

# شناسایی آلودگی باکتری‌های لیستریا مونوسایتوژنز، سالمونلا تیفی موریوم و استافیلوکوکوس اروئوس در محیط کشت با استفاده از نانوحسگر رنگی ساخته شده از نانو صفحات گرافن اکسید آمین دار شده و شناساگر برموفنول آبی

شهاب نقدی<sup>۱</sup>، مسعود رضائی<sup>۲</sup>، نادر بهرامی فر<sup>۳</sup>، مهدی آل‌بوفتیله<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت مقاله: آذرماه ۱۳۹۹

تاریخ پذیرش مقاله: فروردین ماه ۱۴۰۰

## چکیده

امروزه کاربرد بسته‌بندی‌های هوشمند در صنایع مختلف بسته‌بندی بیشتر از گذشته مورد توجه صنعت قرار گرفته است. بسته بندی‌های هوشمند می‌توانند حاوی یک شناساگر یا نانوحسگر باشند که فرایند تغییر کیفیت محصول بسته‌بندی شده را از طریق مختلفی نظیر: تغییر رنگ، تغییر ولتاژ و... به مصرف‌کننده گزارش می‌دهند. در همین راستا استفاده از نانوذرات به دلیل ویژگی‌های منحصر بفرد و مناسبی که دارند باعث بهبود عملکرد نانوحسگرها شده‌اند. به همین دلیل در تحقیق حاضر به منظور مطالعه روند رشد پاتوژن‌های غذایی لیستریا مونوسایتوژنز، سالمونلا تیفی موریوم و استافیلوکوکوس اروئوس در محیط کشت از نانوحسگر رنگی تشکیل شده از نانو صفحات گرافن اکسید آمین دار شده به همراه شناساگر برموفنول آبی بر پایه کاغذ صافی استفاده گردید. نتایج نشان داد در ابتدای رشد باکتری لیستریا مونوسایتوژنز هیچ پرگنه‌ای در محیط کشت مشاهده نشد ولی در نهایت ۲۴ ساعت بعد به تعداد  $1.81 \pm 1.89$  پرگنه رسید ( $p < 0.05$ ). بررسی تغییرات تعداد پرگنه‌ها در طول ۲۴ ساعت برای باکتری استافیلوکوکوس اروئوس روند افزایشی نشان داده و در انتهای دوره انکوباسیون به تعداد  $4.54 \pm 1.96$  پرگنه رسید ( $p < 0.05$ ) و هم اینکه تعداد پرگنه‌ها در باکتری سالمونلا تیفی موریوم در محیط کشت مشخص شد که از تعداد صفر به تعداد  $5.17 \pm 2.03$  پرگنه رسید ( $p < 0.05$ ). نتایج نشان داد که به طور کلی نانوحسگر ساخته شده، روند افزایشی تعداد پرگنه‌های باکتری‌ها را به صورت تغییر رنگ نشان داده و در این رابطه رنگ نانوحسگرها در تمامی پلیت‌ها از رنگ سبز به رنگ آبی تغییر کردند. در حالی که شدت تغییر رنگ ( $\Delta E$ ) ایجاد شده در حضور باکتری‌های مختلف، متفاوت بود و بیشترین شدت تغییر رنگ ( $\Delta E$ ) در محیط کشت تلقیح شده با باکتری سالمونلا تیفی موریوم با عدد  $61.01$  مشاهده شد. همبستگی بین شاخص تغییر رنگ ( $\Delta E$ ) و افزایش تعداد باکتری‌های لیستریا مونوسایتوژنز، سالمونلا تیفی موریوم و استافیلوکوکوس اروئوس به ترتیب مثبت  $0.9$ ، مثبت  $0.95$  و مثبت  $0.94$  بود.

## واژه‌های کلیدی

لیستریا مونوسایتوژنز، سالمونلا تیفی موریوم،  
استافیلوکوکوس اروئوس، نانوحسگر رنگی، گرافن اکسید  
آمین‌دار

۱- دانشجوی دکتری، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران (shahab\_naghdi@modares.ac.ir)

۲- استاد، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران (rezai\_ma@modares.ac.ir)

۳- دانشیار گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران (n.bahramifar@modares.ac.ir)

۴- مرکز ملی تحقیقات فرآوری آبزیان، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندر انزلی، ایران (m.alboofetile@yahoo.com)

5- *Listeria Monocytogenes*  
6- *Salmonella Typhimurium*  
7- *Staphylococcus Aureus*

## ۱- مقدمه

در جهان امروزی زندگی بشر با شرایط روزمره خاصی روبرو است که این اتفاق باعث شده انسان‌ها در معرض بسیاری از عوامل بیماری‌زا مانند: پاتوژن‌های بیماری‌زا قرار گیرند. روند افزایشی استفاده از غذاهای آماده مصرف در بین مردم و بعضاً آلودگی به پاتوژن‌های غذایی باعث بروز بسیاری از بیماری‌ها و مسمومیت‌های غذایی شده‌اند [۱]. به‌طور معمول، باکتری‌ها به وسیله آزمون‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی شناسایی می‌شوند و توسط آزمون‌های تکمیلی تخصصی نظیر: آزمایش‌های سرم‌شناختی، الگوهای حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی بر روی محیط کشت جامد مشخص می‌گردند. روش‌های سنتی و معمول تشخیص عامل باکتریایی عفونت شامل: مشاهده میکروسکوپی (مانند: رنگ‌آمیزی گرم)، بررسی فنوتیپی خصوصیات باکتری بر پایه کشت بر روی محیط‌های مصنوعی، شناسایی آنتی‌بادی‌های ضدساختارهای باکتری با کمک روش‌های سرولوژیک و تعیین حساسیت ضد میکروبی (آنتی‌بیوگرام) است [۲،۳]. هر یک از این روش‌ها دارای مزایا و معایبی می‌باشد. به‌طور مثال روش رنگ‌آمیزی گرم روش سریعی بوده، اما از دقت و قدرت تشخیصی کافی برای جداسازی میکروارگانیسم عامل برخوردار نیست. بررسی خصوصیات فنوتیپی<sup>۱</sup> و آنتی‌بیوگرام زمان‌بر می‌باشند. در روش‌های سرولوژیک<sup>۲</sup> نیز ممکن است واکنش‌های متقاطع سبب عدم تشخیص قطعی عامل عفونت شود [۴، ۱]. بدین منظور توسعه روش‌های جدید که در عین سریع بودن از دقت بالایی نیز برخوردار باشند، دارای اهمیت ویژه‌ای می‌باشند.

بر این اساس، امروزه روش‌های نوینی همانند استفاده از حسگرها و نانوحسگرها در تعیین و تشخیص باکتری‌ها توسعه داده شده‌اند. نتایج استفاده از این روش‌های نوین نشان داده است که حسگرهای تهیه شده دارای ویژگی‌های

منحصر بفردی همانند سادگی در استفاده، زمان آنالیز کوتاه، عملکرد مناسب، قابلیت ادغام با روش‌های عمومی کشت باکتری و... می‌باشند [۲، ۳]. تاکنون انواع مختلفی از حسگرها همانند حسگرهای رنگی، حسگرهای الکترونیکی، حسگرهای شیمیایی تولید شده و عملکرد آن‌ها ارزیابی شده است [۱، ۴].

از بین حسگرهای ساخته شده، حسگرهای رنگی به دلیل کاربری راحت، عدم نیاز به کاربر متخصص، بررسی و شناسایی روند رشد با چشم غیرمصلح مورد توجه قرار گرفته‌اند [۲]. در حال حاضر، انواع متفاوتی از این حسگرها وجود دارد که مکانیسم عملکردشان متفاوت است. در برخی از آن‌ها از مجموعه‌ای از شناساگرهای pH استفاده می‌شود که به آن‌ها پد رنگی<sup>۴</sup> شناسایی گفته می‌شود و در برخی دیگر، تنها یک شناساگر pH به همراه بخش گیرنده استفاده شده است [۷، ۸]. به‌طور کلی، هر حسگر از سه بخش عمده که شامل بخش گیرنده، نشانگر و پایه تشکیل می‌شود [۶]. در سال‌های اخیر، نانوذرات به دلیل داشتن ویژگی‌های مختلفی از قبیل داشتن نسبت سطح به حجم بالا، خواص الکترونیکی مناسب، رسانایی الکتریکی و حرارتی بالا و داشتن گروه‌های عاملی مختلف توجه محققین را به خود معطوف کرده‌اند. بر این اساس، برخی محققین از نانوذرات برای تقویت بخش گیرنده حسگرها در ساختار حسگر برای تشخیص گازها و رایحه‌های حاصل از فساد، آلاینده‌های شیمیایی و عوامل بیماری‌زایی استفاده کرده‌اند [۱، ۱۰]. ساخت یا اصلاح حسگرها بر پایه فناوری نانو سبب افزایش دقت در کنترل کیفیت و رسیدن به سطح بالاتری از امنیت غذایی مشتریان نسبت به انواع معمولی حسگرها شده است [۸].

گرافن اکسید<sup>۵</sup> (GO) از یک لایه اتم‌های کربن اکسید شده تشکیل شده است که در هر صفحه از آن اتم‌های کربن شبکه‌ای از شش ضلعی‌های منتظم را ایجاد می‌کنند به همین دلیل به عنوان یک نانوساختار درشت شناخته

- 1- Antibio gram
- 2- Phenotype
- 3- Serology

- 4- Colorimetric Pad
- 5- Graphene Oxide

فصلنامه علمی علوم و فنون  
**بسته بندی**

می‌شود [۹]. این ساختار به دلیل توانایی بالا در جذب گازهای شیمیایی آلی و برقراری پیوند شیمیایی با این مواد، پایداری در خواص شیمیایی و فیزیکی، نیمه رسانا بودن و خواص الکتریکی خود برای ساخت نانو حسگرها بسیار مورد توجه هستند [۱۲، ۱۳]. به همین منظور، قرار دادن گروه‌های عاملی آمین‌دار بر روی سطح نانو صفحات گرافن اکسید کمک ویژه‌ای به توانایی جذب گازهای مختلفی در این نانو صفحه می‌کند. در همین راستا نیز مطالعاتی به همین منظور انجام شده است که می‌توان به مطالعه باسوا<sup>۱</sup> و همکاران (۲۰۱۴) اشاره کرد که از گرافن به منظور گیرنده در حسگر الکترونیکی خود استفاده کردند. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که گروه‌های متیل موجود در گرافن به عنوان گیرنده باکتری /یشریشیاکلی عمل کرده و با افزایش غلظت باکتری مقاومت الکتریکی حسگر کاهش پیدا می‌کند و حساسیت ۶۰ درصد برای شناسایی غلظت  $4/5 \times 10^7$  cfu/ml باکتری اکلاهی به دست آمد. در مطالعه‌ای دیگر محققین بیان داشتند که پد رنگی ساخته شده از ۸۰ شناساگر<sup>۲</sup> مختلف توانایی شناسایی ۱۵ پاتوژن را در محیط کشت بلاد آگار<sup>۳</sup> با دقت ۹۱ درصد دارد. این پد رنگی همچنین قادر به شناسایی رشد باکتری‌ها در محیط کشت در کمتر از ۳ ساعت و شناسایی ۹۹/۴ درصد باکتری‌ها را دارد [۱۱]. در مطالعه دیگری سوپراتی<sup>۴</sup> و همکاران (۲۰۱۵) از نانوصفحات گرافن اکسید آمین‌دار شده به منظور جذب گازهای هیدروژن سولفید ( $H_2S$ ) و کربن دی اکسید ( $CO_2$ ) استفاده کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که سیستم تهیه شده از گرافن اکسید آمین دار قابلیت بالایی جهت جذب و نگهداری گازهای مذکور را داشته و می‌تواند کاربردهای متنوعی در آینده داشته باشد. با توجه به ویژگی‌های ارائه شده برای گرافن اکسید و همچنین با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای مبنی بر ساخت و استفاده از حسگرهای ساخته شده از گرافن اکسید آمین‌دار شده برای شناسایی باکتری‌ها

گزارش نشده است هدف از پژوهش حاضر، بررسی روند رشد باکتری‌های لیستریا مونوسایتوزنز، سالمونلا تیفی موربیوم و استافیلوکوکوس آروئوس در محیط کشت با استفاده از حسگر رنگی ساخته شده از نانو صفحات گرافن اکسید آمین‌دار شده به همراه شناساگر برموفنول آبی بر پایه کاغذ صافی می‌باشد.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- سنتز نانو صفحات گرافن اکسید (GO)

سنتز نانو صفحات گرافن اکسید طبق روش اکسایش شیمیایی هامرس و آفمن<sup>۵</sup> (۱۹۵۸) و با استفاده از اکسندہ‌های<sup>۶</sup> شیمیایی  $H_2SO_4$ ،  $KMnO_4$ ،  $H_2O_2$  انجام شد. گرافیت به صورت پودر خریداری شد و برای سنتز گرافن اکسید استفاده گردید. مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر از اسید سولفوریک ۹۵ درصد به یک ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در حمامی از یخ همزده شد. بعد از این زمان، مقدار ۳ گرم از گرافیت طی ۱۰ دقیقه و ۲ گرم سدیم نترات در مدت ۲۰ دقیقه به آرامی به اسید سولفوریک اضافه شد. در ادامه مقدار ۱۵ گرم پتاسیم پرمنگنات به آرامی طی ۳۰ دقیقه به ارلن با دمای صفر درجه سانتی‌گراد اضافه گردید. بعد از اضافه شدن پتاسیم پرمنگنات، حمام یخ حذف و اجازه داده شد که دما به ۲۵ درجه سانتی‌گراد برسد. رنگ ماده موجود در فلاسک در این مرحله سبز لجنی بود. سوسپانسیون حاصل برای ۳ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. در مرحله بعد دما به کمک حمام روغن در ۳۵ درجه سانتی‌گراد ثابت و برای ۵ ساعت توسط همزن مغناطیسی مخلوط شد. با حذف حمام روغن و قرار دادن مخلوط تهیه شده در حمام یخ، مقدار ۱۵۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه<sup>۷</sup> به فلاسک اضافه گردید. ماده حاصل از این مرحله بسیار غلیظ و رنگ آن از سبز به قهوه‌ای روشن تغییر یافت. در ادامه سوسپانسیون برای ۱۲ ساعت در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

- 1- Basu
- 2- Indicator
- 3- Blood Agar
- 4- Subrati

۷- آب یون‌زدایی شده

- 5- Hummers and Offeman
- 6- Oxidizer

شناساگر برموفنول<sup>۵</sup> آبی آماده شد [۱۴]. سپس مقدار ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر نانو صفحات گرافن اکسید آمین‌دار به محلول شناساگر بر روی همزن اضافه گردید. در ادامه کاغذ صافی با ابعاد مشخص در محلول آماده شده غوطه‌ور شده و به مدت یک شب نگهداری شد. در نهایت کاغذ صافی‌ها از محلول خارج گشته و در دیسیکاتور<sup>۶</sup> خشک شدند.

## ۲-۴- مراحل احیا کردن باکتری‌ها

باکتری‌های (ATCC 7811) لیستریا مونوسیتوژنز، (ATCC 13565) استافیلوکوکوس آروئوس و (ATCC 14028) سالمونلا تیفی موربیوم از انستیتو پاستور ایران واقع در تهران تهیه و در محیط کشت<sup>۷</sup> TSB حاوی ۳۰٪ گلیسرول قرار داده شده و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای احیا کردن باکتری‌های ذکر شده، ابتدا در شرایط استریل، باکتری‌ها به لوله‌های فالکون<sup>۸</sup> حاوی ۱۰ میلی‌لیتری محیط کشت<sup>۹</sup> BHI اضافه شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس لوله‌های فالکون حاوی محیط کشت و باکتری به مدت ۵ دقیقه در ۶۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی با محلول ۰/۹ درصد آب نمک جایگزین شد. در ادامه به منظور جداسازی کامل محیط کشت از باکتری‌ها محلول حاصل مجدداً به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. تعداد باکتری‌ها در مایع زیرین توسط روش کدورت‌سنجی در طول موج ۶۰۰ نانومتر محاسبه گردید. بدین صورت که جذب نوری ۰/۰۸ تا ۰/۱ معادل ۱×۱۰<sup>۸</sup> باکتری در هر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. در ادامه به منظور کشت باکتری‌های مورد مطالعه در محیط کشت نوترینت<sup>۱۰</sup> آگار مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از باکتری

مرحله بعد با کاهش دما به ۶۰ درجه، مقدار ۵۰ میلی‌لیتر آب جوش و مقدار ۳۰ میلی‌لیتر (۳۰ درصد وزنی-حجمی) آب اکسیژنه به مجموعه اضافه شد. سپس سوسپانسیون را صاف کرده و خمیر قهوه‌ای‌رنگ حاصل جدا گردید. این ماده توسط ۲۵۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۵ و ۱۰ درصد برای حذف گروه‌های سولفاته شست‌وشو شده و در نهایت با آب مقطر pH آن به ۶/۵ رسانده شد. پس از ثابت نمودن pH، نمونه توسط خشک‌کن انجمادی خشک و بعد از آن سوسپانسیون ۰/۰۵ درصد در آب مقطر با استفاده از دستگاه فراصوت با قدرت ۱۰۰ هرتز و مدت زمان ۱ ساعت تهیه گردید. برای جداسازی گرافن اکسیدهای چند لایه از تک لایه، سوسپانسیون حاصل با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ<sup>۱</sup> و مجدداً توسط خشک‌کن انجمادی خشک شد [۱۲].

## ۲-۲- آمین‌دار کردن نانو صفحات گرافن اکساید (GO)

آمین‌دار کردن نانو صفحات گرافن اکساید مطابق با روش زاویزا<sup>۲</sup> و همکاران (۲۰۱۶) انجام شد. بدین منظور ابتدا ۱۰۰ میلی‌گرم نانو صفحات گرافن اکساید سنتز شده در مرحله قبل را با ۱۵ میلی‌لیتر اتیلن دی آمین<sup>۳</sup> EDA مخلوط شد. در ادامه ۰/۷ گرم دی سی سی<sup>۴</sup> DCC به مجموعه اضافه شده و مخلوط حاصل ۴۸ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرارداد شد. بعد از این مدت، مخلوط نهایی در شرایط خلأ در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ ساعت خشک شد [۱۴].

## ۲-۳- ساخت حسگرها

برای ساخت حسگرها در این پژوهش از روش غوطه‌وری در شناساگر استفاده شد. مراحل ساخت حسگرها به صورت ذیل می‌باشد: ابتدا محلول ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر

- 5- Bromophenol Blue
- 6- Desiccator
- 7- Growth Medium
- 8- Falcon Tube
- 9- Growth Medium
- 10- Nutrient Agar

فصلنامه علمی علوم و فنون  
**بسته بندی**

- 1- Centrifuge
- 2- Zawisza
- 3- Ethylenediamine
- 4- N, N'-dicyclohexylcarbodiimide

احیا شده با غلظت  $1 \times 10^5$  باکتری در هر میلی‌لیتر با روش کشت سطحی به خوبی در سطح پلیت پخش شد و پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. در زمان انکوباسیون<sup>۱</sup> در فواصل زمانی هر ۶ ساعت یکبار تعداد پرگنه‌ها شمارش گردید [۱۵].

## ۲-۵- ساخت پلیت‌های هوشمند

حسگرهای ساخته شده به ابعاد  $2 \times 2$  سانتی‌متر بریده شده و سپس با نوار چسب کاغذی بر روی درب پلیت با قطر ۸ سانتی‌متر چسبانده شدند. سپس پلیت‌های مورد نظر به منظور استریل کردن به مدت ۲۴ ساعت تحت تابش لامپ UV قرار گرفتند [۱۶]. تمام تیمارها در سه تکرار انجام شدند.

## ۲-۶- آنالیز دیجیتال رنگ عکس‌های گرفته شده

جهت عکس‌برداری از سطح نانوحسگرهای تهیه شده، از دوربین<sup>۲</sup> NICON تمام HD مدل سایبرشات<sup>۳</sup> با وضوح  $21/1$  مگاپیکسل استفاده گردید. مکان تصویربرداری اتاقک بسته با نور ثابت بود و تمامی عکس‌ها در زمان‌های یکسان در یک مکان ثابت از پلیت‌ها گرفته شد. قابل ذکر است که سه پایه‌ای را که قابلیت نصب دوربین بر روی آن وجود داشت تهیه کرده و پس از نصب دوربین بر روی کف سه پایه یونولیت تیره رنگ قرار داده و تصویربرداری در اتاقک مخصوص انجام گرفت. بعد از عکس‌برداری در زمان‌های مشخص شده، تصاویر برای آنالیز دیجیتال به نرم‌افزار فتوشاپ<sup>۴</sup> CC2017 منتقل شدند. سپس شاخص<sup>۴</sup> RGB عکس‌ها به  $L^*a^*b$  تبدیل شده و ارزش رنگ ( $\Delta E$ ) از طریق رابطه ۱ در نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۶ (میکروسافت- آمریکا) محاسبه شد [۱۷].

$$\Delta E = \text{رابطه ۱} :$$

$$\sqrt{(a_0 - a_n)^2 + (b_0 - b_n)^2 + (L_0 - L_n)^2}$$

۱- گرمخانه گذاری

- 2- Digital Camera
- 3- Cyber-Shot Model
- 4- RGB Index

که در رابطه بالا:

شاخص  $a_0$ : شاخص  $a$  در زمان صفر است و  $a_n$  همین شاخص در زمان  $n$  می‌باشد.

شاخص  $b_0$ : شاخص  $b$  در زمان صفر است و  $b_n$  همین شاخص در زمان  $n$  می‌باشد.

شاخص  $L_0$ : شاخص  $L$  در زمان صفر است و  $L_n$  همین شاخص در زمان  $n$  می‌باشد.

$L^*$  نشان‌دهنده شدت روشنایی است.  $L^* = 0$  به منزله سیاه و  $L^* = 100$  نشان‌دهنده پراکنندگی روشنایی یا نور کامل است.  $a^*$  موقعیت آن بین سبز و قرمز متغیر است، مقادیر منفی  $a^*$  نشان‌دهنده رنگ‌های سبز و مقادیر مثبت آن به منزله رنگ‌های قرمز هستند.

$b^*$  موقعیت آن بین آبی و زرد متغیر است، مقادیر منفی  $b^*$  نشان‌دهنده رنگ‌های آبی و مقادیر مثبت آن به منزله رنگ‌های زرد هستند.

## ۳- تجزیه و تحلیل آماری

عکس‌های مربوط به تغییر رنگ توسط نرم افزار فتوشاپ<sup>۴</sup> CS7 به سیستم رنگی  $L^*a^*b$  تبدیل شدند. برای تعیین همبستگی بین تغییرات پرگنه‌ها و تغییر رنگ نانوحسگر از همبستگی پیرسون و رگرسیون خطی استفاده شد. نمودارها با استفاده از نرم افزار اکسل ۲۰۱۶ رسم شدند.

## ۴- نتایج و بحث

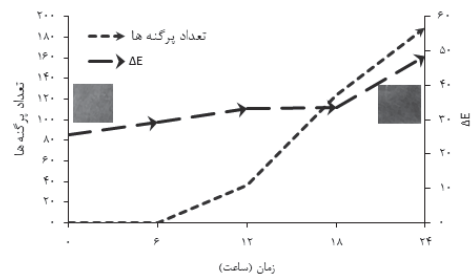
نمودار رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در شرایط بی‌هوای در (شکل ۱) نشان داده شده است. همانطور که در (شکل ۱) مشخص می‌باشد در ابتدای آزمایش هیچ پرگنه‌ای از باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در محیط کشت مشاهده نشد و این روند تا ساعت ۶ بعد از انکوباسیون نیز ادامه داشت. پس از گذشت این زمان تعداد پرگنه‌ها افزایش یافته و در نهایت در ساعت ۲۴ به تعداد  $0.81 \pm$  ۱۸۹ پرگنه رسید به طوری که تمام سطح پلیت را پوشانده

بودند ( $p < 0.05$ ). با رشد باکتری‌ها در سطح محیط کشت و افزایش فعالیت آن‌ها، رنگ نانوسنسورها نیز تغییر یافت. رنگ سنسورها در ابتدا و انتهای آزمایش به ترتیب سبز و آبی بود. بر این اساس، میزان تغییرات رنگی نانوحسگر نیز افزایش نشان داد. تغییرات رنگی تا ساعت ۱۲ آنکوباسیون مقدار ۳۳/۲۱ ولی در انتها به عدد ۴۸/۳۷ رسید. نتایج آزمون همبستگی پیرسون بین شاخص تغییر رنگ و تغییرات تعداد باکتری همبستگی بسیار خوب مثبت ۰/۹ را نشان داد. رگرسیون خطی بین این دو شاخص نیز  $R^2 = ۰/۸۱$  را نشان داد. باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در محیط کشت با مصرف منبع کربن موجود در محیط کشت شروع به تولید ترکیبات مختلفی نظیر: استات<sup>۱</sup>، لاکتات<sup>۲</sup>، فرمات<sup>۳</sup>، اتانول<sup>۴</sup> و کربن دی اکسید<sup>۵</sup> می‌کند که تولید آن‌ها در شرایط هوایی و بی‌هوازی متفاوت است [۱۷]. این ترکیبات تولید شده توسط باکتری می‌توانند از طریق پیوندهای هیدروژنی، کووالانسی<sup>۶</sup> و... بین گروه‌های هیدروکسیل، آمین، متیل و سایر گروه‌های عاملی موجود در نانوحسگر جذب شده و باعث تغییر در pH بخش مترجم نانوحسگر شده و در نهایت باعث ایجاد تغییر رنگ در آن شوند. بر این اساس با افزایش تعداد پرگنه‌ها در محیط کشت، میزان فعالیت آن‌ها در استفاده از سوبسترا افزایش یافته و به تبع آن تولید آنالیت‌ها نیز توسط آن‌ها افزایش می‌یابد. این امر در نهایت باعث تغییر رنگ نانوحسگر می‌گردد. در مطالعه حاضر نیز با افزایش غلظت گاز CO<sub>2</sub> به دلیل فعالیت باکتری، این گاز توسط گروه‌های آمینی موجود در نانوحسگر جذب شده و رنگ نانوحسگر تغییر یافت. قبلاً در مطالعه‌ای ژائو<sup>۷</sup> و همکاران (۲۰۱۲) جذب گاز CO<sub>2</sub> با استفاده از گرافن اکساید آمین‌دار شده را گزارش کرده بودند [۱۸، ۱۹]. در مطالعه دیگری که توسط آلهوگایل<sup>۸</sup> و همکاران

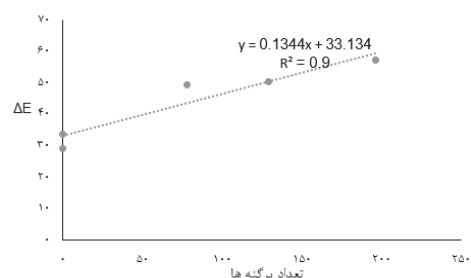
- 1- Lactate
- 2- Acetate
- 3- Formate
- 4- Ethanol
- 5- CO<sub>2</sub>
- 6- Covalent Bond
- 7- Zhao
- 8- Alhogail

- 9- D-amino
- 10- Protease
- 11- Carey

نیز با این یافته‌ها همخوانی داشته و رنگ نانوسنسورها با گذشت زمان تغییر یافت.



شکل (۱. الف) تغییرات تعداد پرگنه‌های باکتری لیستریا مونوسایتوزنز و تغییرات رنگی حسگر در طول ۲۴ ساعت



شکل (۱. ب) معادله رگرسیونی بین تغییرات تعداد پرگنه‌های باکتری لیستریا مونوسایتوزنز و تغییرات رنگی حسگر

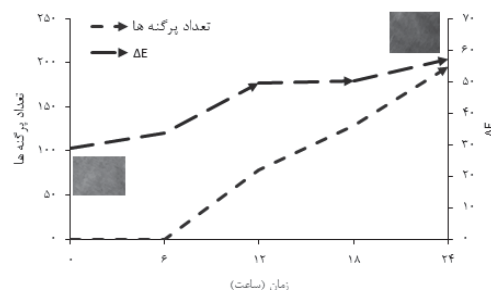
بررسی روند رشد باکتری *S. aureus* و تغییر رنگ نانوسنسور تهیه شده در (شکل ۲) نشان داده شده است. همان طوری که در (شکل ۲. الف) مشخص می‌باشد تعداد پرگنه‌های این باکتری در طول ۲۴ ساعت روند افزایشی نشان داده است و در نهایت در انتهای دوره انکوباسیون به تعداد  $196 \pm 4/54$  پرگنه رسیدند بطوریکه تمام سطح محیط کشت را پوشانده بودند ( $p < 0.05$ )، بین فاصله زمانی ۶ تا ۱۲ ساعت یک تغییر رنگ جزئی در حسگر مشاهده گردید. روند تغییر رنگ تا ساعت ۲۴ ادامه یافت و در این زمان بیشترین تغییر رنگ ( $\Delta E = 57$ ) در نانوحسگر ثبت شد. نتیجه همبستگی پیرسون بین تغییرات تعداد باکتری‌ها و تغییرات رنگی عدد مثبت  $0.94$  را نشان داد. ضریب همبستگی خطی بین این دو شاخص مطابق نمودار نشان داده شده در (شکل ۲. ب) عدد  $R^2 = 0.9$  را نشان داد. باکتری استافیلوکوکوس اروتوس در زمان فعالیت بر روی سوبسترا

یکسری پروتئاز برون سلولی تولید می‌کند که امروزه این پروتئازها به خوبی شناخته شده و برای شناسایی این باکتری مورد توجه محققین قرار گرفته‌اند [۲۳]. در مطالعه‌ای سیوآیفان<sup>۱</sup> و همکاران (۲۰۱۹) توانایی شناسایی پروتئاز تولید شده از باکتری استافیلوکوکوس اروتوس در محیط کشت با استفاده از پلیت کشت حاوی شناساگر رنگی برمکروزل بنفش<sup>۲</sup> و برموتیمول آبی را بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که یک رابطه مستقیم بین رشد باکتری و هاله پروتئاز تولید شده به وسیله باکتری وجود دارد که پس از تولید این پروتئازها رنگ شناساگر نیز تغییر می‌یابد. همچنین نتایج نشان داد که در غلظت‌های مختلف باکتری شدت تغییر رنگ شناساگر نیز متفاوت بود [۲۳]. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۳ توسط سونگ<sup>۳</sup> و همکاران (۲۰۱۳) انجام شد از نانوکامپوزیت‌های تشکیل شده از نانوذرات مغناطیسی و نانوذرات طلا و آنتی بادی برای تشخیص باکتری استافیلوکوکوس اروتوس در شیر استفاده شد. نتایج نشان داد که این بیوحسگر رنگی به ترتیب قادر به تشخیص مقادیر  $10^3 \times 1/5$  (CFU/ml) و  $10^5 \times 1/5$  باکتری استافیلوکوکوس اروتوس در بافر فسفات نمکی و شیر می‌باشد. این محققین اظهار داشتند که نتایج شناسایی این باکتری با افزودن نانوذرات طلا بسیار بیشتر از زمانی بود که از نانوذرات طلا استفاده نشده بود. همچنین با افزایش غلظت باکتری توانایی نانوکامپوزیت تهیه شده در شناسایی باکتری استافیلوکوکوس اروتوس افزایش یافت و شدت تغییر رنگ آن نیز افزایش نشان داد [۲۴]. بر اساس مطالعات عنوان شده و دیگر مطالعات می‌توان عنوان کرد که با رشد باکتری استافیلوکوکوس اروتوس در سوبستراهای آلوده شده به آن، به دلیل تولید آنزیم‌های پروتئاز برون سلولی توسط باکتری فرایند هضم پروتئین‌ها اتفاق می‌افتد که نتیجه آن رهایش آمین‌های ناشی از تجزیه پروتئین‌ها است. در مطالعه حاضر، آمین‌های آزاد شده توسط گروه‌های

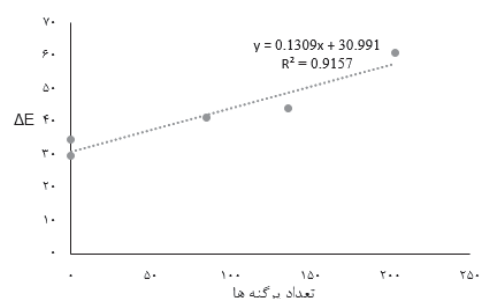
- 1- Suaifan
- 2- Bromocresol Purple
- 3- Sung

همبستگی پیرسون بین آن‌ها عدد مثبت ۰/۹۵ را نشان داد. پارک<sup>۱</sup> و همکاران (۲۰۱۵) در مطالعه‌ای از یک سیستم رنگی حاوی نانوذرات مغناطیسی جهت شناسایی باکتری‌ها استفاده کردند. مکانیسم عمل این بیوحسگر بدین گونه بود که نانوذرات مورد استفاده قابلیت عملکرد شبه آنزیمی (پروکسیدازی) بودند بدین گونه که توانایی تغییر رنگ سوبسترای رنگی<sup>۲</sup> (TMB) 5,5- , 3,3 را داشتند. بعد از افزودن باکتری سالمونلا تیفی موریوم به محلول حاوی نانوذرات مغناطیسی متناسب با جذب باکتری توسط نانوذرات، مکانیسم پروکسیدازی آن افزایش پیدا کرده و این افزایش فعالیت سبب بروز تغییر رنگ در سوبسترای رنگی شده و از حالت بی‌رنگ به آبی تغییر رنگ می‌داد. در مطالعه‌ای دیگری از بیوحسگر ساخته شده بر پایه‌ی نانوذرات مغناطیسی که حاوی آنتی‌بادی جهت شناسایی باکتری سالمونلا تیفی موریوم استفاده کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که بیوحسگر موردنظر قابلیت شناسایی محدوده- ای خطی (CFU/ml) ۱۰<sup>۰</sup>-۱۰<sup>۱</sup> را دارا می‌باشد. کمترین مقداری از باکتری را که توانست شناسایی کند، مقدار (CFU/ml) ۱۰<sup>۱</sup> × ۱/۶ است [۲۵]. به طور کلی باکتری سالمونلا تیفی موریوم در محیط کشت پس از رشد شروع به تولید H<sub>2</sub>S می‌کند. بر این اساس، در مطالعه حاضر پس از رهایش این گاز در محیط کشت این گاز می‌تواند از طریق گروه‌های آمینو موجود در نانوصفحات گرافن اکسید آمین دار جذب شده و باعث تغییر رنگ در نانوحسگر مورد مطالعه گردد [۲۶].

هیدروکسیل موجود در نانوصفحات گرافن اکسید آمین دار از طریق پیوند هیدروژنی جذب شده و باعث افزایش pH نانوحسگر شده که این امر نیز باعث تغییر رنگ نانوحسگر می‌گردد.



شکل (۲. الف) تغییرات تعداد پرگنه‌های باکتری استافیلوکوکوس اروتوس و تغییرات رنگی حسگر در طول ۲۴ ساعت



شکل (۲. ب) معادله رگرسیونی بین تغییرات تعداد پرگنه‌های باکتری استافیلوکوکوس اروتوس و تغییرات رنگی حسگر

شکل (۳. الف) روند رشد باکتری سالمونلا تیفی موریوم و تغییر رنگ نانوسنسور تهیه شده را نشان می‌دهد. برای باکتری سالمونلا تیفی موریوم نیز در ابتدای آزمایش تعداد پرگنه‌های این باکتری صفر و بعد از گذشت ۲۴ ساعت به تعداد ۵/۱۷ ± ۲۰۳ عدد رسید به طوری که تمام سطح محیط کشت را پوشانده بودند. همانطور که (شکل ۳) قابل مشاهده است در ابتدای روند رشد این باکتری، تغییرات رنگ نانوسنسورها به صورت یکنواختی روند افزایشی داشته است. در مطالعه حاضر، همانند سایر باکتری‌های بررسی شده تغییرات رنگی حسگر برای این باکتری نیز در انتهای آزمایش بیش‌ترین مقدار را داشته است (شکل ۳. ب) (ΔE=۶۱). نتیجه رگرسیون خطی بین دو شاخص تغییرات تعداد پرگنه و تغییرات رنگی نانوحسگر عدد R<sup>2</sup>= ۰/۹۱ را نشان داد.

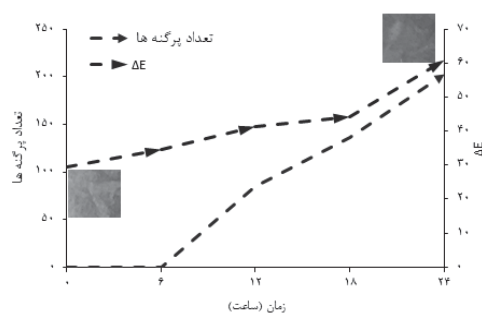
1- Park

2- Tetramethylbenzidine

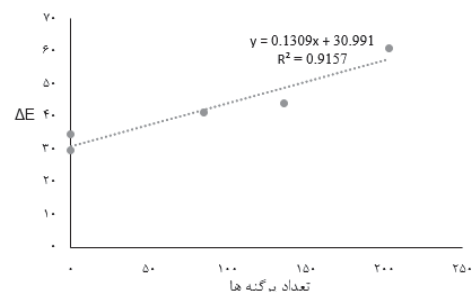


## ۶- منابع

1. Alboofetileh, M., Rezaei, M., Tabarsa, M., Rittà, M., Donaliso, M., Mariatti, F., ... & Cravotto, G. (2019). "Effect of different non-conventional extraction methods on the antibacterial and antiviral activity of fucoidans extracted from *Nizamuddinia zanardinii*." International journal of biological macromolecules, 124, 131-137.
2. Alhogail, S., Suaifan, G. A., & Zourob, M. (2016). "Rapid colorimetric sensing platform for the detection of *Listeria monocytogenes* foodborne pathogen." Biosensors and Bioelectronics, 86, 1061-1066.
3. Basu, P. K., Indukuri, D., Keshavan, S., Navratna, V., Vanjari, S. R. K., Raghavan, S., & Bhat, N. (2014). "Graphene based *E. coli* sensor on flexible acetate sheet." Sensors and Actuators B: Chemical, 190, 342-347.
4. Bumbudsanpharoke, N., & Ko, S. (2019). "Nanomaterial-based optical indicators: promise, opportunities, and challenges in the development of colorimetric systems for intelligent packaging." Nano Research, 12(3), 489-500.
5. Chen, Q., Li, H., Ouyang, Q., & Zhao, J. (2014). "Identification of



شکل (۳. الف) تغییرات تعداد پرگنه‌های باکتری سالمونلا تیفی مورمیوم و تغییرات رنگی حسگر در طول ۲۴ ساعت



شکل (۳. ب) معادله رگرسیونی بین تغییرات تعداد پرگنه‌های باکتری سالمونلا تیفی مورمیوم و تغییرات رنگی حسگر

## ۵- نتیجه گیری

در مطالعه حاضر به منظور بررسی روند رشد تعداد پرگنه‌های باکتری‌های پاتوژن غذایی لیستریا مونوسایتوژنز، سالمونلا تیفی مورمیوم و استافیلوکوکوس اروئوس در محیط کشت، از حسگر رنگی ساخته شده از نانوصفحات گرافن اکسید آمین دار استفاده گردید. نتایج نشان داد هر کدام از باکتری‌های مورد مطالعه در زمان رشد باعث ایجاد تغییر رنگ مختلفی در نانوحسگر گرافن اکسید آمین دار شدند در حالی که هیچ گونه تغییر رنگی در تیمار شاهد مشاهده نگردید. در مطالعه حاضر، با توجه با نتایج به دست آمده از همبستگی بین شاخص تغییر رنگ و روند تغییر رشد باکتری‌ها می‌توان این نتیجه را گرفت که استفاده از نانوحسگر گرافن اکسید آمین دار شده بر پایه کاغذ صافی می‌تواند یک جایگزین مناسب برای روش‌های معمول شمارش کلنی باکتریایی باشد.

- application.”** Sensors and Actuators B: Chemical, 305, 127447.
11. Kuswandi, B., Maryska, C., Abdullah, A., & Heng, L. Y. (2013). **“Real time on-package freshness indicator for guavas packaging.”** Journal of Food Measurement and Characterization, 7 (1), 29-39.
  12. Lim, S. H., Mix, S., Xu, Z., Taba, B., Budvytiene, I., Berliner, A. N., ... & Martino, R. A. (2014). **“Colorimetric sensor array allows fast detection and simultaneous identification of sepsis-causing bacteria in spiked blood culture.”** Journal of clinical microbiology, 52(2), 592-598.
  13. Alaie, M. M., Jahangiri, M., Rashidi, A. M., Asl, A. H., & Izadi, N. (2015). **“A novel selective H<sub>2</sub>S sensor using dodecylamine and ethylenediamine functionalized graphene oxide.”** Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 29, 97-103.
  14. Carey, J. R., Suslick, K. S., Hulkower, K. I., Imlay, J. A., Imlay, K. R., Ingison, C. K., ... & Wittrig, A. E. (2011). **“Rapid identification of bacteria with a disposable colorimetric sensing array.”** Journal of the American Chemical Society, 133(12), 4650-4655.
  6. Duncan, T. V. (2011). **“Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: barrier materials, antimicrobials and sensors.”** Journal of colloid and interface science, 363(1), 1-24.
  7. Guo, R., Wang, S., Huang, F., Chen, Q., Li, Y., Liao, M., & Lin, J. (2019). **“Rapid detection of Salmonella Typhimurium using magnetic nanoparticle immunoseparation, nanocluster signal amplification and smartphone image analysis.”** Sensors and Actuators B: Chemical, 284, 134-139.
  8. Huang, J., Sun, J., Warden, A. R., & Ding, X. (2020). **“Colorimetric and photographic detection of bacteria in drinking water by using 4-mercaptophenylboronic acid functionalized AuNPs.”** Food Control, 108, 106885.
  9. Hummers Jr, W. S., & Offeman, R. E. (1958). **“Preparation of graphitic oxide. Journal of the American chemical society,”** 80(6), 1339-1339.
  10. Ko, Y., Jeong, H. Y., Kwon, G., Kim, D., Lee, C., & You, J. (2020). **“pH-responsive polyaniline /polyethylene glycol composite arrays for colorimetric sensor**

- flame atomic absorption spectrometric determination of copper and cadmium.”**  
 Talanta, 79(4), 1066-1070.
20. Sung, Y. J., Suk, H. J., Sung, H. Y., Li, T., Poo, H., & Kim, M. G. (2013). **“Novel antibody/gold nanoparticle/magnetic nanoparticle nanocomposites for immunomagnetic separation and rapid colorimetric detection of Staphylococcus aureus in milk.”** Biosensors and Bioelectronics, 43, 432-439.
21. Valentini, F., Carbone, M., & Palleschi, G. (2013). **“Graphene oxide nanoribbons (GNO), reduced graphene nanoribbons (GNR), and multi-layers of oxidized graphene functionalized with ionic liquids (GO-IL) for assembly of miniaturized electrochemical devices.”** Analytical and bioanalytical chemistry, 405(11), 3449-3474.
22. Wilson, D., Materón, E. M., Ibáñez-Redín, G., Faria, R. C., Correa, D. S., & Oliveira Jr, O. N. (2019). **“Electrical detection of pathogenic bacteria in food samples using information visualization methods with a sensor based on magnetic nanoparticles functionalized with antimicrobial peptides.”** Talanta, 194, 611-618.
- Chemical Society, 133(19), 7571-7576.
15. Roh, S. G., Robby, A. I., Phuong, P. T. M., In, I., & Park, S. Y. (2019). **“Photoluminescence-tunable fluorescent carbon dots-deposited silver nanoparticle for detection and killing of bacteria.”** Materials Science and Engineering: C, 97, 613-623.
16. Romick, T. L., Fleming, H. P., & McFeeters, R. F. (1996). **“Aerobic and anaerobic metabolism of Listeria monocytogenes in defined glucose medium.”** Applied and environmental microbiology, 62(1), 304-307.
17. Shin, G. J., Rhee, K., & Park, S. J. (2016). **“Improvement of CO<sub>2</sub> capture by graphite oxide in presence of polyethylenimine.”** International Journal of Hydrogen Energy, 41(32), 14351-14359.
18. Su, H., Zhao, H., Qiao, F., Chen, L., Duan, R., & Ai, S. (2013). **“Colorimetric detection of Escherichia coli O157: H7 using functionalized Au@ Pt nanoparticles as peroxidase mimetics.”** Analyst, 138(10), 3026-3031.
19. Shabani, A. M. H., Dadfarnia, S., & Dehghani, Z. (2009). **“On-line solid phase extraction system using 1, 10-phenanthroline immobilized on surfactant coated alumina for the**

23. Yavari, F., Chen, Z., Thomas, A. V., Ren, W., Cheng, H. M., & Koratkar, N. (2011). **“High sensitivity gas detection using a macroscopic three-dimensional graphene foam network.”** Scientific reports, 1(1), 1-5.
24. Zawisza, B., Baranik, A., Malicka, E., Talik, E., & Sitko, R. (2016). **“Preconcentration of Fe (III), Co (II), Ni (II), Cu (II), Zn (II) and Pb (II) with ethylenediamine-modified graphene oxide.”** Microchimica Acta, 183(1), 231-240.
25. Zhao, Y., Ding, H., & Zhong, Q. (2012). **“Preparation and characterization of aminated graphite oxide for CO<sub>2</sub> capture.”** Applied Surface Science, 258(10), 4301-4307.
26. Allardyce, R. A., Langford, V. S., Hill, A. L., & Murdoch, D. R. (2006). **“Detection of volatile metabolites produced by bacterial growth in blood culture media by selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS).”** Journal of microbiological methods, 65(2), 361-365.

#### آدرس نویسنده

مازندران- دانشکده منابع طبیعی و علوم

دریایی- دانشگاه تربیت مدرس- نور- ایران