

کاربرد نانوزیست حسگرها در تشخیص و تعیین مقدار عوامل بیماری‌زا در آب

مجتبی هادی، علی احسانی، مهدی صدیقی و رضا انصاری طادی

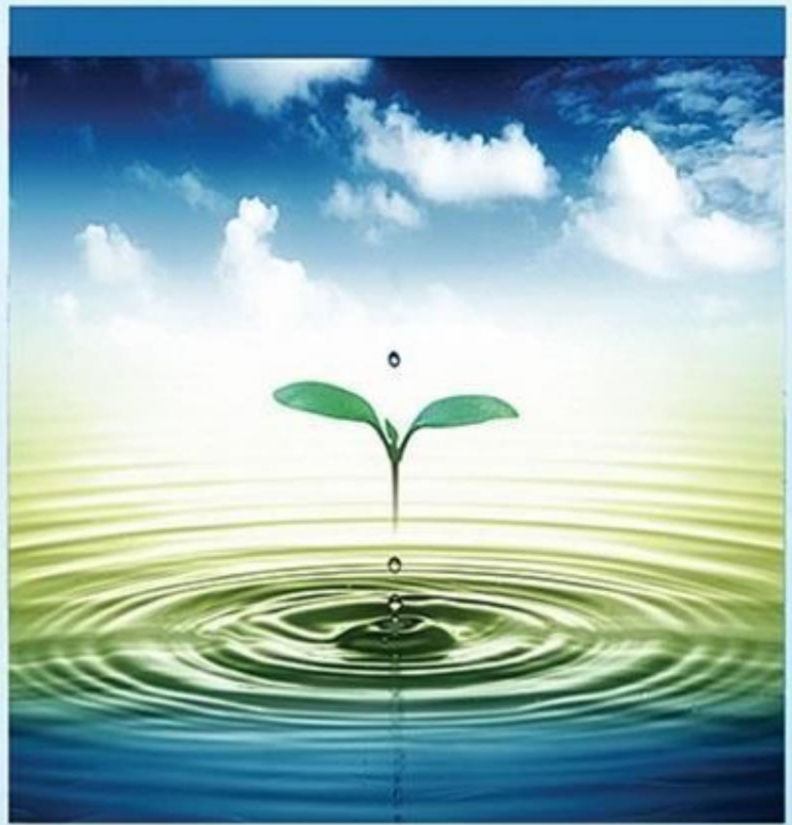
دوره ۴، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۷، صفحات ۳۶۸ - ۳۵۷

Vol. 4(4), Winter 2019, 357 - 368

DOI: 10.22034/jewe.2018.122305.1247

**Application of Nano-Biosensors in Detection
and Determination of Pathogens in Water**

Hadi M., Ehsani A., Sedighi M. and Ansari Tadi R.



www.jewe.ir

OPEN ACCESS

ارجاع به این مقاله: هادی م.، احسانی ع.، صدیقی م. و انصاری طادی ر. (۱۳۹۷). کاربرد نانوزیست حسگرها در تشخیص و تعیین مقدار عوامل بیماری‌زا در آب. مجله محیط‌زیست و مهندسی آب، دوره ۴، شماره ۴، صفحات: ۳۶۸ - ۳۵۷.

Citing this paper: Hadi M., Ehsani A., Sedighi M. and Ansari Tadi R. (2019). Application of nano-biosensors in detection and determination of pathogens in water. J. Environ. Water Eng., 4(4), 357- 368. DOI: 10.22034/jewe.2018.122305.1247

کاربرد نانو زیست حسگرها در تشخیص و تعیین مقدار عوامل بیماری‌زا در آب

مجتبی هادی^{۱*}، علی احسانی^۱، مهدی صدیقی^۲ و رضا انصاری طادی^۳

^۱ گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه قم، قم، ایران

^۲ گروه مهندسی شیمی، دانشکده‌ی مهندسی، دانشگاه قم، قم، ایران

^۳ مرکز کنترل کیفیت و بهداشت آب و فاضلاب، شرکت آب و فاضلاب استان قم، قم، ایران

*نویسنده مسئول: m.hadi@qom.ac.ir

مقاله مروری

تاریخ دریافت: [۱۳۹۶/۱۲/۲۰]

تاریخ بازنگری: [۱۳۹۷/۰۴/۱۸]

تاریخ پذیرش: [۱۳۹۷/۱۱/۰۷]

چکیده

در فرآیند تصفیه یا گندزدایی آب تشخیص سریع و پایش عوامل بیماری‌زا از جمله باکتری‌ها و ویروس‌ها به‌عنوان شاخص‌هایی مهم در کنترل کیفیت آب از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از طرفی، پایش و اندازه‌گیری پیوسته و تشخیص عوامل بیماری‌زا با مشکلاتی از جمله پایین بودن غلظت آن‌ها در آب و ناکافی بودن حساسیت روش‌های موجود، پیچیده بودن زمینه‌ی شیمیایی آب و عدم گزینش‌پذیری کافی روش‌های فعلی، و نیز عدم کارآمدی این روش‌ها در تشخیص سریع و پایش پیوسته و ارزان عوامل بیماری‌زا همراه بوده است. این موضوع اهمیت و لزوم توجه به علوم و فن‌آوری‌های جدید را در ساخت حسگرهای زیستی به‌منظور دست‌یابی به حساسیت، سرعت پاسخ، و گزینش‌پذیری بیش‌تر نشان می‌دهد. در این مقاله به‌طور مختصر رویکرد جدید علوم نانو و کاربرد مواد نانوساختاری در طراحی و ساخت حسگرهای زیستی جدید به‌منظور تشخیص و پایش عوامل بیماری‌زا در آب معرفی شده و مثال‌هایی نیز از کاربرد نانوزیست‌حسگرها ارائه شده است.

واژه‌های کلیدی: کنترل کیفیت آب؛ عوامل بیماری‌زا؛ مواد نانو ساختاری؛ نانو زیست حسگر.

ه هستند. شکل (۲-الف) به طور فرضی اتصال انتخابی یک آنتی‌بادی را با آنتی‌ژن‌های سطح باکتری ویژه آن آنتی‌بادی نمایش می‌دهد (Homann and Göringer 1999). شکل (۲-ب) نیز نمایشی از برهم‌کنش انتخابی یک آپتامر را با سلول باکتری هدف نشان می‌دهد (Homann and Göringer 1999). آپتامرها توالی‌های نوکلئوتیک اسید کوچکی هستند که تمایل و گزینش پذیری بالایی را نسبت به مولکول هدف نشان داده‌اند و اخیراً کاربرد آن‌ها به عنوان عوامل تشخیصی بسیار گزینش‌پذیر در ساخت زیست‌حسگرها مورد توجه است. شکل (۲-ج) نیز یک حسگر با عامل تشخیصی از نوع کربوهیدرات برپایه برهم‌کنش و اتصال بین کربوهیدرات مانوز با پروتئین ConA را در سطح سلول هدف *E. Coli* نشان می‌دهد (Shen et al. 2007). کربوهیدرات‌ها از جدیدترین عوامل تشخیصی هستند که اخیراً مورد توجه قرار گرفته‌اند. همچنین در برخی پژوهش‌ها، از برهم‌کنش رشته‌های پپتیدی ضد میکروبی با مناطقی از سطح سلول باکتری هدف برای ساخت زیست‌حسگر استفاده شده است. شکل (۲-د) نمایشی فرضی را از چنین برهم‌کنشی بین چند نوع رشته‌ی پپتیدی ضد میکروبی با سطح سلول باکتری *E. Coli O157:H7* نشان می‌دهد (Arcidiacono et al. 2008).

۴- نحوه عملکرد نانوزیست‌حسگرها

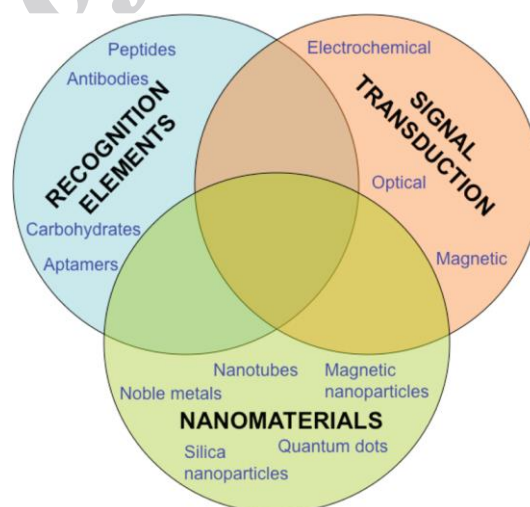
زمانی که برهم‌کنش انتخابی بین عامل تشخیصی و سلول هدف رخ می‌دهد، به منظور تشخیص و تعیین مقدار سلول هدف لازم است این برهم‌کنش به یک علامت مناسب تبدیل شود. در ساخت زیست‌حسگرهای جدید از مواد نانوساختاری از جمله نانوذرات فلزی، نانوذرات سیلیسیومی، نقاط کوانتومی، نانوذرات مغناطیسی، نانوساختارهای کربنی، و بسیاری مواد نانوساختاری دیگر (شکل ۱) به منظور تبدیل برهم‌کنش زیستی به یک علامت با حساسیت بالا استفاده شده است (Koedrith et al. 2015; Qu et al. 2013; Vikesland and Wigginton 2010). همان‌طور که اشاره شد، در طراحی یک نانوزیست‌حسگر عامل تشخیصی معمولاً به سطح ذرات نانوساختار متصل است. علامت ایجاد شده پس از برهم‌کنش عامل تشخیصی با سلول هدف بسته به نانوساختار مورد استفاده، معمولاً از نوع نوری، مغناطیسی، یا الکتروشیمیایی (شکل ۱) است. اندازه‌ی کوچک ذرات مواد

۱- مقدمه

به دلیل ارتباط مستقیم وجود عوامل بیماری‌زا از جمله باکتری‌ها و ویروس‌ها در آب با سلامت عمومی جامعه، تشخیص و پایش پیوسته‌ی این عوامل در آب پیش و پس از مرحله‌ی گندزدایی در تصفیه‌خانه‌ها اهمیت ویژه‌ای دارد. به دلیل ناکارآمدی و عدم گزینش‌پذیری روش‌های مرسوم در تشخیص و پایش سریع و ارزان این عوامل بیماری‌زا در آب، در سال‌های اخیر تلاش گسترده‌ای به منظور توسعه‌ی نانوزیست‌حسگرهای جدید با کاربرد مواد نانوساختاری در طراحی و ساخت آن‌ها انجام شده است (Koedrith et al. 2015; Qu et al. 2013; Hadi et al. 2016).

۲- اجزاء تشکیل دهنده‌ی نانوزیست‌حسگر

سه جزء اصلی در طراحی و ساخت نانوزیست‌حسگرها عبارتند از عامل تشخیصی، انتقال علامت، و ماده‌ی نانوساختاری (شکل ۱). عامل تشخیصی معمولاً به ماده‌ی نانوساختاری متصل است و برهم‌کنش عامل تشخیصی/ماده‌ی نانوساختاری با عامل بیماری‌زا با یک مکانیزم انتقال علامت کنترل می‌شود.



شکل ۱- اجزاء تشکیل دهنده‌ی نانوزیست‌حسگرها

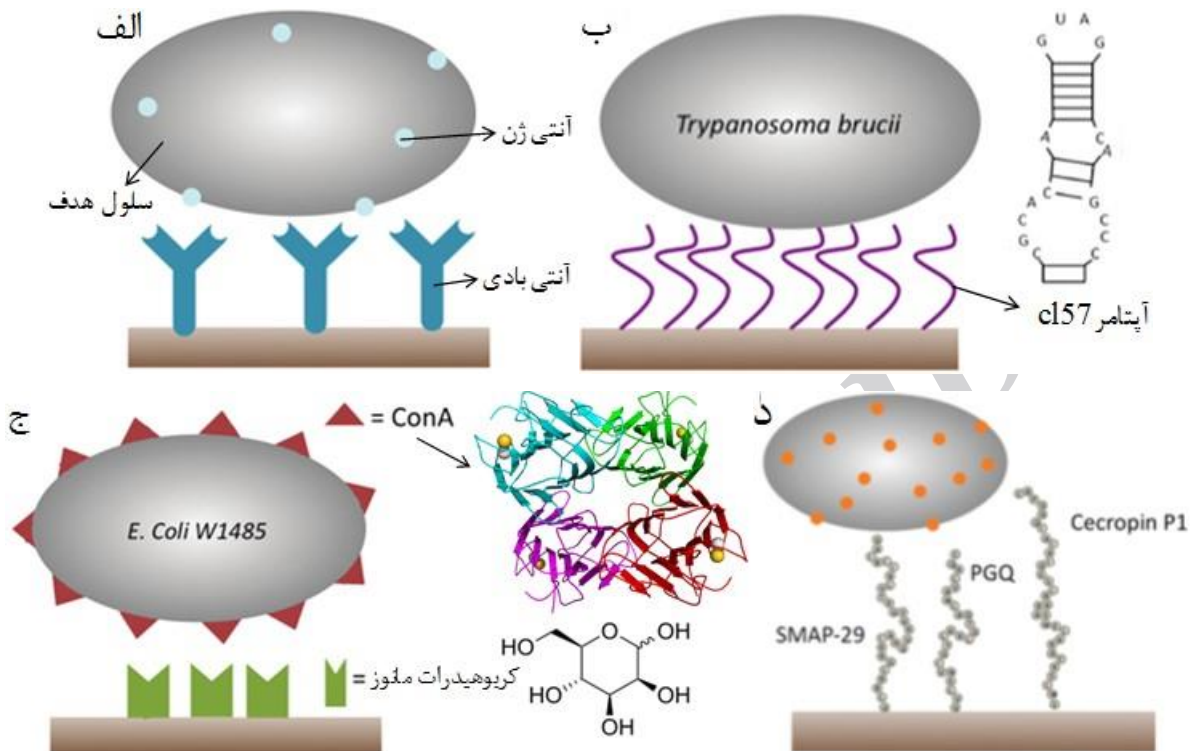
Fig. 1 Components of bio-nanosensors (Vikesland and Wigginton 2010)

۳- عوامل تشخیصی و برهم‌کنش انتخابی آن‌ها با سلول هدف

عوامل تشخیصی معمولاً مولکول‌های زیستی هستند که اتصال گزینش‌پذیری را با اپیتوپ‌های روی سطح سلول باکتری یا ویروس هدف برقرار می‌کنند. از پرکاربردترین عوامل تشخیصی در ساخت زیست‌حسگرها آنتی‌بادی‌ها

میکروبی یا ویروسی به‌طور قابل توجهی افزایش می‌دهد (Koedrith et al. 2015; Vikesland and Wigginton 2010).

نانوساختاری و به عبارتی نسبت سطح به حجم بالای آن‌ها و خواص فیزیکی-شیمیایی قابل کنترل نانوذرات که به اندازه، شکل، و ترکیب آن‌ها مرتبط است گزینش‌پذیری و حساسیت پاسخ نانوذرات نسبت به سگرها را نسبت به عوامل



شکل ۲- نمایش فرضی نحوه‌ی اتصال عوامل تشخیصی مختلف با سطح سلول هدف: الف- اتصال آنتی‌بادی با آنتی‌ژن (Homann and Göringner 1999)، ب- اتصال انتخابی آپتامر (Homann and Göringner 1999)، ج- اتصال کربوهیدرات مانوز با پروتئین ConA (Arcidiacono et al. 2008)، و د- اتصال انتخابی انواعی از پپتیدهای آنتی‌میکروبی (Shen et al. 2007)

Fig. 2 Schematic representation of different recognition elements interactions with the target cells: a) antibody/antigen-based, b) aptamer-based, c) manoze/ConA-based, and d) antimicrobial peptides-based interactions

نانوذره محتوی هزاران مولکول فلئورسان است. عامل تشخیصی، آنتی‌بادی ویژه‌ی سلول‌های هدف از نوع *E. coli O157* است که پس از اصلاح و آماده‌سازی شیمیایی سطح نانوذرات، با پیوند کووالانسی به سطح آن‌ها متصل شده است. شکل (۳-ب) تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از یک سلول *E. coli O157* را در محیط آبی محتوی نانوذرات مذکور نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است نانوذرات سطح سلول *E. coli O157* را به نحو موثری احاطه کرده‌اند. شکل (۳-ج) تصویر میکروسکوپ فلئورسان را از سلول *E. coli O157* در محیط آبی محتوی نانوذرات سیلیکا/آنتی‌بادی نشان می‌دهد.

۴-۱- نانوزیست‌حسگرهای با انتقال علامت نوری

انتقال علامت در نانوزیست‌حسگرهای نوری معمولاً بر اساس فلئورسانسی یا بر اساس پدیده‌ی تشدید پلاسمون سطحی استوار است (Comparelli et al. 2007; Vikesland and Wigginton 2010). اخیراً نانوذرات سیلیکای آرایش شده با مولکول‌های فلئورسان برای کاربردهای مختلف از جمله در ساخت نانوحسگرهای با انتقال علامت نوری بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (Wang et al. 2007; Yan et al. 2007). به‌عنوان مثال، شکل (۳-الف) تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری با بزرگ‌نمایی بالا را از نانوذرات سیلیکای آرایش‌شده با مولکول‌های با ویژگی فلئورسانسی قوی نشان می‌دهد (Zhao et al. 2004). هر

آبی پیچیده تشخیص داد (Zhao et al. 2004). شکل (۴) نحوه عملکرد یک زیست‌حسگر نوری حساس به ویروس Niikura et al.) را به طور فرضی نمایش می‌دهد (2009).

همان‌طور که مشخص است به دلیل احاطه‌ی سلول هدف با نانوذرات از طریق برهم‌کنش ویژه‌ی آنتی‌بادی با سلول هدف، فلئوئورسانسی شدیدی در سطح آن مشاهده می‌شود. بدین ترتیب، با کاربرد این روش، می‌توان با گزینش‌پذیری بسیار بالایی، حتی یک تک سلول هدف را در یک محیط



شکل ۳- (الف) تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از نانوذرات سیلیکای آرایش شده با مولکول‌های فلئوئورسان، (ب) یک سلول *E. Coli* در محیط آبی محتوی نانوذرات پیوند شده با آنتی‌بادی، (ج) تصویر میکروسکوپ فلئوئورسانسی از یک سلول *E. Coli* در محیط آبی محتوی نانوذرات سیلیکا/آنتی‌بادی (Zhao et al. 2004).

Fig. 3 a) Transmission electron microscope image of fluorescent molecules-doped silica nanoparticles. b) Scanning electron microscope image of *E. Coli* cell in aqueous environment containing nanoparticles conjugated with antibody. c) Fluorescence image of *E. Coli* cell in aqueous environment containing silica nanoparticles/antibody



شکل ۴- حسگر نوری ویروس JC، با عامل تشخیصی کربوهیدرات پیوند شده بر سطح نانوذرات طلا با سازوکار انتقال علامت نوری از نوع تشدید پلاسمون سطحی (Niikura et al. 2009)

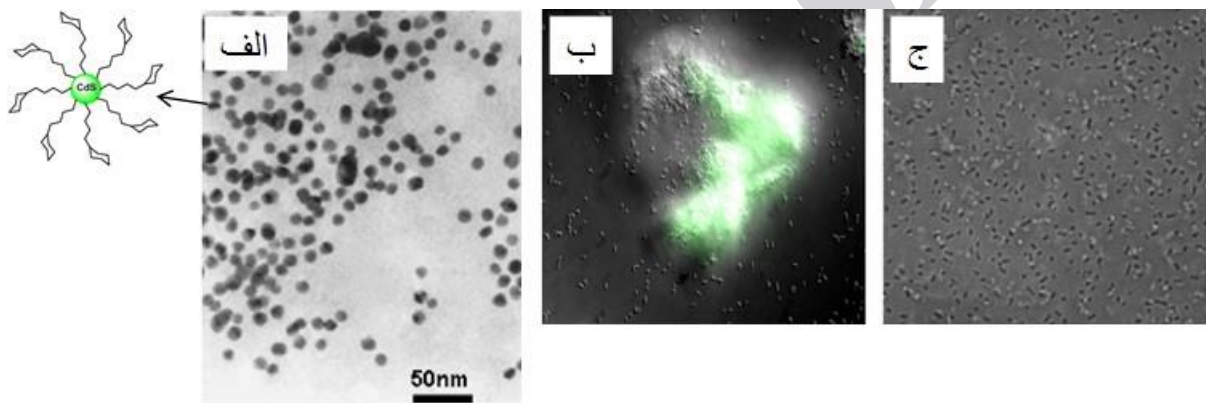
Fig. 4 Optical JC virus sensor based on carbohydrate recognition element-linked Au nano particles with the surface plasmon resonance optical signal transduction mechanism

اسید با پروتئین کپسید در سطح ویروس، همان‌طور که در شکل نمایش داده شده است، یک آرایش فضایی از نانوذرات طلا در سطح ویروس شکل می‌گیرد. این آرایش فضایی نانوذرات طلا در سطح ویروس هدف با ایجاد تغییراتی در ویژگی‌های نوری آن‌ها همراه است. بدین ترتیب که پیک جذبی تشدید پلاسمون سطحی نانوذرات طلا در محدوده‌ی مرئی به سمت طول موج‌های بلندتر (جابه‌جایی قرمز) جابه‌جا می‌شود. مشاهده‌ی این جابه‌جایی بیانگر وجود ذرات

سطح این ویروس شامل آرایه‌ی تکرارشونده‌ای از پروتئین کپسید است که می‌تواند با کربوهیدرات سیالیک‌اسید برهم‌کنش انتخابی داشته باشد. بدین ترتیب در این زیست‌حسگر از سیالیک‌اسید به‌عنوان عامل تشخیصی کربوهیدراتی استفاده شده است. تصویر سمت چپ یک نانو ذره‌ی طلا را با مولکول‌های سیالیک‌اسید که با روش شیمیایی به سطح آن متصل شده‌اند، به‌طور فرضی نشان می‌دهد. در مواجهه با ویروس JC، به دلیل برهم‌کنش و اتصال انتخابی سیالیک

همراه یک شکل فرضی از ساختار آن‌ها نشان می‌دهد. از این نانوذرات با حساسیت بالا برای تشخیص مقادیر کم باکتری *E. Coli ORN178* با روش میکروسکوپ فلئوئورسانسی استفاده شد. شکل ۵ب تصویر میکروسکوپ فلئوئورسانسی را برای این باکتری پس از تماس با نانوذرات مذکور نشان می‌دهد. برهم‌کنش و اتصال مولکول‌های مانوز در سطح این نانوذرات با سطح سلول‌های باکتری، سبب تجمع این سلول‌ها شده به طوری که ویژگی فلئوئورسانسی قابل توجهی را می‌توان در محل تجمع باکتری‌ها و به تبع آن‌ها نانوذرات CdS ملاحظه نمود. به منظور مقایسه، شکل ۵ج نتایج آزمایش مشابهی را با باکتری *E. Coli ORN178* نشان می‌دهد. به سبب عدم امکان اتصال سطح سلول‌های این باکتری با کربوهیدرات مانوز، پاسخ مشابهی با این باکتری مشاهده نشد (Mukhopadhyay et al. 2009).

ویروس و میزان این جابه‌جایی معیاری از غلظت ویروس هدف در محیط آبی خواهد بود (Niikura et al. 2009). در مقایسه با رنگ‌های فلئوئورسان، ویژگی فلئوئورسانسی قوی‌تر نانوذرات نقاط کوانتومی سبب شده است تا در ساخت زیست‌حسگرها مورد توجه قرار گیرند (Medintz et al. 2006; Yang and Li 2005). به عنوان مثالی از کاربرد نقاط کوانتومی در اندازه‌گیری باکتری‌ها در یک پژوهش از نانوذرات CdS و از کربوهیدرات مانوز به عنوان عامل تشخیصی استفاده شد (Mukhopadhyay et al. 2009). با یک روش ساده‌ی شیمی مرطوب و در یک مرحله، نانوذرات CdS تهیه شده و سطح آن‌ها با مولکول‌های مانوز پیوند داده شد. شکل ۵الف یک تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری را از نانوذرات پیوند شده با کربوهیدرات به



شکل ۵- (الف) تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از نانوذرات CdS پیوند شده با مولکول‌های کربوهیدرات مانوز. تصویر میکروسکوپ فلئوئورسانسی از برهم‌کنش (ب) باکتری *E. Coli ORN178* و (ج) باکتری *E. Coli ORN208* با نانوذرات مذکور (Mukhopadhyay et al. 2009)

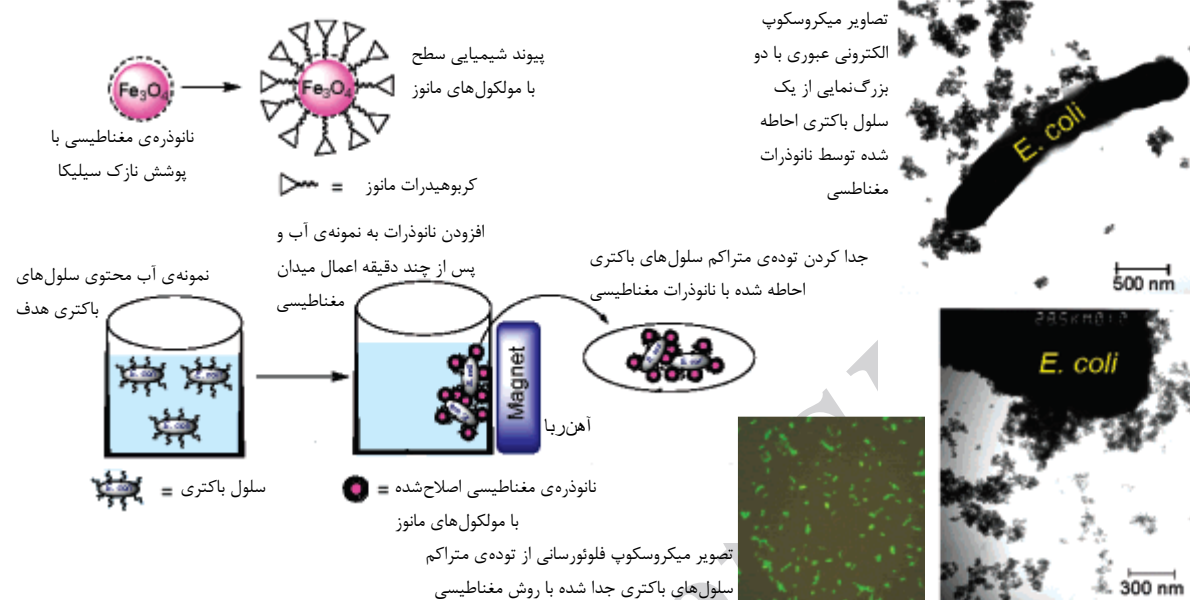
Fig. 5 a) Transmission electron microscope image of manoze carbohydrate-linked CdS nanoparticles. Fluorescence images of interactions of b) *E. Coli ORN178* cells and c) *E. Coli ORN208* cells with manoze/CdS particles

می‌دهد که سطح هر نانوذره با روش شیمیایی به تعدادی مولکول‌های کربوهیدرات مانوز (عامل تشخیصی) با پیوند کووالانسی متصل شده است. این نانوذرات سپس برای مدت کوتاهی در محلول محتوی سلول‌های هدف (*E. Coli*) پخش می‌شوند. در تصاویر میکروسکوپی الکترونی در شکل (۶) به روشنی اتصال نانوذرات/کربوهیدرات را به سطح سلول هدف *E. Coli* بر اساس برهم‌کنش کربوهیدرات مانوز با پروتئین‌های سطح سلول‌ها می‌توان مشاهده کرد. کوچکی اندازه‌ی نانوذرات سبب می‌شود که اجرای این روش آنالیزی

۴-۲- نانو زیست حسگرهای بر اساس نانوذرات مغناطیسی

اخیراً کاربرد نانوذرات مغناطیسی در طراحی و ساخت نانوحسگرها بسیار مورد توجه بوده است (Laurent et al. 2008; Olsvik et al. 1994). به عنوان مثال شکل (۶) به‌طور فرضی یک نانوذره را از جنس آهن اکسید (Fe_3O_4) نشان می‌دهد (El-Boubbou et al. 2007). سطح این نانوذره به‌منظور آسان‌نمودن اصلاح شیمیایی آن با لایه‌ی بسیار نازکی از سیلیکا پوشانده شده است. شکل (۶) نشان

مشاهده و شمارش آن‌ها با میکروسکوپ فلئوئورسانسی (شکل ۶) تخمین زد. این روش امکان اندازه‌گیری سریع سلول‌های هدف را با حداقل غلظت Cell/ml ۱۰۰۰۰ از نمونه‌ی آب فراهم می‌آورد (El-Boubbou et al. 2007).

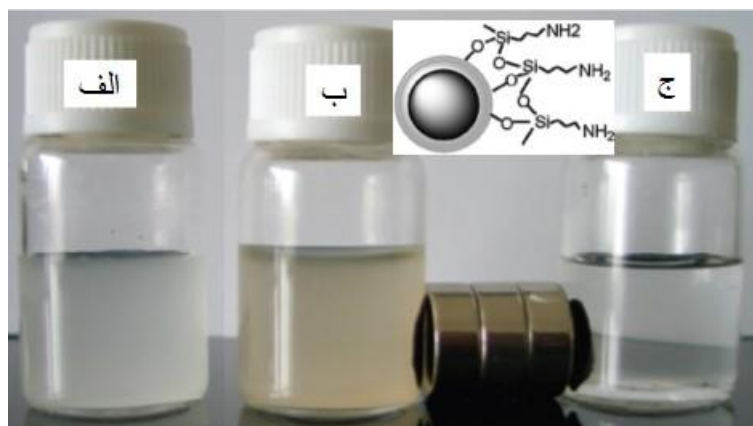


شکل ۶- کاربرد نانوذرات مغناطیسی در ساخت حسگر سلول *E. Coli* با عامل تشخیصی کربوهیدرات و تصاویر میکروسکوپ الکترونی از چگونگی برهم‌کنش نانوذرات عامل تشخیصی با سطح سلول هدف و تصویر میکروسکوپ فلئوئورسانسی از توده‌ی سلول‌های جدا شده با روش مغناطیسی (El-Boubbou et al. 2007).

Fig. 6 Applications of magnetic nanoparticles in fabrication of *E. Coli* sensor with carbohydrate recognition element and electron microscope images of interaction of nanoparticles/recognition element with the surface of target cells and fluorescence microscope image of concentrated bacterial cells separated by magnetic method

به pH نمونه آب که در ۷ تنظیم شده است) در سطح نانوذرات با مکان‌های با بار منفی در سطح باکتری‌ها مربوط با شد (Huang et al. 2010). در شکل (۷) (هر دو حالت ب و ج) به‌وسیله یک آهن‌ربا تحت میدان مغناطیسی قرار گرفته‌اند و pH آب ۷ است. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که در برخی موارد حتی یک مولکول ساده‌ی آمین‌دار نیز می‌تواند قابلیت اتصال خوبی را با سطح سلول باکتری برقرار نماید. همان‌طور که قبلاً نیز اشاره شد می‌توان به جای آنتی‌بادی‌ها یا آپتامرها به‌عنوان عوامل متصل‌شونده به سطح سلول باکتری، از مولکول‌های دیگر مانند کربوهیدرات‌ها و رشته‌های پپتیدی نیز استفاده کرد. استفاده از مولکول‌های ساده‌تر در مقایسه با آنتی‌بادی‌ها و آپتامرها، هرچند ویژگی گزینش‌پذیری کم‌تری دارد اما کم‌هزینه‌تر و پایداری بیشتری خواهد داشت.

در پژوهشی دیگر از نانوذرات Fe₃O₄ با سطح عامل‌دار شده با گروه آمینی برای جدا کردن برخی باکتری‌های آب استفاده شد (Huang et al. 2010). تصویر درونی شکل (۷) نمایشی است فرضی از ساختار کروی یک نانوذره مغناطیسی Fe₃O₄ عامل‌دار شده با گروه‌های آمین‌دار. تهیه‌ی این نانوذرات و عامل‌دار کردن سطح آن‌ها با یک روش ساده شیمی مرطوب انجام پذیرفت. تصویر الف در شکل (۷)، آب محتوی باکتری *E. Coli* و تصاویرهای ب و ج مربوط به زمانی است که به ترتیب نانوذرات غیرعامل‌دار شده و نانوذرات عامل‌دار شده در نمونه آب پراکنده شده و سپس با اعمال یک میدان مغناطیسی جدا شده‌اند. مقایسه‌ی نمونه آب تصویر ج با تصویر ب در شکل (۷) به روشنی قابلیت اتصال نانوذرات عامل‌دار شده را با باکتری‌های موجود در آب نشان می‌دهد. این قابلیت اتصال شاید به جاذبه‌ی بین بار مثبت عامل‌های آمینی (با توجه



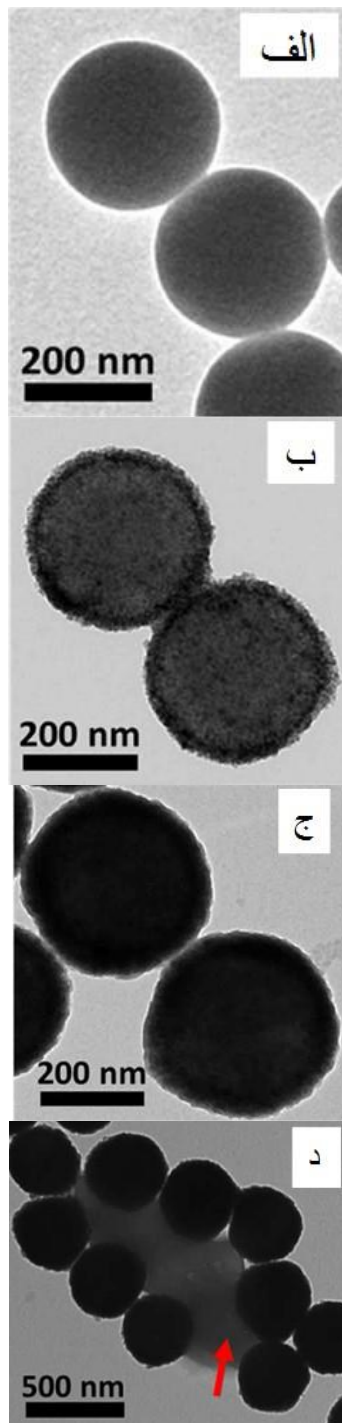
شکل ۷- نمایشی فرضی از نانوذره مغناطیسی عامل‌دار شده، الف- نمونه آب محتوی باکتری *E. Coli*، ب- نمونه آب محتوی باکتری و نانوذرات مغناطیسی عامل‌دار شده، ج- نمونه آب محتوی باکتری و نانوذرات مغناطیسی غیر عامل‌دار شده و ج- نمونه آب محتوی باکتری و نانوذرات مغناطیسی غیر عامل‌دار شده. Both b and c are subjected to an applied magnetic field (pH = 7).

در شکل (۸-۵) یک باکتری *Salmonella typhimurium* را نشان می‌دهد که به‌نحو موثری به‌وسیله تعدادی از نانوذرات مغناطیسی احاطه شده است. پس از مرحله جداسازی باکتری‌ها، اندازه‌گیری آن‌ها در این پژوهش با روش معمول اسپکتروسکوپی فلورسانسی انجام پذیرفت. استفاده از ذرات مغناطیسی در جداسازی موثر باکتری‌ها، نیاز به مراحل طولانی کشت باکتری را قبل از اندازه‌گیری‌ها آن مرتفع می‌نماید.

۴-۳- نانوزیست‌حسگرهای با مکانیزم انتقال علامت الکتروشیمیایی

نانوزیست‌حسگرهای از نوع ترانزیستورهای اثر میدانی را می‌توان در این گروه جای داد. به‌عنوان مثال، شکل (۹-الف) به‌طور فرضی ساختار و نحوه‌ی عملکرد را در یک نوع حسگر سلول *E. Coli DH5a* نشان می‌دهد (So et al. 2008). ساخت این حسگر اثر میدانی با روش فوتولیتوگرافی انجام شده و بینابین دو الکتروود ترانزیستور با فاصله‌ی $5 \mu\text{m}$ معمولاً یک تا چهار نانولوله‌ی کربنی پل ارتباطی ایجاد می‌کنند (شکل ۹-الف). عامل تشخیصی آپتامر ویژه‌ی سلول هدف *E. Coli DH5a* است که دیواره‌های جانبی نانولوله‌های کربنی با روش شیمیایی به این آپتامر پیوند شده است. شکل (۹-ب) بیانگر تغییرات هدایت الکتریکی نانولوله‌ی کربنی در مواجهه با سلول هدف است. در اثر برهم‌کنش انتخابی آپتامر با سلول هدف، هدایت الکتریکی نانولوله‌ی کربنی دستخوش تغییر شده و همان‌طور که از شکل

اندازه‌ی ذرات مغناطیسی نقش موثری در سرعت و کارایی آن‌ها در جداسازی باکتری‌های هدف خواهد داشت طوری که اندازه‌ی درشت‌تر ذرات، هرچند با جداسازی سریع‌تر آن‌ها در میدان مغناطیسی همراه است، اما کارایی آن‌ها را در به‌دام انداختن باکتری‌های هدف کاهش می‌دهد و کاهش اندازه‌ی ذرات مغناطیسی نیز از دیگر سو با نتایجی معکوس همراه است. در یک پژوهش با تهیه‌ی چند مرحله‌ای و لایه‌به‌لایه‌ی نانوذرات مغناطیسی روی بستر نانوذرات کروی پلیمری، توانسته‌اند ذرات مغناطیسی را با ابعادی کنترل شده‌تر تهیه نمایند (Wen et al. 2017). شکل (۸) تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری را از نانوذرات کروی پلیمری (الف) پیش و (ب) پس از نشان دادن یک لایه‌ی نازک از پلیمر پلی‌اتیلن‌ایمین و سپس لایه‌ی نازکی از نانوذرات Fe_3O_4 روی سطح آن‌ها نشان می‌دهد. با تکرار لایه‌نشانی لایه‌ی پلیمری و سپس لایه‌ی Fe_3O_4 تا ۴ بار متوالی، ذرات مغناطیسی کروی (شکل ۸ تصویر ج) با اندازه‌های بهینه و مطلوب تهیه شد. سپس سطح این نانوذرات با آنتی‌بادی به‌عنوان عامل تشخیصی پیوند داده شد. در این روش از ذرات مغناطیسی برای جداسازی باکتری *Salmonella typhimurium* استفاده شد که هم سرعت مطلوبی را در جداسازی با میدان مغناطیسی داشتند و هم کارایی بالایی را در به‌دام انداختن باکتری‌ها نشان دادند طوری که تنها پس از حدود ۲۰ min اعمال میدان مغناطیسی، تقریباً تمامی باکتری‌های نمونه به‌همراه نانوذرات جدا شدند (Wen et al. 2017). پیکان قرمز رنگ



شکل ۸- تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از بسترهای کروی پلیمری (الف) قبل و (ب) پس از یک مرحله و (ج) پس از چهار مرحله متوالی لایه‌نشانی پلیمر پلی‌اتیلن‌ایمین و Fe_3O_4 . (د) تصویر یک باکتری که توسط تعدادی از نانوذرات مغناطیسی احاطه شده است (Wen et al. 2017)

Fig. 8 Transmission electron microscope images of spherical polymeric substrates a) before and b) after one step and c) after four successive steps of polyethyleneimine/ Fe_3O_4 deposition. Image of a bacterial cell surrounded by some magnetic nanoparticles

مشخص است، با افت جریان عبوری از ترانزیستور همراه است. تصویر داخلی در شکل (۹-ب) تصویری میکروسکوپی را از دو سلول هدف *E. Coli DH5a* در سطح نانولوله‌ی کربنی/آپتامر نمایش می‌دهد. در این روش، میزان کاهش جریان عبوری از ترانزیستور می‌تواند به‌عنوان یک علامت خروجی و معیاری از تشخیص و تعیین مقدار سلول هدف *E. Coli DH5a* در نظر گرفته شود (So et al. 2008).

کاربرد نانوذرات فلزی پیوند شده با عامل تشخیصی و سپس استفاده از روش‌های حساس ولتامتری را می‌توان به‌عنوان مثالی دیگر از روش‌های مبتنی بر مکانیزم انتقال علامت الکتروشیمیایی معرفی کرد (Liébana et al. 2014; Merkoçi 2007; Wang 2007). در یک پژوهش از نانوذرات طلا پیوند شده با آنتی‌بادی برای اندازه‌گیری و تشخیص باکتری *Salmonella typhi* استفاده شد (Dungchai et al. 2008). مراحل انجام روش در شکل (۱۰) نمایش داده شده است. همان‌طور که در شکل مشخص است، نخست مولکول‌های آنتی‌بادی به‌مقدار کافی روی سطح بستر پیوند شده‌اند. سپس سطح پیوند شده با آنتی‌بادی برای مدتی مشخص با نمونه‌ی آب محتوی باکتری تماس داده می‌شود. پس از شستشو و در مرحله‌ی بعد محلول محتوی نانوذرات طلا پیوند شده با آنتی‌بادی برای مدت کافی با سطح مذکور تماس داده می‌شود. همان‌طور که از شکل (۱۰) مشخص است، پس از شستشو، تماس سطح با محلول محتوی آسکوربیک اسید و یون‌های مس، با کاهش الکتروشیمیایی یون‌های مس دو ظرفیتی در اثر ویژگی کاهندگی آسکوربیک اسید و شکل‌گیری لایه‌ی نازکی از فلز مس روی سطح نانوذرات طلا همراه خواهد بود. پس از شستشوی باقیمانده‌ی محلول مذکور، این لایه‌ی مس در تماس با حجم معینی از محلول اسید نیتریک و در اثر ویژگی اکسندگی الکتروشیمیایی اسید نیتریک، دوباره به‌صورت یون‌های مس دو ظرفیتی اکسید شده و به محلول وارد می‌شود. در مرحله‌ی نهایی، یون‌های مس در محلول مذکور با روش الکتروشیمیایی ولتامتری برهنه‌سازی آندی و در یک سیستم سه الکترودی و با الکتروود کار از جنس کربن شیشه‌ای اندازه‌گیری می‌شوند.

Fig. 10 Representation of some of the measuring steps of *Salmonella typhi* cells with electrochemical signal transduction mechanism

با روش درجه‌بندی می‌توان اندازه‌ی علامت ولتامتری برهنه-سازی آن‌دی یون‌های مس را به مقدار غلظت باکتری در نمونه‌ی آب مرتبط نمود.

۵- نتیجه‌گیری

در این نوشتار به‌طور مختصر نانوزیست‌حسگرها، اجزاء تشکیل‌دهنده و ساختار آن‌ها، عوامل تشخیصی و نحوه‌ی برهم‌کنش آن‌ها با سلول‌های هدف، و نحوه‌ی عملکرد و مکانیزم انتقال علامت در آن‌ها به‌طور مختصر معرفی شد.

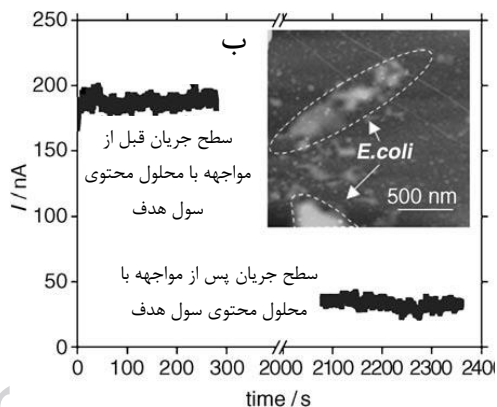
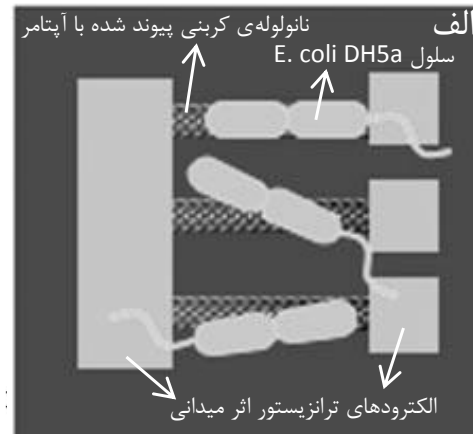
۱- مکانیزم‌های انتقال علامت در نانوزیست‌حسگرها از جمله مکانیزم‌های نوری، مغناطیسی، و الکتروشیمیایی معرفی شده و انواع عوامل تشخیصی از جمله آنتی‌بادی‌ها، کربوهیدرات‌ها، آپتامرها، و برخی رشته‌های پپتیدی که معمولاً به ماده‌ی نانساختاری متصل می‌شوند معرفی شدند.

۲- هم‌چنین در دنباله و به منظور فراهم‌کردن یک آشنایی مقدماتی، مثال‌هایی از برخی انواع نانوزیست‌حسگرها در تشخیص و تعیین مقدار عوامل بیماری‌زا در آب ارائه شد. در این مثال‌ها به کاربرد انواعی از مواد نانساختاری از جمله نانوذرات فلزی، نقاط کوانتومی، نانوذرات سیلیسیومی، نانوذرات مغناطیسی، و برخی نانساختارهای کربنی در ساخت نانوزیست‌حسگرها اشاره شد.

۳- این مثال‌ها نشان دادند که پژوهش‌ها در زمینه‌ی نانوزیست‌حسگرها در سال‌های اخیر ظرفیت خوبی را جهت توسعه‌ی روش‌های با کارایی، حساسیت، سرعت عمل، و گزینش‌پذیری مطلوب برای تشخیص و تعیین مقدار عوامل بیماری‌زا در آب فراهم نموده است.

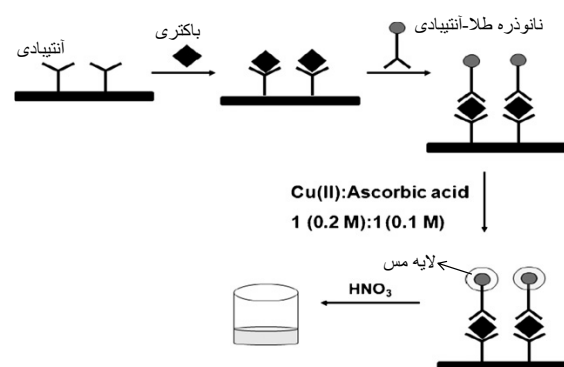
۶- تشکر و قدردانی

بخش‌هایی از این مقاله حاصل بخشی از نتایج مطالعات طرح پژوهشی مورد اشاره در مرجع (Hadi et al. 2016) است و به همین منظور از شرکت آب و فاضلاب شهری استان قم به دلیل حمایت از طرح پژوهشی مذکور تشکر و قدردانی می‌گردد.



شکل ۹- حسگر سلول *E. Coli DH5a* از نوع ترانزیستورهای اثر میدانی با عامل تشخیصی آپتامر سلول هدف پیوند شده با نانولوله‌های کربنی (So et al. 2008).

Fig. Field effect transistor *E. Coli DH5a* cell sensor with aptamer recognition element-linked carbon nanotubes



شکل ۱۰- نمایش بخشی از مراحل اندازه‌گیری باکتری *Salmonella typhi* با مکانیزم انتقال علامت الکتروشیمیایی (Dungchai et al. 2008)

References

- Arcidiacono S., Pivarnik P., Mello C. M. and Senecal A. (2008). Cy5 labeled antimicrobial peptides for enhanced detection of *Escherichia coli* O157: H7. *Biosens. Bioelect.*, 23, 1721-1727.
- Comparelli R., Curri M. L., Cozzoli P. D. and Striccoli M. (2007). Optical biosensing based on metal and semiconductor colloidal nanocrystals. *Nanotech. Life Sci., C.S. Kumar* (Ed.), doi:10.1002/9783527610419.ntls0086
- Dungchai W., Siangproh W., Chaicumpa W., Tongtawe P. and Chailapakul O. (2008). *Salmonella typhi* determination using voltammetric amplification of nanoparticles: a highly sensitive strategy for metalloimmunoassay based on a copper-enhanced gold label. *Talanta*, 77(2), 727-732.
- El-Boubbou K., Gruden C. and Huang X. (2007). Magnetic glyco-nanoparticles: a unique tool for rapid pathogen detection, decontamination, and strain differentiation. *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 13392-13393.
- Hadi M., Sedighi M. and Ehsani A. (2016). Evaluation of nanotechnology methods in improving and increasing the efficiency of water and wastewater treatment processes. Final Report, Water and Wastewater Co. Qom, Iran [In Persian].
- Homann M. and Göringer H. U. (1999). Combinatorial selection of high affinity RNA ligands to live African trypanosomes. *Nucleic acids Res.*, 27, 2006-2014.
- Huang Y-F., Wang Y-F. and Yan X-P. (2010). Amine-functionalized magnetic nanoparticles for rapid capture and removal of bacterial pathogens. *Environ. Sci. Technol.*, 44, 7908-7913.
- Koedrith P., Thasiphu T., Weon J-I., Boonprasert R., Tuitemwong K. and Tuitemwong P. (2015). Recent trends in rapid environmental monitoring of pathogens and toxicants: potential of nanoparticle-based biosensor and applications. *Sci. World J.*, 2015, 510982.
- Laurent S., Forge D., Port M., Roch A., Robic C., Vander Elst L. and Muller R. N. (2008). Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem. Rev.*, 108, 2064-2110.
- Liébana S., Brandão D., Alegret S. and Pividori M. I. (2014). Electrochemical immunosensors, genosensors and phagosensors for *Salmonella* detection. *Analyt. Methods*, 6, 8858-8873
- Medintz I. L., Uyeda H. T., Goldman E. R. and Mattoussi H. (2005). Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat. Mater.*, 4, 435-446.
- Merkoçi A. (2007). Electrochemical biosensing with nanoparticles. *FEBS J.*, 274, 310-316.
- Mukhopadhyay B., Martins M. B., Karamanska R., Russell D. A. and Field R. A. (2009). Bacterial detection using carbohydrate-functionalised CdS quantum dots: a model study exploiting *E. coli* recognition of mannosides. *Tetrahedron Lett.*, 50, 886-889.
- Niikura K., Nagakawa K., Ohtake N., Suzuki T., Matsuo Y., Sawa H. and Ijiro K. (2009). Gold nanoparticle arrangement on viral particles through carbohydrate recognition: a non-cross-linking approach to optical virus detection. *Biocon. Chem.*, 20, 1848-1852.
- Olsvik O., Popovic T., Skjerve E., Cudjoe K. S., Hornes E., Ugelstad J. and Uhlen M. (1994). Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. *Clinic. Microb. Rev.*, 7, 43-54.
- Qu X., Alvarez P. J. and Li Q. (2013). Applications of nanotechnology in water and wastewater treatment. *Water Res.*, 47, 3931-3946.
- Shen Z., Huang M., Xiao C., Zhang Y., Zeng X. and Wang P. G. (2007). Nonlabeled quartz crystal microbalance biosensor for bacterial detection using carbohydrate and lectin recognitions. *Analyt. Chem.*, 79, 2312-2319.
- So H-M., Park D-W., Jeon E-K., Kim Y-H., Kim B-S., Lee C-K., Choi S-Y., Kim S-C., Chang H. and Lee J-O. (2008) Detection and titer estimation of *Escherichia coli* using aptamer- functionalized single-

- walled carbon- nanotube field- effect transistors. *Small*, 4, 197-201.
- Vikesland P. J. and Wigginton K. R. (2010). Nanomaterial enabled biosensors for pathogen monitoring-a review. *Environ. Sci. Technol.*, 44, 3656-3669.
- Wang J. (2007). Nanoparticle- based electrochemical bioassays of proteins. *Electroanal.*, 19, 769-776.
- Wang L., Zhao W., O'Donoghue M. B., Tan W. (2007). Fluorescent nanoparticles for multiplexed bacteria monitoring. *Biocon. Chem.*, 18, 297-301
- Wen C-Y., Jiang Y-Z., Li X-Y., Tang M., Wu L.-L., Hu J., Pang D. W. and Zeng J-B. (2017) Efficient enrichment and analyses of bacteria at ultralow concentration with quick-response magnetic nanospheres. *ACS Appl. Mater. Interfaces.*, 9, 9416-9425.
- Yan J., Estévez M. C., Smith J. E., Wang K., He X., Wang L. and Tan W. (2007). Dye-doped nanoparticles for bioanalysis. *Nano Today*, 2, 44-50.
- Yang L. and Li Y. (2006). Simultaneous detection of *Escherichia coli O157:H7* and *Salmonella Typhimurium* using quantum dots as fluorescence labels. *Analyst*, 131, 394-401.
- Zhao X., Hilliard L. R., Mechery S. J., Wang Y., Bagwe R. P., Jin S. and Tan W. (2004). A rapid bioassay for single bacterial cell quantitation using bioconjugated nanoparticles. *Proceed. National Academy Sci.*, 101, 15027-15032.

Archive of SID

Application of Nano-biosensors in Detection and Determination of Pathogens in Water- A minireview

Mojtaba Hadi^{1*}, Ali Ehsani¹, Mehdi Sedighi² and Reza Ansari Tadi³

¹Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Qom, Qom, Iran

²Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, University of Qom, Qom, Iran

³Quality Control Department, Qom Province Water and Wastewater Company, Qom, Iran

*Corresponding author: m.hadi@qom.ac.ir

Review Paper

Received: March 11, 2018

Revised: July 09, 2018

Accepted: January 27, 2019

Abstract

In water disinfection and treatment, rapid detection and monitoring of pathogens such as bacteria and viruses, as important water quality indices, are of prime importance. On the other hand, continuous monitoring and detection of pathogens have encountered the problems such as low concentration of bacteria and viruses in water, low sensitivity of the conventional detection methods, complex sample matrices and insufficient selectivity of the conventional methods, and inability of these methods in fast and cheap detection and continuous monitoring of pathogens. These indicate the importance of considering new sciences and technologies in fabrication of biosensors in order to achieve higher sensitivity, response rapidity, and selectivity. In this paper, briefly, new nanoscience approach and application of nanostructured materials in design and fabrication of nanobiosensors in order to detecting and monitoring of bacteria and viruses in water have been introduced and some examples of the applications of nanobiosensors have been also presented.

Keywords: Nano-Biosensor; Nano-structured Materials; Pathogens; Water Quality Control.