طراحی نانو بیوسنسور پلیمر قالب ملکولی مبتنی بر پتانسیومتری جهت تشخیص اگزوتوکسین باکتری استافیلوکوکوس ارئوس

حامد اهری[a*]، ودود رضویلر[b]، بهروز اکبری آدرگانی[c]، عباسعلی مطلبی[b]

[a] مربی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، تهران، ایران
[b] استاد دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، تهران، ایران
[c] دانشیار مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران

Archive of SID

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۹/۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۱۲/۲

چکیده

مقدمه: باتوجه به رشد روزافزون جمعیت و صنعتی شدن سیرتکاملی حیات بشر، تشخیص سموم تولید شده در مواد غذائی با استفاده از روش‌های سنتی دشوار بوده چرا که از لحاظ زمانی، مدت بررسی کیفیت طولانی شده و مقرون به صرفه نبوده و حتی در بسیاری از موارد دقت روش‌های کاربردی همچون محیط کشت باکتریائی و غیره دارای خطای آزمایشگاهی می‌باشد، لذا با پیشرفت تکنولوژی نانو، طراحی سنسورهای انتخابی و هوشمند، تحولی بزرگ در صنعت کنترل کیفی مواد غذائی محسوب می‌شود که هم در زمانی کوتاه و هم با دقتی بسیار بالا می تواند تشخیص توکسین باکتری‌ها را انجام دهد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق از مونومرهای متااکریلیک اسید برای تهیه قالب ملکولی و تهیه پلیمر استفاده گردیده شدکه با پیوند کوالانسی بین مونومرهای متااکریلیک اسید (MAA) پلیمری سفید تشکیل شده، همچنین پیوند هیدروژنی بین اسید آمینه اگزوتوکسین و متااکریلیک اسید بوجود می‌آید که عامل جذب انتخابی آن خواهد بود.

یافته‌ها: نتایج بدست آمده حاکی ا زآن است که تا رقت 10^{-3} مولار از رقت توکسین باکتری مذکور توسط سنسور پلیمر قالب ملکولی قابل تشخیص می‌باشد و رقت‌های رقیق‌تر قابل ردیابی نمی‌باشد، همچنین حساسیت سنسور تا ۶۰ روز مورد آزمون قرارگرفت که سنسور مبتنی بر پلیمر قالب ملکولی تا ۲۸ روز مورد تائید بوده و بعد از زمان مذکور رو به کاهش قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: اگرچه حساسیت تکنیک پائین بوده ولی دقت مراحل عالی بوده برنامه‌ریزی می‌شود تا جهت افزایش حساسیت تست روش دیگری طراحی گردد.

واژه‌های کلیدی: *اگزوتوکسین استافیلوکوکوس ارئوس، سنسور پلیمرقالب ملکولی، نانوحسگر*

[*] نویسنده مسئول مکاتبات email: Dr.h.ahari@Gmail.com

www.SID.ir

مقدمه

سالانه معادل میلیاردها دلار هزینه دور ریز و خروج مواد غذائی فساد یافته از چرخه صنعت غذا می باشد که به دلایل متعددی همچون نقل و انتقالات طولانی جاده ای و هوائی و یا دیرکرد جواب غیرقطعی آزمون‌های کنترل کیفی آزمایشگاه‌های همکار و مرجع صورت می‌گیرد، این دیرکرد خود بدلیل استفاده از روش‌های استاندارد مرسوم و نیز جواب‌های منفی کاذب که در بسیاری ازموارد توکسین باکتری در نمونه باقی است ایجاد می‌گردد (Ravetz *et al*., 2013; Murakami, 2013).

با توجه به زمان مورد نیاز جهت رویت نتایج حاصل از کشت میکروبی در مبحث کنترل کیفی مواد غذائی قطع بر یقین مدت زمان معادل ۴۸ ساعت و در خصوص برخی از پاتوژن‌ها که نیاز به پیش غنی‌سازی و غنی‌سازی دارند همچون سالمونلا به یک هفته هم نیازمند می باشیم تا در نهایت نتایج تشخیص اولیه حاصل گردد. استفاده از بیوسنسورها و نانوبیو سنسورها بسیار ارزشمند می‌باشد، زیرا در بسیاری از کارخانجات مواد غذائی در بخش تحقیقات و توسعه و نیز بخش کنترل کیفی زمان لازم برای نگهداری مواد و اعلام نتایج آزمون جهت عدم تائید و یا تائید محصول برای عرضه به مصرف کننده بسیار طولانی است. این موضوع سبب کاهش زمان ماندگاری و از طرفی بصورت غیر مستقیم سبب خسارت وارده به تولید کننده می گردد. این مهم در حالی است که در گرایش‌های متعدد صنایع غذائی همچون صنایع لبنی و یا صنایع گوشتی بسیار متفاوت‌تر از صنایعی همچون غلات و حبوبات و روغن و کنسرو و غیره می‌باشد لذا زمان در امر تشخیص بسیار کلیدی و حائز اهمیت در بحث سیستم‌های کنترل کیفیت و نیز برگشت سرمایه برای تولید کننده می‌باشد (Santana Porben, 2012).

تولید ماده غذایی سالم یکی از مهمترین دغدغه‌های موجود در صنعت غذاست. امروزه مصرف کنندگان خواهان غذایی هستند که حداقل فرآوری روی آن انجام شده باشد و عاری از انواع میکروارگانیسم، ماده افزودنی و مواد نگهدارنده بوده و در عین حال زمان ماندگاری بیشتری را داشته باشد که این مهم به کمک بیوسنسورها ممکن گردیده است (Hamrin and Hoeft, 2012).

از مهمترین بخش‌های صنعت تمام کشورها که با صنایع غذایی در ارتباط است امنیت غذایی می‌باشد. استفاده از فناوری‌های نوین در این بخش رویکرد جدیدی است که بسیار مورد توجه قرار می‌گیرد. همگرایی فناوری نانو و علم غذا منجر به بروز قابلیت‌های فراوانی می‌شود که همین امر باعث شده که حدود ۲۰۰ شرکت بزرگ در سراسر دنیا در این زمینه سرمایه‌گذاری کلان نموده و محصولاتی را نیز به بازار عرضه کنند. با توجه به پتانسیل فوق العاده کار برد فناوری نانو در صنایع غذایی انتظار می‌رود طی دو دهه آینده انقلاب بزرگی در زمینه محصولات غذایی و کشاورزی پدید آید، به گونه‌ای که اثرات آن بسیار فراتر از کشاورزی مکانیزه و انقلاب سبز خواهد بود (Chilton *et al*., 2009) .

سنسورهای مبتنی به روش پلیمر قالب ملکولی از نوین‌ترین متدهای طراحی و ساخت زیستگرهای حسی در تشخیص میکروبی مواد غذائی می‌باشند ولیکن بیشتر در بعد شیمی مواد غذائی (پیگیری آنزیمی،خواص ارگانولپتیک و غیره) کاربری گردیده و کمتر در تشخیص میکروبی استفاده شده است (Mashhadizadeh and Talemi, 2011).

براساس مطالعات و مرورمتون انجام یافته در خصوص سم باکتری مورد نظر نانوحسگری طراحی نشده ولی حسگرهای متعددی از نانوذرات طلا و گرافیت و کربن شبیه سازی شده که براساس بررسی BABU و همکاران درسال ۲۰۱۳ وFERROو همکاران در سال ۲۰۱۲ سنسورها زمان تشخیص بیشتر و حساسیت کمتری در مقایسه با نانو حسگرها دارا می‌باشند و از طرفی ویژگی و دقت نانوسنسورها باتوجه به افزایش خاصیت رسانش و هدایت الکتریکی بسیار بالاتر می باشد که این امر به خاطر نانوذره بکاربرده شده در سنسور شبیه سازی شده می باشد.

هدف از اجرای این تحقیق تشخیص اگزوتوکسین باکتری استافیلوکوکوس ارئوس به عنوان یکی از شایع‌ترین عوامل مسمومیت‌های غذائی به روش پتانسیومتری می‌باشد. طراحی سنسوری با کاربری فن آوری نانو بوده تا با حساسیت و دقت زیادی بتواند توکسین حاصل از استافیلوکوکوس ارئوس که یکی از شایعترین عوامل مسمویت‌های غذائی می‌باشد را شناسائی نماید.

مواد و روش‌ها

مواد

Archive of SID

www.SID.ir

توکسین باکتری استافیلوکوکوس ارئوس از کمپانی سیگما، استیک اسید تهیه شده از کمپانی مرک، حلال DMF (دی متیل فوران)تهیه شده از کمپانی مرک، تترا اتوکسی سیلان تهیه شده از کمپانی سیگما، هیدروکسید آمونیم تهیه شده از کمپانی مرک، واکنشگر APTES تهیه شده از کمپانی سیگما، سوکسینیک انیدرید، تری اتیل آمین.

کلیه مواد کاربردی در این تحقیق دارای درجه خلوص تجزیه ای بوده و در تهیه محلول‌ها از آب دوبار تقطیر استفاده شده است.

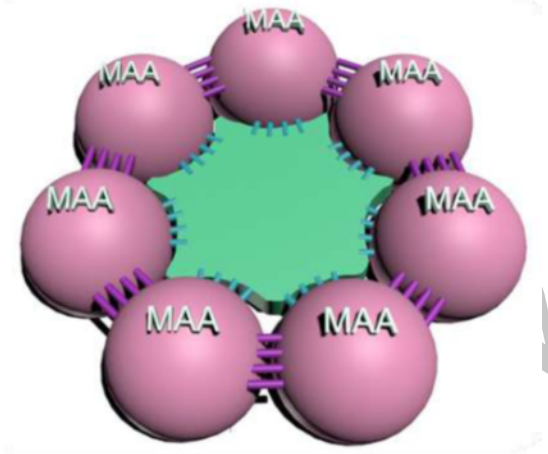
روش

- پتانسیومتری مبتنی بر پلیمرقالب ملکولی

به منظور ساخت الگوی‌های مقاوم از نظر فیزیکی و شیمیایی برای اگزوتوکسین استاف ابتدا بایستی محلول مناسبی از این حسگر از محلول خالص آن تهیه شود. برای این منظور از محلول خالص عرضه شده توسط کمپانی سیگما با رقیق سازی مناسب با آب مقطر خالص محلول با غلظت ۱×۱۰^{-۵} از آن تهیه گردید و کار در شرایط دمایی استاندارد در تمام مراحل کار با توکسین رعایت گردید و محلول‌ها به صورت روزانه تهیه و در مراحل مختلف آزمایش در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام یافت (Xu *et al*., 2009).

ابتدا غلظت $۱۰^{-۵}$واحد از اگزوتوکسن *استافیلوکوکوس ارئوس* تیپ Aتهیه شده از کمپانی سیگما را بوسیله آب مقطر دوبار تقطیر تهیه نموده، درروش پلیمرقالب ملکولی از مونومر متا اکریلیک اسید در دوزهای متعدد استفاده گردیده شد بدین منظور در این بررسی از نسبت های مونومر به توکسین شامل نسبت‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ استفاده شد که در نهایت بعد از بررسی های انجام شده نسبت ده به یک از مونومر متا اکریلیک اسید به اگزوتوکسین به عنوان نسبت بهینه برای تولید قالب انتخاب شد (Mashhadizadeh and Talemi, 2011). جهت تشکیل الگوی مناسب پلیمری در اطراف اگزوتوکسن و برای توزیع حلال پوشی مناسب از حجم حلال بیشتری استفاده گردید.

درروش پلیمرازاسیون رسوبی بر خلاف روش توده‌ای، از حجم حلال بیشتری استفاده می‌شود که با ایجاد فرصت هسته‌زائی منجر به تولید ذرات در ابعاد نانو می‌گردد. (در این روش معادل ۳۸ میلی‌لیتر استفاده گردید) و سپس محلول به آرامی هم زده شد و از عامل پیوند دهنده عرضی اتیلن گلایکول متا کریلات به مقدار ۱۱,۳۲ mlاستفاده شد و همچنین به عنوان آغازگر واکنش از پلیمرازاسیون از آزوبیس ایزو بوتیرو نتیریل به مقدار ۱۰میلی‌گرم استفاده شد. بلافاصله بعد از افزودن آغازگر از پرتودهی ماورابنفش برای تسریع واکنش پلی مرازاسیون استفاده شد. استفاده از اشعه ماورا بنفش تشکیل رادیکال‌های آزاد و شروع پلیمرازسیون را به دنبال داشت، در نهایت بعد از انجام واکنش، پیوند کوالانسی بین مونومرهای متااکریلیک اسید (Meta Acrylic AcidMAA:) تشکیل شده و ذرات پلیمری سفید رنگ حاصل گردید. همچنین پیوند هیدرونی بین اسید آمینه اگزوتوکسین و متااکریلیک اسید بوجود می‌آید که عامل جذب انتخابی آن بود.



شکل ۱- نمایش پیوندهای کووالانسی بین مونومرهای متااکریلیک اسید و بر همکنش اگزوتوکسین با قالب ملکولی

الگوی پلیمری تشکیل شده در اطراف مولکول‌های اگزوتوکسین با پیوندهای هیدروژنی به عوامل اسیدهای آمینه موجود در ساختار توکسین پیوند داده شده و از اینرو برای خارج کردن مولکول توکسین از محلول رقیق اسید استفاده گردیده شد و الگوی پلیمری بجا مانده جهت بکارگیری در سنسور پتانسیومتری وارد مرحله بعدی آزمایش شد (Ferro *et al*., 2012; Wu *et al*., 2011; Murphy-Perez *et al*., 2011).

از محلول ۱ به ۱۰ از متانول و اسید استیک به عنوان محلول اسیدی الکل استفاده شد تا ملکول اگزوتوکسین را از درون پلیمر تشکیل شده خارج نماید. مکانسیم این عمل از طریق حذف پیوندهای هیدروژنی بین اسید آمینه‌ها و

Archive of SID

www.SID.ir

متااکریلیک اسید بعنوان واحدهای مونومر پلیمر در شکل ۱ نشان داده شده است (Shimomura *et al*., 2012).

به منظورتعیین خصوصیت نانوذرات پلیمری تولیدی و تعیین مورفولوژی و اندازه این ذرات از تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی SEM[1] استفاده گردیده شد.

بدین منظور ابتدا آماده سازی ذرات پلیمری MIP[2] و NIP[3] ازطریق تهیه سوسپانسون در حلال استونیتریل در فالکون‌های آزمایشگاهی انجام شد و مقدار ۳ سی سی از محلول حاصله را روی پایه دارای چسب گذارده تا حلال تبخیر گردد و سپس در دستگاه اسپاترکوتر[4] حاوی گاز آرگون جهت تثبیت روکش آب طلا به روی نمونه های موجود برپایه می‌باشد انتقال داده تا بعد از ۱۰ دقیقه نمونه‌های آماده شده دارای روکش طلا به محفظه دستگاه میکروسکوپ انتقال یابند و در نهایت بعد از تنظیم میکروسکوپ SEM به روی بزرگنمائی ۱۰X تصاویر نمونه به روی مانتیور ظاهر گردیده شد.

- آماده‌سازی جهت تصویربرداری میکروسکوپ TEM:

در ادامه به نحوه آماده‌سازی نمونه برای مطالعه آن با TEM اشاره می گردد. در TEM، نمونه موردبررسی باید چگالی آن به حدی باشد که اجازه دهد تا الکترون‌ها تا حدی از آن عبور کنند. راه‌های مختلفی برای تهیه این نوع نمونه وجود دارد. برش‌های بسیارنازک از نمونه مد نظر تهیه و آن را در یک پلاستیک فیکس و ثابت گردیده شد. می‌توان نمونه را با روش‌های مختلف رنگ کرد و با استفاده از نشانه‌گذاری آنرا مطالعه نمود. برای مثال، فلزاتسنگین رنگ شده مانند اورانیوم و سرب الکترون‌های را به خوبی متفرق می‌کنند و کنتراست نمونه را در زیر میکروسکوپ بهبود می‌بخشند.

تهیه برش با کمک مواد در برگیرنده :مواد زیستی شامل مقادیر آب می‌باشند. به علت این برای استفاده از TEM باید کار درخلاء انجام شود لازم است تا آب به گونه ای تبخیر و یا جداسازی شود (با کمک الکل یااستون) و در نهایت نمونه ثابت می‌شود. حال نمونه در پلاستیکی محصور می‌شود (به شکل یک بلوک پلاستیکی سخت) و سپس برش‌های نازکی از آن به کمک چاقوی الماس مربوطبه دستگاه اولترا میکروتوم (برای ایجاد برش‌های بسیار ظریف) تهیه می‌شود که تنها۵۰-۱۰۰ نانومتر ضخامت دارند. برش‌های تهیه شده روی یک توری مسی قرار داده می‌شوند و با کمک فلزات سنگین رنگ می‌شوند. حال نمونه بافت آماده مطالعه با کمک پرتویالکترونی TEM می‌باشد، سپس با بزگنمائی ۴۰۰kx معادل ۴۰ هزار برابر بزگتر تصویر نهائی رویت خواهد شد.

- اندازه‌گیری توزیع اندازه ذرات:

این آزمون تحت عنوان اندازه‌گیری توزیع اندازه ذرات و مقادیر سطح ویژه پودرهای شیمیایی توسط دستگاه پار تیکل سایز آنالایزر مدلFritsch A22 انجام گرفته شد که چگونگی پراکنش متوسط ذرات موجود در نمونه MIP و NIP را نشان می دهد.

- ساخت میکروالکترود غشائی با اصلاحگر پلیمر قالب ملکولی:

از دو جنس گرافیت و طلا جهت ساخت بدنه میکرو الکترود می توان استفاده نمود که در این پروژه باتوجه به محدودیت های موجود از الکترود گرافیت استفاده گردید. این میکرو الکترود در غلافی از لوله کاپیلاری به شکل یک میکروواپر محبوس گردید و لوله شیشه‌ای کاپیلاری محتوی میکرو الکترود گرافیت بصورت عمود بر سطح مقطع برش داده شد و بعد از برش سطح مقطع کوچکی از گرافیت رویت گردید که جهت تهیه غشا نازک پلیمری روی سرالکترود برش داده شده استفاده گردید (Mashhadizadeh and Talemi, 2011).

- تهیه غشا نازک پلیمری روی سطح مقطع الکترود:

مقدار 50mg پودر پلی ونیل کلراید را با مقدار 50mg از یونوفور و مقدارمعینی از افزودنی KTPCIPB [5] به همراه ۷۵ میلی گرم پلاستی سایزر مخلوط نموده و مخلوط حاصله را در حجم 5 ml حلال تترا هیدروفوران در بشر شیشه‌ای 25 ml حل نموده و درفضای آزمایشگاه جهت

[1] scanning electron microscope
[2] Molecularly imprinted polymer
[3] Non-imprinted polymer
[4] Spotter Coater
[5] KTPCIPB: پتاسیم تتراکیس پاراکلروفنیل بورات

Archive of SID

www.SID.ir

تبخیر حلال به مدت ۲۰ دقیقه باقی می‌گذاریم تا محلول غلیظ روغنی همگن حاصل گردید برای تسریع در حصول این محلول از حرارت غیرمستقیم استفاده شد تا زمان کاهش یابد ولی نکته قابل توجه آن است که حرارت باید به نحوی باشد تا از بجوش آمدن محلول جلوگیری گردد (Babu *et al*., 2013).

برای ایجاد غشا نازک پلیمری روی سطح الکترود: نوک غشا برش زده شده را در محلول غلیظ روغنی بالا بصورت لحظه ای فرو برده و خارج نموده در نهایت غشای تشکیل شده در سرالکترود را به مدت ۲۴ ساعت در مجاور هوای آزمایشگاه خشک نموده و به مدت ۴۸ ساعت در محلول 10^{-3} مولار توکسین *استافیلوکوکوس ارئوس* گذارده تا اگزوتوکسین به جایگاه طراحی شده قبلی اتصال یابد و بعد گذشت این زمان و انجام اتصال به وسیله روش پتانسیومتری و بررسی شیب نرست به ادامه آزمون طراحی پرداخته شد(Shen *et al*., 2012).

اساس روش بر اساس مکانیسم الکتروشمیائی می باشد که در این واکنش پلیمرقالب ملکولی بعنوان یک اصلاحگر جهت بهبود خواص الکتروشمیائی غشائی پلی ونیل کلراید بکار رفته است تا توکسین باکتری مربوطه را شناسائی نماید. جهت تشخیص اختلاف پتانسیل حاصل از وجود و یا عدم وجود توکسین باکتری از دستگاه pH/mV مترمدل ۸۲۷ ساخت سوئیس استفاده شد، علت استفاده از این دستگاه، اندازه‌گیری پتانسیل الکترود یون گزین طراحی شده می‌باشد این دستگاه دارای الکترود مرجع Ag/AgCl اشباع شده با کلرید پتاسیم ۳ مولار است که این الکترود خود دارای پتانسیل معادل۲۲۲/.ولت می‌باشدکه این عدد هم تابعی از غلظت کلرید پتاسیم درون الکترود می‌باشد که به عنوان اشباع کننده الکترود هست، در نهایت اختلاف پتانسیل الکترود Ag/AgCl با الکترود PVC عددی می‌باشد که در نتایج بعنوان پاسخ سنسور ناشی از وجود یا عـدم وجـود اگـزوتوکسـین باکتری مطرح گردیـده است (Li *et al*., 2012).

- بررسی حساسیت سنسور:

براساس مندرجات برگ آنالیزمحلول اگزوتوکسین A باکتری استافیلوکوکوس ارئوس تهیه شده از کمپانی سیگما به ازای هر میکرولیتر حاوی ۲ میلی‌گرم توکسین است که در حجم ویال ۲۰۰ میکرولیتری تهیه شده معادل ۴۰۰ میلی‌گرم وزن توکسین می‌باشد. جهت محاسبه جرم ملکولی توکسین تجاری براساس مندرجات برگ آنالیز هر ۱میلی مول از توکسین دارای جرم ملکولی ۲۰۲ میلی گرم می باشد که در وزن محاسبه شده قبلی ویال، مقدار ۲میلی مول وجود دارد . براساس تعریف مولار،(مول بر لیتر یا میلی‌مول در میلی‌لیتر) ۲ میلی‌مول محلول حاصله را در ۱میلی لیتر حل کرده و بدین ترتیب توکسین ۱ مولار تهیه شده (Xu *et al*., 2009) توکسین ۱مولار بدست آمده جهت حداقل رقتی که سنسور تفکیک می نماید بکار می‌رود.

با استفاده از آب مقطر دوبار تقطیر ۱میلی لیتر از توکسین ۱مولار را با ۹/. میلی لیتر آب مقطر دوبار تقطیر مخلوط شد و تا رقت ۱/. توکسین بدست می آید در ادامه مجددا یک میلی لیتر از رقت قبلی را با ۹ میلی لیتر آب مقطر دوبار تقطیر ترکیب و رقت ۰۱/.بدست آمد و به همین ترتیب تا رقت ۰۰۰۰۰۱/. تهیه گردید. لازم به ذکراست که جهت سهولت در کاربری سنسور و ورود الکترود به درون محفظه برای تهیه این رقت ها از پلیت الایزا استفاده شده است .

سپس با استفاده از پتانسیومتر وتست هر رقت توسط الکترود طراحی شده، دستگاه اختلاف پتانسیل هر رقت را ثبت نمود بدین نحوکه چنانچه با ورود میکروالکترود از رقت اولیه به رقت بعدی میزان اختلاف پتانسیل ۵۹ میلی ولت باشد طبق تعریف از رابطه نرست تبعیت می کند و پاسخ الکترود در رقت بعدی قابل قبول بوده و بیشتر می شود ولی اگر هر رقتی با رقت رقیق شده بعدی دارای اختلاف پتانسیل ۵۹ میلی ولت پر دیکید باشد طبق تعریف رابطه استانداردشیب نرست یعنی سنسور به وجود اگزوتوکسین در آن رقت پاسخ داده است ولی اگر اختلاف پتانسیل هر رقتی با رقت قبلی یعنی رقت غلیظ تر خود کمتر از ۵۹ میلی ولت باشد یعنی سنسور به آن رقت حساس نبوده و به عبارتی نتوانسته آن رقت را تشخیص بدهد(Mashhadizadeh and Talemi, 2011).

- تعیین طول عمر سنسور:

منظور از تعیین طول عمر سنسور این است که هر یک از سنسورهای مبتنی بر پلیمرقالب ملکولی تا چه محدوده‌ای

Archive of SID
www.SID.ir

از زمان خصوصیات تشخیصی خود را حفظ می نمایند یا بعبارتی بهتر توانائی تشخیص توکسین را دارند که این مهم در روزهای ۴ الی ۶۰ روزگی از طراحی سنسورها انجام یافت (Li *et al*., 2012) .

یافته‌ها

- **حساسیت سنسور پلیمر قالب ملکولی:**

همانگونه که در جدول مشاهده می گردد دررقت های ۲- و۳- اختلاف عددی ۵۹ میلی ولت مشهود بوده ولی از رقت ۳- به بعد تفاضل اختلاف پتانسیل معادل ۵۹ میلی ولت نمی‌باشد و سنسور قادر به تفکیک این رقت از رقت‌های رقیق تر نیست. لذا براساس نتایج حاصله رقت ۳- حداقل رقت می باشد که نانوبیوسنسور در آب مقطر قادر به تشخیص توکسین می باشد .

جدول ۱- اختلاف پتانسیل های حاصل در رقت های متعدد از توکسین باکتری استافیلوکوکوس ارئوس

$۱۰^{-۱}$	۱۰۷mV
$۱۰^{-۲}$	۱۶۶mV
$۱۰^{-۳}$	۲۲۶mV
$۱۰^{-۴}$	۲۶۹mV
$۱۰^{-۵}$	۳۳۸mV
$۱۰^{-۶}$	۳۶۵ mV

- **نتایج تصاویر بزرگنمائی حاصل از میکروسکوپ الکترونی SEM:**

همانگونه که در تصاویرذیل رویت می‌گردد به ترتیب تصاویر SEM ذرات MIP و NIP بهینه سنتز شده و سپس تصاویر میکروسکوپ TEM برای قالب‌گیری توکسین نشان داده شده است. همانطورکه در تصاویر مربوط به MIP مشاهده می‌شود این ذرات هموژن و کروی هستند و نیز در حلال استونیتریل تولید گردیده شده‌اند.

پراکنش ذرات بصورت یکنواخت رویت می‌گردد و حالت اگلومره بعلت سونیکت صحیح و حلال استونیتریل اتفاق نیفتاده و بررسی انجام یافته با ۱۵کیلوولت توسط میکروسکوپ الکترونی بیانگر آن است که سایز ذرات در مقیاس نانومتریک می‌باشد، لازم به ذکر است که در تصاویر میکروسکوپ SEM برخلاف TEM چون نمونه ضخیم می‌باشند کلیه الکترون‌ها منعکس می‌گردد و الکترون‌های منعکس شده توسط دتکتور تفکیک و تصویر نهائی را ایجاد می نمایند.

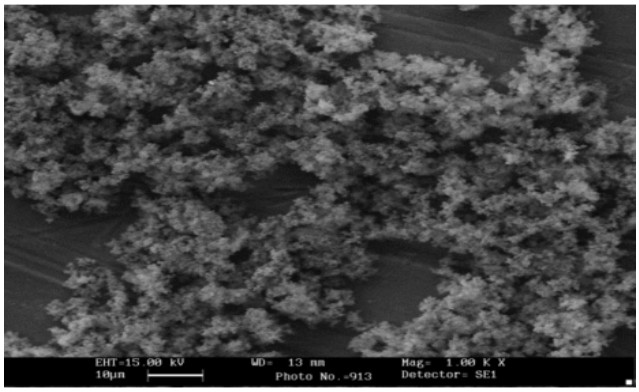
شرایط رقت بالای مونومر و میزان مناسب و بهینه توکسین به مونومر به پیوند دهنده عرضی ۱به ۱۰ سبب تولید اینگونه ذرات با مورفولوژی کروی و یکسان شده است، همچنین طی پلیمرازاسیون رسوبی از اختلاط آرام محلول پلیمرازاسیون استفاده شده تا جاذب‌های یکنواخت‌تری تولید شود.

- **پراکنش ذرات نانو با استفاده از داده‌های دستگاه (Particle size analyzer)**

همانگونه که در نمودار ۱ مشاهده می‌گردد متوسط پراکنش ذرات در نمونه بین ۱۰۰ تا ۱۸۰ نانومتر می‌باشد که تراکم ذرات ۱۶۸ نانومتر می باشد.

- **نتایج مربوط به پایداری حساسیت سنسورها:**

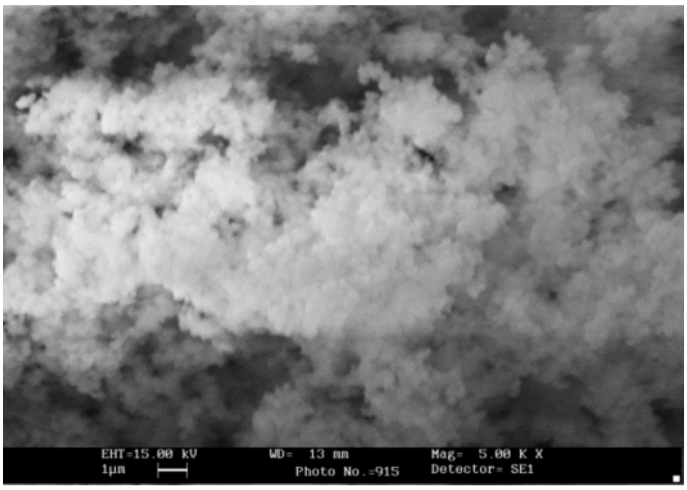
نتایج حاصل از این بخش، در خصوص تحلیل میزان حفظ حساسیت سنسور براساس گذشت زمان حاکی از آن است که سنسور در روز ۲۸ به بعد نسبت به پاسخ نسبت به اتصال به آنتی ژن روبه کاهش رفته، لذا نتایج مذکور حاکی از آن است که سنسور دارای زمان مصرف معادل ۱ ماه می باشد.



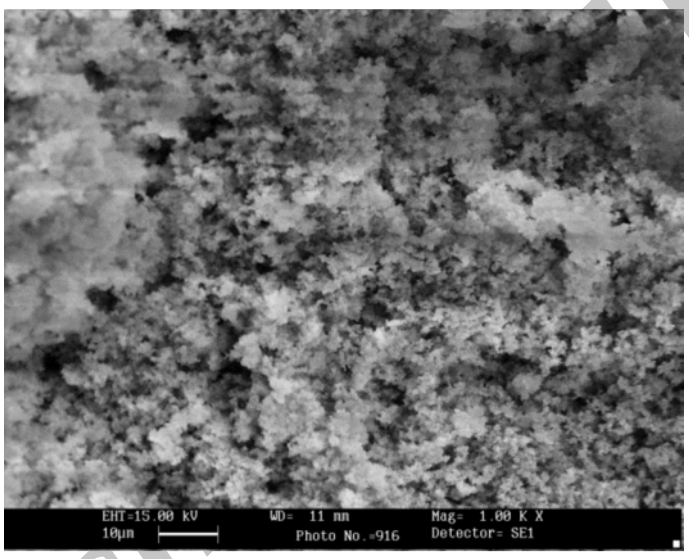
شکل ۲- تصاویر میکروسکوپ الکترونی ذرات پلیمرقالب ملکولی MIP (Molecularly imprinted polymer) با بزرگنمائی KX ۱/۰۰ با قطر ذرات ۱۰میکرومتر در مقیاس مشخص شده به روی تصویر

Archive of SID

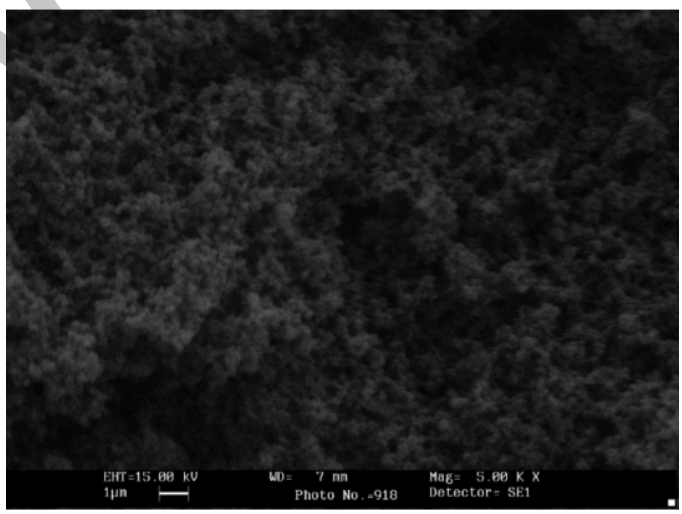
www.SID.ir



شکل ۳- تصاویر میکروسکوپ الکترونی ذرات پلیمر قالب ملکولی Molecularly imprinted polymer (MIP) بابزرگنمائی KX ۵/۰۰ با قطر ذرات ۱میکرومتر در مقیاس مشخص شده به روی تصویر



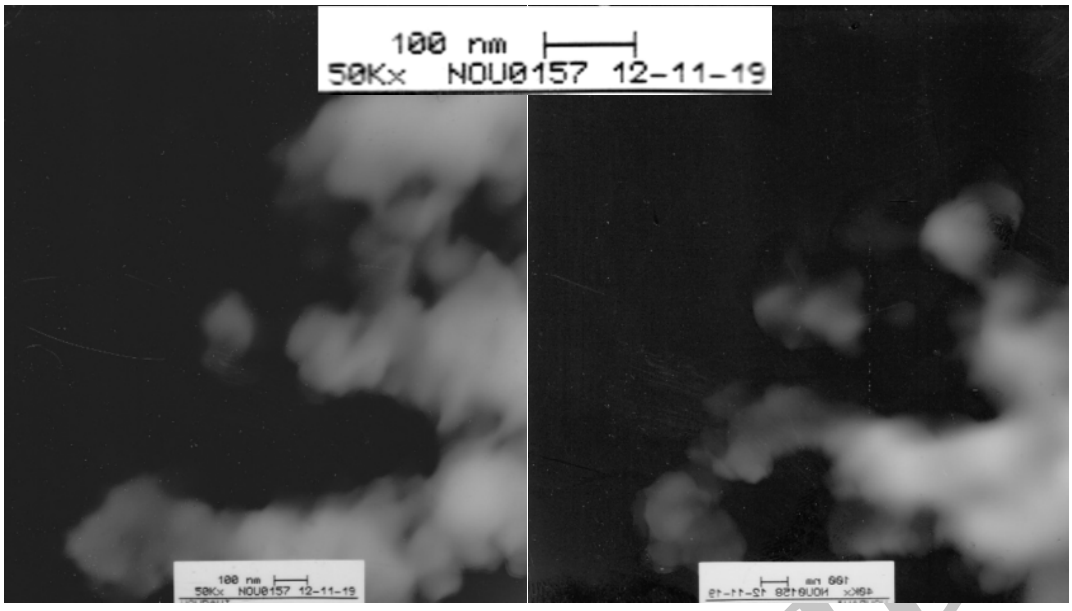
شکل ٤- Non-imprinted polymer (NIP)
با بزرگنمائیKX ۱/۰۰ با قطر ذرات ۱۰میکرومتر



شکل ۵- تصاویرمیکروسکوپ الکترونی ذرات پلیمر قالب ملکولی Non-imprinted polymer (NIP) با بزرگنمائی KX ۵/۰۰ با قطر ذرات ۱
میکرومتر در مقیاس مشخص شده

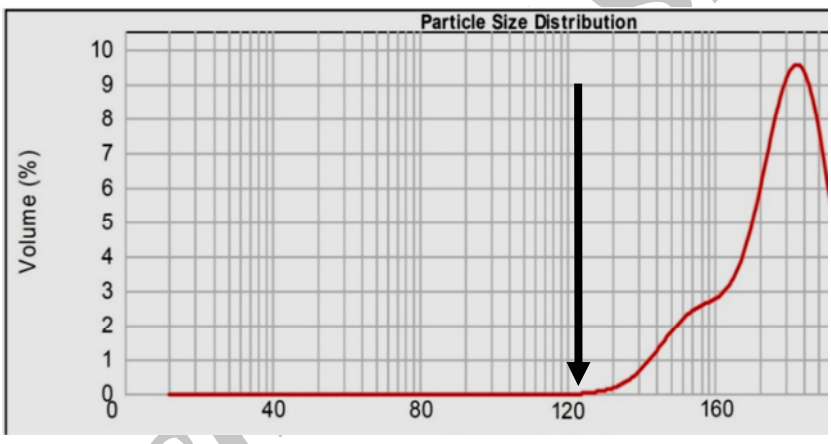
Archive of SID

www.SID.ir

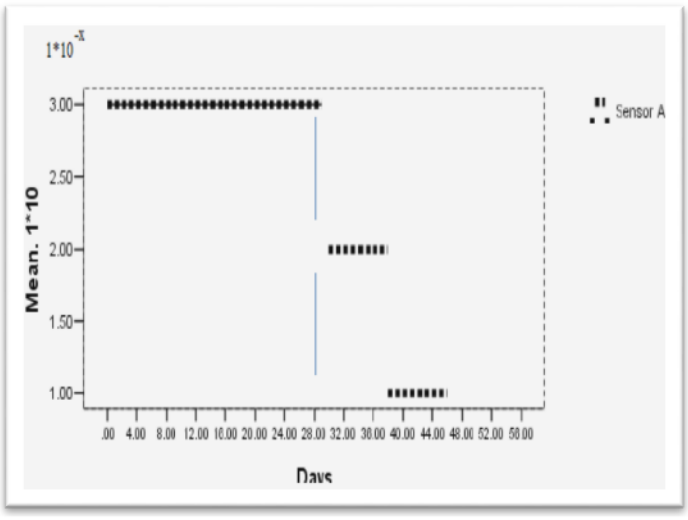


شکل ٦- میکروسکوپ الکترونی: TEMبابزرگنمائی KX ۵۰ بامشخصه معین شده ۱۰۰نانومتر

x مقدار ضخامت صفحات می باشد که هرچه بیشتر باشد و چگالی بیشتری داشته باشد مقدار عبور الکترون را کاهش خواهد داد.



نمودار ۱- پراکنش ذرات نانو با استفاده از داده‌های دستگاه (Particle size analyzer)



نمودار۲- طول عمرمفید سنسور بر اساس گذشت زمان :Life Time

www.SID.ir

بحث

روش‌های سنتی کار با محیط کشت برای تشخیص توکسین باکتری‌ها بسیار وقت‌گیر و کسل کننده است. امروزه استفاده از تکنیک‌های سریع و حساس تشخیص پاتوژن‌های منتقله از طریق مواد غذایی از اهمیت خاصی برخوردارند. از آنجا که در مورد بسیاری از پاتوژن‌های منتقله از طریق مواد غذایی با غلظت‌های بسیار کم آلودگی مواجه هستیم، بنابراین برای اطمینان از سلامت مواد غذایی به روش‌های سریع و حساس تشخیص نیازمندیم. روش‌های متداول تشخیص باکتری‌ها و توکسین‌ها عموما مبتنی بر استفاده از محیط‌های کشت و آزمون‌های بیوشیمی استوار است و این روش‌ها عموما ۴ تا ۷ روز به طول می انجامد (Anatolii, 1980).

با توجه به زمان مورد نیاز جهت رویت نتایج حاصل از کشت میکروبی در مبحث کنترل کیفی مواد غذائی قطع بر یقین مدت زمان معادل ۴۸ ساعت و در خصوص برخی از پاتوژن‌ها که نیاز به پیش غنی‌سازی و غنی‌سازی دارند همچون سالمونلا به یک هفته هم نیازمند می باشد تا در نهایت نتایج تشخیص اولیه حاصل گردد، استفاده از بیوسنسورها و نانوبیو سنسورها بسیار ارزشمند می‌باشد چراکه در بسیاری از کارخانجات مواد غذائی در بخش تحقیقات و توسعه و نیز بخش کنترل کیفی زمان لازم برای نگهداری مواد و اعلام نتایج آزمون جهت عدم تائید و یا تائید محصول برای عرضه به مصرف کننده بسیار طولانی و سبب کاهش زمان ماندگاری و از طرفی بصورت غیر مستقیم سبب خسارت وارده به تولید کننده می‌گردد (Belokrylov, 1970)، این امر در حالی است که در گرایش‌های متعدد صنایع غذائی همچون صنایع لبنی و یا صنایع گوشتی بسیار متفاوت‌تر از صنایعی همچون غلات و حبوبات و روغن و کنسرو و غیره می‌باشد لذا زمان در امر تشخیص بسیار کلیدی و حائز اهمیت در بحث سیستم‌های کنترل کیفیت و نیز برگشت سرمایه برای تولید کننده می‌باشد.

نکته ارزنده دیگر در این خصوص آن است که در بسیاری از موارد توکسین باکتری که به وسیله روش‌های مذکور و قدیمی قابل تشخیص است بعلت رقابت پاتوژن‌های دیگر و یا عوامل محیطی همچون دما و محیط اسیدی و غیره از بین می رود و توکسین باکتری که ممکن است به دما مقاوم باشد باقی می‌ماند که سنسور توانائی تشخیص در این موارد را به تنهائی داشته و کمک بسزائی به محققین و متخصصین کنترل کیفیت در سیستم‌های مدیریت ایمنی غذا می‌نماید، لذا در جمع بندی موارد مذکور سرعت و دقت و شرایط تشخیص از جمله فاکتورهای مهم در برتری سنسورها نسبت به روش‌های پیشین و مرسوم در کنترل کیفیت صنایع غذائی می‌باشد (Xu *et al*., 2009).

بیوسنسور از مزایایی همچون کوتاه بودن زمان آنالیز و حساسیت بیشتر در تشخیص توکسین برخوردار است و نیز هزینه تمام شده سنسور با در نظر داشتن خصوصیات میکروبی سنسور اشاره نمود که سنسور پلیمر قالب ملکولی هزینه بسیار زیادی جهت طراحی اولیه نیاز دارد ولی در شبیه سازی آن و در نهایت تولید انبوه این نقیصه مرتفع می‌گردد (Mashhadizadeh and Shimomura *et al*., 2012; Talemi, 2011).

براساس مطاللعه (Marques *et al*., 2009) نوع نانوذره مصرفی بسیار حائز اهمیت می‌باشد با توجه به استفاده از ذرات طلا میزان حساسیت سنسور تا 10^{-6} مولار افزایش یافته، این در حالی است که امروزه در بسیاری از تحقیقات از گرافیت بعلت قیمت ارزان‌تر آن در مقایسه با طلا و یا نقره استفاده می گردد.

در مطالعه‌ای که توسط MARQUES و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام گردید استفاده از نانو بیوسنسور مبتنی بر ذرات موثر طلا به روی ایمنی غذائی سنجیده شد و پایه این سنسور جز سنسورهای الکتروشمیائی بوده که شیب خطی معادل 10^{-6} را داشته و طول عمر آن معادل ۶ ماه می‌باشد که کاربری ذرات طلا به جای گرافیت یا هر نانوذره دیگری در افزایش هدایت الکتریکی که بطور مستقیم در شیب خطی اثر دارد موثربوده است.

ساخت سنسورهای پتانسیومتری مبتنی بر پلیمرهای قالب مولکولی از نظر دستگاهی کاملا مقرون به صرفه و ارزان است. پس از ساخت سنسور، به کمک یک دستگاه پتانسیومتر ساده می توان آزمایش مورد نظر را انجام داد به عبارتی واضح تر ترکیبات لازم برای ساخت سنسور گران قیمت ولی دستگاه لازم جهت تشخیص و اعلام نتایج بسیار ساده و قابل دسترس می‌باشد، اما مواد شیمیایی مورد استفاده در ساخت سنسور اغلب خطرناک بوده و آلاینده محیط زیست محسوب می شوند که از بعد سازمان جهانی

Archive of SID
www.SID.ir

محیط زیستEPA ترکیبات بکار رفته، از معایب دیگر این نوع بیوسنسور می‌توان به کوتاه بودن عمر آنها و از دست رفتن حساسیت آنها اشاره نمود (Shen *et al*., 2012; Li *et al*., 2012).

نبودن روش تهیه عمومی برای تهیه پلیمر نقش‌پذیر مولکولی، مشکل انتخاب و جمع‌آوری انتقال دهنده‌ها، انتقال سیگنال‌های نتیجه شده به سیگنال الکتریکی کاربردی از جمله محدودیت‌های این نوع حسگر است. همچنین آن‌ها عملکرد خوبی در محلول آبی ندارد. بنابراین، پیشرفت‌هایی در روش تهیه عمومی‌برای طراحی حسگر پلیمر نقش پذیر مولکولی به وجود آمده است. محاسبات ترمودینامیکی به طور موفقیت‌آمیزی برای تشیخص بهترین مونومرها برای نقش زدن به کار می‌رود. یک راه حل بالقوه برای حل این مسائل استفاده از نرم افزار مدل سازی و الگوریتم جستجو و بررسی است که به طور قراردادی در طراحی پلیمرها و اخیرا در طراحی داروها به کار می‌رود. پلیمرهایی که با استفاده از این روش کامپیوتری طراحی شده است، اغلب با گیرنده‌های طبیعی قابل مقایسه‌اند. پیشرفت‌های سریع در الکترونیک به‌میکرو پروسسورهایی منتهی شده است که به عنوان ابزاری مناسب در حسگر شیمیایی به کار می‌رود. چنین‌میکرو پروسسورهایی نوفه را کم نموده و عملکرد حسگر را بهتر می‌نماید. یکی دیگر از مشکلات در اندازه‌گیری با حسگر پلیمر قالب مولکولی زمان طولانی پاسخ دهی در حدود ۶۰–۱۵ دقیقه است. این تاخیر با بهینه نمودن سینتیک و گزینش پذیری حسگر کاهش می‌یابد (Li *et al*., 2012).

نتیجه‌گیری

استفاده از پلیمرهای سخت‌تر گزینش پذیری را توجیه می‌کند، چرا که هر چه انرژی بیشتری برای جابجایی و تغییر آنالیت مصرف شده باشد، زمان پاسخ دهی بیشتر می‌شود. همچنین پلیمرهای متخلخل ظرفیت اتصال پلیمر را در زمان پاسخ دهی افزایش می‌دهد. می‌توان با استفاده از ذرات پلیمری کوچک تر یا پلیمر لایه نازک، سرعت نفوذ را بهبود بخشید. بنابراین با سینتیک اتصال مشخص، زمان پاسخ دهی کمتر می‌شود .

سپاسگزاری

بدین‌وسیله نویسندگان کمال تشکر و قدردانی را از بخش بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران و اداره آزمایشگاه‌های مرجع وزارت بهداشت (آزمایشگاه نانوبیوتکنولوژی)، آزمایشگاه میکروسکوپ الکترونی مجتمع آزمایشگاهی واحد علوم و تحقیقات تهران بجهت مساعدت‌های لازم در جهت اجرای این پروژه اعلام می‌دارند.

منابع

Anatolii, S. A. (1980). Increasing the sensitivity of mice to substances of microbial origin following administration of staphylococcal exotoxin, *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 112-113.

Babu, E., Mareeswaran, P. M. & Rajagopal, S. (2013). Highly sensitive optical biosensor for thrombin based on structure switching aptamer-luminescent silica nanoparticles, *J Fluoresc,* 23, 137-146.

Belokrylov, G. A. (1970). The effect of thyroidectomy on the resistance of adult rats to Escherichia coli endotoxin and staphylococcal exotoxin, *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol,* 47, 72-74.

Chilton, M., Black, M. M., Berkowitz, C., Casey, P. H., Cook, J., Cutts, D., Jacobs, R. R., Heeren, T., Decuba, S. E., Coleman, S., Meyers, A. & Frank, D. A. (2009). Food insecurity and risk of poor health among US-born children of immigrants, *Am J Public Health,* 99, 556-562.

Ferro, Y., Perullini, M., Jobbagy, M., Bilmes, S. A. & Durrieu, C. (2012). Development of a biosensor for environmental monitoring based on microalgae immobilized in silica hydrogels, *Sensors (Basel),* 12, 16879-16891.

Hamrin, P. & Hoeft, B. (2012). Quality control throughout the production process of infant food, *Ann Nutr Metab,* 60, 208-210.

Li, Y., Zhang, L., Li, M., Pan, Z. & Li, D. (2012). A disposable biosensor based on immobilization of laccase with silica spheres on the MWCNTs-doped screen-printed electrode, *Chem Cent J,* 6, 103.

Marques, P. R., Lermo, A., Campoy, S., Yamanaka, H., Barbe, J., Alegret, S. & Pividori, M. I. (2009). Double-tagging polymerase chain reaction with a thiolated primer and electrochemical genosensing based on gold nanocomposite sensor for food safety, *Anal Chem,* 81, 1332-1339.

Mashhadizadeh, M. H. & Talemi, R. P. (2011). Used gold nano-particles as an on/off

Archive of SID

www.SID.ir

hydrogen peroxide biosensor,*Biosens Bioelectron,* 34, 132-136.

Shimomura, T., Sumiya, T., Ono, M., Ito, T. & Hanaoka, T. A. (2012). Amperometric L-lactate biosensor based on screen-printed carbon electrode containing cobalt phthalocyanine, coated with lactate oxidase-mesoporous silica conjugate layer, *Anal Chim Acta,* 714, 114-120.

Wu, S., Zhang, L., Qi, L., Tao, S., Lan, X., Liu, Z. & Meng, C. (2011). Ultra-sensitive biosensor based on mesocellular silica foam for organophosphorous pesticide detection, *Biosens Bioelectron,* 26, 2864-2869.

Xu, G., Xia, J. H., Zhou, H., Yu, C. Z., Zhang, Y., Zuo, K. J., Shi, J. B. & Li, H. B. (2009). Interleukin-6 is essential for Staphylococcal exotoxin B-induced T regulatory cell insufficiency in nasal polyps, *Clin Exp Allergy,* 39, 829-837.

switch for response of a potentiometric sensor to Al(III) or Cu(II) metal ions,*Anal Chim Acta,* 692, 109-115.

Murakami, A. (2013). Modulation of protein quality control systems by food phytochemicals, *J Clin Biochem Nutr,* 52, 215-227.

Murphy-Perez, E., Arya, S. K. & Bhansali, S. (2011). Vapor-liquid-solid grown silica nanowire based electrochemical glucose biosensor, *Analyst,* 136, 1686-1689.

Ravetz, J. R., Healey, P. & Rayner, S. (2013). GM food: Rat reality show blurs quality control, *Nature,* 493, 304.

Santana Porben, S. (2012). Quality control an assessment system. Its location within a program for food, nutrition and metabolic intervention, *Nutr Hosp,* 27, 894-907.

Shen, J., Yang, X., Zhu, Y., Kang, H., Cao, H. & Li, C. (2012). Gold-coated silica-fiber hybrid materials for application in a novel

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir