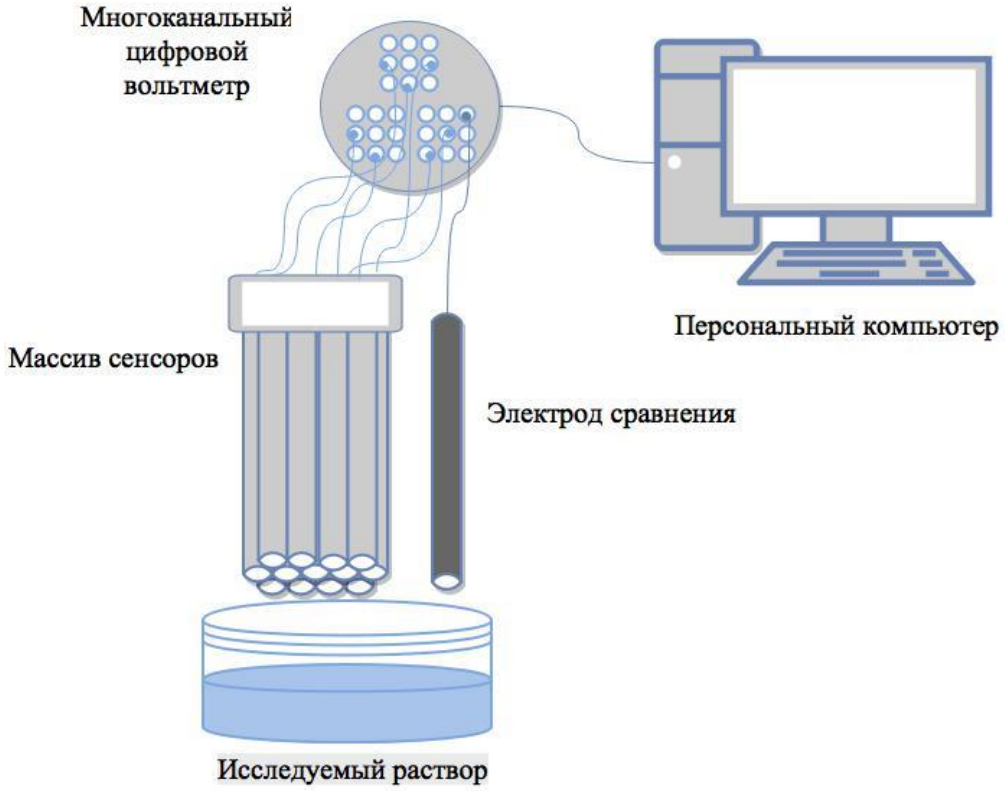


Рисунок 6. Схема работы потенциометрической мультисенсорной системы.

Мультисенсорная система представляет собой массив химических сенсоров с относительно невысокой селективностью, которым присуща, так называемая, **перекрестная чувствительность,** т.е. чувствительность одновременно к нескольким компонентам исследуемого раствора. Количество химических сенсоров, включенных в массив, может варьироваться от нескольких до десятков.

Полученный в результате анализа набор откликов сенсоров подвергается методам обработки многомерных данных, позволяющих сделать вывод о качественном и количественном составе образцов [52].

Сенсоры, составляющие массив, подходящий для решения конкретной задачи, должны обладать хорошо воспроизводимыми аналитическими характеристиками, а также высокой перекрёстной чувствительностью. Существует три основных параметра, позволяющие оценить перекрестную чувствительность отдельно взятого сенсора и принять решение о возможности или невозможности включения электрода в мультисенсорную систему [53]:

- **Средний наклон *S*** рассчитывается по формуле:

$$S = \frac{1}{n}\sum_i S_i \qquad (3),$$

где S_i – угловой коэффициент электродной функции сенсора в калибровочных растворах индивидуальных веществ, перекрёстная чувствительность к которым оценивается; n – число изучаемых веществ.

Считается, что чувствительность сенсоров к выбранному кругу веществ тем выше, чем больше значение среднего наклона, однако, каждый конкретный случай стоит рассматривать отдельно. Теоретическое значение S равное ±29 мВ·(pX)$^{-1}$ соответствует чувствительности сенсора к двухзарядным ионам. Обычно считают, что электроды со средним наклоном > 25 мВ·(pX)$^{-1}$ обладают высокой перекрёстной чувствительностью и могут быть включены в состав мультисенсорной системы для определения данного набора ионов. Существуют случаи, когда средний наклон сенсорного материала может превышать 30 мВ·(pX)$^{-1}$ – это связано с супернернстовской чувствительностью к одному или нескольким ионам.

- **Фактор стабильности *K*** – это усредненное по всем изучаемым веществам соотношение сигнала и шума для определенного сенсора, которое соответствует следующей формуле:

$$K = \frac{1}{n}\sum_i K_i = \frac{1}{n}\sum_i \frac{S_i}{s_i} \qquad (4)$$

В этом соотношении S_i – коэффициент электродной функции сенсора в растворах выбранных веществ; s_i – стандартное отклонение коэффициента электродной функции сенсора в растворах выбранных веществ. Для расчета стандартного отклонения проводятся параллельные измерения, позволяющие определить, насколько хорошо воспроизводятся характеристики сенсора в исследуемых растворах. Ясно, что чем выше значение фактора стабильности, тем лучше воспроизводятся показания электрода, практически доказано, что сенсоры, для которых $K \geq 2$ могут быть использованы в составе мультисенсорной системы.

- **Фактор неселективности *F*** характеризует равномерность распределения чувствительности сенсора к выбранному для изучения набору веществ:

$$F = \frac{S}{s^2} \qquad (5)$$

S - средний наклон; s – стандартное отклонение среднего наклона.

Фактор неселективности помогает установить, обладает ли сенсор перекрестной чувствительностью в данной конкретной ситуации. Значение приблизительно 0,1 типично для высокоселективных сенсоров, которые проявляют высокую чувствительность только одному иону, такие электроды не подходят для использования в качестве составной единицы мультисенсорной системы. Величина фактора равная 0,1 говорит о наличии чувствительности к нескольким ионам из числа исследованных. Для материалов с приблизительно одинаковой чувствительностью ко всем ионам фактор неселективности должен

быть больше 0,1. Как правило, считают, что F = 0,5 и больше свидетельствует о наличии перекрёстной чувствительности данного сенсора к изучаемому набору ионов. На практике, при выборе электродов для мультисенсорных систем, учитывают все вышеперечисленные параметры.

Широкий круг задач, решаемый с помощью мультисенсорных систем, часто связан с установлением вкусовых характеристик, качества продуктов, установлением их подлинности и соответствия принятым нормам, кроме того, в качестве анализируемых образцов нередко используют другие вещества, употребляемые человеком, например, лекарственные средства. Впервые система, определяющая пять базовых вкусов, была предложена группой японских исследователей в начале девяностых годов XX века [54, 55] и состояла из восьми потенциометрических сенсоров; в качестве чувствительного слоя в этих сенсорах использовались липидные мембраны, в состав которых входил поливинилхлорид и пластификатор диоктил фенилфосфонат.

В работах, связанных с определением тех или иных вкусовых параметров, референтными методами становились оценки людей-дегустаторов, таким образом, использование мультисенсорных систем позволяло избегать проблем субъективного человеческого восприятия. В случае с фармацевтическими препаратами сравнение проводилось относительно реакций млекопитающих животных, в частности, крыс.

Опубликованы статьи, связанные с применением мультисенсорных систем для анализа напитков, например, в статье [56] массив сенсоров использовался для анализа и классификации 13 различных марок минеральной воды.

В работе [57] для анализа образцов чёрного чая применялись два типа мультисенсорных систем: потенциометрический и вольтамперометрический. Взаимосвязь между данными, полученными массивами сенсоров, и референтными данными изучали, используя коэффициенты матричных корреляций. Статья [58] посвящена решению задачи классификации молока с помощью массива микроэлектродов на основе эпоксидной смолы.

Довольно много исследований посвящены оценке вкуса вина по показаниям людей-дегустаторов [59-61], определению содержания компонентов, влияющих на качество напитка [62]. Популярным объектом исследования является пиво [63-66], например, в [63] гибридная система на основе потенциометрических и вольтамперометрических сенсоров использовалась для распознавания различных сортов пива.

Кроме напитков мультисенсорные системы часто используются для исследования продуктов - оливковых масел [67], овощей [68], рыбы [69]. Как правило, в этих случаях массив сенсоров также используется для классификации продуктов и для их количественного анализа, определения содержания различных неорганических элементов, органических кислот и т.д.

Существуют работы, в которых описывается применение мультисенсорных систем для оценки концентрации ферментов, а также проверки некоторых стадий производства, например, закваска для сыров [70].

Несколько работ посвящено исследованию возможности оценки вкуса не только продуктов, но и, например, лекарственных смесей, основная задача таких работ заключается в измерении интенсивности горького вкуса активных веществ, а также эффективности его маскировки специальными веществами, такими как подсластители и ароматизаторы [71, 72].

Однако использование мультисенсорных систем не ограничивается изучением пищевой продукции и её вкусовых характеристик.

В области медицинских исследований были проведены эксперименты, посвященные применению мультисенсорных систем, например, для определения химического состава биологических жидкостей человека, таких как моча [73-75].

Массивы сенсоров использовались и при решении задач промышленного контроля, в частности, в [76] было предложено использовать мультисенсорную систему для анализа облучённого ядерного топлива. Проводились исследования, посвященные обнаружению присутствия ванадия различной валентности в каталитических процессах [77], одновременному определению содержания нескольких лантаноидов [78].

Перспективным направлением применения мультисенсорных систем представляется их использование при решении экологических проблем различного рода, таких как загрязнение грунтовых вод на территориях промышленных объектов и производств. Ключевой задачей таких работ является исследование водных образцов на присутствие в них ионов Cu^{2+}, Fe^{3+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, Cl^{-}, и SO_4^{2-} [79, 80]. В ряде статей описывается анализ сточных вод различного состава и происхождения с помощью массива сенсоров [81].

1.5. Методы анализа многомерных данных

Международное хемометрическое общество определяет хемометрику, как науку о соотнесении измерений, проведенных над химической системой или процессом, с состоянием этой химической системы (процесса) путем использования математических либо статистических методов. Впервые хемометрика появилась в двадцатом веке [82-86] и изначально выделялась как отдельная дисциплина в аналитической химии. Однако, со временем, в связи с появлением все более сложных задач, не всегда относящихся к области аналитической химии, и развитием методов анализа, хемометрика превратилась в отдельную дисциплину.

Цель любого анализа многомерных данных заключается в нахождении неких скрытых закономерностей, связанных со свойствами изучаемых объектов. Для выявления информации, интересной исследователю, необходимо использовать различные теоретические модели, методы математической статистики, проводить оптимизацию эксперимента и подбор правильных методов анализа – всё это в итоге и составляет основу хемометрики.

Использование методов хемометрики в настоящее время позволяет решать круг задач, которые ранее казались практически неразрешимыми, например, это касается широко распространенных проблем, связанных с перекрывающимися и наложенными сигналами, полученными при работе с методами спектроскопии. Развитие методов многомерного анализа позволило обойти подобные

экспериментальные сложности, используя созданный на основе методов хемометрики математический аппарат, а также соответствующее программное обеспечение. В частности, на основе данных спектроскопии, применяя подходящие методы анализа, можно проводить контроль подлинности лекарственных средств, определять место происхождения вин и многое другое. Следует сказать, что большинство подобных задач невозможно решить, не прибегая к помощи многомерного подхода к полученным спектральным данным, что связано с неразрешенностью и наложением спектральных сигналов, особенно полученных в ближней области инфракрасной спектроскопии.

Выбор метода анализа полученных данных зависит от конкретной задачи, поставленной перед исследователем (рисунок 7).

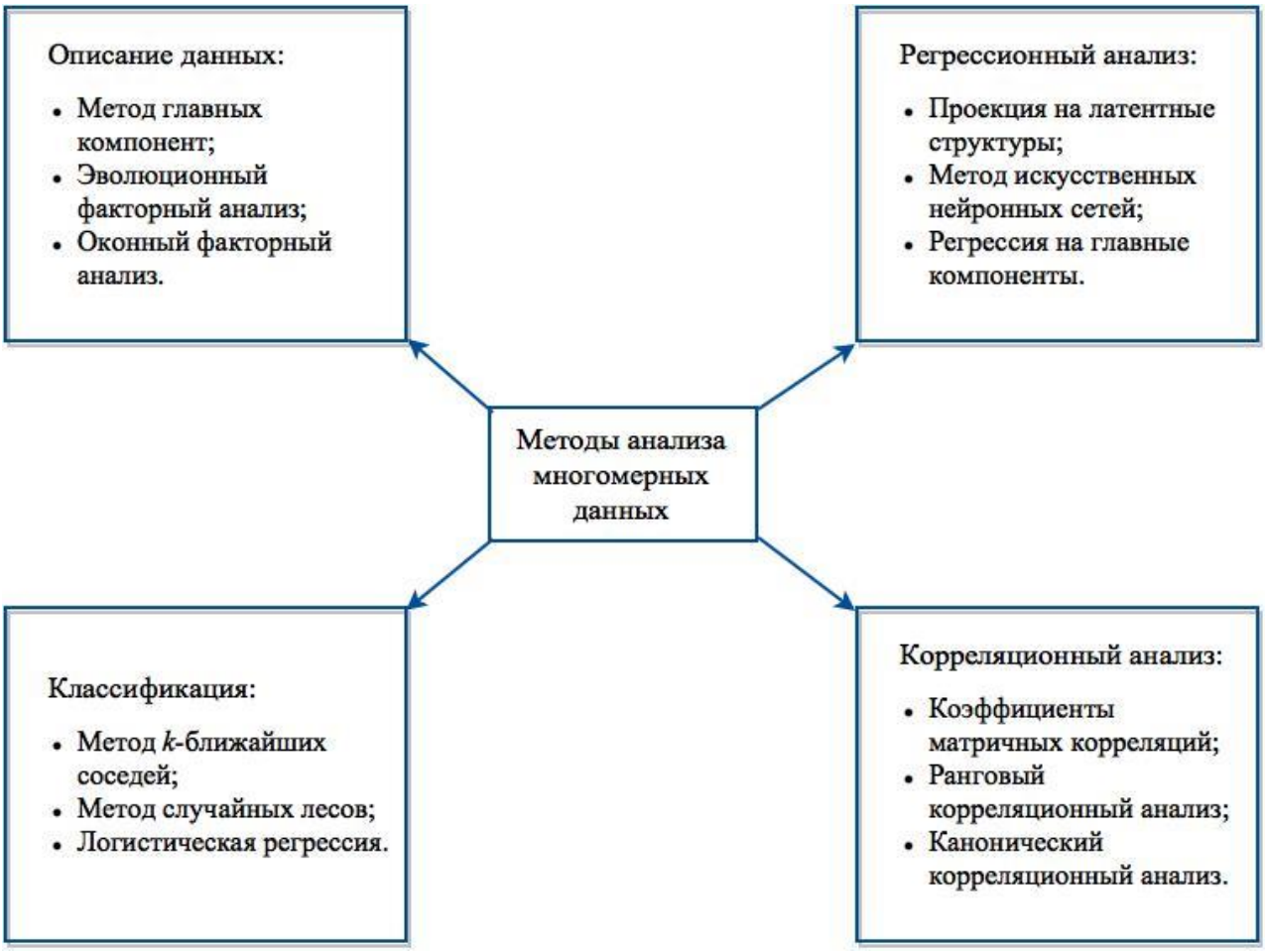


Рисунок 7. Классификация хемометрических методов [87].

Например, для нахождения структуры в данных (описания общей картины) чаще всего применяют метод главных компонент (МГК), который позволяет разделить образцы на кластеры схожих или различных между собой.

Для того, чтобы отнести образец, информация о котором неизвестна, к одному из уже заявленных классов используют методы классификации, такие как логистическая регрессия, метод k-ближайших соседей и т.п.

Обнаружение численных корреляций между, например, матрицей данных, полученных с помощью мультисенсорной системы, и информацией от других методов, таких как биотестирование, проводится с использованием регрессионного анализа. Методы проекций на латентные структуры (ПЛС), искусственных нейронных сетей (ИНС), являются одними из наиболее популярных.

Сравнение различных аналитических методик можно провести, используя корреляционный анализ.

Зачастую, вопросы, связанные с планированием эксперимента, анализом конкретных образцов, удобной визуализацией полученных результатов, а также получением химически важной информации из отобранных данных, возможно решить только используя методы и подходы хемометрики. Например, существует необходимость максимально увеличить выход технологического процесса, который зависит от ряда параметров, таких как концентрации исходных веществ, температура, давление, значения pH и т.д.

Для того чтобы выбрать оптимальные условия процесса необходимо оценить влияние различных комбинаций факторов на результат (например, низкая температура при высоком давлении и низком значении pH, недостаток одного из исходных веществ при низком давлении и т.д.). Используя современные методы хемометрики, нетрудно найти наиболее подходящие условия процесса, проведя анализ минимального количество комбинаций параметров.

Также в качестве примера можно привести задачу диагностики заболеваний у пациентов, путем осуществления одного анализа (ЯМР-спектроскопия) какой-

нибудь биологической жидкости (слюна, кровь, моча). Решить эту проблему можно с применением аппарата хемометрики.

Часто методы хемометрики используются в физической химии для исследования кинетики химических процессов, используя спектроскопические данные, так в работе [88] использовался спектральный анализ в ультрафиолетовой и видимой области спектра для изучения кинетики реакции образования фенилгидразона бензофенона. Для интерпретации спектральных данных в этой статье использовался метод главных компонент.

Исследование кинетики процессов проводятся и с применением хроматографических данных [89], в этом случае важную для исследователя информацию также можно получить, используя методы обработки многомерных данных.

Методы хемометрики использовались и для решения задач органической химии, например, для прогнозирования свойств химических соединений, исходя из их структуры (QSAR) [90].

Кроме того, использование методов хемометрики позволяет оценить и спрогнозировать различные интегральные параметры образцов - горькость лекарственных препаратов в шкалах человеческого восприятия или вкусовые параметры различных напитков, оцененных с помощью людей-дегустаторов.

В связи с постоянно растущим числом веществ, которые являются потенциальными загрязнителями, индивидуальное определение всех опасных токсикантов в каждой пробе воды не представляется возможным. В такой ситуации особое значение приобретают аналитические методы группового определения различных загрязнителей, а также методы интегральной оценки качества воды. Среди последних наибольшее распространение в настоящее время получили методы оценки токсичности с помощью биотестирования, которое основано на изучении реакций различных живых организмов на изменения окружающей их среды. В качестве биологических реакций могут выступать, например, выживаемость дафний, плодовитость водорослей, хемотаксис инфузорий.

Методы биотестирования позволяют оценить качество воды, а также ее опасность для живых организмов, однако, они обладают рядом существенных недостатков: необходимость использования живых организмов, которые должны культивироваться и поддерживаться в рабочем состоянии в определенных условиях; длительное время анализа (в некоторых случаях до 96 часов). Также серьёзной проблемой представляется отсутствие универсальных биотестов, характеризующихся надёжностью и широким диапазоном применимости.

Инструментальное определение токсичности без использования живых организмов явилось бы крайне востребованной альтернативой традиционным методам биотестирования. Было сделано предположение, что мультисенсорные системы в сочетании с методами обработки многомерных данных могут стать достойной заменой современным методам биотестирования на основе реакций живых гидробионтов.

Анализ литературных данных показал, что мультисенсорные потенциометрические системы ранее не применялись для оценки интегральной токсичности водных сред в терминах реакций живых тест-объектов.

Преимуществами такого подхода к оценке токсичности воды может стать экспрессность анализа, так как длительность потенциометрических измерений составляет всего 3-5 минут, что в дальнейшем может позволить разработать on-line систему комплексной оценки состояния гидросферы. Кроме того, несомненным достоинством подобной системы стало бы отсутствие проблем, связанных с использованием живых организмов, которые в этом случае использовались бы только на стадии градуировки массива сенсоров.

Таким образом, основная задача данного исследования заключается в изучении возможности оценки токсичности водных образцов, как модельных, так и реальных, в шкалах различных методов биотестирования, основанных на реакциях нескольких живых тест-объектов.

ГЛАВА 2. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЪЕКТОВ И МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Аппаратура

Система, состоящая из 21 перекрестно-чувствительного сенсора: 7 анион- и 9 катион-чувствительных сенсоров с жидким контактом, 5 твердотельных электрода (таблица 2), использовалась при работе с исследуемыми образцами, кроме того в массиве присутствовал стеклянный pH-электрод (Гомель, Беларусь). Все сенсоры разрабатывались на базе Лаборатории Химических Сенсоров СПбГУ, выбор электродов для массива основывался на опыте работы с образцами различной природы.

Таблица 2. Составы мембран перекрестно-чувствительных сенсоров

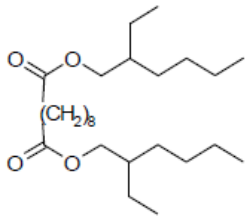
Код	**Состав мембран**	**Спектр чувствительности**
Ан1	поликристаллическая мембрана на основе Ag_2S-AgCl	анионы галогенидов [91]
Ан2	поливинилхлорид 33% ортонитрофенилоктиловый эфир 66% тетрадодецилламмоний нитрат 1 %	неорганические и органические анионы [92]
Ан3	поливинилхлорид 33% ортонитрофенилоктиловый эфир 65,5% тридодецилметиламмоний нитрат 0,5 % тетрафенилпорфирин марганца хлорид 1%	неорганические и органические анионы [92]
Ан4	поливинилхлорид 33% ортонитрофенилоктиловый эфир 66% тридодецилметиламмоний нитрат 1%	неорганические и органические анионы [93]
Ан5	поливинилхлорид 33% ортонитрофенилоктиловый эфир 66%	неорганические и органические анионы

Код	Состав мембран	Спектр чувствительности
	тетрафенилпорфирин родия (III) хлорид 1%	[93]
Ан6	поливинилхлорид 32,8% ортонитрофенилоктиловый эфир 65,5% (1,3-[бис(3-фенилтиоуреидометил)] бензол) 1% тридодецилметиламмоний хлорид 0,7%	гидрофильные анионы (сульфат, карбонат, бикарбонат) [93]
Ан7	поливинилхлорид 33% ортонитрофенилоктиловый эфир 66% триметилдодециламмоний хлорид 1 %	неорганические и органические анионы [94]
Кат1	поливинилхлорид 33% ортонитрофенилоктиловый эфир 65% N,N,N’,N’-тетраоктилдиамид дигликолевой кислоты 0,5% хлорированный дикарболлид кобальта 1,5%	катионы переходных металлов [95, 96]
Кат2	поливинилхлорид 33% ди-(2-этилгексил)себацинат 65,5% хлорированный дикарболлид кобальта 1,5%	катионы щелочных, щелочно-земельных и переходных металлов [97]
Кат3	поливинилхлорид 33% ди-(2-этилгексил)себацинат 66% тетракис(3,5-бис-трифторметил)фенил борат калия 1%	катионы щелочных, щелочноземельных и переходных металлов [98]
Кат4	поливинилхлорид 33% ортонитрофенилоктиловый эфир 65% N, N’ – диэтил – N, N’ – ди-п-толил диамид дипиколиновой кислоты 0,5% хлорированный дикарболлид кобальта 1,5%	катионы переходных металлов [99, 100]
Кат5	поливинилхлорид 33%	катионы переходных

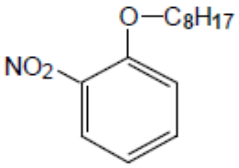
Код	Состав мембран	Спектр чувствительности
	ди-(2-этилгексил)себацинат 65% тетрафенил метилен дифосфин диоксид 0,5% хлорированный дикарболлид кобальта 1,5%	металлов [101, 102]
Кат6	поливинилхлорид 33% ортонитрофенилоктиловый эфир 65,5% хлорированный дикарболлид кобальта 1,5%	катионы щелочных, щелочно-земельных и переходных металлов [97]
Кат7	поливинилхлорид 33% 2-фтор-2’-нитродифениловый эфир 66% тетракис(3,5-бис-трифторметил)фенил борат калия 1%	катионы щелочных, щелочно-земельных и переходных металлов [97]
Кат8	поливинилхлорид 33% ди-(2-этилгексил)себацинат 65% триоктилфосфин оксид 1,5% тетра(4-хлорфенил)борат калия 0,5%	катионы щелочно-земельных и переходных металлов [103]
Кат9	поливинилхлорид 33% ди-(2-этилгексил)себацинат 65% фенилоктил-N,N-ди-i-бутилкарбамоилметилен фосфин оксид 0,5% хлорированный дикарболлид кобальта 1,5%	катионы переходных металлов [101]
Хк1	иодид кадмия 33% сульфид серебра 33% сульфид мышьяка 33%	ионы кадмия, серебра, ртути, редокс пары [103, 104]
Хк2	сульфид свинца 12% сульфид серебра 39% сульфид мышьяка 49%	ионы свинца, серебра, ртути, редокс пары [103, 104]
Хк3	медь 10,5%	ионы железа, редокс

Код	Состав мембран	Спектр чувствительности
	серебро 12% мышьяк 25,5% селен 17% теллур 35%	пары [103, 104]
Хк4	серебро 14% мышьяк 33,5% сера 47% железо 5%	ионы серебра, ртути, редокс пары [104]
Хк5	бромид серебра 56,5% сульфид серебра 30% мышьяк 9% сера 3% иодид ртути 1,5%	ионы ртути, редокс пары [104]

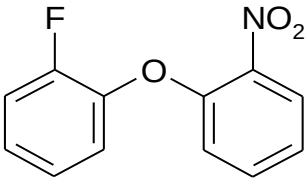
В катион- и анион-чувствительных сенсорах в качестве полимерной матрицы использовался поливинилхлорид (ПВХ), а в качестве пластификатора одно из двух соединений: ди-(2-этилгексил)себацинат (ДОС), о-нитрофенилоктиловый эфир (НФОЭ) или 2-фтор-2’-нитродифениловый эфир (2Ф2Н) (рисунок 8).



ДОС



НФОЭ



2Ф2Н

Рисунок 8. Структурные формулы использовавшихся в работе пластификаторов.

Соотношение ПВХ:пластификатор составляло 1:2, то есть примерно 33 и 66% массовых процента соответственно. Кроме этого в состав полимерной мембраны также входили ионообменные добавки, например, калия тетракис[3,5-бис(трифторметил)фенил]борат, хлорированный диарболид кобальта, упрощающие перенос иона из анализируемого раствора в объем мембраны. Также мембраны сенсоров содержали различные нейтральные фосфоро- и азотосодержащие лиганды, например, дифосфин диоскиды и диамид дигликолиевой кислоты.

Твердотельные электроды представляли собой сенсоры с халькогенидными стеклянными мембранами, чувствительные к катионам различных тяжёлых металлов. Они были приобретены у компании ООО «Сенсорные Системы» (Санкт-Петербург).

Для изготовления пластифицированных мембран для сенсоров использовалась стандартная методика. Навески компонентов мембраны суммарной массой 300 мг в стеклянном стакане заливали небольшим объёмом свежеперегнанного тетрагидрофурана (ТГФ) и перемешивали на магнитной мешалке до полного растворения. Изготовленная смесь переносилась в тефлоновый бюкс, после чего оставлялась минимум на сутки до полного испарения ТГФ. Из полученной мембраны вырезали диски требуемых размеров, которые затем вклеивали в корпуса электродов (ПВХ – трубки) при помощи клея, представляющего собой раствор ПВХ в циклогексаноне. После высыхания клея сенсоры заполняли 0.01 М раствором хлорида натрия и вымачивали одни сутки перед началом измерений в растворе того же состава. Между последующими измерениями сенсоры хранились на воздухе.

Исследование электродных свойств мембран проводили методом измерения электродвижущей силы (э.д.с.) гальванического элемента:

$$Cu\ |Ag\ |AgCl,\ KCl_{нас}|\ исследуемый\ раствор\ |мембрана\ |\ 0{,}01M\ NaCl,\ AgCl\ |\ Ag\ |Cu$$

Электродом сравнения служил хлорсеребряный электрод ЭСр 10103 (ООО «Измерительная техника», Москва), заполненный насыщенным раствором хлорида калия. Показания сенсоров снимали на 32-канальном цифровом вольтметре с высоким входным сопротивлением, подключенном к персональному компьютеру для сбора и обработки данных (рисунок 9). Значения потенциалов были измерены с точностью 0,1 мВ.

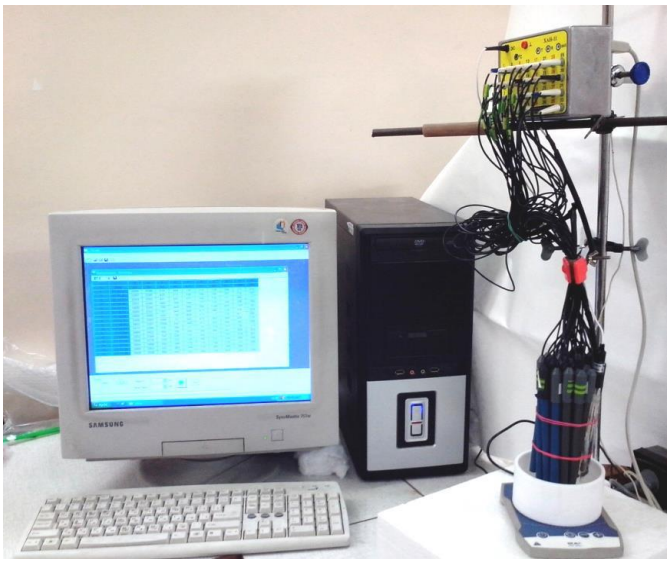


Рисунок 9. Потенциометрическая мультисенсорная система.

Обработка полученных данных проводилась с помощью программного обеспечения «R version 2.13.0» (The R Foundation for Statistical Computing) и «Unscrambler 9.7» (CAMO, Norway).

Проведение методики биотестирования на основе реакции *Daphnia magna* не требовало использования специального оборудования. Подсчет умерших особей дафний вёлся визуально с использованием простейшей лупы. Объём исследуемой пробы составлял не менее 1 дм^3, температура анализируемого образца ~20°С.

Оценка хемотаксиса инфузорий *Paramecium caudatum* проводилась с использованием прибора «Биотестер-2» (рисунок 10), который позволяет определять количество движущихся клеток. Оптимальное число взвеси клеток составляло около 1000 в 1 мл пробы.

Рисунок 10. Биотестер-2.

Прибор выдает информацию о средней концентрации находящихся в объеме и движущихся клеток в условных единицах от 0 до 512. Существует три возможных режима проведения эксперимента: 1) выдача одного отсчёта через 35 секунд; 2) выдача среднего после 5 отсчетов; 3) выдача усредненного значения после 10 отсчётов.

Измеритель оптической плотности суспензии ИПС-03 (рисунок 11) применялся для исследования оптической плотности *Chlorella vulgaris*, которое проводится непосредственно во флаконах, в которых культура выращивается.

Рисунок 11. Измеритель оптической плотности суспензии ИПС-03.

Длина волны, при которой происходит измерение оптической плотности, - 560±10 Нм. Диапазон измерения – 0,000 – 0,650, если оптическая плотность

культуры выше, чем представленное значение, то для получения корректных результатов суспензию необходимо предварительно разбавить.

Снижение люминесценции морских бактерий *Vibrio fischeri* измерялось с помощью специально разработанного для этих целей прибора «Microtox M500» (рисунок 12).

Рисунок 12. Анализатор Microtox M500.

Данный прибор представляет собой интеграцию люминометра и инкубатора. Инкубатор способен одновременно поддерживать два температурных режима: 15°C – температура, при которой содержатся тестовые образцы, а также одна кювета с температурой 5°C, необходимой для хранения штамма бактерий в рабочем режиме. Люминометр измеряет количество света элиминированного *Vibrio fischeri*. Microtox подключен к персональному компьютеру для сбора и последующей обработки данных с помощью программного обеспечения MicrotoxOmni (Carlsbad, CA, USA).

Средства измерения

Весы электронные Ohaus Discovery, предел допускаемой погрешности ±0,00001 г, класс точности (по ГОСТ) – 1.

32-канальный вольтметр с высоким входным сопротивлением ХАН-11.

Вспомогательное оборудование

Микродозаторы переменного объема фирмы «BIOHIT» вместимостью 0,1 – 2,5; 2 – 20; 20 – 200; 200-1000 мм3 с пределом допускаемой погрешности измерения не более 5%.

Мерный цилиндр (Химлаборприбор), 100 мл, предел допускаемой погрешности ±0,15 мл, класс точности (по ГОСТ) – 2.

Магнитная мешалка «IKA color squid» (Германия).

Ячейка для потенциометрических измерений, 100 мл, тефлоновая.

2.2. Реагенты

Реагенты для приготовления водных растворов поверхностно-активных веществ: додецилсульфат натрия («Невареактив», 98%), цетилтриметиламмоний бромид («Диа-М», 99%).

Реагенты для приготовления водных растворов веществ класса фенолов: фенол («Вектон», 99,5%), *о*-нитрофенол («Невареактив», 99%), *п*-крезол («ЛабТех», 99%).

Вспомогательные реактивы: бидистиллированная вода.

2.3. Исследуемые образцы

Водные растворы индивидуальных токсикантов: поверхностно-активных веществ и соединений класса фенолов.

В качестве индивидуальных токсикантов, к которым изучалась чувствительность массива сенсоров, были выбраны следующие вещества: поверхностно-активные вещества – додецилсульфат натрия, цетилтриметиламмоний бромид, а также вещества, относящиеся к классу фенолов – фенол, *о*-нитрофенол, *п*-крезол.

В случае поверхностно-активных веществ диапазон концентраций водных растворов составлял от 10^{-6} до 10^{-2} моль/л для додецилсульфат натрия и от 10^{-6} до 10^{-3} моль/л для цетилтриметиламмоний бромида. Интервалы концентраций индивидуальных растворов ПАВ были выбраны исходя из литературных данных о том, что 50% смертность дафний за 48 часов вызывали растворы, концентрация которых находилась в исследуемом диапазоне [105, 106].

Растворы поверхностно-активных веществ были изготовлены весовым методом, растворы с меньшими концентрациями приготавливались методом объемного разбавления последовательно в 10, 100, 1000 и 10000 раз. Все растворы были приготовлены на бидистиллированной воде непосредственно перед проведением эксперимента.

Чувствительность массива сенсоров к веществам класса фенолов изучалась в диапазоне концентраций: от 10^{-5} до 10^{-3} моль/л для фенола, от 10^{-5} до 10^{-2} моль/л для *о*-нитрофенола и от 10^{-5} до 10^{-3} моль/л для *п*-крезола. Интервалы концентраций индивидуальных растворов этих веществ также были выбраны исходя из литературных данных о том, что 50% смертность дафний за 48 часов вызывали растворы, концентрация которых находилась в исследуемом диапазоне [107 – 109].

Водные растворы фенола, *о*-нитрофенола и *п*-крезола были изготовлены весовым методом, растворы с меньшими концентрациями приготавливались методом объемного разбавления последовательно в 10, 100, 1000 и 10000 раз. Все растворы были приготовлены на бидистиллированной воде.

Водные растворы индивидуальных токсикантов

Двадцать четыре водных раствора индивидуальных токсикантов были изготовлены в Центре Исследований и Инноваций в Токсикологии Технического Университета Каталонии (Террасса, Испания) (таблица 3). Объём каждого образца составлял 500 мл, все растворы хранились в пластиковых бутылках с завинчивающейся крышкой в холодильнике. Все водные растворы

индивидуальных токсикантов приготавливались непосредственно перед началом измерений.

Таблица 3. Водные растворы индивидуальных токсикантов

Образец	**Концентрация**	**Применение**	**Токсичность**
4-нитроанилин	$32*10^{-5}$ моль/л	производство красителей, пестицидов	умеренная
карбофуран	$3,8*10^{-4}$ моль/л	инсектицид	высокая
имидаклоприд	$1,6*10^{-3}$ моль/л	инсектицид	умеренная
сульфат ртути ($HgSO_4$)	$1,6*10^{-6}$ моль Hg/л	химическая промышленность	умеренная
диметилсульфоксид	$2,9*10^{-3}$ моль/л	лекарственное средство	низкая
дихромат калия ($K_2Cr_2O_7$)	$3.6*10^{-4}$ моль/л	производство красителей	высокая
додецилсульфат натрия	$1,8*10^{-5}$ моль/л	бытовая химия	низкая
2-хлорбензойная кислота	$1,6*10^{-4}$ моль/л	синтез красителей	умеренная
фенол	$1,3*10^{-3}$ моль/л	производство пестицидов, лекарственных средств	высокая
3,4-дихлоранилин	$1,3*10^{-4}$ моль/л	гербицид	умеренная
кофеин	$1,3*10^{-2}$ моль/л	пищевая промышленность	умеренная
мочевина	$3,8*10^{-1}$ моль/л	минеральное удобрение	низкая

Образец	Концентрация	Применение	Токсичность
лимонная кислота	$2,9*10^{-4}$ моль/л	пищевая, косметическая промышленность	низкая
триэтиламин	$3,9*10^{-3}$ моль/л	производство удобрений, гербицидов	высокая
4-хлорфенол	$3,1*10^{-2}$ моль/л	промежуточный продукт при синтезе гербицидов	умеренная
уксусная кислота	$7,3*10^{-4}$ моль/л	пищевая промышленность	высокая, при больших концентрациях
α-нафтол	$1,1*10^{-4}$ моль/л	производство пестицидов	умеренная
ацетонитрил	$2,2*10^{-3}$ моль/л	фармацевтическая промышленность	умеренная
борная кислота	$5,8*10^{-2}$ моль/л	инсектицид	умеренная
этанол	$2,5*10^{-3}$ моль/л	бытовая химия	низкая
3,5-дихлорфенол	$1,3*10^{-4}$ моль/л	гербицид	высокая
2-фенилэтанол	$2,9*10^{-4}$ моль/л	парфюмерная промышленность	умеренная
цинковый купорос ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	$2,9*10^{-5}$ моль/л	минеральное удобрение	умеренная
глифосат	$1,8*10^{-4}$ моль/л	гербицид	низкая

Реальные водные образцы

Шестьдесят шесть образцов воды были предоставлены ЗАО «ЦИКВ», г. Санкт-Петербург и ФБУ "ЦЛАТИ по Северо-Западному ФО" и представляли

собой стоки различных промышленных объектов города Санкт-Петербурга, отбор проб осуществлялся по стандартным методикам (ГОСТ Р 51592-2000 «Вода. Общие требования к отбору проб», ГОСТ 17.1.5.04-81 «Охрана природы. Гидросфера. Приборы и устройства для отбора, первичной обработки и хранения проб природных вод. Общие технические условия»).

Образцы были предоставлены в тщательно закрытых пластиковых бутылках. Объём каждого образца составлял 450 мл, образец анализировался непосредственно в том виде, в котором он был получен [110].

Двадцать шесть образцов были предоставлены Центром Исследований и Инноваций в Токсикологии Технического Университета Каталонии (Террасса, Испания) и представляли собой стоки различных промышленных объектов нескольких регионов Испании. Отбор проб проводился в соответствии со стандартными методиками, принятыми в Испании. Объем каждого образца составлял 500 мл, все растворы хранились в пластиковых бутылках с завинчивающейся крышкой в холодильнике.

2.4. Оценка токсичности образцов с помощью методик биотестирования

2.4.1. Методика биотестирования с использованием *Daphnia magna*

Этот метод основан на использовании дафний (*Daphnia magna*) – маленьких рачков (рисунок 13), в качестве индикатора острой токсичности водных объектов, т.е. токсичности, проявляющейся вследствие воздействия токсического вещества.

Рисунок 13. *Daphnia magna* [111].

Обычно такой биотест выглядит следующим образом. Специальную культуру *Daphnia magna* выращивают при постоянных условиях, таких как температура (20±2°C), освещение (рассеянный свет, отсутствие прямых солнечных лучей), стабильное питание (суспензия водорослей) и отсутствие каких-либо источников стресса. В возрасте четырёх дней отбирают несколько, обычно около десяти, особей и помещают их в устройство для тестирования, где также поддерживается постоянная температура, освещение и кислородный режим, и наблюдают через лупу, микроскоп или с помощью компьютеризированной видеокамеры, за изменением двигательной активности дафний при помещении в камеру исследуемого образца воды.

Присутствие в воде токсикантов вызывает сначала повышенную двигательную активность дафний, а затем угасание всякой активности и, при высокой токсичности, летальный исход. В качестве живых особей рассматривают тех дафний, которые свободно перемещаются в толще воды или всплывают на поверхность воды не позднее чем через 15 секунд после встряхивания сосуда, если этого не происходит, тест-объект считается умершим.

Оценка токсичности химических веществ для *Daphnia magna* проводится с помощью установления средней (медиальная) концентрации – концентрация токсического вещества, вызывающая гибель 50% тест-объекта за определённое время, в данном случае проводится 24-часовой опыт:

$$T = \frac{1}{ЛК_{50}^{24}} \quad (6),$$

где T – токсичность, а $ЛК_{50}^{24}$ – летальная концентрация вещества, вызывающая смерть половины живых организмов за 24 часа, мг/л.

Однако обычно такой метод биотестирования проводится в течение 72 - 96 часов. Если проводить наблюдения за поведением дафний, снижением их выживаемости и плодовитости более длительный период времени, то можно определить хроническую токсичность воды. Образец воды определяется как

токсичный в том случае, если смертность особей превышает 20% или достоверное снижение их плодовитости в тестируемой воде по сравнению с контрольной пробой за период до 7 суток.

Довольно широкий спектр веществ опасен и высокотоксичен для дафний: $Cr_2O_7^{2-}$, Cu^{2+}, Cd^{2+}, Hg^{2+}, Cl^-, пестициды различных типов, аммиак [4, 112].

2.4.2. Методика биотестирования с использованием *Paramecium caudatum*

Этот метод основан на способности инфузорий *Paramecium caudatum* (рисунок 14) перемещаться из неблагоприятных и опасных для их обитания зон в более чистые.

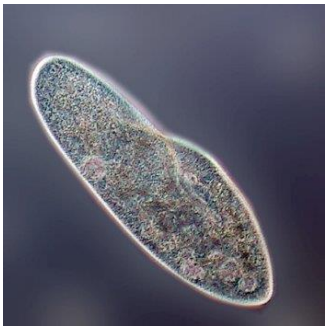


Рисунок 14. *Paramecium caudatum.*

Количественной характеристикой степени воздействия загрязняющих веществ на тест-объект будет считаться число клеток инфузории, переместившихся вдоль градиента концентрации химических веществ, такое направленное перемещение называют *хемотаксис*. Нужно сказать, что перемещение этих живых существ может быть связано с различными неблагоприятными условиями, различают гео-, магнито-, гальванотаксис, именно поэтому так важно, чтобы в процессе биотестирования все остальные условия, за исключением химического состава среды, оставались неизменными. Достоинством инфузорий как биообъекта является крайняя чувствительность организма к воздействию токсиканта, что предполагает быструю ответную реакцию на изменения состава окружающей водной среды.

Анализ, проводимый с участием инфузорий туфелек, выглядит следующим образом: в фотометрическую кювету вносят взвесь клеток инфузорий, туда же наливают раствор поливинилового спирта, для увеличения плотности взвеси клеток инфузорий, и на плотный слой жидкости наслаивают исследуемый образец. Если исследуемый образец нетоксичен, то практически все тест-объекты переходят в этой слой; но чем выше токсичность пробы, тем меньше количество клеток, которые оказываются в пробе.

Как и в случае с дафниями, инфузории выращиваются в определённых условиях со строгим соблюдением качества и количества корма, температуры, значения pH, кислородного режима. Средой для культивирования является среда Лозина-Лозинского (состав – NaCl – 0,1 г/л, KCl – 0,01 г/л, $MgSO_4$ – 0,01 г/л, $CaCl_2$ – 0,01 г/л, $NaHCO_3$ – 0,02 г/л), храниться она может около суток.

В качестве тест-реакции используют показания специального прибора, который до начала эксперимента калибруют относительно разной концентрации клеток инфузорий в миллилитре пробы.

Степень токсического загрязнения оценивается с помощью индекса токсичности *T*:

$$T = \frac{I_k - I_{on}}{I_k} \quad (7),$$

где I_k – величина тест-реакции для нетоксичной пробы, например дистиллированной воды, I_{on} – величина тест-реакции для исследуемой пробы.

Для инфузорий токсичными веществами являются тяжёлые металлы: Cd^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+}, хелатирующие соединения, пестициды [9, 113 - 115].

2.4.3. Методика биотестирования с использованием *Chlorella vulgaris*

Эта методика предполагает использование в качестве тест-функции, которая характеризует качество среды, изменение оптической плотности водоросли хлорелла *Chlorella vulgaris* (рисунок 15), культивированной в чистой среде и в исследуемой пробе, содержащей токсичные вещества.

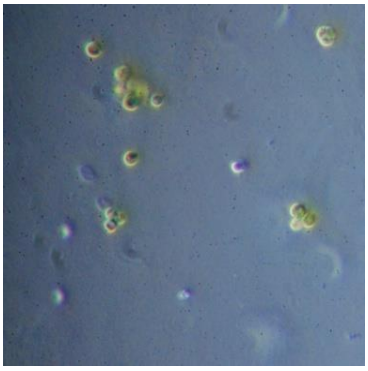


Рисунок 15. *Chlorella vulgaris* [116].

При анализе оценивают замедление роста водоросли, которое рассчитывают в процентах по следующей формуле:

$$I = \frac{X_k - X_0}{X_k} * 100\% \quad (8)$$

I – торможение роста водоросли, X_k и X_0 – средние значения оптической плотности соответственно в контрольной и исследуемой пробе.

Водоросли этого вида культивируют в специальной питательной среде Тамия (состав: KNO_3 – 5.0 г/л; $MgSO_4*H_2O$ – 2,5 г/л; KH_2PO_4 – 1,25 г/л), при постоянной аэрации в люминостатах или на специальных стеллажах, оснащённых лампами дневного света. Поддерживаемая температура составляет 18-20°С.

Как и для дафний, и инфузорий, для хлорелл токсичными веществами являются тяжёлые металлы, а также гербициды, инсектициды [117].

2.4.4. Методика биотестирования с использованием *Vibrio fischeri*

Индикатором качества среды в этой методике обычно считают снижение количества света, производимого данным типом люминесцентных бактерий *Vibrio fischeri* (рисунок 16).

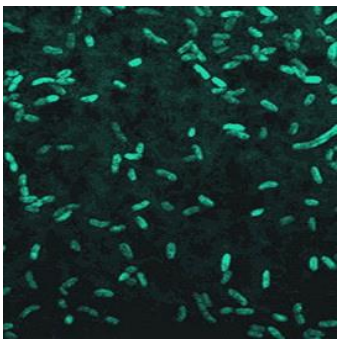


Рисунок 16. *Vibrio fischeri* [118].

Анализ уменьшения люминесценции проводят на специально разработанном для этого приборе и рассчитывают по формуле:

$$GAMMA(\Gamma) = \frac{\frac{I_t^0}{I_0^0} \cdot I_0^C - I_t^C}{I_t^C} \qquad (9),$$

где Γ – сокращение количества света, I_0^0 - интенсивность свечения раствора при нулевой концентрации токсиканта в нулевой момент времени, I_t^0 - интенсивность свечения раствора при нулевой концентрации токсиканта в момент времени *t*, I_0^C - интенсивность свечения раствора при концентрации токсиканта *C* в нулевой момент времени, I_t^C - интенсивность свечения раствора при концентрации *C* токсиканта в момент времени t. При последующей обработке полученной информации Γ позволяет рассчитать эффективную концентрацию (*ЭК*) образца, при которой происходит снижение свечения на 50% за время t [119, 120]. Чем меньше значение *ЭК50*, тем токсичнее образец. Существуют несколько классов острой токсичности: «высокотоксичные» – *ЭК50* ≤ 1 мг/л; «токсичные» – *ЭК50* ≤ 10 мг/л; «малотоксичные» – *ЭК50* ≤ 100 мг/л.

Штамм морских бактерий выращивают в жидкой среде Луриа-Бертани (состав: пептон - 10 г, дрожжевой экстракт - 5 г, хлористый натрий - 10 г на 1 л раствора, при pH=7) в присутствии 3% NaCl. В случае использования

агаризованной среды в этот состав добавлялся микробиологический агар, примерно, 20 г/л. Культивацию проводят при постоянной температуре 25°С [121].

После выращивания бактерии хранятся в лиофилизированном состоянии, т.е. заморожены и высушены в вакууме, такой принцип содержания позволяет использовать особей в течение долго периода времени.

Для морских бактерий опасными также являются тяжёлые металлы, гербициды, инсектициды, органические растворители.

2.5. Исследование чувствительности индивидуальных сенсоров в водных растворах поверхностно-активных веществ и веществ, относящихся к классу фенолов

Оценивалась чувствительность 21 сенсора, которые предполагалось использовать в дальнейшем эксперименте, к ряду поверхностно-активных веществ и нескольким веществам класса фенолов. В массив входило 7 анион- и 9 катион-чувствительных полимерных сенсоров, 5 твердотельных электродов на основе халькогенидных стекол. Составы сенсоров соответствуют сенсорам, описанным в таблице 2.

В массив сенсоров также был включен стеклянный pH-электрод.

Изучение чувствительности сенсоров осуществлялось путем проведения градуировочных измерений, в результате которых рассчитывались величины углового коэффициента (наклона) электродной функции всех сенсоров в растворе каждого из индивидуальных токсикантов.

Измерения проводились в 50 мл ячейке, в которую помещалось 50 мл раствора индивидуального токсиканта определенной концентрации, в первую очередь исследовался самый разбавленный раствор, затем более концентрированные образцы. Каждое измерение продолжалось три минуты (интервал снятия показания сенсоров – 7 секунд), после чего сенсоры ополаскивались бидистиллированной водой, остатки влаги удалялись с помощью

фильтровальной бумаги. Для каждого из индивидуальных токсикантов было проведено, по крайней мере, три калибровочных измерения.

После каждого анализа мультисенсорная системы несколько раз промывалась в бидистиллированной воде, обычно такая процедура представляет три отмывки по три минуты. Эта процедура промывки достаточна для обеспечения воспроизводимости (СКО ≤ 3 мВ) показаний сенсоров в трех повторных измерениях.

2.6. Исследование модельных водных растворов индивидуальных токсикантов и реальных водных образцов с помощью потенциометрической мультисенсорной системы

Для исследования водных образцов индивидуальных токсикантов и реальных водных образцов использовался массив сенсоров, состоящий из 21 электрода. В массив входило 7 анион- и 9 катион-чувствительных полимерных сенсоров, 5 твердотельных электродов на основе халькогенидных стекол. Составы сенсоров соответствуют сенсорам, описанным в таблице 2.

Массив сенсоров, в который также был включен стеклянный pH-электрод, использовался для анализа образцов, отобранных в Санкт-Петербурге (66 образцов), различных регионах Испании (26 образцов), а также 24 модельных раствора индивидуальных токсикантов, изготовленных в Центре исследований и инноваций в токсикологии.

Измерения проводились в 50 мл ячейке, в которую помещалось 50 мл образца или модельного раствора. Все растворы исследовались в том виде, в котором они были получены; анализ образцов проводился не позже, чем через 6 часов после отбора пробы, дополнительные разбавления или этапы пробоподготовки не проводились (ПНД Ф Т 14.1:2:4.10-2004, ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04 16.1:2.3:3.8-04, ПНД Ф Т 16.1:2.3:3.10-06, ФР.1.39.2007.03222). Каждое измерение продолжалось три минуты (интервал снятия показания сенсоров – 7 секунд), после чего сенсоры ополаскивались бидистиллированной

водой, остатки влаги удалялись с помощью фильтровальной бумаги. Для каждого из образцов было проведено, по крайней мере, три калибровочных измерения.

После завершения измерения мультисенсорная системы несколько раз промывалась в бидистиллированной воде, проводилось три отмывки по три минуты. Эта процедура промывки достаточна для обеспечения воспроизводимости (СКО ≤ 3 мВ) показаний сенсоров в трех повторных измерениях.

2.7. Применение хемометрических методов для обработки данных, полученных с помощью мультисенсорных систем

2.7.1. Метод главных компонент

Метод главных компонент (PCA - *principal component analysis)* – один из основополагающих методов в хемометрике. Основной принцип этого метода состоит в разделении полученных данных на «содержательную» часть и «шум». Отклик массива сенсоров представляется в виде исходной матрицы данных, в которой *n* строк соответствует количеству исследованных образцов, а *p* столбцов – количество переменных, например, сенсоров в системе. Элементы матрицы соотносятся с откликом, полученным определенным сенсором в конкретном образце. Каждый элемент этой матрицы может быть представлен в виде точки в многомерном пространстве, где число координатных осей равно числу сенсоров, использовавшихся в массиве. Тогда матрица данных графически выглядит, как облако точек в многомерном пространстве (рисунок 17).

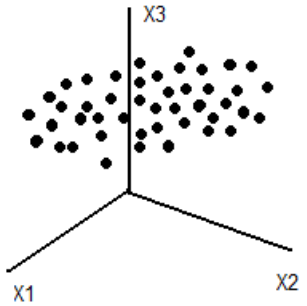


Рисунок 17. Графическое изображение матрицы данных.

Многомерный анализ необходим для нахождения в полученных данных определенных закономерностей. Основным предположением, которое допускается в этом случае, является то, что направления, в которых происходят наибольшие изменения в данных, каким-то образом связаны с этими закономерностями.

Первым важнейшим этапом в методе главных компонент является обнаружение в облаке точек направления наибольшей дисперсии в данных, затем происходит последовательное уменьшение размерности пространства путем проецирования всех точек на выделенное направление. В результате уменьшения размерности пространства становится возможным представление исходной матрицы в виде графика в двухмерном пространстве, в координатах направлений наибольших изменений исследуемых данных (рисунок 18).

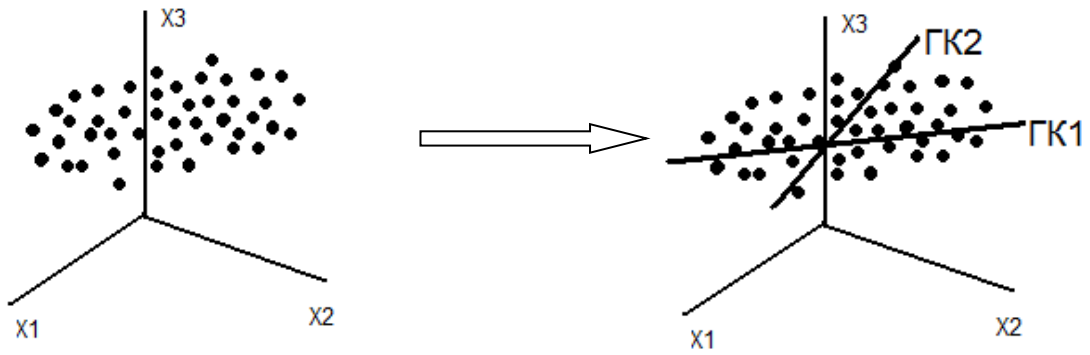


Рисунок 18. Выделение в облаке данных двух главных компонент.

Описанное проецирование позволяет, в итоге, выявить существующую в данных скрытую внутреннюю структуру, установить наличие групп образцов схожих/различных между собой, для визуализации сходств и различий в образцах обычно используется график счетов (рисунок 19). Довольно часто метод главных компонент применяется при работе с мультисенсорными системами для того, чтобы оценить возможности массива сенсоров к распознаванию (разделению) различных классов внутри единой группы образцов.

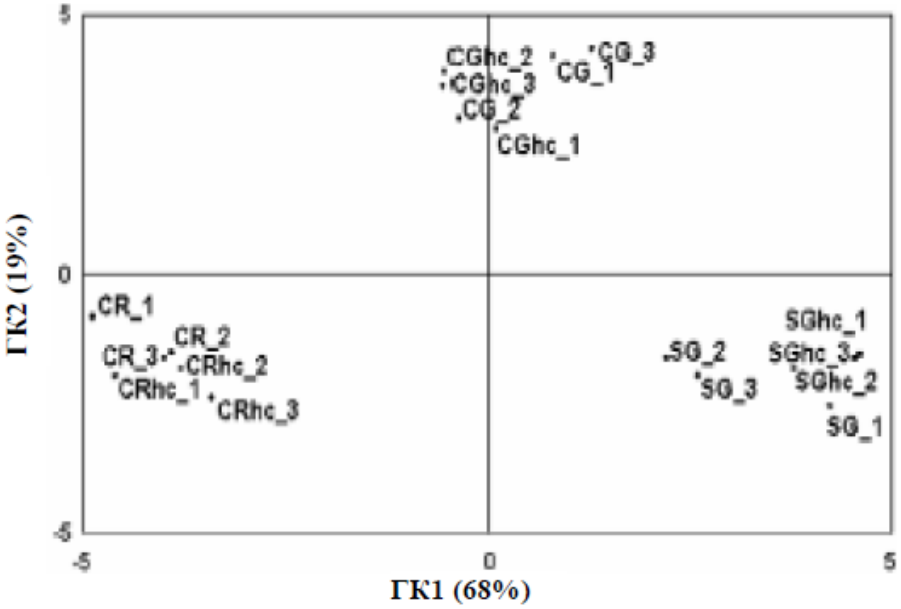


Рисунок 19. Пример графика счетов.

Математически метод главных компонент можно представить, как представление исходной матрицы данных *X* в виде произведения двух матриц *T* и *P*.

$$X = T * P^t + E \qquad (10),$$

где *T* – матрица счетов, *P* – матрица нагрузок, *E* – матрица остатков.

Матрица E – ошибка моделирования, выражается в процентах остаточной дисперсии. % объясненной дисперсии + % остаточной дисперсии = 100 %.

Стоит сказать, что метод главных компонент полезен не только для решения задачи визуализации скрытой структуры полученной информации, но и для снижения размерности данных, уменьшения шума и т.д.

2.7.2. Метод проекции на латентные структуры

Метод проекции на латентные структуры (ПЛС) основан на представлении, схожим с МГК, отклика массива сенсоров в виде матрицы, но в этом случае кроме данных, полученных с помощью мультисенсорной системы (*X*), используются

данные других методов анализа, с которыми планируется обнаружить корреляцию (Y), например, данные методик биотестирования.

Смысл этого метода, как и любого другого метода регрессионного анализа, в том, чтобы получить возможность в дальнейшем не измерять значения Y, а определять их исключительно по значениям X.

Модель ПЛС регрессии может быть представлена в виде матричных уравнений:

$$Y = X * B + F \quad (11),$$

где матрицы X - значения потенциалов сенсоров, вектор-столбец Y – степень токсичности исследуемых образцов воды, B - матрица коэффициентов регрессии, и F – остаток моделирования матрицы ошибок, появляющийся после проецирования исходных данных высокой размерности в новое пространство более низкой размерности.

В процессе моделирования ПЛС X и Y раскладываются согласно следующим уравнениям:

$$X = TP^T + E \quad (12)$$

$$Y = UQ^T + Fy \quad (13)$$

Затем с условием максимальной ковариации (совместного распределения) между матрицами счетов T и U можно рассчитать весовые нагрузки:

$$W = \max\left(\operatorname{cov}(T, U)\right) \quad (14)$$

Матрица коэффициентов регрессии B рассчитывается:

$$B = W\left(P^T W\right)^{-1} Q^T \quad (15)$$

После получения регрессионных коэффициентов градуировочная модель может быть использована для прогнозирования необходимых параметров ($Y_{нов}$) из новых измерений ($X_{нов}$):

$$Y_{нов} = X_{нов} * B \qquad (16)$$

Представленная процедура позволяет осуществить градуировку системы по какому-либо свойству, однако, только в том случае, если это свойство действительно связано с откликом массива сенсоров.

Результаты построения градуировочной модели принято представлять в виде прямых для градуировки и проверки в координатах «введено-найдено».

Существует несколько основных параметров калибровочной модели, которые позволяют оценить её надежность: наклон (slope), оффсет (offset), квадрат коэффициента корреляции R^2 и среднеквадратичное отклонение (*СКО*, в иностранной литературе *RMSE* - root mean square error) градуировки и прогнозирования.

Проанализировав наклон и квадрат коэффициента корреляции, можно сделать вывод о том, в какой мере точки в градуировке и проверке правильно ложатся на прямую. Чем ближе эти величины к единице, тем лучше модель описывает данные. Параметр оффсет позволяет оценить смещение полученных прямых относительно начала координат, его значение должно быть максимально близко к нулю.

Исходя из полученного значения среднеквадратичного отклонения, можно установить насколько адекватный прогноз зависимых перемененных может сделать созданная регрессионная модель. Этот параметр обладает размерностью величины *Y*, по которой проводилась градуировка, и для хорошей модели должна быть минимальна:

$$СКОП = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i^{пред} - y_i^{истин})^2}{n}} \quad (17),$$

где n – количество исследуемых образцов, $y_i^{пред}$ – значение, спрогнозированное моделью, $y_i^{истин}$ – значения, полученные практически [54].

2.7.3. Метод случайных лесов

Метод случайных лесов [122] применяется в хемометрике для решения классификационных и регрессионных задач. Ряд так называемых деревьев решений строится на основе полученных данных, исходя из того, что есть N тестовых образцов и M независимых переменных. Пример дерева решений представлен на рисунке 20.

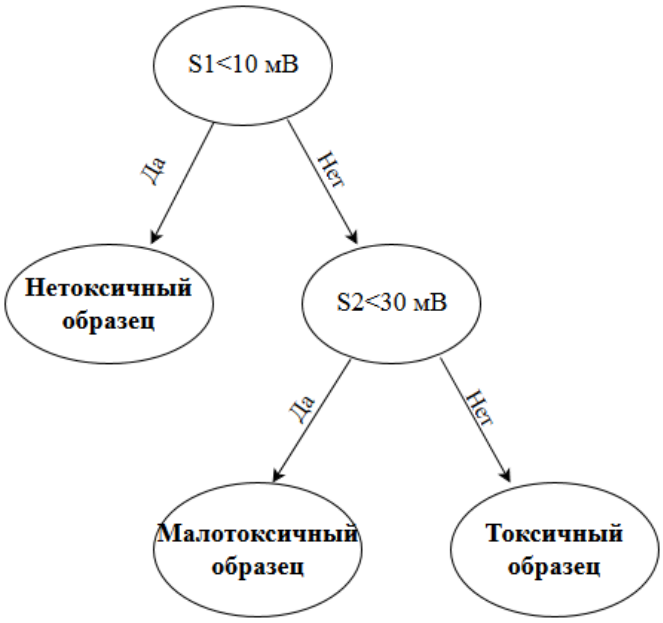


Рисунок 20. Пример дерева решений

Алгоритм Бреймана, который используется в методе случайных лесов, применяется при обсуждении вопросов, связанных с классификацией полученных данных. Для того чтобы построить одно дерево, случайно выбирается $n \leq N$ тестовых образцов, необходимых для формирования обучающей выборки этого

дерева. В нашем примере это *n* сенсоров, использующихся для оценки токсичности водных образцов.

Для построения корневого узла дерева, случайным образом выбирается $m \leq M$ переменных, лучшее разделение данных основывается на значении одного из *m* переменных и, как правило, выбирается исходя из критерия Джини или критерия прироста информации [123]. В примере выбранной переменной является значение потенциала каждого из сенсоров (*S1, S2…Sn*) в образце.

Рассмотрим значения потенциалов сенсоров *S1* и *S2* в образце, токсичность которого неизвестна. Если значение *S1* не превышает 10 мВ, то можно сделать вывод о том, что образец относится к классу нетоксичных; если нет, то следует переместиться вниз по дереву и оценить превышает ли потенциал второго сенсора (*S2*) значение 30 мВ. В зависимости от этого водный образец принадлежит либо к классу малотоксичных образцов, либо, если *S2*>30 мВ, то образец токсичен.

В общем случае для прогнозирования класса нового образца используется одно дерево, образец перемещается вниз по дереву к одному из его листьев, класс листа и становится классом нового образца. Лес деревьев решений прогнозирует класс образца, основываясь на решении большинства.

2.7.4. Метод случайного выбора *k*-ближайших соседей

Метод случайного выбора *k*-ближайших соседей (КБС) [124] является расширенной версией алгоритма *k*-ближайших соседей [125]. В этом алгоритме тестовый набор используется для осуществления прогнозирования: для этого рассматривается расстояние *d* между точками, соответствующими образцам, например, Евклидово расстояние между векторами переменных.

Для классификации образца рассматриваются *k* ближайших (в зависимости от выбранного *d*) образца («соседа»), которые присутствуют в тестовом наборе. Если решается вопрос, связанный с классификацией образца, то учитывается класс, к которому принадлежат большинство из соседних точек; если задача регрессионная, то зависимая величина усредняется.

На рисунке 21 представлен пример классификации с помощью метода случайного выбора k-ближайших соседей. В этом случае необходимо определить класс образца, отмеченного треугольником, зная классы ближайших пяти соседей. На рисунке видно, что большинство (три из пяти) ближайших соседей относятся к классу, отмеченному кругом, таким образом, можно сделать вывод, что класс неизвестного образца соответствует классу большинства соседей.

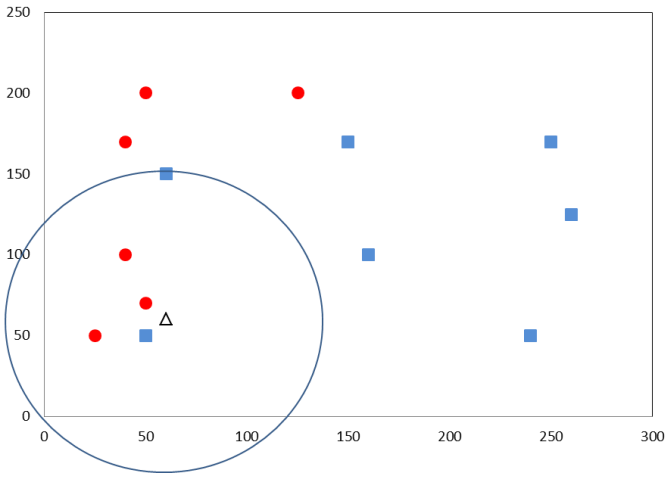


Рисунок 21. Классификация с помощью метода случайного выбора *k*-ближайших соседей [126]

Основная идея метода случайного выбора *k*-ближайших соседей схожа с той, что используется в методе случайных лесов. Набор *r* КБС используется для прогнозирования параметров одного образца-соседа. Каждая такая модель строится с использованием различных случайно выбранных переменных подмножеств. Так как все модели независимы, то их создание и последующее использование могут проводиться параллельно.

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ СЕНСОРОВ К ИНДИВИДУАЛЬНЫМ ТОКСИКАНТАМ И ФОРМИРОВАНИЕ МУЛЬТИСЕСНСОРНОЙ СИСТЕМЫ

3.1. Стратегия выбора сенсоров в состав мультисенсорной системы

В работе использовалась мультисенсорная система, состоящая из массива потенциометрических перекрестно-чувствительных сенсоров, т.е. сенсоров, дающих отклик на содержание не одного, а нескольких компонентов в растворе. Количество сенсоров в массиве может варьироваться от нескольких штук до нескольких десятков электродов.

Критерием выбора сенсоров для каждой отдельно взятой задачи обычно является чувствительность выбранных сенсоров к компонентам, которые обуславливают целевую характеристику образца, определяемую с помощью мультисенсорной системы. Например, если стоит задача определения терпкого вкуса в вине, то сенсоры массива должны обладать чувствительностью к полифенолам – веществам, в значительной степени определяющим проявлением терпкого вкуса. При этом число сенсоров в массиве определяется доступностью соответствующих сенсорных материалов с различными спектрами перекрестной чувствительности.

В этой работе при выборе сенсоров для мультисенсорной системы учитывали чувствительность сенсоров к веществам, которые могут оказывать токсическое воздействие на гидробионты. При этом руководствовались либо литературными данными, либо результатами данного исследования.

Например, в массив был включен поликристаллический сенсор Ан1, чувствительный к анионам галогенидов, прежде всего к аниону Cl^- токсичного для *Daphnia magna*.

Кроме того, в массив были включены сенсоры чувствительные к различным неорганическим и органическим анионам. Чувствительность сенсоров схожего состава к анионам Cl^-, NO_3^- была изучена в работах [127, 128], сенсоры Ан2 и Ан3

проявляют чувствительность к анионам органических кислот [92], например, молочной, яблочной и т.д. Доказана чувствительность сенсоров Ан4, Ан5 и Ан6 к перхлорат-иону ClO_4^- [93], по данным статьи [94] сенсор Ан7 обладает высокой чувствительностью в растворах анионных поверхностно-активных веществ.

Потенциометрические сенсоры, входившие в состав мультисенсорной системы, которая применялась в этой работе, проявляют чувствительность к катионам тяжелых металлов [129], которые токсичны для живых организмов, так сенсор Кат4 чувствителен к ионам свинца [99], сенсор Кат8 обладает чувствительностью к катионам свинца, меди, цинка, кадмия [103] и т.д.

Мультисенсорная система также включала несколько сенсоров на основе халькогенидных стекол чувствительных к катионам тяжелых металлов [104].

Вместе с тем, в литературных данных практически нет информации о чувствительности сенсоров, использовавшихся в этой работе, к другим общераспространенным классам загрязняющих веществ. Исследованию чувствительности индивидуальных сенсоров в водных растворах ряда токсикантов, таких как, например, поверхностно-активные вещества и соединения класса фенолов, будет посвящена эта глава.

Исследование вышеописанной информации не единственный подход, который можно применить при выборе сенсоров для решения определенной задачи. В качестве вспомогательного метода для получения дополнительных сведений также можно использовать следующий метод.

На основании данных о чувствительности индивидуальных сенсоров в растворах компонентов, обуславливающих целевую характеристику образца, строится модель по методу главных компонент (МГК), в этом случае каждый состав принято рассматривать как независимый образец. Матрица данных в этом случае состоит из n строк, соответствующих количеству сенсоров в массиве, а также p столбцов – количество ионов, чувствительность к которым изучалась. Элемент матрицы соотносится с величиной наклона электродной функции определенного сенсора, полученной при изучении чувствительности сенсора к конкретному иону.

График счетов метода главных компонент позволяет увидеть схожее/различное поведение сенсоров и принять решение, какие сенсоры следует включить в массив для получения необходимой в данном исследовании информации.

На рисунке 22 представлен график счетов МГК для 21 состава полимерных сенсорных мембран (1-7 – анион-чувствительные сенсоры, 8-16 – катион-чувствительные сенсоры) и мембран на основе халькогенидных стекол (17-21), рассчитанный на основе чувствительности сенсоров к органическим и неорганическим анионам, а также различным катионам.

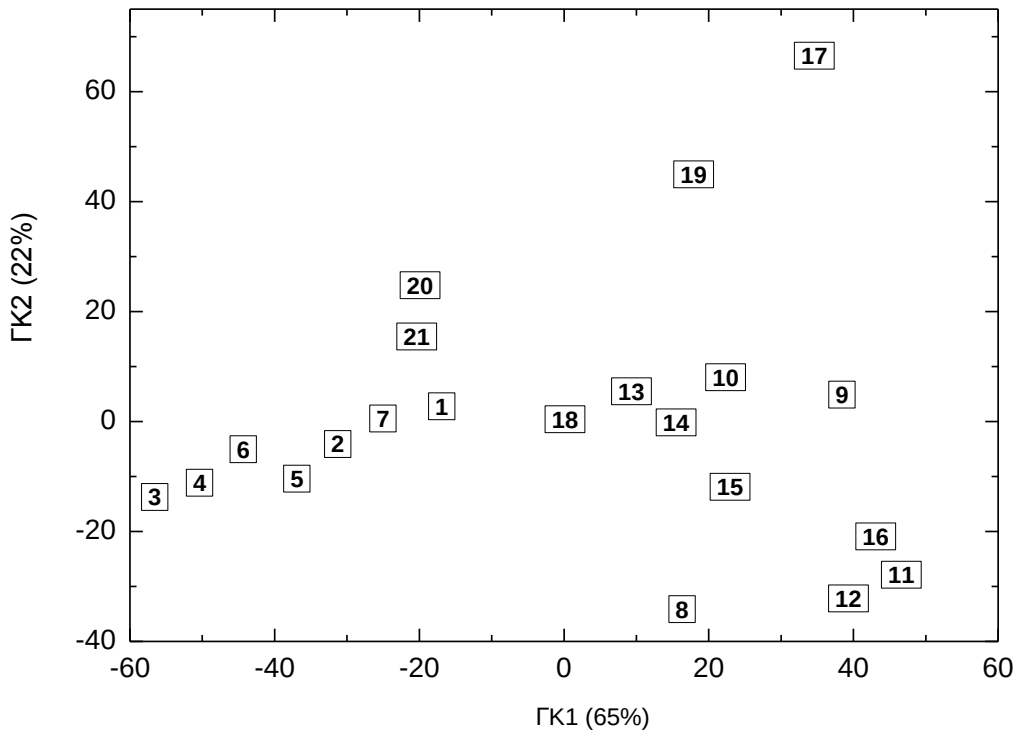


Рисунок 22. График счетов МГК в координатах ГК1-ГК2

Изучая взаимное расположение точек на графике счетов, можно сделать вывод о схожести или различии спектров чувствительности сенсоров различного состава, информация о которых использовалась для построения МГК модели. Из графика видно, что максимально различным спектром чувствительности обладают сенсоры состава, например, 3 и 11, 9 и 20, которые имеют счета МГК

противоположных знаков вдоль оси первой главной компоненты, а также сенсоры состава 8 и 17, счета МГК вдоль оси второй главной компоненты которых также противоположны.

На рисунке также можно заметить, что спектры чувствительности некоторых сенсоров схожи, например, сенсоров состава 13 и 14, которые проявляют чувствительность к катионам щелочных, щелочно-земельных и переходных металлов. Однако поведение этих сенсоров в растворах компонентов отличается, так, например, сенсор 14 проявляет большую чувствительность к катионам тяжелых металлов, в частности, к катиону свинца.

Кроме того, из рисунка видно, что пространство графика счетов заполнено более-менее равномерно, спектр чувствительности для всех сенсоров различен, отсутствуют составы с совершенно одинаковым поведением в растворах компонентов. Таким образом, можно сделать вывод, что изученные сенсоры возможно использовать в одном массиве.

3.2. Исследование чувствительности индивидуальных сенсоров в водных растворах поверхностно-активных веществ

Как уже говорилось ранее, одним из широко распространенных типов загрязнителей являются поверхностно-активные вещества.

Существуют ранее опубликованные данные [130], полученные при изучении чувствительности ионоселективных электродов на основе полимерных мембран, пластифицированных ионными жидкостями, в водных растворах поверхностно-активных веществ различных типов. Было доказано, что такие электроды на основе определенных ионных жидкостей проявляют отклик на уровне теоретического на катионные и анионные ПАВ.

Однако чувствительность к поверхностно-активным веществам сенсоров такого же или схожего состава как те, что применялись в этой работе, ранее не изучалась, поэтому это было сделано на первом этапе данного исследования.

Изучалась чувствительность сенсоров к додецилсульфату натрия и цетилтриметиламмоний бромиду, которые являются типичными представителями анионных и катионных поверхностно-активных веществ.

В случае поверхностно-активных веществ чувствительность оценивалась в диапазоне концентраций от 10^{-6} до 10^{-2} моль/л для додецилсульфат натрия и от 10^{-6} до 10^{-3} моль/л для цетилтриметиламмоний бромида.

На рисунке 23 в качестве примера представлены виды откликов нескольких сенсоров в водных растворах додецилсульфата натрия.

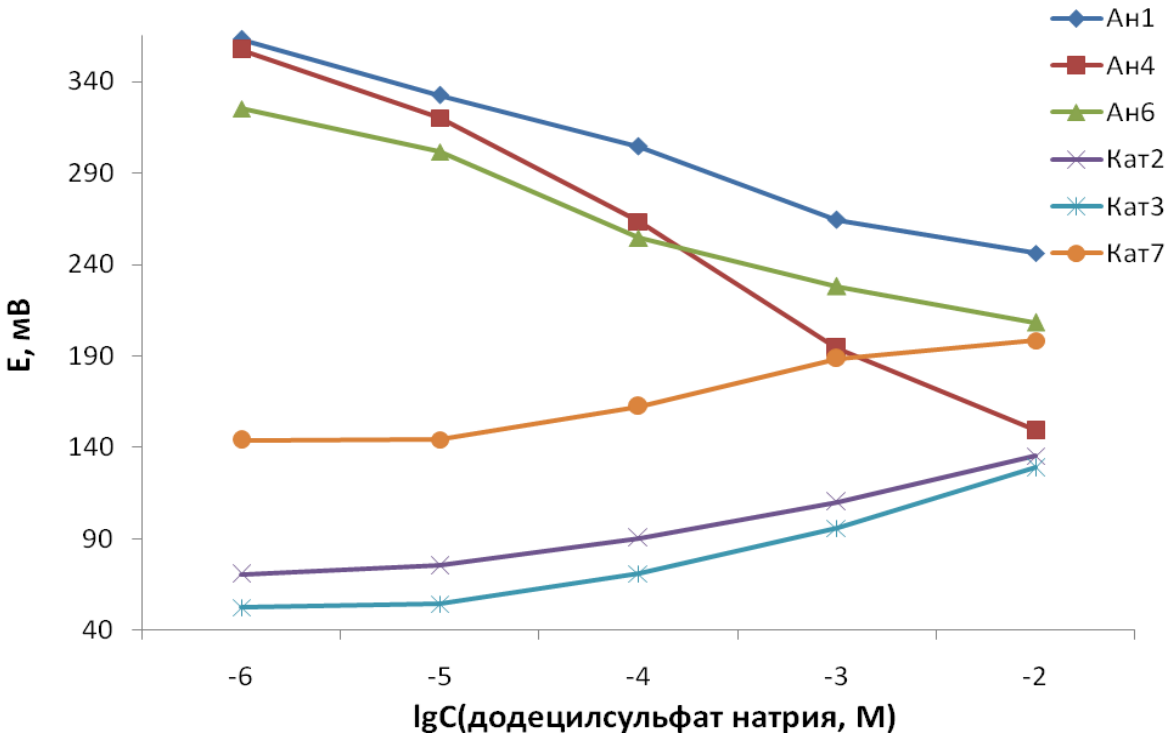


Рисунок 23. Вид отклика сенсоров в водных растворах додецилсульфат натрия

Из рисунка видно, что изучаемые сенсоры обладают, как катионной чувствительностью, так и анионной чувствительностью в растворах додецилсульфат натрия. Для всех чувствительных к катионам сенсоров наблюдается примерно одинаковое изменение значений потенциалов, около 20-25 мВ при изменении значений концентрации на порядок. Среди представленных

анион-чувствительных сенсоров самый резкий скачок значений потенциала наблюдается для сенсора Ан4.

На рисунке 24 представлены угловые коэффициенты градуировочных зависимостей.

Согласно методике 2.5. все градуировочные измерения проводились по три раза, затем вычислялось среднее значение потенциала каждого сенсора в каждом образце. Среднеквадратичные отклонения (СКО) величин электродной чувствительности, установленные в условиях воспроизводимости (n=3), не превышали 2 мВ/дек.

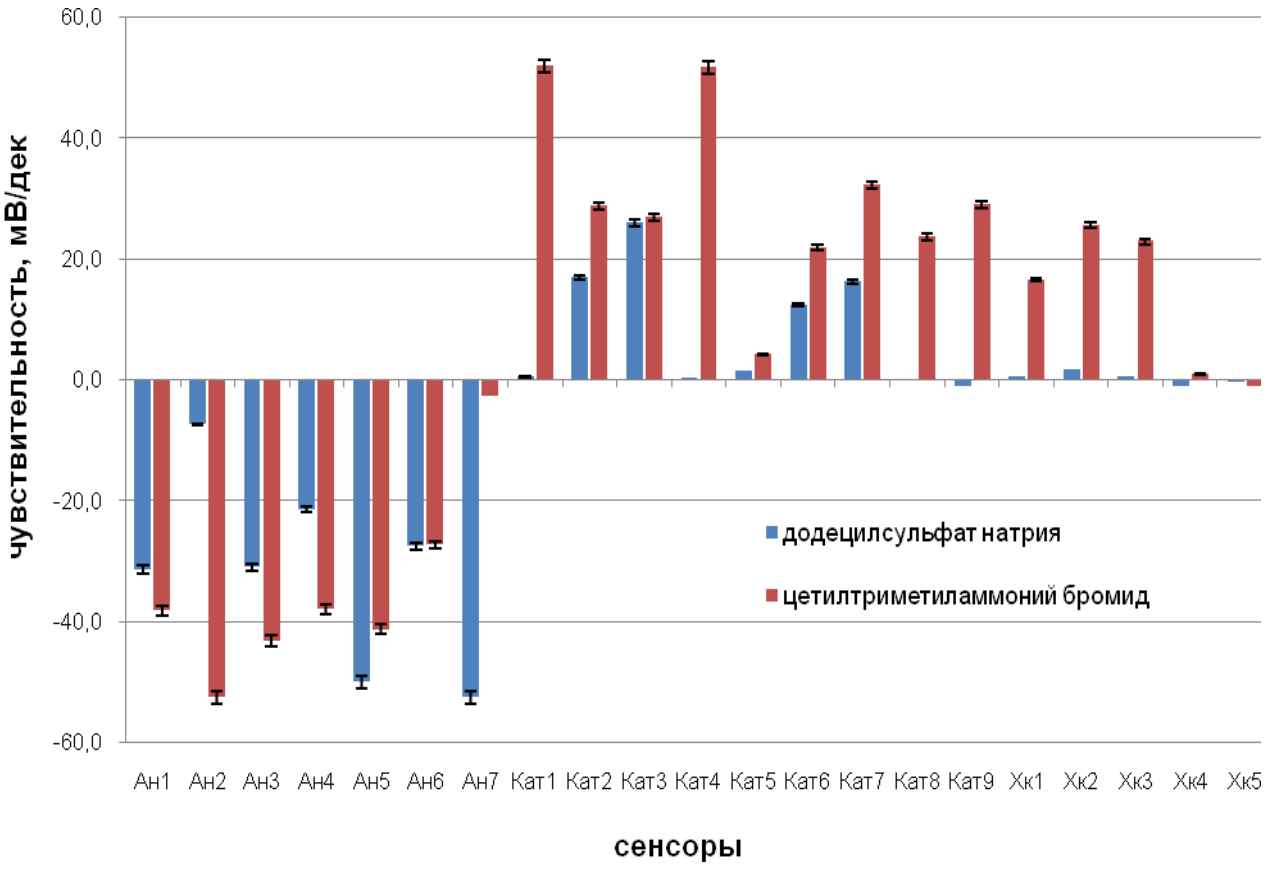


Рисунок 24. Величины наклонов электродных функций сенсоров в водных растворах поверхностно-активных веществ. Диапазон изучения чувствительности для додецилсульфат натрия от 10^{-6} до 10^{-2} моль/л и от 10^{-6} до 10^{-3} моль/л для цетилтриметиламмоний бромида.

Полученные результаты показывают, что в водных растворах цетилтриметиламмоний бромида многие сенсоры, независимо от того являются они катионо- и анион-чувствительными, проявляют высокую чувствительность, кроме того значения хорошо воспроизводятся (СКО ≤ 3 мВ/дек), например, сенсоры Кат1 (+52 мВ/дек), Кат4 (+52 мВ/дек) и Ан2 (-53 мВ/дек). На основании полученных результатов можно сделать вывод, что в массиве присутствуют сенсоры, проявляющие чувствительность к бромид-аниону, такие как сенсоры Ан2, Ан3 и Ан5, спектр чувствительности которых включает неорганические анионы, а также поликристаллический сенсор Ан1, проявляющий чувствительность к анионам галогенидов. Кроме того, некоторые сенсоры проявляют заметную чувствительность к катиону цетилтриметиламмония, в частности сенсоры Кат1 и Кат4 на основе диамидов дигликолевой и дипиколиновой кислоты соответственно и хлорированного дикарболлида кобальта.

Однако в водных растворах додецилсульфата натрия величины наклонов электродных функций только в случаях анион-чувствительных сенсоров, а именно Ан5 (-50 мВ/дек) на основе тетрафенилпорфирин родия (III) хлорида и Ан7 (-53 мВ/дек) на основе триметилдодециламмоний хлорида, близки к теоретическим значениям. Таким образом, в массиве есть сенсоры чувствительные к анионам додецилсульфата. Кроме того, сенсор Кат3 проявляет чувствительность к ионам натрия, значение наклона электродной функции в этом случае составляет ~ +26 мВ/дек.

3.3. Исследование чувствительности индивидуальных сенсоров в водных растворах веществ класса фенолов

На следующем этапе работы в качестве модельных токсикантов были выбраны вещества, относящиеся к классу фенолов – фенол, *о*-нитрофенол, *п*-крезол. Выбор соединений класса фенолов связан с тем фактом, что фенол и его

указанные производные являются широко распространенными токсикантами и часто присутствуют в сточных водах.

Часто для определения этих соединений используются биосенсоры на основе тирозиназы [131, 132] или пероксидазы [133].

Чувствительность к веществам класса фенолов сенсоров такого же или схожего состава как те, что применялись в этой работе, ранее не изучалась, поэтому это было сделано в данной работе.

Чувствительность сенсоров оценивалась по методике 2.5. в диапазоне концентраций: от 10^{-5} до 10^{-3} моль/л для фенола, от 10^{-5} до 10^{-2} моль/л для *о*-нитрофенола и от 10^{-5} до 10^{-3} моль/л для *п*-крезола.

На рисунке 25 изображены виды откликов нескольких сенсоров в водном растворе *о*-нитрофенола.

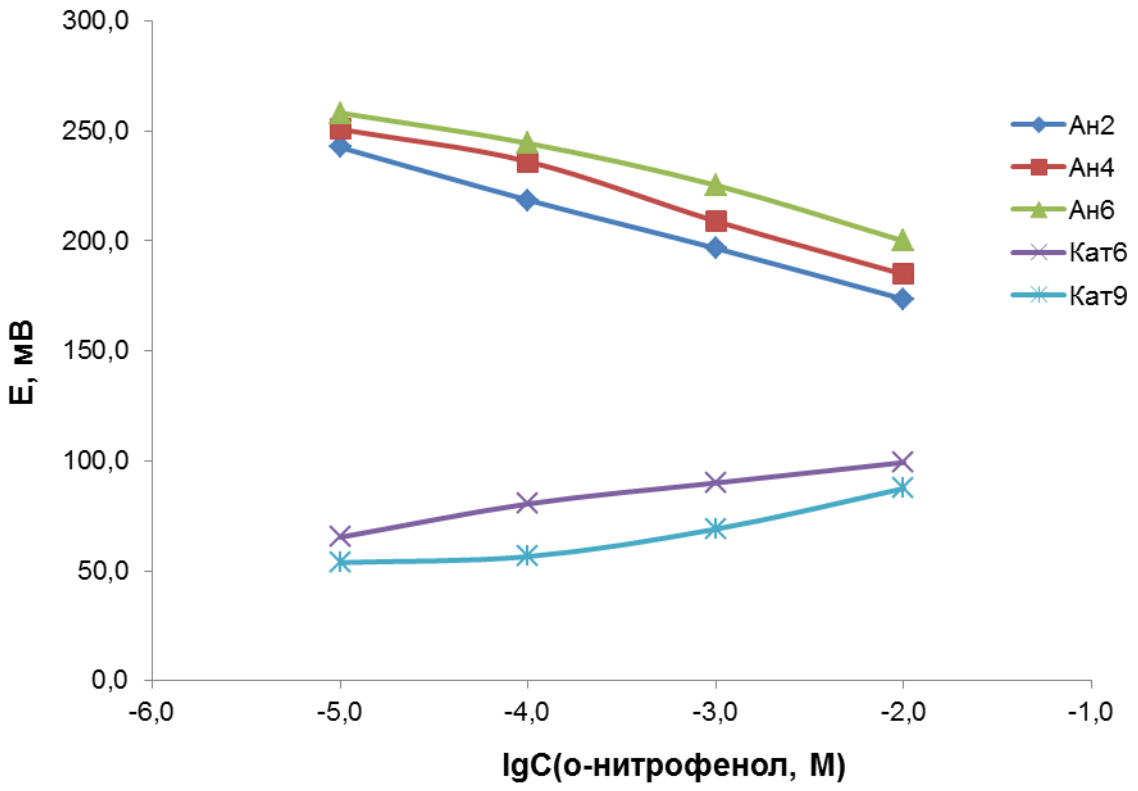


Рисунок 25. Вид отклика сенсоров в водных растворах *о*-нитрофенола

Из графика видно, что в массиве присутствуют сенсоры, обладающие анионной чувствительностью в водных растворах о-нитрофенола. Для всех

чувствительных к анионам сенсоров наблюдается примерно одинаковое изменение значений потенциалов, ΔE составляет около 15-20 мВ при изменении концентрации на порядок.

На рисунке 26 экспериментально полученная информация о чувствительности сенсоров к веществам класса фенолов представлена в графическом виде.

Согласно методике 2.5. все градуировочные измерения проводились по три раза, затем вычислялось среднее значение потенциала каждого сенсора в каждом образце. Среднеквадратичные отклонения (СКО) величин электродной чувствительности, установленные в условиях воспроизводимости (n=3), не превышали 2 мВ/дек.

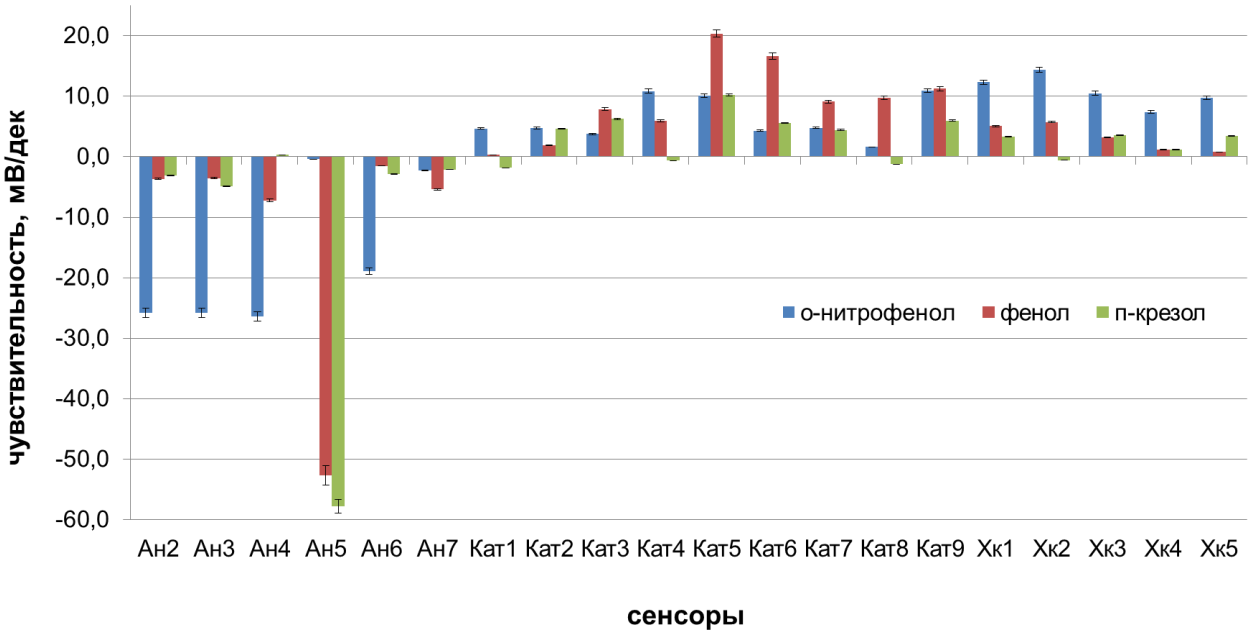


Рисунок 26. Величины наклонов электродных функций сенсоров в водных растворах веществ класса фенолов. Диапазон изучения чувствительности для фенола и *п*-крезола от 10^{-5} до 10^{-3} моль/л и от 10^{-5} до 10^{-2} моль/л для *о*-нитрофенола

На диаграмме видно, что большинство из используемых в данном массиве сенсоров проявляют невысокую чувствительность в растворах *о*-нитрофенола, например, сенсоры Ан2 и Ан3, чувствительные к органическим анионам. Самое

высокое значение наблюдается для сенсора, чувствительного к органическим анионам, Ан4 на основе тридодецилметиламмоний нитрата.

В растворах фенола чувствительность сенсоров в основном невелика (около 10 мВ/дек), исключение составляет сенсор Кат5, в состав которого входил нейтральный лиганд – дифосфин диоксид, величина наклона электродной функции в этом случае составляет примерно 20 мВ/дек; а также сенсор Ан5, чувствительный к органическим анионам, величина наклона электродной функции для этого сенсора составляет -53 мВ/дек.

В растворах *п*-крезола сенсоры проявляют чувствительность, схожую с откликом сенсоров в растворе фенола, это касается и высокой чувствительности сенсора Ан5 (около -58 мВ/дек) на основе тетрафенилпорфирин родия (III) хлорида.

Исходя из приведенных выше данных, можно сделать вывод, что рассмотренные сенсоры можно использовать в системе для оценки состояния вод, загрязнённых этими веществами.

ГЛАВА 4. КЛАССИФИКАЦИЯ ВОДНЫХ ОБРАЗЦОВ ПО ТОКСИЧНОСТИ

4.1. Получение референтных данных с помощью методик биотестирования на основе *Daphnia magna*, *Paramecium caudatum*, *Chlorella vulgaris* и *Vibrio fischeri*

На первом этапе работы, токсичность двадцати четырех водных растворов индивидуальных токсикантов оценивалась по методике на основе реакции люминесцентных бактерий *Vibrio fischeri*, описанной в пункте 2.4.4. Данные о значениях эффективной концентрации образцов, при которой происходит снижение свечения бактерий на 50%, представлены в таблице 4.

Таблица 4. Эффективная концентрация водных растворов индивидуальных токсикантов

Образец	**Единицы измерения**	***ЭК50* (15 минут)**
4-нитроанилин	мг/л	0,87
карбофуран	мг/л	17,66
имидаклоприд	мг/л	96,00
сульфат ртути	мг/л	0,06
диметилсульфоксид	мкл/мл	58,39
дихромат калия	мг/л	26,90
додецилсульфат натрия	мг/л	1,28
2-хлорбензойная кислота	мг/л	6,23
фенол	мг/л	23,20
3,4-дихлоранилин	мг/л	4,60
кофеин	мг/л	93,14
мочевина	мг/л	100,00
лимонная кислота	мг/л	14,00
триэтиламин	мг/л	100,00
4-хлорфенол	мг/л	100,00

Образец	**Единицы измерения**	***ЭК50* (15 минут)**
уксусная кислота	мг/л	11,00
α-нафтол	мг/л	3,60
ацетонитрил	мкл/мл	22,30
борная кислота	мг/л	95,50
этанол	мл/л	29,00
3,5-дихлорфенол	мг/л	3,40
2-фенилэтанол	мг/л	8,90
цинковый купорос	мг/л	1,18
глифосат	мг/л	20,07

Для водных растворов индивидуальных токсикантов *ЭК50* - это концентрация раствора с известной концентрацией продукта, разбавленного в воде, которая вызывает 50 % снижение интенсивности люминесценции бактерий.

Кроме того, проводилась оценка токсичности реальных образцов воды, отобранных на территории Санкт-Петербурга, а также различных регионов Испании. Шестьдесят шесть образцов, полученных при отборе проб из водоёмов Санкт-Петербурга, были разделены на три группы и проанализированы согласно методиками 2.4.1., 2.4.2 и 2.4.3. Образцы, исследованные с помощью *Chlorella vulgaris,* анализировались два раза: первый раз – в том виде, в котором они были собраны изначально; второй раз – после разбавления образцов в 50 раз, такое разбавление проводится дополнительно для подтверждения результатов, полученных для неразбавленных образцов. Двадцать шесть образцов, отобранных на территории различных регионов Испании, анализировались согласно методике, описанной в пункте 2.4.4. Итоговая информация о токсичности образцов представлена в таблице 5.

Таблица 5. Группы реальных водных образцов и методы биотестирования

Тест-объект	**Биологическая реакция**	**Диапазон токсичности**	**Количество образцов**
Daphnia magna (сточные воды)	Смертность тест-объекта	0-100%	15
Chlorella vulgaris (поверхностные воды)	Замедление роста водоросли	40-63%	15
Chlorella vulgaris (50-кратное разбавление)	Замедление роста водоросли	22-36%	15
Paramecium Caudatum (поверхностные и сточные воды)	Хемотаксис	0-1 (безразмерный коэффициент токсичности)	36
Vibrio fischeri (поверхностные и сточные воды)	Снижение интенсивности люминесценции	0,08 - >100% (ЭК50(15 минут))	26

Для реальных образцов, исследованных с помощью *Vibrio fischeri*, показателем токсичности является эффективная концентрация, которая выражается в процентах, так как содержания веществ в этих образцах неизвестны, эффективная концентрация нетоксичных образцов выражается в виде *ЭК*50>100%.

4.2. Классификация водных растворов индивидуальных токсикантов по токсичности

На этом этапе работы оценивалась возможность применения мультисенсорной системы для классификации водных растворов индивидуальных

токсикантов согласно их токсичности. Для этого применялись алгоритм случайных лесов и метод случайного выбора *k*-ближайших соседей. Была поставлена задача отнесения любого проанализированного с помощью мультисенсорной системы образца к одному из двух классов: с *ЭК50* ≤ 100 – токсичные образцы и *ЭК50* > 100 – нетоксичные образцы.

В методе случайных лесов строилось 100 деревьев, для формирования каждого дерева использовались $n=N-1$ тестовых образцов, для создания корневого узла случайным образом выбиралась одна переменная m – значение *ЭК50*. В методе случайного выбора *k*-ближайших соседей $k=1$. Выбор параметров для методов случайных лесов и случайного выбора *k*-ближайших соседей производился методом перебора.

Метод случайных лесов оказался более эффективным для классификации образцов на выбранные классы, чем метод случайного выбора *k*-ближайших соседей, в качестве критерия эффективности в этом случае использовался процент верно классифицированных образцов. Для метода случайного выбора *k*-ближайших соседей процент верно классифицированных образцов не превышал 80%.

Для метода случайных лесов в таблице 6 представлена матрица ошибок, вычисленная в процессе полной перекрестной проверки и использующаяся для оценки точности классификации водных образцов индивидуальных токсикантов по их токсичности. Для методов со случайным выбором параметров (таких как метод случайных лесов) принято проводить многократную проверку результатов с последующим усреднением, поэтому было построено 1000 матриц ошибок с разными случайно выбранными тестовыми образцами, которые в последующем были усреднены.

В матрице ошибок, отмеченной в таблице серым цветом, в столбцах записываются классы, спрогнозированные с помощью математических методов, т.е. метода случайных лесов, а в строках – классы, использующиеся для проверки, т.е. классы, установленные референтным методом биотестирования. Главная

диагональ матрицы (13,7 и 8,3) показывает усредненное число случаев, когда реальные и прогнозируемые классы совпадают – верная классификация.

Таблица 6. Усредненная матрица ошибок для метода случайных лесов

	Прогнозируемые значения “≤ 100”	**Прогнозируемые значения “> 100”**	**Общее число образцов**
Реальные значения “≤ 100”	13,7	0,3	14
Реальные значения “> 100”	1,7	8,3	10
Усредненное число попаданий в класс	15,4	8,6	24

Отношение суммы элементов главной диагонали к общему числу образцов называется усредненным процентом верно классифицированных образцов, для метода случайных лесов эта величина составила 91,7%. Эта же величина для метода случайных лесов для класса “≤ 100” – 88,9%; для класса “> 100” – 96,5%.

4.3. Классификация реальных водных образцов по токсичности

В первую очередь, для изучения возможности распознавания токсичных/нетоксичных образцов применялся набор данных, полученный при анализе образцов поверхностных вод, отобранных в Санкт-Петербурге. В этом случае для обработки данных применялся метод главных компонент (МГК), который позволяет, выявить наличие скрытой внутренней структуры данных, установить наличие групп образцов схожих/различных между собой.

На рисунке 27 приведен график счетов метода главных компонент, представляющий собой «карту образцов» для 36 образцов сточных вод, токсичность которых определялась с помощью *Paramecium caudatum*.

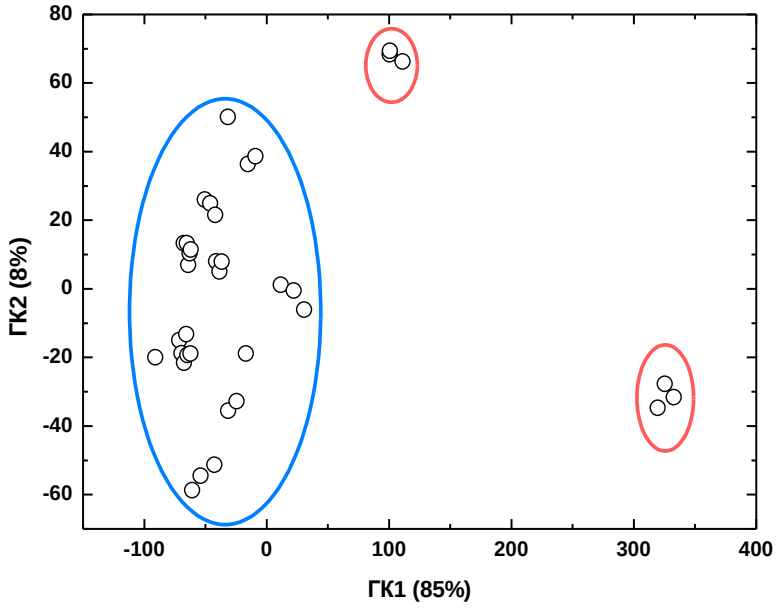


Рисунок 27. График счетов для образцов сточных вод, токсичность которых определялась с помощью *Paramecium caudatum* [110].

На рисунке наблюдается четкое разделение точек, соответствующих образцам, на три кластера. Самая многочисленная группа, выделенная синим, состоит из образцов, для которых инфузории показали очень низкую степень токсичности (0,0 – 0,2), либо показали, что образец нетоксичен. Два «красных» небольших кластера соответствуют образцам, для которых степень токсичности, как было установлено экспериментально, равна единице. Разделение этих двух кластеров обуславливается различием в составах образцов, группа, для которой наблюдается большее изменение по первой главной компоненте, соответствует растворам индивидуальных токсикантов (0,1 мг/л меди (II)). Изначально эта информация была скрыта, образцы выдавались, как сточные воды, реальный состав был предоставлен организацией, отвечающей за проведение биотестирования, уже после проведения эксперимента и обработки полученных данных.

Представленный график позволяет сделать вывод, что мультисенсорная система может быть использована как для выявления токсичных образцов и нетоксичных, так и для выделения различных типов загрязнения.

На следующем этапе работы оценивалась возможность применения мультисенсорной системы для классификации водных образцов, отобранных на территории различных округов Испании, согласно их токсичности. В качестве референтных данных в этом случае использовали данные, полученные с помощью люминесцентных бактерий *Vibrio fischeri*.

Для этого применялись алгоритм случайных лесов и метод случайного выбора *k*-ближайших соседей. Была поставлена задача отнесения любого проанализированного с помощью мультисенсорной системы образца к одному из двух классов: с *ЭК50* ≤ 100 – токсичные образцы и *ЭК50* > 100 – нетоксичные образцы.

В методе случайных лесов строилось 100 деревьев, для формирования каждого дерева использовались $n=N$-1 тестовых образцов, для создания корневого узла случайным образом выбиралась одна переменная m – значение *ЭК50*. В методе случайного выбора *k*-ближайших соседей k=1. Выбор параметров для методов случайных лесов и случайного выбора *k*-ближайших соседей производился методом перебора.

Как показала оценка, первый метод, т.е. алгоритм случайных лесов, лучше подходит для решения данной задачи, в качестве критерия эффективности в этом случае использовался процент верно классифицированных образцов. В случае метода случайного выбора *k*-ближайших соседей процент верно классифицированных образцов не превышал 80%.

Для метода случайных лесов была построена матрица ошибок (отмечена серым цветом), вычисленная в процессе полной перекрестной проверки и использующаяся для оценки точности классификации водных образцов, отобранных на территории Испании, по их токсичности. Для методов со случайным выбором параметров (таких как метод случайных лесов) принято проводить многократную проверку результатов с последующим усреднением,

поэтому было построено 1000 матриц ошибок с разными случайно выбранными тестовыми образцами, которые в последующем были усреднены. Полученная матрица представлена в таблице 7.

Таблица 7. Усредненная матрица ошибок для метода случайных лесов для реальных водных образцов

	Прогнозируемые значения “≤ 100”	**Прогнозируемые значения “> 100”**	**Общее число образцов**
Реальные значения “≤ 100”	14,5	0,5	15
Реальные значения “> 100”	1,4	9,6	11
Усредненное число попаданий в класс	15,9	10,1	26

Главная диагональ матрицы (14,5 и 9,6) показывает усредненное число случаев, когда реальные и прогнозируемые классы совпадают. Усредненный процент верно классифицированных образцов, т.е. отношение суммы элементов главной диагонали матрицы ошибок к общему числу образцов, составил 92,6%. Эта же величина для метода случайных лесов для класса “≤ 100” – 91,2%, для класса “> 100” – 95%.

Результаты, представленные выше, позволяют сделать вывод, что данные полученные с помощью мультисенсорной системы, в совокупности с математическими алгоритмами могут быть использованы как для классификации по токсичности водных образцов индивидуальных токсикантов, так и для классификации реальных водных образцов, отобранных в Санкт-Петербурге и различных регионах Испании.

Кроме того, на примере образцов, интегральная токсичность которых была определена с помощью *Paramecium caudatum*, было показано, что используя показания мультисенсорной системы и последующей обработки данных с помощью метода главных компонент, можно не только разделить загрязненные и чистые образцы, но также выделить различные типы загрязнения.

ГЛАВА 5. ЧИСЛЕННАЯ ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ ВОДНЫХ ОБРАЗЦОВ С ПОМОЩЬЮ ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОЙ МУЛЬТИСЕНСОРНОЙ СИСТЕМЫ

5.1. Численная оценка токсичности водных растворов индивидуальных токсикантов с помощью потенциометрической мультисенсорной системы

Система, состоящая из 21 потенциометрического сенсора, использовалась для анализа 24 водных растворов индивидуальных токсикантов, изготовленных в лаборатории Центра исследований и инноваций в токсикологии Технического Университета Каталонии (Террасса, Испания). Все измерения проводились по методике, описанной в 2.6., каждый образец исследовался, по крайней мере, три раза в случайном порядке.

Все данные, полученные в процессе измерений, использовались для создания регрессионной модели для модельных растворов индивидуальных токсикантов. При создании регрессионной модели использовалось пять главных компонент, которыми суммарно объясняется 85% и 97% дисперсии в данных X и Y соответственно. Результаты построения градуировочной модели в виде прямых для градуировки и проверки в координатах значений токсичности, полученных с помощью люминесцентных бактерий и мультисенсорной системы, представлены в приложении 1. Следует сказать, что образцы, для которых люминесцентные бактерии показали низкую токсичность, прогнозируются хуже, что, возможно, связано с небольшим количеством таких образцов.

Так как количество образцов было ограничено, то для проверки моделей использовалось два разных подхода: полная перекрёстная проверка моделей, а также проверка, использующая *k*-кратное случайное разбиение образцов на тестовый и градуировочный набор. При *k*-кратном случайном разбиении рандомным образом извлекалась 1/3 образцов, которые использовались в качестве тестового набора, а оставшиеся 2/3 образцов использовались для построения калибровочной модели. Процедура разбиения проводилась 30 раз, столько же раз

рассчитывалась среднеквадратичное отклонение прогнозирования, кроме того вычислялись наклон, оффсет и квадрат коэффициента корреляции (таблица 8).

Таблица 8. Параметры регрессионных моделей

Варианты проверки	**Наклон**	**Оффсет**	***СКОП, мг/л***	R^2
полная перекрёстная проверка (24 образца)	0,62	10,3	19,1	0,64
30-кратное случайное разбиение (10 образцов)	-	-	20,6	-

Данные из таблицы позволяют предполагать, что мультисенсорную потенциометрическую систему можно использовать для оценки токсичности образцов. Установлено, что мультисенсорная система позволяет со среднеквадратичным отклонением прогнозирования не более 21 мг/л определять токсичность водных растворов индивидуальных токсикантов. Токсичность образцов, а также значение *СКОП* в этом случае рассчитывались относительно отклика люминесцентных бактерий, т.е. снижения интенсивности люминесценции бактерий в исследуемом образце. Приведенные результаты позволяют сделать вывод об интегральной токсичности водных растворов индивидуальных токсикантов в терминах живых биообъектов, и не относятся к чувствительности массива сенсоров к концентрации отдельных веществ.

Кроме того, полученная регрессионная модель использовалась для прогнозирования значений эффективной концентрации двух образцов, значения токсичности которых были неизвестны до окончания проведения эксперимента и обработки полученных данных, однако, была предоставлена информация об их происхождении. В таблице 9 представлены значения эффективной концентрации, спрогнозированные с помощью регрессионной модели, и исходя из оценки морских бактерий.

Таблица 9. Прогнозируемые с помощью мультисенсорной системы и референтные значения токсичности водных образцов индивидуальных токсикантов

Токсикант	**Референтные значения *ЭК50*, мг/л**	**Прогнозируемые значения *ЭК50*, мг/л**	**Относительная погрешность определения, %**
Имидаклоприд	100	98	2
Хлорацетамид	19,5	15	23

Из таблицы можно сделать вывод, что спрогнозировать значение эффективной концентрации для водных растворов индивидуальных токсикантов, исходя из данных мультисенсорной системы, можно с относительной погрешностью, не превышающей 23%.

Для численной оценки токсичности водных растворов индивидуальных токсикантов, также использовались метод случайных лесов (количество тестовых образцов $n=N-1$, для построения узлов деревьев использовалась одна переменная m - значение *ЭК50*) и метод случайного выбора k-ближайших соседей ($k=1$). Выбор параметров для методов случайных лесов и случайного выбора k-ближайших соседей производился методом перебора. Метод случайных лесов и метод случайного выбора k-ближайших соседей использовали для образцов, относящихся к классу *ЭК50*≤100.

В связи с ассиметричным распределением данных, а именно недостатком образцов с высокими значениями эффективной концентрации, было решено провести логарифмическое преобразование ($\log_2$) данных и только потом использовать данные для прогнозирования значения эффективной концентрации. Таким образом, все ошибки прогнозирования далее также даны в логарифмической форме. Так как наборы данных образцов были относительно небольшими, то эффективность выбранных алгоритмов оценивалась с использованием полной перекрестной проверки.

При построении регрессионных моделей для водных образцов индивидуальных токсикантов более эффективным из двух использовавшихся методов оказался метод случайных лесов. В качестве критерия эффективности рассматривали значение среднего абсолютного отклонения, т.е. арифметическое среднее отклонение всех значений от среднего, вычисленное при проведении полной перекрестной проверки 1000 раз. Значение среднего абсолютного отклонения составило $2^{3,1} \approx 8,57$ мг/л.

Величина ошибки прогнозирования *ЭК50* для модельных образцов индивидуальных токсикантов может быть связана с тем фактом, что размер обучающего набора, т.е. количество градуировочных образцов, был относительно небольшим.

5.2. Численная оценка токсичности реальных водных образцов с помощью потенциометрической мультисенсорной системы

5.2.1. Образцы, отобранные на территории Санкт-Петербурга

Система, состоящая из 21 сенсора, использовалась для анализа 66 образцов, отобранных на территории города Санкт-Петербурга. Все измерения проводились по методике, описанной в 2.6., каждый образец исследовался, по крайней мере, три раза в случайном порядке.

После окончания измерения изучалась связь между данными о токсичности образцов, полученными в результате проведения биотестирования, а также информацией, предоставленной мультисенсорной потенциометрической системой. Исследование взаимосвязей осуществлялось с помощью методов обработки многомерных данных: метода проекций на латентные структуры.

Для всех 66 образцов было создано четыре регрессионных модели: по одной модели для каждой из методик биотестирования, использовавшихся для определения токсичности, а также одна модель для 50-кратно разбавленных образцов, исследованных с помощью *Chlorella vulgaris*. При создании

регрессионных моделей использовалось 4, 7, 4 и 6 главных компонент для *D. Magna*, *C. vulgaris*, *C. Vulgaris* (50-кратное разбавление) и *P. Caudatum* соответственно. Для дафний четыре компоненты суммарно объясняют 100% и 91% дисперсии в данных X и Y соответственно. Для образцов, изученных с помощью водорослей, семь компонент объясняют 100% и 99% дисперсии в данных X и Y, в случае 50-кратного разбавления этих образцов 97% и 98% дисперсии объясняются четырьмя компонентами. Для инфузорий шесть главных компонент суммарно объясняют 100% и 98% дисперсии в данных X и Y соответственно. Все результаты построения градуировочной модели в виде прямых для градуировки и проверки в координатах значений токсичности, полученных с помощью методов биотестирования и мультисенсорной системы, представлены в приложении 2.

Количество образцов было ограниченным, поэтому для проверки качества разработанных моделей была проведена полная перекрёстная проверка моделей, а также проверка, использующая *k*-кратное случайное разбиение образцов на тестовый и градуировочный набор. При *k*-кратном случайном разбиении случайным образом извлекалась 1/3 образцов, которые использовались в качестве тестового набора, а оставшиеся 2/3 образцов использовались для построения калибровочной модели. Процедура разбиения проводилась 20 раз, столько же раз рассчитывалась среднеквадратичное отклонение прогнозирования, кроме того вычислялись наклон, оффсет и квадрат коэффициента корреляции (таблица 10).

Таблица 10. Параметры регрессионных моделей

Тест-объект и вариант проверки	**Наклон**	**Оффсет**	***СКОП***	R^2
Daphnia magna *(сточные воды)* полная перекрёстная проверка	0,83	6,3	16,5	0,81
20-кратное случайное	-	-	23,5	-

Тест-объект и вариант проверки	**Наклон**	**Оффсет**	***СКОП***	R^2
разбиение (5 образцов)				
Chlorella vulgaris *(поверхностные воды)* полная перекрёстная проверка	0,81	8,8	3,8	0,83
20-кратное случайное разбиение (5 образцов)	-	-	6,1	-
Chlorella vulgaris (50-кратное разбавление) полная перекрёстная проверка	0,95	1,6	1,5	0,94
20-кратное случайное разбиение (5 образцов)	-	-	2,7	-
Paramecium caudatum *(поверхностные и сточные воды)* полная перекрёстная проверка	0,93	0,03	0,09	0,95
20-кратное случайное разбиение (14 образцов)	-	-	0,15	-

Данные, представленные в таблице, позволяют сделать вывод, что регрессионные модели можно использовать для определения токсичности с точностью сопоставимой с величиной разброса данных, получаемых с помощью живых объектов, независимо от того, какой тест-объект применялся для анализа образцов. Однако наилучшая корреляция в данных наблюдается для тех образцов, токсичность которых была установлена с помощью *Chlorella vulgaris*, и было проведено 50-кратное разбавление. Погрешность прогноза составила 24, 27, 19 и

15% для *D. Magna, C. vulgaris, C. Vulgaris* (50-кратное разбавление) и *P. Caudatum* соответственно.

5.2.2. Образцы, отобранные в различных округах Испании

Система, состоящая из 21 сенсора, использовалась для анализа 26 образцов, отобранных на территории различных регионов Испании. Все измерения проводились по методике, описанной в 2.6., каждый образец исследовался, по крайней мере, три раза в случайном порядке.

Обработка данных, полученных с помощью мультисенсорной системы, а также системы Microtox, работа которой основывается на измерении люминесценции морских бактерий, проводилась с использованием трёх методов хемометрики: проекции на латентные структуры, метод случайных лесов, метод *k*-ближайших соседей.

Следует сказать, что образцам со значением эффективной концентрации >100% в методе проекций на латентные структуры были присвоены максимальные значения эффективной концентрации 100%. Это допущение было сделано для сохранения репрезентативности регрессионных моделей, так как удаление образцов могло негативно повлиять на представительность модели, ввиду ограниченного количества данных.

Все полученные данные использовались для создания регрессионной модели для реальных водных образцов. При создании регрессионной модели использовалось шесть главных компонент, которыми суммарно объясняется 89% и 97% дисперсии в данных X и Y. Результаты построения градуировочной модели в виде прямых для градуировки и проверки в координатах значений токсичности, полученных с помощью люминесцентных бактерий и мультисенсорной системы, представлены в приложении 3. В этом случае несколько хуже прогнозируются значения токсичности для тех образцов, которые метод биотестирования определил как токсичные, возможно это связано с небольшим количеством градуировочных образцов.

Так как количество образцов было ограничено, то для проверки моделей использовалось два разных подхода: полная перекрёстная проверка моделей, а также проверка, использующая *k*-кратное случайное разбиение образцов на тестовый и градуировочный набор. При *k*-кратном случайном разбиении случайным образом извлекалась 1/3 образцов, которые использовались в качестве тестового набора, а оставшиеся 2/3 образцов использовались для построения калибровочной модели. Процедура разбиения проводилась 30 раз, столько же раз рассчитывалась среднеквадратичное отклонение прогнозирования, кроме того вычислялись наклон, оффсет и квадрат коэффициента корреляции. Параметры построенных моделей представлены в таблице 11.

Таблица 11. Параметры регрессионных моделей

Варианты проверки	**Наклон**	**Оффсет**	***СКОП, %***	R^2
полная перекрёстная проверка (26 образцов)	0,84	12,5	20,7	0,78
30-кратное случайное разбиение (10 образцов)	-	-	21	-

Данные из таблицы позволяют предполагать, что мультисенсорную потенциометрическую систему и в этом случае можно использовать для оценки токсичности образцов. Было установлено, что система позволяет со среднеквадратичным отклонением прогнозирования не более 21% определять токсичность реальных водных образцов, для анализа которых в качестве тест-объекта использовались люминесцентные бактерии.

Полученная регрессионная модель также была использована для прогнозирования значений эффективной концентрации трех неизвестных образцов, впрочем, информация о происхождении растворов была приоткрыта. В таблице 12 представлены значения токсичности, спрогнозированные с помощью регрессионных моделей, и оценка морских бактерий.

Таблица 12. Прогнозируемые с помощью мультисенсорной системы и референтные значения токсичности водных образцов

Образец	**Референтные значения *ЭК50*, %**	**Прогнозируемые значения *ЭК50*, %**	**Относительная погрешность определения, %**
Сточные воды	100	78	22
Биофильтрат	100	81	19
Поверхностные воды	100	78	22

Из таблицы видно, что спрогнозировать значения эффективной концентрации на основе данных потенциометрической мультисенсорной системы можно с погрешностью не более 22%. Следует отметить, что методы обработки многомерных данных, в данном случае метод проекций на латентные структуры, можно, с некоторыми допущениями, использовать в ситуациях, когда определяемый параметр выражен в виде неравенств (*ЭК50*>100).

Для численной оценки токсичности реальных водных образцов, отобранных на территории различных регионов Испании, также использовались метод случайных лесов (количество тестовых образцов $n=N-1$, для построения узлов деревьев использовалась одна переменная m - значение *ЭК50*) и метод случайного выбора k-ближайших соседей ($k=1$, $r=100$). Выбор параметров для методов случайных лесов и случайного выбора k-ближайших соседей производился методом перебора. Методы случайных лесов и случайного выбора k-ближайших соседей использовали для образцов, относящихся к классу *ЭК50*≤100.

В связи с ассиметричным распределением данных, а именно недостатком образцов с высокими значениями эффективной концентрации, было решено провести логарифмическое преобразование ($\log_2$) данных и только потом использовать данные для прогнозирования значения эффективной концентрации. Таким образом, все ошибки прогнозирования далее даны в логарифмической

форме. Так как наборы данных образцов были относительно небольшими, то эффективность выбранных алгоритмов оценивалась с использованием полной перекрестной проверки.

Прогнозирование значений эффективной концентрации для реальных образцов, отобранных в Испании, проводилось с меньшей погрешностью при использовании метода случайного выбора *k*-ближайших соседей (*k*=1, *r*=100). В качестве критерия эффективности рассматривали значение среднего абсолютного отклонения, т.е. арифметическое среднее отклонений всех значений от среднего, вычисленное при проведении полной перекрестной проверки 1000 раз.

Статистика распределения среднего абсолютного отклонения представлена в таблице 13.

Таблица 13. Статистика распределения среднего абсолютного отклонения

Среднее значение	**Среднее абсолютное отклонение**
Среднее арифметическое	1,51
Медиана	1,49

Из таблицы можно сделать вывод, что значение среднего абсолютного отклонения прогнозирования зависимой переменной, в данном случае эффективной концентрации, составило $2^{1,5} \approx 2,83$ %.

Все полученные результаты свидетельствуют о возможности использования потенциометрической мультисенсорной системы в качестве скринингового метода оценки интегральной токсичности воды, а также водных растворов индивидуальных веществ в шкалах методов биотестирования. Таким образом, используя данные мультисенсорной системы в совокупности с соответствующими методами обработки многомерных данных, можно сделать вывод о токсичности/нетоксичности образца в шкалах методов биотестирования, основанных на реакциях различных живых тест-объектов, например, *Daphnia magna*, *Paramecium caudatum*, *Chlorella vulgaris* и *Vibrio fischeri*, с погрешностью

не более 27%. При этом скрининг с помощью системы, описанной в данной работе, позволяет значительно снизить время оценки качества воды, с 48-96 часов, необходимых для проведения методов биотестирования, до 3-5 минут, а также избежать сложностей, связанных с применением живых биотестов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках диссертационной работы поставленные задачи решены и цель достигнута. На основании полученных результатов можно сделать ряд выводов:

1. Установлено, что массив потенциометрических сенсоров обладает чувствительностью к ряду веществ, относящихся к классу фенолов, таких как фенол, *о*-нитрофенол, *п*-крезол, а также поверхностно-активным веществам – додецисульфату натрия и цетилтриметиламмоний бромиду. Таким образом, установлено, что мультисенсорная система может применяться для анализа образцов, в составе которых присутствуют данные вещества.

2. Установлено, что анализ водных образцов разного состава мультисенсорной системой с последующей многомерной обработкой позволяет проводить оценку интегральной токсичности водных образцов индивидуальных токсикантов в шкалах биотестирования на основе реакции *Vibrio fischeri*. В качестве метода обработки многомерных данных выбран метод проекций на латентные структуры. Погрешность определения значения токсичности не превышает 21%.

3. Установлено, что анализ водных образцов разного состава мультисенсорной системой с последующей многомерной обработкой позволяет проводить оценку интегральной токсичности воды в шкалах методов биотестирования, основанных на реакциях различных живых тест-объектов, например, *Daphnia magna*, *Paramecium caudatum*, *Vibrio fischeri* и *Chlorella vulgaris*. В качестве метода обработки многомерных данных выбран метод проекций на латентные структуры. Погрешность определения значения токсичности в шкалах первых трех тест-объектов не превышала 24%.

4. На примере образцов, интегральная токсичность которых была определена с помощью *Paramecium caudatum*, было показано, что используя показания мультисенсорной системы и последующей обработки данных с помощью метода главных компонент, можно разделить загрязненные и чистые образцы, а также выделить различные типы загрязнения.

5. На примере образцов, интегральная токсичность которых была определена с помощью *Vibrio fischeri*, было установлено, что используя показания массива потенциометрических сенсоров и последующую обработку полученных данных с помощью метода случайных лесов и метода случайного выбора k-ближайших соседей, можно разделить образцы на два класса в зависимости от токсичности, а затем спрогнозировать конкретные численные значения токсичности для образцов с эффективной концентрацией выше 50.

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ И ТЕРМИНЫ

ПДК – предельно-допустимая концентрация

ПДУ – предельно-допустимый уровень загрязнения

ИСО – международная организация по стандартизации

ИСЭ – ионоселективные электроды

ИСПТ – ионоселективные полевые транзисторы

МСР – метод смешанных растворов

БИП – метод биионных потенциалов

МАК – мембраноактивный компонент

ПВХ – поли(винилхлорид)

$ЛК_{50}$ – среднелетальная концентрация

$ЛД_{50}$ – среднелетальная доза

ПАВ – поверхностно-активные вещества

ДСН – додецидсульфат натрия

ЦТАБ – цетилтриметиламмоний бромид

МГК – метод главных компонент

ПЛС – проекция на латентные структуры

ИНС – искусственные нейронные сети

ТГФ - тетрагидрофуран

э.д.с. – электродвижущая сила

ЭК – эффективная концентрация

ДОС - ди-(2-этилгексил)себацинат

НФОЭ - *о*-нитрофенилоктиловый эфир

СКОП - среднеквадратичное отклонение прогноза

КБС – метод случайного выбора *k*-ближайших соседей

Список литературы

1. Мелехова О.П., Егорова Е.И., Евстегнеева Т.И. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование: учеб. пособие для высш. учеб. заведений // Москва: изд. центр "Академия", 2007, 288 с.

2. Дедков Ю. М., Современные проблемы аналитической химии сточных вод // Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева, 2002, №4, с. 11-17.

3. Куриленко В.В, Зайцева О. В., Новикова Е. А., Осмоловская Н. Г., Уфимцева М. Д. Основы экологии, биоиндикации и биотестирования водных экосистем // СПБ, Изд-во СПбГУ, 2004, 480 с.

4. Бубнов А.Г., Буймова С.А., Гущин А.А., Извекова Т.В. Биотестовый анализ - интегральный метод оценки окружающей среды: учебно-методическое пособие; под общ. ред. Гриневича В.И. // Иваново, ГОУ ВПО Ивановский государственный химико-технологический университет, 2007, 112 с.

5. Ляшенко О.А. Биоиндикация и биотестирование в охране окружающей среды: учебное пособие // Санкт-Петербург, Санкт-Петербургский государственный технологический университет растительных полимеров, 2012, 67 с.

6. Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов.// Москва, РЭФИА, НИА-Природа, 2002.

7. Фомин Г.С. Контроль химической, бактериальной, радиационной безопасности по международным стандартам: справ.// Г.С. Фомин, А.Б. Ческес // Москва: Геликон, 1992, 365 с.

8. РД 118-02-90. Методическое руководство по биотестированию воды. // Москва: Госкомприроды СССР, 1991, 48 с.

9. Патент на изобретение РФ № 2514115 от 01.12.2011. Устройство и способ для определения токсичности жидких сред.

10. Биотестирование как современный метод оценки токсичности природных и сточных вод: Монография. // Нижневартовск: Изд-во Нижневартовского государственного университета, 2013, 119 с.

11. Кокова В.Е. Непрерывное культивирование простейших. // В.Е. Кокова// Простейшие – новые объекты биотехнологии: сб. материалов конф. // Ленинград: Наука, 1898, с 113 - 139.

12. Hodgson E. A Textbook of modern toxicology. 3d Edition // Editor: Ernest Hodgson, Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2004, 557 p.

13. Islam Md. S., Tanaka M., Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis // Mar. Pollut. Bull., 2004, v. 48, p. 624-649.

14. Randall D.J., Tsui T.K.N., Ammonia toxicity in fish // Mar. Pollut. Bull., 2002, v. 45, p. 17-23.

15. Camargo J. A., Alonso Á., Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment // Environ. International, 2006, v. 32, p. 831-849.

16. Rodrigues S.K., Abessa D.M.S., Machadol E.C., Geochemical and ecotoxicological assessment for estuarine surface sediments from Southern Brazil // Mar. Environ. Res., 2013, v. 91, p. 68-79.

17. Stuart M., Lapworth D., Crane E., Hart A., Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater // Science of the Total Environ., 2012, v. 416, p. 1-21.

18. Kaiser K.L.E., Ribo J.M., Photobacterium phosphoreum Toxicity Bioassay. II. Toxicity Data compilation // Toxic. Assess., 1988, v. 3, p. 195-237.

19. Koukal B., Dominik J., Vignati D., Arpagaus P., Santiago S., Ouddane B., Benaabidate L., Assessment of water quality and toxicity of polluted Rivers Fez and Sebou in the region of Fez (Morocco) // Environ. Pollut., 2004, v. 131, p. 163-172.

20. Zabetoglou K., Voutsa D., Samara C., Toxicity and heavy metal contamination of surficial sediments from the Bay of Thessaloniki (Northwestern Aegean Sea) Greece // Chemosphere, 2002, v. 49, p. 17–26.

21. Heberer T., Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data // Toxicol. Letters, 2002, v. 131, p. 5-17.

22. Мельников Н.Н. Пестициды. Химия, технология и применение. // Москва: Химия, 1987, 712 с.

23. Мельников Н.Н., Новожилов К. В., Пылова Т. Н., Химические средства защиты растений (пестициды). Справочник. // Москва: Химия, 1980, 288 с.

24. Зинченко В.А., Химическая защита растений: средства, технология и экологическая безопасность. // Москва: КолосС, 2005, 232 с.

25. Вергейчик Т.Х., Токсикологическая химия: учебник. // Т.Х. Вергейчик, под ред. Проф. Е. Н. Вергейчика, Москва: МЕДпресс-информ, 2009, 400 с.

26. Грушко Я.М., Вредные органические соединения в промышленных сточных водах, Изд. 2. // Ленинград: Химия, 1982, 216 с.

27. Коробкин В.И., Передельский Л.В., Экология: учебник для вузов // В.И. Коробкин, Л.В. Передельский., Изд. 12-е, доп. и перераб. // Ростов-на-Дону: Феникс, 2007, 602 с.

28. Гальперин М.В., Общая экология: Учебник // М.В. Гальперин, Москва: Форум, 2012, 336 с.

29. Кэссиди Д., Биссета Д., Спенса Р. А. Дж., Пэйн М., Справочник по онкологии // пер. с англ. под ред. проф. В.А. Горбуновой, Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2010, 512 с.

30. Абрамзон А.А., Бочаров В.В., Гаевой Г.М., Поверхностно-активные вещества. Справочник // А. А. Абрамзон, Г. М. Гаевой, Ленинград: Химия, 1979, 376 с.

31. Абрамзон А.А., Зайченко Л.П., Файнгольд С.И., Поверхностно-активные вещества. Синтез, анализ, свойства, применение. Учебное пособие для вузов // А.А. Абрамзон, Ленинград: Химия, 1988, 200 с.

32. Ланге К.Р., Поверхностно-активные вещества: синтез, свойства, анализ, применение // К.Р. Ланге, под науч. ред. Л.П. Зайченко, Санкт-Петербург: Профессия, 2004, 240 с.

33. Токсикология: учебное пособие // сост. И. Н. Полина; Сыктывкарский лесной институт, Сыктывкар: СЛИ, 2012, 128 с.

34. Зилов Е.А., Гидробиология и водная экология (организация, функционирование и загрязнение водных экосистем): учеб. пособие // Е. А. Зилов, Иркутск : Изд-во Иркутского государственного университета, 2009, 147 с.

35. Manahan S. E. Toxicological chemistry and biochemistry. 3rd ed. // Boca Raton, Florida, USA: CRC Press LLC, 2003, 424 p.

36. Никольский Б.П., Матёрова Е.А. Ионоселективные электроды // Ленинград: Химия, 1980, 239 с.

37. Камман К. Работа с ИСЭ // Москва: Мир, 1980, 283 с.

38. Дамаскин Б.Б., Петрий О.А., Цирлина Г.А. Электрохимия // Москва: Химия, КолосС, 2006, 672 с.

39. Белюстин А.А. и др. Аналитическая химия. в 3 т. Т. 1. Методы идентификации и определения веществ: учеб. для студ. высш. учеб. заведений; под ред. Л.Н. Москвина // Москва: Издательский центр "Академия", 2008, 57 с.

40. Научный совет по аналитической химии ОХНМ РАН. Проблемы аналитической химии. Т.14. Химические сенсоры / под ред. Ю.Г.Власова. – М.: Наука, 2010. – 399 с.

41. Huser M., Morf W.E., Fluri K., Seiler K., Schulthess P., Simon W. Transport properties of anion-selective membranes based on cobyrinates and metalloporphyrin complexes as ionophores // Helvetica Chim. Acta., 1990, V.73, p. 1481-1496.

42. Bakker E., Pretsch E. Lipophilicity of tetraphenylborate derivatives as anionic sites in neutral carrier-based solvent polymeric membranes and lifetime of corresponding ion-selective electrochemical and optical sensors // Anal. Chim. Acta, 1995, V.309, p.7-15.

43. Vlasov Yu., Legin A., Rudnitskaya A., Di Natale C., D’Amico, A. Nonspecific sensor arrays (“electronic tongue”) for chemical analysis of liquids. // Pure Appl.Chem. 2005, v.77, p. 1965–1983.

44. Di Natale C., Davide F., Brunink J.A.J., D’Amico A., Vlasov Yu.G., Legin A.V., Rudnitskaya A.M. Multicomponent analysis of heavy metal cations and inorganic anions in liquids by a non-selective chalcogenide glass sensor array. // Sens.Actuat.B. 1996.V.34. P.539-542.

45. Legin A.V., Bychkov E.A., Seleznev B.L., Vlasov Yu.G. Development and analytical evaluation of a multisensor system for water quality monitoring // Sens. Actuat. B. 1995. V. 27 (1-3). P. 377-379.

46. Winquist F., Wide P., Lundstrom I. An electronic tongue based on voltammetry // Anal. chim. acta, 1997, v. 357, p. 21—31.

47. Legin A., Rudnitskaya A., Vlasov Yu., Di Natale C., Mazzone E., D'Amico A. Application of electronic tongue for qualitative and quantitative analysis of complex liquid media // Sens. Actuators B., 2000, v. 65, p. 232—234.

48. Del Valle M. Electronic tongues employing electrochemical sensors (Review) // Electroanal., 2010, v. 22, p. 1539-1555.

49. Ciosek P., Wróblewski W. Potentiometric electronic tongues for foodstuff and biosample recognition-an overview // Sensors. 2011, v. 11 (5), p. 4688-4701.

50. Ciosek P., Wróblewski W. Sensor arrays for liquid sensing - Electronic tongue systems // Analyst. 2007, v. 132 (10), p. 963-978.

51. Бобрешова О.В. Паршина А.В. Потенциометрические сенсоры на основе ионообменников для анализа водных растворов // Воронеж: Издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета, 2012, 154 с.

52. Esbensen K.H., Multivariate Analysis – in Practice. // K.H.Esbensen. – 5th edition – Norway – Ålborg University, Esbjerg: CAMO Process AS, 2001., p.594

53. Власов Ю.Г., Легин А.В., Рудницкая А.М.,// Электронный язык - системы химических сенсоров для анализа водных сред// Рос. хим. журнал №2, 2008. с. 101-112.

54. Toko K., Hayashi K., Yamanaka M., Yamafuji K. Multichannel taste sensor with lipid membranes // Technical Digest of the 9th Sensor Symposium, 1990, p. 193–196.

55. Hayashi K., Yamanaka M., Toko K., Yamafuji K. Multichannel taste sensor using lipid membranes // Sen. and Actuat. B. 1990, v. 2 (3), p. 205-213.

56. Moreno L., Merlos A., Abramova N., Jiménez C., Bratov A., Multi-sensor array used as an “electronic tongue” for mineral water analysis // Sens. Actuators B., 2006, v.116, p. 130-134.

57. Yaroshenko I., Kirsanov D., Kartsova L., Bhattacharyya N., Sarkar S., Legin A., On the application of simple matrix methods for electronic tongue data processing: Case study with black tea samples // Sens. Actuators B., 2014, v. 191, p. 67-74.

58. Ciosek P., Wróblewski W., Miniaturized electronic tongue with an integrated reference microelectrode for the recognition of milk samples // Talanta, 2008, v. 76(3), p. 548-556.

59. Rudnitskaya A., Nieuwoudt H.H., Muller N., Legin A., Du Toit M., Bauer F.F. Instrumental measurement of bitter taste in red wine using an electronic tongue // Anal. and Bioanal. Chem. 2010. V. 397 (7). P. 3051-3060.

60. Legin A., Rudnitskaya A., Lvova L., Vlasov Y., Di Natale C. Evaluation of Italian wine by the electronic tongue: Recognition, quantitative analysis and correlation with human sensory perception // Anal. Chim. Acta. 2003. V. 484. P. 33-44.

61. Cetó X., González-Calabuig A., Capdevila J., Puig-Pujol A., del Valle M., Instrumental measurement of wine sensory descriptors using a voltammetric electronic tongue // Sens. Actuators B., 2015, v. 207, p. 1053-1059.

62. Kirsanov D., Mednova O., Vietoris V., Kilmartin P.A., Legin A. Towards reliable estimation of an "electronic tongue" predictive ability from PLS regression models in wine analysis // Talanta. 2012. V. 90. P. 109-116.

63. Gutiérrez J. M., Haddi Z., Amari A., Bouchikhi B., Mimendia A., Cetó X., del Valle M., Hybrid electronic tongue based on multisensor data fusion for discrimination of beers // Sens. Actuators B., 2013, v. 177, p. 989-996.

64. Rudnitskaya A., Polshin E., Kirsanov D., Lammertyn J., Nicolai B., Saison D., Delvaux F.R., Delvaux F., Legin A. Instrumental measurement of beer taste attributes using an electronic tongue // // Anal. Chim. Acta. 2009. V. 646. P. 111-118.

65. Arrieta T.A., Rodríguez-Méndez M.L., de Saja J.A., Blanco C.A. , Nimubona D. Prediction of bitterness and alcoholic strength in beer using an electronic tongue // Food Chem. 2010. V. 123 (3). P. 642-646.

66. Polshin E., Rudnitskaya A., Kirsanov D., Legin A., Saison D., Delvaux F., Delvaux F., Nicolai B., Lammertyn J. Electronic tongue as a screening tool for rapid analysis of the quality parameters of beer // Talanta, 2010. V. 81(1-2). P. 88-94.

67. Peres A. M., Veloso A. C.A., Pereira J. A., Dias L. G., Electrochemical Multi-sensors Device Coupled with Heuristic or Meta-heuristic Selection Algorithms for Single-cultivar Olive Oil Classification // Pr. Engin. 2014, v. 87, p. 192-195.

68. Beullens K., Kirsanov D., Irudayaraj J., Rudnitskaya A., Legin A., Nicolaï B. M., Lammertyn J., The electronic tongue and ATR–FTIR for rapid detection of sugars and acids in tomatoes // Sens. Actuators B., 2006, v. 116, p. 107-115.

69. Rodríguez-Méndeza M.L., Gay M., Apetrei C., De Saja J.A., Biogenic amines and fish freshness assessment using a multisensor system based on voltammetric electrodes. Comparison between CPE and screen-printed electrodes // Electr. Acta, 2009, v. 54(27), p. 7033-7041.

70. Lvova L., Denis S., Barra A., Mielle P., Salles C., Vergoignan C., Di Natale C., Paolesse R., Temple-Boyer P., Feron G., Salt release monitoring with specific sensors in “in vitro” oral and digestive environments from soft cheeses // Talanta, 2012, v. 97. p. 171-180.

71. Legin A., Rudnitskaya A., Clapham D., Seleznev B., Lord K., Vlasov Yu. Electronic tongue for pharmaceutical analytics – quantification of tastes and masking effects // Anal. Bioanal. Chem. 2004. V. 380. P. 36-45.

72. Rudnitskaya A., Kirsanov D., Blinova Y., Legin E., Seleznev B., Clapham D., Ives R., Saunders K., Legin A. Assessment of bitter taste of pharmaceuticals with multisensor system employing 3 way PLS regression // Anal. Chim. Acta., 2013. V. 770. P. 45-52.

73. Ciosek P., Grabowska I., Brzozka Z., Wroblewski W. Analysis of dialysate fluids with the use of a potentiometric electronic tongue // Microchim. Acta., 2008, v. 163(1–2), p. 139–145.

74. Lvova L., Martinelli E., Dini F., Bergamini A., Paolesse R., Di Natale C., D'Amico A. Clinical analysis of human urine by means of potentiometric electronic tongue // Talanta, 2009, v. 77 (3), p. 1097-1104.

75. Yaroshenko I., Kirsanov D., Kartsova L., Sidorova A., Borisova I., Legin A. Determination of urine ionic composition with potentiometric multisensor system // Talanta, 2015, v. 131, p. 556-561.

76. Кирсанов Д. О., Легин А. В., Бабаин В. А., Меднова О. В., Власов Ю. Г., Новые сенсоры и мультисенсорные системы («электронный язык») для анализа растворов отработанного ядерного топлива // Вест. СПбГУ, 2007, т. 4, № 4, с. 101—106.

77. Rudnitskaya A., Evtuguin D. V., Gamelas J.A.F., Legin A., Multisensor system for determination of polyoxometalates containing vanadium at its different oxidation states // Talanta, 2007, v. 72 (2). p. 497-505.

78. Legin A., Babain V., Kirsanov D., Mednova O. Cross-sensitive rare earth metal sensors based on extraction systems // Sens. and Actuat. B., 2008, v. 131, p. 29-36.

79. Di Natale C., Macagnano A., Davide F., D'Amico A., Legin A., Vlasov Y., Rudnitskaya A., Selezenev B., Multicomponent analysis on polluted waters by means of an electronic tongue // Sens. Actuators B., 1997, v. 44 (1-3), p. 423-428.

80. Legin A., Kirsanov D., Babain V., Gall L., Gall N. Promising analytical techniques for HLW analysis in “Radioactive Waste: Sources, Types and Management” // Editors: Satoshi Yuan and Wenxu Hidaka, Hauppauge NY, USA: NOVA Science Publishers Inc, 2012, 234 p.

81. Gutés A., Cespedes F., del Valle M., Louthander D., Krantz-Rülcker C., Winquist F. A flow injection voltammetric electronic tongue applied to paper mill industrial waters // Sen. and Actuat. B, v.115 (1), p. 390-395.

82. Родионова О.Е. Хемометрика в аналитической химии. // О.Е. Родионова, А.Л. Померанцев, Москва: Институт химической физики РАН, 2006, 61 с.

83. James G., Witten D., Hastie T., Tibshirani R. An Introduction to Statistical Learning with Applications in R // New York, Springer Science+Business Media. 2013, 426 p.

84. Bro R. Multiway calibration. Multilinear PLS // J. Chemometr. 1996. v. 10. p. 47-61.

85. Ramsay J.O. et al. Matrix correlation // Psychometrika. 1984. V. 49. p. 403–423.

86. Smilde A.K., Kiers H.A.L., Bijlsma S., Rubingh C.M., van Erk M.J. Matrix correlations for high-dimensional data: the modified RV-coefficient // Bioinform. 2009. V. 25. № 3. P. 401–405.

87. Шараф М.А., Хемометрика. // М.А. Шараф, Д.Л. Иллмэн, Б.Р. Ковальски. Перевод с англ., Ленинград: Химия, 1989, 272 с.

88. Thurston T.J., Brereton R.G., Foord D.G., Escott R.E.A. Principal components plots for exploratory investigation of reactions using ultraviolet-visible spectroscopy: application to the formation of benzophenone phenylhydrazone // Talanta, 2004, v. 63, p. 757-769.

89. Bezemer E., Rutan S.C. Multivariate curve resolution with non-linear fitting of kinetic profiles // Chemom. Intell. Lab. Syst., 2005, v. 59, p. 19-31.

90. Koh H.-L., Yau W.-P., Ong P.-S., Hegde A. Current trends in modern pharmaceutical analysis for drug discovery // Drug discov. today, 2003, v. 8(19), p. 889-897.

91. Nikolskii B.P., Materova E.A. Solid contact in membrane ion-selective electrodes // Ionselective electrode Rev. 1985, v.7., p.3-39.

92. Кирсанов Д.О., Легин А.В., Куликова А.П., Польшин Е.Н., Власов Ю.Г. Полимерные сенсоры для определения анионов органических кислот // Журнал Прикладной Химии, 2007, Т. 80 (5), с. 575-580.

93. Польшин Е.Н., Кирсанов Д.О., Рудницкая А.М., Легин А.В., Власов Ю.Г. Сравнение аналитических возможностей отдельных сенсоров и мультисенсорной системы на примере определения перхлорат-иона // Журнал Прикладной Химии, 2010, Т. 83 (9), с. 1463-1470.

94. Umino K., Habara M., Toko K. Simple screening method for pesticide residues by detecting coexistent adjuvants using potentiometric measurement // Sensors and Materials, 2012, v. 24, p. 1-11.

95. Grüner B., Kvíčalová M., Selucký P., Lučaníková M. Anionic alkyl diglycoldiamides with covalently bonded cobalt bis(dicarbollide)(1−) ions for lanthanide and actinide extractions // J. Organomet. Chem., 2010. v. 695. p. 1261-1264.

96. Alyapyshev M.Y., Babain V.A., Boyko V.I., Eliseev I.I., Kirsanov D.O., Klimchuk O.V., Legin A.V., Mikhailina E.S., Rodik R.V., Smirnov I.V. Calixarenes functionalized with phosphine oxide and diamide functions as extractants and ionofores for rare-earth metals // J. Incl. Phenom. Macroc. Chem. 2010. V. 67 (1-2). P. 117-126.

97. Кирсанов Д. О. Электродноактивные материалы на основе фосфиноксидов для мультисенсорных систем типа "электронный язык": автореферат дис. ... кандидата химических наук: 02.00.02 С.-Петерб. гос. ун-т, Санкт-Петербург, 2005.

98. Rosatzin T., Bakker E., Suzuki K., Simon W., Lipophilic and Immobilized Anionic Additives in Solvent Polymeric Membranes of Cation-Selective Chemical Sensors //Anal. Chim. Acta, 1993, v. 280, p. 197-205.

99. Кирсанов Д.О., Меднова О.В., Польшин Е.Н., Легин А.В., М.Ю. Аляпышев, И.И. Елисеев, Бабаин В.А., Власов Ю.Г. Новые полимерные химические сенсоры для определения ионов свинца // Журнал Прикладной Химии, 2009, Т. 82 (2), с. 254-261

100. Grüner B., Kvíčalová M., Plešek J., Šícha V., Císařová I., Lučaníková M., Selucký P. Cobalt bis(dicarbollide) ions functionalized by CMPO-like groups attached to boron by short bonds; efficient extraction agents for separation of trivalent f-block elements from highly acidic nuclear waste // J. Organomet. Chem., 2009. v. 694. p. 1678-1689.

101. Legin A.V., Babain V.A., Kirsanov D.O., Mednova O.V. Cross-sensitive rare earth metal ion sensors based on extraction systems // Sens. Actuators B., 2008, v. 131 (1), p. 29-36.

102. Kirsanov D., Khaydukova M., Tkachenko L., Legin A., Babain V. Potentiometric Sensor Array for Analysis of Complex Rare Earth Mixtures // Electroanal., 2012. v. 24 (1). p. 121-130.

103. Rudnitskaya A., Legin A., Seleznev B., Kirsanov D., Vlasov Y. Detection of ultra-low activities of heavy metal ions by an array of potentiometric chemical sensors // Microchimica Acta, 2008, v. 163 (1), p. 71-80.

104. Vlasov Yu.G., Bychkov E. Ion-selective chalcogenide glass electrodes // Ion-Selective Electrode Reviews, 1987, v. 9(1), p. 5-91.

105. Sodium dodecyl sulfate. Sigma-Aldrich Safety Data Sheet // Version 5.5 Revision Date 30.01.2015, Available from: http://www.sigmaaldrich.com.

106. Hexadecyltrimethylammonium bromide. Sigma-Aldrich Safety Data Sheet // Version 6.9 Revision Date 01.02.2016, Available from: http://www.sigmaaldrich.com.

107. Phenol. Sigma-Aldrich Safety Data Sheet // Version 5.5 Revision Date 04.02.2016, Available from: http://www.sigmaaldrich.com.

108. 2-Nitrophenol. Sigma-Aldrich Safety Data Sheet // Version 5.0 Revision Date 03.08.2012, Available from: http://www.sigmaaldrich.com.

109. p-Cresol. Sigma-Aldrich Safety Data Sheet // Version 5.0 Revision Date 17.09.2012, Available from: http://www.sigmaaldrich.com.

110. Kirsanov D., Zadorozhnaya O., Krasheninnikov A., Komarova N., Popov A., Legin A. Water toxicity evaluation in terms of bioassay with an Electronic Tongue // Sens. Actuators B., 2013, v. 179, p. 282-286.

111. Ebert D 2005. Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia // Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, 2005 Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Books

112. РД 52.24.635-2002. Методические указания. Проведение наблюдений за токсическим загрязнением донных отложений в пресноводных экосистемах на основе биотестирования.

113. Кокова В.Е. Непропорционально – проточная культура простейших. // В.Е. Кокова, Г.М. Лисовский, Новосибирск: Наука, 1982, 188 с.

114. Кокова В.Е. Непрерывное культивирование беспозвоночных. // В.Е. Кокова, Новосибирск: Наука, 1982, 256 с.

115. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.2-98. Методика определения токсичности проб природных, питьевых, хозяйственно-питьевых, хозяйственно-бытовых сточных, очищенных сточных, сточных, талых, технологических вод экспресс-методом с применением прибора серии «Биотестер» // Москва, 1998.

116. The CAUP (Charles University in Prague) image web–database

117. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-2004. Токсикологические методы анализа. Методика определения токсичности питьевых, природных и сточных вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов производства и потребления по изменению оптической плотности культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris beijer*) // Москва, 2004.

118. Фото E. Nelson & L. Sycuro с сайта microbewiki.kenyon.edu

119. Zadorozhnaya O., Kirsanov D., Buzhinsky I., Tsarev F., Abramova N., Bratov A., Javier Muñoz F., Ribó J., Bori J., Riva M. C., Legin A. Water pollution monitoring by an artificial sensory system performing in terms of *Vibrio fischeri* bacteria. // Sens. Actuators B., 2015, v. 207, p. 1069—1075.

120. Blaise C., Ferard J.-F., Small-scale Freshwater Toxicity Investigations, vol. 1 Toxicity Test Methods // Springer, Berlin, 2005, p. 69–105.

121. Патент на изобретение РФ № 2457254 от 22.02.2011. Способ оценки эффективности антимикробного воздействия антибиотиков и ультразвукового излучения на патогенные бактерии, существующие в форме биопленки.

122. Breiman L., Random Forests // Machine Learning, 2001, v. 45 (1), p. 5–32.

123. Rokach L., Maimon O., Top-down induction of decision trees classifiers – a survey // IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, Part C, 2005, v. 35 (4), p. 476–487.

124. Li S., Random KNN Modeling and Variable Selection for High Dimensional Data // PhD thesis, West Virginia University, 2009.

125. Altman N.S., An introduction to kernel and nearest-neighbor nonparametric regression // The Am. Statistician, 1992, v. 46 (3), p. 175–185.

126. Изображение с сайта http://www.slideshare.net/yandex/ss-28834887

127. Cortina M., Duran A., Alegret S., del Valle M., A sequential injection electronic tongue employing the transient response from potentiometric sensors for anion multidetermination // Anal Bioanal Chem, 2006, v.385, p. 1186–1194.

128. Gutiérrez M., Alegret S., Cáceres R., Casadesús J., Marfà O., del Valle M., Nutrient Solution monitoring in greenhouse cultivation employing a potentiometric electronic tongue // J. Agric. Food Chem., 2008, v. 56, p. 1810–1817.

129. Задорожная О.А., Кирсанов Д.О., Власов Ю.Г., Тонкопий В.Д., Рыбакин В.Н., Загребин А.О., Легин А.В. Определение интегральной токсичности воды в терминах биотестирования с помощью мультисенсорной системы, чувствительной к индивидуальным токсикантам // Ж. прикл. Химии, 2014, т. 87, № 4, с. 416-423.

130. Шведене Н. В., Чернышёв Д. В., Плетнёв И. В. Ионные жидкости в электрохимических сенсорах // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева), 2008, т. LII, № 2, с. 81-91.

131. Campuzano S., Serra B., Pedrero M., de Villena F.J.M., Pingarrón J. M., Amperometric flow-injection determination of phenolic compounds at self-assembled monolayer-based tyrosinase biosensors // Anal. Ch. Acta, 2003, v. 494 (1-2), p. 187-197.

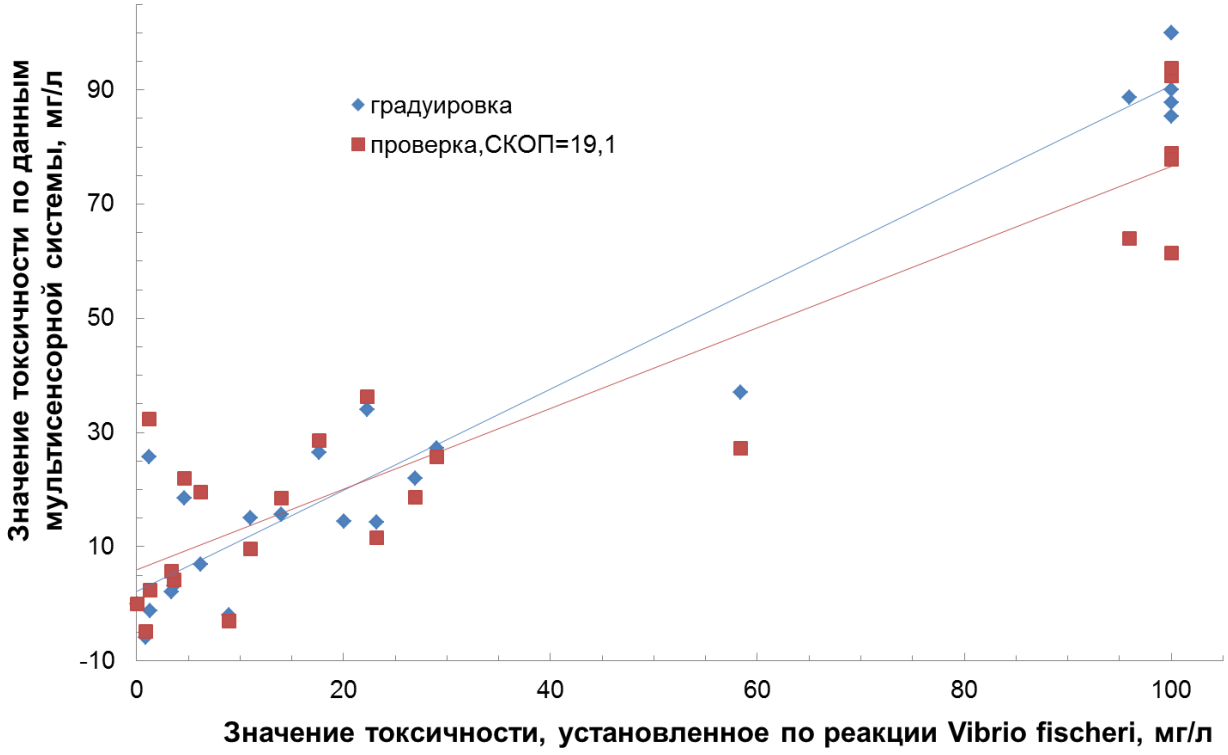
132. Mai Anh T., Dzyadevych S.V., Soldatkin A.P., Duc Chien N., Jaffrezic-Renault N., Chovelon J.-M., Development of tyrosinase biosensor based on pH-sensitive field-effect transistors for phenols determination in water solutions // Talanta, 2002, v. 56 (4), p. 627-634.

133. Ruzgas T., Csoregi E., Emneus J., Gorton L., Marko-Varga G., Peroxidase-modified electrodes: fundamentals and application. Review // Anal. Ch. Acta, 1996, v. 330, p. 123-138.

134. Львовский Е.Н. Статистические методы построения эмпирических формул: Учебное пособие для вузов // Москва: Высшая школа, 1988, 239 с.

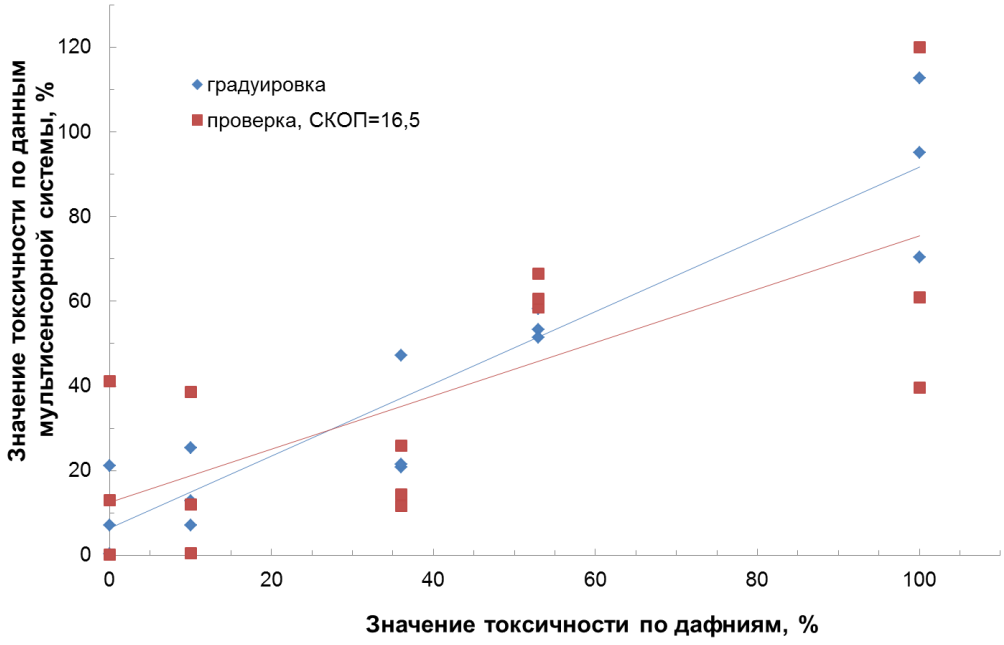
ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Прямые для градуировки и проверки в координатах значений токсичности, полученных с помощью люминесцентных бактерий и мультисенсорной системы. Значение квадрата коэффициента корреляции R^2=0,64.

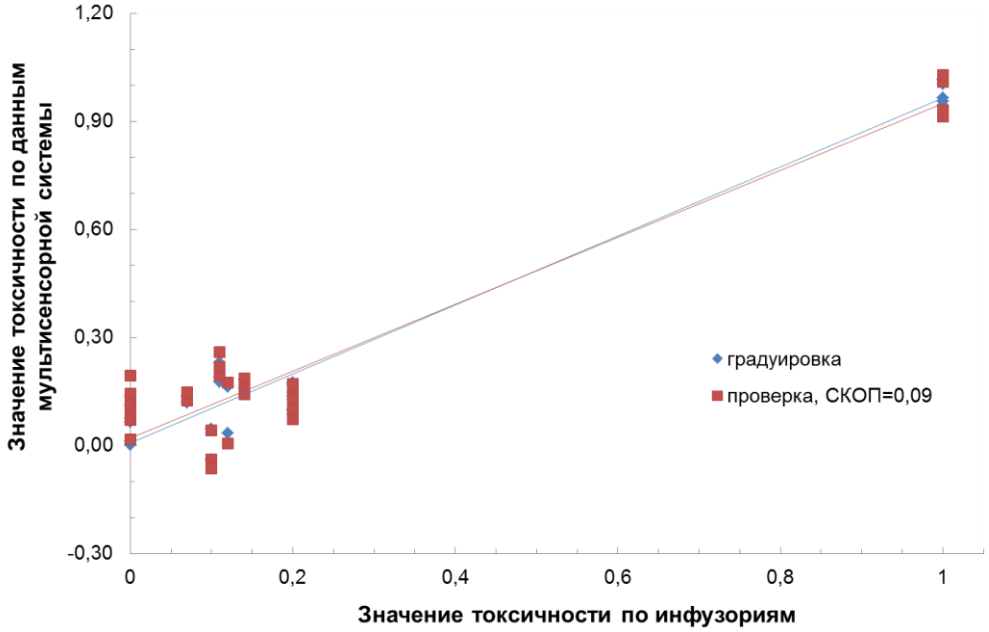


ПРИЛОЖЕНИЕ 2

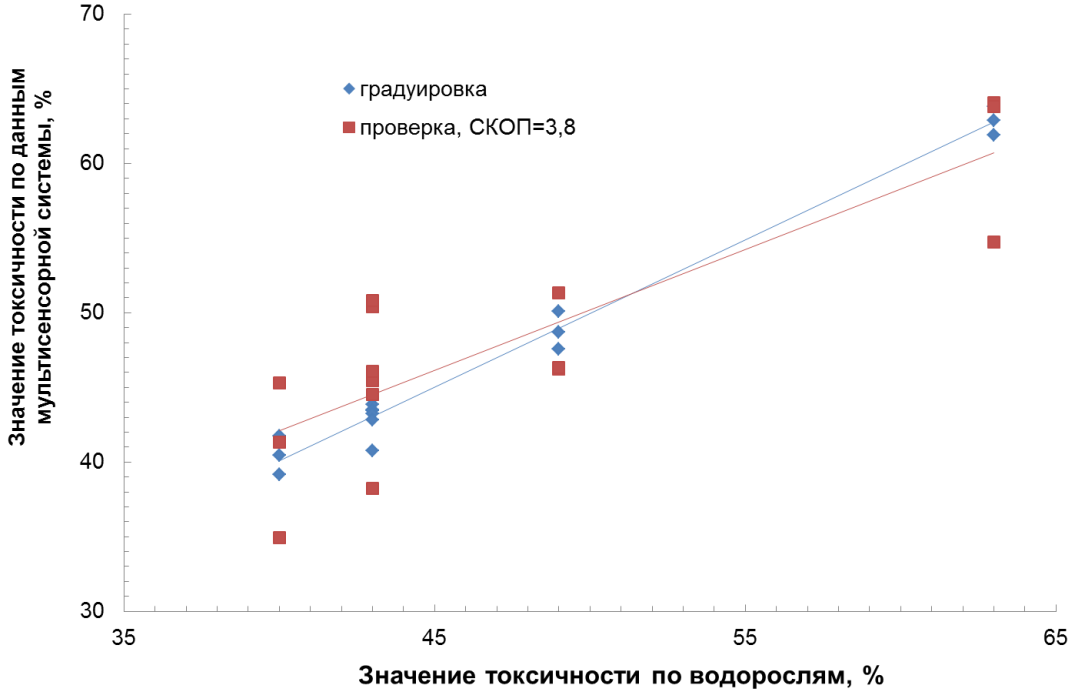
Прямые для градуировки и проверки в координатах значений токсичности, полученных с помощью дафний и мультисенсорной системы. Значение квадрата коэффициента корреляции R^2=0,81.



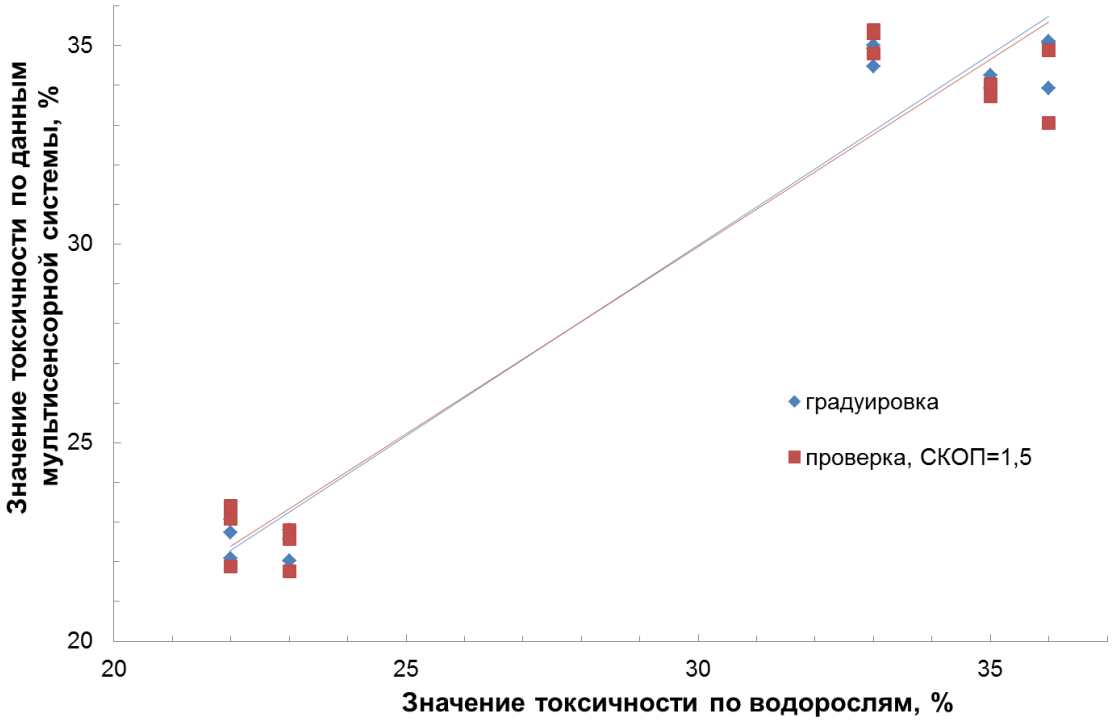
Прямые для градуировки и проверки в координатах значений токсичности, полученных с помощью инфузорий и мультисенсорной системы. Значение квадрата коэффициента корреляции R^2=0,95.

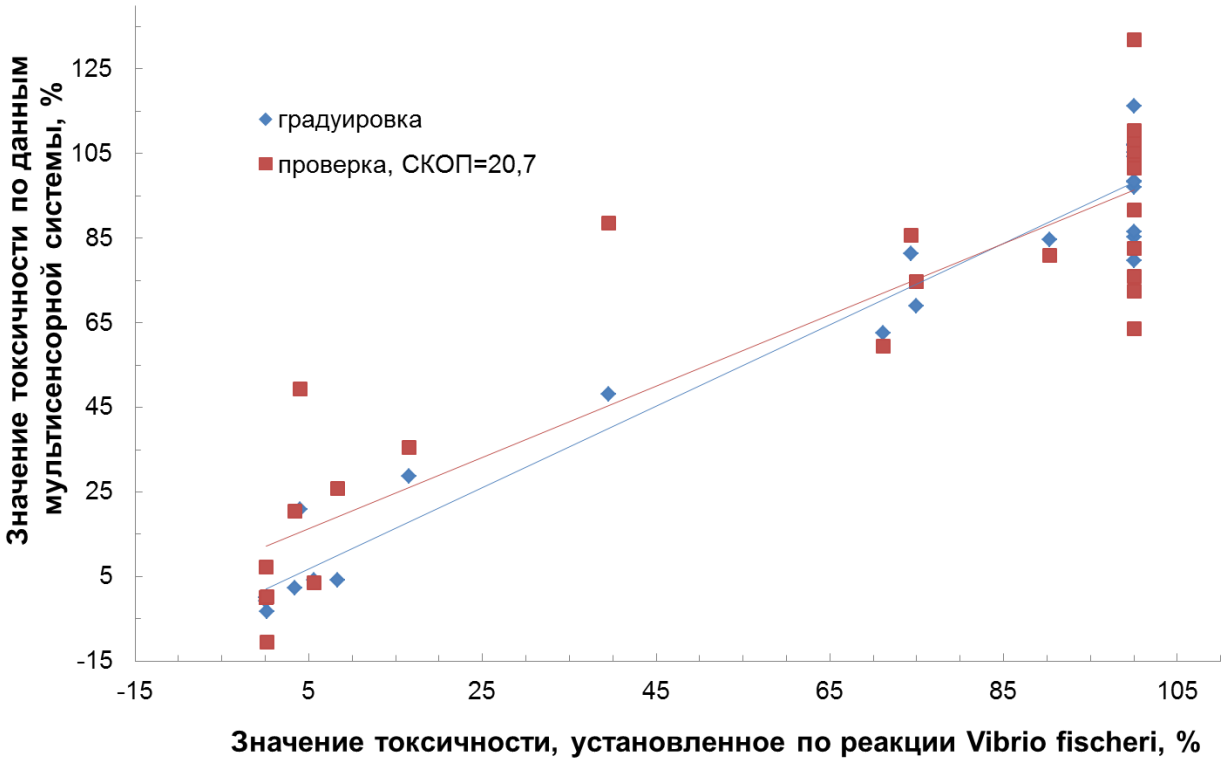


Прямые для градуировки и проверки в координатах значений токсичности, полученных с помощью водорослей хлорелла и мультисенсорной системы. Значение квадрата коэффициента корреляции R^2=0,83.



Прямые для градуировки и проверки в координатах значений токсичности, полученных с помощью водорослей хлорелла (50-кратное разбавление) и мультисенсорной системы. Значение квадрата коэффициента корреляции R^2=0,94.



ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Прямые для градуировки и проверки в координатах значений токсичности, полученных с помощью люминесцентных бактерий и мультисенсорной системы. Значение квадрата коэффициента корреляции R^2=0,78.