

## Биосензорен екологичен мониторинг на тежки метали

Маргарита Стойчева

Минно-геоложки университет "Св. Иван Рилски", 1700 София

**РЕЗЮМЕ.** Осъществено е биоелектрокаталитично определение на йони на тежки метали ( $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  и  $\text{AsO}_3^{3-}$ ), като за целта е използван ацетилхолинестеразен амперометричен сензор. Анализът се основава на електрохимичната регистрация на намалението на ензимната активност като функция от концентрацията на аналита, проявяващ инхибиторно действие. Количествената оценка на изменението на активността на имобилизираната върху електродната повърхност ацетилхолинестераза, на степента на инхибиране и на инхибиторните константи показва, че активността на инхибиторите намалява в реда  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{AsO}_3^{3-}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , факт позволяващ диференцирането им. Определението се отличава с чувствителност, варираща в границите 0.15 – 3.72  $\mu\text{A/p}(\text{mol/L})$ , широк диапазон на линейност на калибровъчната графика и особено ниска граница на откриване на определяните компоненти ( $2 \times 10^{-10}$  –  $10^{-14}$  mol/L). Направените изследвания са от интерес за екологичния мониторинг на тежки метали.

### BIOSENSORS APPLICATION IN THE HEAVY METALS ECOLOGICAL MONITORING

**ABSTRACT.** A bioelectrocatalytic determination of heavy metals' ions ( $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{AsO}_3^{3-}$ ) has been accomplished using an acetylcholinesterase amperometric sensor. The analysis is based on the electrochemical registration of the diminution of the enzyme activity as a function of the concentration of the analyte, having an inhibitory action. The quantitative evaluation of the variation of the activity of the immobilized acetylcholinesterase, the degree of inhibition and the inhibition constants shows that the activity of the inhibitors decreases in the order  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{AsO}_3^{3-}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ . This fact allows their differentiation. The determination is sensitive (0.15 – 3.72  $\mu\text{A/p}(\text{mol/L})$ ), with an important linear dynamic range and low detection limit ( $2 \times 10^{-10}$  –  $10^{-14}$  mol/L). These studies represent an interest for the heavy metals ecological monitoring.

### Въведение

По данни на EPA, NIOSH, AOAC и APHA, най-разпространените понастоящем методи за мониторинг на замърсяването на околната среда с тежки метали са рентгено флуоресцентният, атомно абсорбционният и атомно емисионният анализ с индуктивно свързана плазма. Те се отличават с точност и чувствителност и позволяват да бъдат измерени концентрации от порядъка на ПДК, но дават резултат само за общото съдържание на съответния елемент. От решаващо значение за екологичната експертиза обаче е разграничаването на отделните валентни форми, проявяващи различна токсичност, биологична активност и физиологично действие. Налагащата се поради тази причина предварителна химическа или физико-химическа обработка на пробата, обикновено чрез екстракционни или хроматографски методи усложнява определението, води до значително увеличение на времетраенето му и изисква провеждането му единствено в специализирани лаборатории. Не на последно място, недостатък на изброените методи е скъпо струващото оборудване, което повишава стойността на анализа.

Изброените факти показват, че е необходимо да се разработят алтернативни методи за екологичен мониторинг на тежки метали. Такава алтернатива представлява биосензорният електроанализ (Stoytcheva, 1994; Stoytcheva et al., 1998; Krawczynsky vel Krawczyk et al., 2000; Kormis et al., 2000; Botré et al., 2001; Gooding et al., 2002; Paitan et al., 2003). Електрохимичните биосензори – комбинация от електрохимичен преобразувател и тясно свързан или интегриран с него биокомпонент (най-често

ензим), се очертават като ефективни аналитични устройства поради това, че съчетават каталитичната активност и субстратна специфичност на биомолекулата с чувствителността на електрохимичните методи, увеличена многократно в резултат на биологичното усилване на аналитичния сигнал, дават възможност за детекция в реално време и измерване *in situ* и се поддават на автоматизация.

Целта на настоящата работа е да се проучи възможността за приложение на амперометричен ацетилхолинестеразен сензор за определяне на метални йони – приоритетни замърсители на околната среда.

### Експериментална част

#### Реагенти и апаратура

Използвани бяха следните реагенти: ацетилхолинестераза Ach (E. C. 3.1.1.7, от говежди еритроцити, 1000 U/mg), BDH Chemicals Ltd., England; ацетилтиохолин йодид, Chemapol, Czechoslovakia;  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  0.05 mol/L, Merck;  $\text{CuSO}_4$  0.1 mol/L, Fluka;  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  0.1 mol/L, Fluka;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , Sigma;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , Aldrich;  $\text{As}_2\text{O}_3$ , Fluka. Определено pH се поддържа с помощта на буферен разтвор на Britton-Robinson – 0.1 mol/L ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , NaOH).

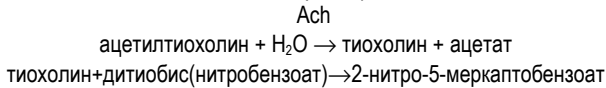
За провеждане на електрохимичните изследвания се използваше три електродна електролиза клетка от конвенционален тип. Индикаторният електрод от графит със спектроскопска чистота (Ringsdorf Werke, Germany) и диаметър на работната дискова повърхност 0.6 mm, бе модифициран с имобилизиран ензим. За сравнителен електрод служеше наситеният каломелов електрод (нке). Помощният електрод бе от платина или стъклографит.

Електрохимичната апаратура включваше потенциостат EG&G Princeton Applied Research 273A, амперометрична единица Tacussel и полярограф Radelkis OH 105.

Спектрофотометричните измервания се осъществяваха с помощта на спектрофотометър Varian-Cary 1, Perkin Elmer, Merck или Specol.

### Определяне на ензимната активност

Активността на солибилизираната ацетилхолинестераза се определяше по метода на Ellman (Ellman et al., 1961). Той се основава на следните реакции:



Анализът се провеждаше в съответствие с протокол 124 117, разработен от Boehringer Mannheim GmbH. Към 3 ml фосфатен буферен разтвор (52 mmol/L, pH 7.2), съдържащ 5,5'-дитиобис(нитробензоена) киселина (0.26 mmol/L) се прибавяха 0.02 ml от разтвора на пробата и 0.10 ml разтвор на ацетилтиохолин йодид (156 mmol/L). Светлинната абсорбция A на сместа се отчиташе на интервали от 30 sec ( $\tau = 0, 30, 60$  и  $90$  sec) при дължина на вълната 405 nm и оптичен пробег 1 cm. Ензимната активност U се изчисляваше по формулата:

$$\frac{U}{\tau} (25^\circ \text{C}) = 23460 \times \frac{\Delta A_{405\text{nm}}}{30 \text{ sec}}$$

Активността на имобилизираната ацетилхолинестераза се определяше електрохимично. За целта ензимният електрод се внасяше в електролизната клетка, съдържаща разтворен в буферирания воден разтвор (Britton-Robinson, 0.1 mol/L, pH 7) ацетилтиохолин. Регистрираше се, при потенциал +0.8 V, с помощта на индикаторен електрод от графит, токът на окисление на тиохолина, получаващ се при каталитичната хидролиза на ацетилтиохолина, инициирана от ензима ацетилхолинестераза. Активността на имобилизираната ензим се изчисляваше чрез сравняване на наклона на линейната част на кривата ток/време с този, получен при същите условия, но в присъствие на солибилизиран ензим с известна активност. Количеството на ацетилтиохолина в разтвора трябваше да бъде достатъчно голямо, за да се наситят активните центрове на ензима.

### Имобилизация на ацетилхолинестеразата

Ацетилхолинестеразата съдържа значително количество  $\text{NH}_2$ -функционални групи с второстепенно значение, което прави възможна ковалентната ѝ имобилизация на повърхността на графитови електроди по описаната в (Stoytcheva, 1994; Stoytcheva, 1995; Stoytcheva, 1995) методика.

След полиране, обезмасляване с алкохол и промиване с дестилирана вода на електродната повърхност, графитът се подлагаше на електрохимично окисление и активиране с карбодимид. За да се осъществи ковалентното свързване на ензима, върху дисковата повърхност на електрода се инжектираха 20  $\mu\text{L}$  буферен разтвор (Britton-Robinson 0.1 mol/L, pH 8), съдържащ 0.5, 1, 2.5 или 5  $\text{mg}/\text{cm}^2$  ацетилхолинестераза. Имобилизацията протичаше

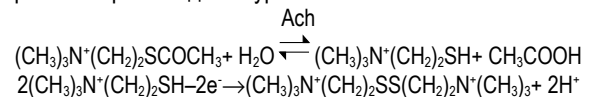
за 2, 4, 5 или 12 часа при температура  $4^\circ\text{C}$  или за 0.5, 1, 2 или 4 часа при температура  $30^\circ\text{C}$ , като се поддържаше постоянна влажност на средата. Изборът на оптимални операционни параметри се извърши по три критерия: минимален разход на ензим, минимално времетраене на процеса и максимална чувствителност на определението. На тези изисквания отговаряха електродите, изготвени при следните условия: концентрация на разтвора на ацетилхолинестераза:  $2.5 \text{ mg}/\text{cm}^2$ ; времетраене на процеса: 2 часа; температура:  $30^\circ\text{C}$ .

Следваше промиване (3 x 10 min) в буферния разтвор (Britton-Robinson 0.1 mol/L, pH 7) при скорост на въртене на електрода 1000 rpm.

## Резултати и обсъждане

### Принцип на определението

При потенциал +0.8 V/кне се регистрираше токът на окисление на тиохолина – продукт на хидролизата на субстрата ацетилтиохолин, катализирана от имобилизираната върху повърхността на индикаторния графитов електрод ацетилхолинестераза (Stoytcheva, 1995; Stoytcheva, 1995). Протичащите процеси се изразяват чрез следните уравнения:



В резултат на инхибирането на ензима, концентрацията на генерирания продукт намалява, което води до намаление на регистрирания аналитичен сигнал като функция от концентрацията на инхибитора.

### Инхибиране на имобилизираната ацетилхолинестераза под действието на йони на тежки метали

Инхибиторното действие на йоните  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  и  $\text{AsO}_3^{3-}$  върху активността на имобилизираната ацетилхолинестераза бе изследвано при следните експериментални условия: температура  $25^\circ\text{C}$ , концентрация на субстрата варираща в границите от 0.1 mmol/L до 1.2 mmol/L, при което се достигаше до насищане на активните центрове на имобилизираната биоконпонент и различни концентрации на инхибитора. Хидролизата на солите  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  и  $\text{MnSO}_4$  се избягваше чрез избор на подходящо pH на средата (0.1 mol/L буфер на Britton-Robinson) – 2 за  $\text{Fe}^{3+}$  и 4.5 за  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$ . В останалите случаи -  $\text{Hg}^{2+}$  и  $\text{AsO}_3^{3-}$  се поддържаше pH 7.

Получените опитни данни и направените изчисления показваха, че максимална степен на инхибиране D (при условия на насищане на ензима) се достига при концентрация на  $\text{Cu}^{2+}$  или  $\text{Cd}^{2+}$  10 mmol/L, концентрация на  $\text{Mn}^{2+}$  0.1 mmol/L, концентрация на  $\text{Fe}^{3+}$  1 mmol/L, концентрация на  $\text{Hg}^{2+}$  0.01 mmol/L и концентрация на  $\text{AsO}_3^{3-}$  0.002 mmol/L. Получените стойности са посочени в таблица 1.

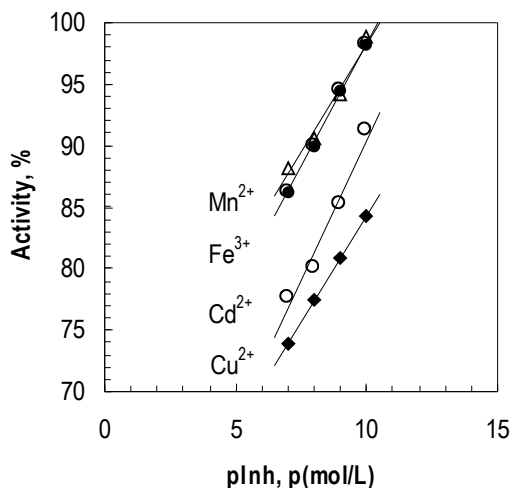
Таблица 1

Максимална степен на инхибиране D на имобилизираната ацетилхолинестераза

| Инхибитор | D, % | Инхибитор | D, % |
|-----------|------|-----------|------|
|-----------|------|-----------|------|

|                            |       |   |       |
|----------------------------|-------|---|-------|
| 10 mmol/L Cu <sup>2+</sup> | 28.69 | 0.1 mmol/L Mn <sup>2+</sup>                 | 11.76 |
| 10 mmol/L Cd <sup>2+</sup> | 21.83 | 0.01 mmol/L Hg <sup>2+</sup>                | 64.44 |
| 1 mmol/L Fe <sup>3+</sup>  | 15.78 | 0.002 mmol/L AsO <sub>3</sub> <sup>3-</sup> | 19    |

Изменението на активността на имобилизираната ацетилхолинестераза като функция от концентрацията на инхибиторите Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> и Fe<sup>3+</sup> е представено графично на фиг. 1.



Фиг. 1. Изменение на активността на имобилизираната ацетилхолинестераза като функция от концентрацията на инхибитора [Inh] (pInh = -lg[Inh]). Концентрация на субстрата = 1 mmol/L.

Кинетичните параметри на ензимната реакция: привидна константа на Michaelis-Menten  $K_m^{app}$ , максимална скорост  $I_{max}$  и инхибиторна константа  $K_i$ , определени по метода на Lineweaver-Burk (Lineweaver et al., 1934) и по метода на Dixon (Dixon, 1972) са посочени в таблица 2 и таблица 3.

Таблица 2

Кинетични параметри на хетерогенната ензимна реакция ( $r^2 > 0.98$ ).

| Инхибитор                      | pH  | $K_m^{app} \times 10^{-4}$ , mol/L | $I_{max} \times 10^{-6}$ , A |
|--------------------------------|-----|------------------------------------|------------------------------|
| -                              | 2   | 2.04                               | 9.41                         |
| Fe <sup>3+</sup>               | 2   | 2.16                               | 7.45                         |
| -                              | 4.5 | 1.81                               | 11.63                        |
| Cu <sup>2+</sup>               | 4.5 | 1.99                               | 8.39                         |
| Cd <sup>2+</sup>               | 4.5 | 1.87                               | 8.95                         |
| Mn <sup>2+</sup>               | 4.5 | 1.86                               | 9.84                         |
| -                              | 7   | 2.06                               | 63.81                        |
| Hg <sup>2+</sup>               | 7   | 1.89                               | 28.93                        |
| AsO <sub>3</sub> <sup>3-</sup> | 7   | 2.23                               | 52.96                        |

( $I_{max}$  е определен за концентрация на инхибиторите, посочена в таблица 1)

Таблица 3

Инхибиторни константи ( $r^2 > 0.98$ )

| Инхибитор                      | pH  | $K_i \times 10^{-4}$ , mol/L |
|--------------------------------|-----|------------------------------|
| Fe <sup>3+</sup>               | 2   | 14.71                        |
| Cu <sup>2+</sup>               | 4.5 | 2.72                         |
| Cd <sup>2+</sup>               | 4.5 | 3.41                         |
| Mn <sup>2+</sup>               | 4.5 | 6.84                         |
| Hg <sup>2+</sup>               | 7   | 0.59                         |
| AsO <sub>3</sub> <sup>3-</sup> | 7   | 1.21                         |

Анализът на опитните данни и резултати показва, че привидната константа на Michaelis-Menten  $K_m^{app}$  запазва постоянна стойност, докато максималната скорост на ензимната реакция  $I_{max}$  намалява с нарастването на концентрацията на инхибитора. Подобен тип инхибиране се счита за неконкурентно.

Посочените в таблица 2 стойности на  $I_{max}$  позволиха да се оцени количествено ензимната активност в отсъствие и в присъствие на инхибитори. При изчисленията се вземаше пред вид, че при окислението на тиохалина, генериран в еквивалентно на субстрата количество, се отдава един електрон. Получените резултати са представени в таблица 4.

Таблица 4

Активност на имобилизираната ацетилхолинестераза

| Инхибитор                      | pH  | $i_{max}$ , $\mu A \cdot cm^{-2}$ | $V$ , mol.s.cm <sup>-2</sup> | $U$ , mU.s <sup>-1</sup> .cm <sup>-2</sup> | $U$ , % |
|--------------------------------|-----|-----------------------------------|------------------------------|--|---------|
| -                              | 2   | 33.29                             | $3.45 \times 10^{-10}$       | 20.70                                      | 100     |
| Fe <sup>3+</sup>               | 2   | 26.38                             | $2.73 \times 10^{-10}$       | 16.38                                      | 79.13   |
| -                              | 4.5 | 41.15                             | $4.26 \times 10^{-10}$       | 25.56                                      | 100     |
| Cu <sup>2+</sup>               | 4.5 | 29.69                             | $3.08 \times 10^{-10}$       | 18.48                                      | 72.31   |
| Cd <sup>2+</sup>               | 4.5 | 31.68                             | $3.28 \times 10^{-10}$       | 19.68                                      | 77.00   |
| Mn <sup>2+</sup>               | 4.5 | 34.81                             | $3.61 \times 10^{-10}$       | 21.66                                      | 84.74   |
| -                              | 7   | 225.79                            | 23.41                        | 140.46                                     | 100     |
| Hg <sup>2+</sup>               | 7   | 102.37                            | 10.61                        | 63.68                                      | 45.34   |
| AsO <sub>3</sub> <sup>3-</sup> | 7   | 187.40                            | 19.42                        | 116.53                                     | 82.96   |

$V$  – скорост на ензимната реакция;

$i_{max}$  – максимална скорост на ензимната реакция, изразена чрез плътността на тока.

Те са в съгласие с данните в таблица 1 и показват, че активността на инхибиторите намалява в реда Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, AsO<sub>3</sub><sup>3-</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup>. Този факт осигурява селективност на определянето.

Съгласно стойностите на  $K_i$ , активността на инхибиторите намалява в реда Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>. Различната киселинност на изследваните разтвори не позволява сравняването на всички инхибиторни константи, поради тяхната зависимост от pH на средата.

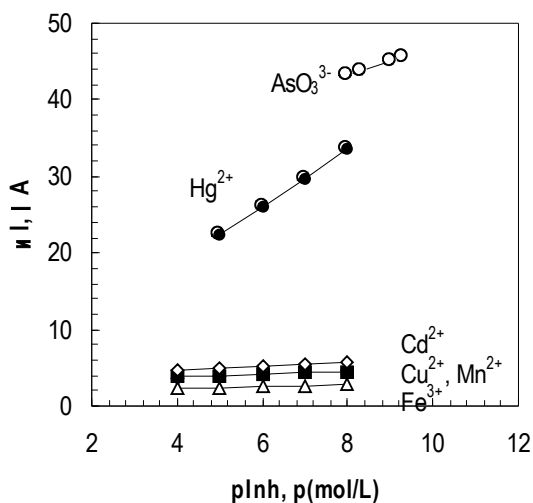
**Аналитични и метрологични характеристики на биоелектрокаталитичното определение на йони на тежки метали, основаващо се на инхибиторното им действие**

С оглед на аналитичното приложение на ензимния електрод за количествен анализ на метални йони - инхибитори на ацетилхолинестеразата, се правеше оценка на следните показатели: граница на откриване, чувствителност, диапазон на линейност на калибровъчната графика, точност и възпроизводимост.

Анализът се основаваше на определянето на намалението  $\Delta I$  на големината на тока на окисление на тиохолонийодида в зависимост от концентрацията на инхибитора [Inh].

Пред вид въздействието на инхибиторите на ацетилхолинестеразата върху човешкия организъм и изискванията на екологичния мониторинг, от съществено значение бе да се определи границата на откриване на изследваните вещества. Тя се дефинираше чрез установяване на минималното съдържание на компонента, което може да се определи с относително стандартно отклонение в регистрирания аналитичен сигнал 0.33.

Чувствителността на анализа се определяше от наклона на линейната част на калибровъчната крива (фиг. 2).



Фиг. 2. Калибровъчна графика за определяне на метални йони на базата на инхибиторното им действие

Възпроизводимостта на определенията се изразяваше посредством величината относително стандартно отклонение RSD. Точността на аналитичния метод се оценяваше количествено чрез процентната грешка на определенията.

Анализът на получените опитни данни при вариране на pH на средата, температурата, скоростта на въртене на ротиращия индикаторен електрод и концентрацията на субстрата позволи да се оптимизират условията за провеждане на определенията.

Характеристиките на определенията, проведени при температура 25°C, pH 7, скорост на въртене на електрода 1000 rpm и количество на ацетилхолинестеразата в разтвора за имобилизация 2.5 mg/cm<sup>3</sup>, са посочени в табл. 5. Чувствителността на анализите бе определена при условията на насищане на ензима.

Таблица 5

Характеристики на определението на инхибитори на ацетилхолинестеразата ( $r^2 > 0.98$ )

| Инхибитор           | Граница на откриване, mol/L | Градуировъчна функция $\Delta I = a + b \lg[\text{Inh}]$ |                                  | Линейен диапазон, mol/L |
|---------------------|-----------------------------|--|----------------------------------|-------------------------|
|                     |                             | a, $\mu\text{A}$   | b, $\mu\text{A/p}(\text{mol/L})$ |                         |
| $\text{Mn}^{2+}$    | $10^{-11}$                  | -2.80±0.10   | 0.24±0.02                        | До $10^{-4}$            |
| $\text{Cu}^{2+}$    | $10^{-14}$                  | -3.10±0.11   | 0.18±0.01                        | До $10^{-2}$            |
| $\text{Fe}^{3+}$    | $10^{-10}$                  | -1.66±0.06   | 0.15±0.01                        | До $10^{-4}$            |
| $\text{Cd}^{2+}$    | $10^{-12}$                  | -3.60±0.14   | 0.28±0.03                        | До $10^{-2}$            |
| $\text{Hg}^{2+}$    | $10^{-10}$                  | -3.72±0.11   | 3.72±0.06                        | До $10^{-5}$            |
| $\text{AsO}_3^{3-}$ | $2 \times 10^{-10}$         | -30.10±0.77  | 1.65±0.04                        | До $2 \times 10^{-8}$   |

Изчислено бе, въз основа на опитните данни, че RSD < 5%. Сравнението на резултатите с получените по други методи в независими лаборатории показва, че точността на определенията е много добра (относителната грешка не надвишава 4 %).

Получените експериментални данни и резултати послужиха като основа за разработването на методика за определяне на  $\text{AsO}_3^{3-}$  в проби промивни и отпадни води от МДК-Пирдоп (Stoytcheva et al., 1998). Методът предлага решение на двата основни проблема, свързани с определянето на арсен – снижаване на границата на откриване и разграничаване на  $\text{AsO}_3^{3-}$  от  $\text{AsO}_4^{3-}$ , не проявяващ инхибиторно действие.

## Изводи

Извършени са имащи практическо значение изследвания върху процеса на инхибиране на имобилизираната ацетилхолинестераза под действието на йони на тежки метали. Чрез използвания електрохимичен подход, различаващ се от конвенционалните, са получени нови данни, свързани с кинетичните параметри на хетерогенната ензимна реакция. Направена е комплексна оценка на аналитичните и метрологични характеристики на биоелектрокаталитичните определения, основаващи се на амперометричната регистрация на намалението на активността на ензима като функция от концентрацията на инхибитора, с оглед разработването на методи за биосензорен екологичен мониторинг на тежки метали.

## Използвани съкращения

EPA - Environmental Protection Agency  
 NIOSH - National Institute for Occupational Safety and Health  
 AOAC - Association of Official Analytical Chemists  
 APHA - American Public Health Association

## Литература

Botré, F., E. Podesta, B. Silvestrini, C. Botré. 2001. Toxicity testing in environmental monitoring: the role of enzymatic biosensors. – *Ann. Ist Super. Sanità*, 37, 607-613  
 Dixon, M. 1972. The graphical determination of  $K_m$  and  $K_i$ . – *Biochem. J.*, 129, 197-202  
 Ellman, G., K. Courtney, V. Andres, R. Featherstone. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. – *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88-95

- Gooding, G., E. Chow, R. Finlayson. 2002. Biosensors for detecting metal ions: new trends. – *Aust. J. Chem.*, 56, 159-162
- Kormis, F., A. Lengauer. 2000. Studies concerning the biomonitoring of the degree of environmental pollution using urea-sensitive enzymatic sensor. – *Lab. Robotics. Automat.*, 12, 27-30
- Krawczynsky vel Krawczyk, T., M. Moszczynska, M. Trojanowicz. 2000. Inhibitive determination of mercury and other metal ions by potentiometric urea biosensor. – *Biosens. Bioelectron.*, 15, 681-691
- Lineweaver, H., B. Burk. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. - *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 658-666
- Michel, C., F. Battaglia-Brunet, C. T. Minh, M. Bruschi, I. Ignatiadis. 2003. Amperometric cytochrome c3-based biosensor from chromate determination. – *Biosens. Bioelectron.*, 19, 345-352
- Paitan, Y., D. Biran, I. Biran, N. Shechter, R. Babai, J. Rishpon, E. Ron. 2003. On-line and in situ biosensors for monitoring environmental pollution. – *Biotechnol. Advances*, 22, 27-33
- Stoytcheva, M. 1994. Bioelectrocatalytic determination of some heavy metals and their influence on the catalytic activity of the immobilized acetylcholinesterase. – *Bull. Soc. Chim. Belge*, 103, 147-149
- Stoytcheva, M. 1994. Acetylcholinesterase based amperometric sensor – inhibitor detection. – *Anal. Letters*, 27, 3065-3080
- Stoytcheva, M. 1995. Acetylcholinesterase based amperometric sensor. – *Electroanalysis*, 7, 560-562
- Stoytcheva, M. 1995. Electrocatalysis with an acetylcholinesterase immobilized graphite electrode. – *Electroanalysis*, 7, 660-662
- Stoytcheva, M., V. Sharkova, M. Panayotova. 1998. Electrochemical approach in studying the inhibition of acetylcholinesterase by arsenate(III) – analytical characterization and application for arsenic determination. – *Anal. Chim. Acta*, 364, 195-201