DOI: http://dx.doi.org/ 10.22104/JIFT.2019.3581.1860

فصلنامه فناوری‌های جدید در صنعت غذا، دوره ۸، شماره ۴، صفحه ۴۶۸-۴۵۷، تابستان ۱۴۰۰

مقاله پژوهشی

ساخت و پیاده‌سازی یک زیست‌حسگر به‌منظور ارزیابی سلامت در شیر خام

آیت محمدرزداری[۱]، سجاد رستمی[۲*]، زهرا ایزدی[۳]، مهدی قاسمی ورنامخواستی[۲]، علی‌اصغر انصافی[۴]، مجتبی بنیادیان[۵]

۱. دانشجوی دکتری، گروه مهندسی مکانیک بیوسیستم، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد
۲. دانشیار، گروه مهندسی مکانیک بیوسیستم، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد
۳.استادیار، گروه مهندسی مکانیک بیوسیستم، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد
۴. استاد، گروه شیمی، دانشگاه صنعتی اصفهان
۵. دانشیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد

(تاریخ دریافت: ۹۸/۲/۹، تاریخ آخرین بازنگری: ۹۸/۳/۱۸، تاریخ پذیرش: ۹۸/۴/۲۹)

چکیده

استفاده مفرط از داروهای دامپزشکی، از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به باقی‌ماندن آن‌ها در فرآورده‌های دامی مثل گوشت، شیر و تخم‌مرغ می‌شود؛ بنابراین شناسایی سریع، دقیق و اقتصادی آنتی‌بیوتیک‌ها، به‌منظور پایش امنیت غذایی ضروری به‌نظر می‌رسد. در تحقیق حاضر، یک زیست‌حسگر مبتنی بر الکترود مغز مداد گرافیتی اصلاح‌شده با گرافن و نانو ذرات طلا جهت تشخیص آنتی‌بیوتیک بتالاکتام در نمونه‌های شیر ساخته شد. از تکنیک‌های ولتامتری چرخه‌ای و طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی برای ارزیابی تغییرات سطح الکترود استفاده شد. تحت شرایط بهینه، با استفاده از تکنیک طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی مشخص شد که در محدوده 1×10^{-15} M تا 1×10^{-5}، رابطه تغییرات مقاومت انتقال بار با لگاریتم غلظت آنتی‌بیوتیک خطی بود و از معادله رگرسیونی ($R^2=0.977$) y=119x+2600 تبعیت کرد. پیک جریان در سه مرتبه اندازه‌گیری، به ترتیب ۱۸، ۱۹/۵ و ۱۹ μA به دست آمد. محاسبه انحراف استاندارد نسبی (RSD=٪۳/۳۱) حاکی از تکرارپذیری قابل‌قبول زیست‌حسگر بود. برای بررسی تکثیرپذیری انحراف استاندارد نسبی پیک‌های جریان ۸/۹۴٪ به دست آمد که نشان از تکثیرپذیری نسبتاً مطلوب زیست‌حسگر داشت. گزینش‌پذیری زیست‌حسگر در حضور سه آنتی‌بیوتیک، شامل استرپتومایسین، تتراسایکلین و سولفادیازین آزمون شد و نتایج داده‌های مقاومت انتقال بار نشان داد که زیست‌حسگر نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها، پاسخ قابل‌توجهی ندارد. نتایج نشان داد که پاسخ زیست‌حسگر بعد از گذشت ۱۸ روز ۶٪ در مقایسه با روز اول، کاهش می‌یابد که نشان از پایداری مطلوب زیست‌حسگر دارد. محدوده درصد بازیابی برای نمونه‌های شیر در غلظت‌های 1×10^{-9} M و 1×10^{-11} برای دو نمونه شیر گاو و گوسفند، در سه تکرار ۹۲/۳ تا ۱۰۴٪ به دست آمد که حاکی از درصد بازیابی قابل‌قبول برای زیست‌حسگر پیشنهاد شده دارد.

کلیدواژه‌ها: آنتی بیوتیک، شیر، حسگر زیستی، نانو ذرات طلا، طیف سنجی امپدانس الکتروشیمیایی

* نویسنده مسئول: rostami.sajad@yahoo.com

۱. مقدمه

شیر یکی از گروه‌های اصلی برنامه غذایی انسان محسوب می‌شود که اهمیت آن بر کسی پوشیده نیست؛ بنابراین، بهداشت، سلامت و امنیت غذایی ویژه‌ای دارد. از مهم‌ترین آلودگی‌های شیر می‌توان به آنتی‌بیوتیک‌ها اشاره کرد که تهدیدی جدی برای سلامت مصرف‌کننده است [۱]. آنتی بیوتیک‌ها معمولاً برای درمان بیماری‌های عفونی و کنترل رشد دام‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. استفاده نامناسب و بی‌اندازه از آنتی‌بیوتیک‌ها در داروهای دامپزشکی، منجر به باقیماندن سطوح غیرمجاز در زنجیره غذایی انسان و افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی می‌شود و در نهایت خطرات قابل توجهی برای مصرف‌کنندگان، از جمله افزایش هزینه‌های درمان را در پی دارد [۲]. در بین آنتی‌بیوتیک‌ها، خانواده بتالاکتام به‌دلیل آن‌که اغلب برای درمان ماستیت بالینی گاوهای شیری تجویز می‌شوند، منبع اصلی آنتی بیوتیک‌ها موجود در شیر محسوب می‌شوند [۳]. به‌منظور حفظ سلامت عمومی مصرف‌کننده و کاهش هزینه‌ها، اتحادیه اروپا بیشترین حد مجاز را برای اکثر داروهای دامپزشکی مشخص کرده است؛ برای مثال حداکثر حد مجاز آنتی بیوتیک پنی‌سیلین در شیر ۴ μg/L است [۴].

تاکنون روش‌های مختلفی برای شناسایی آنتی‌بیوتیک‌ها در مواد غذایی مختلف گزارش شده است که می‌توان به کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، روش‌های میکروبی، روش‌های رنگ‌سنجی و اسپکترومتری جرمی اشاره کرد[۵]. اگرچه این روش‌ها دقیق و حساس هستند، اما هزینه‌بر، وقت‌گیر، نیازمند تجهیزات حجیم و پیچیده، کاربر متخصص و آماده‌سازی پیچیده نمونه برای آزمایش هستند [۶]. برای غلبه بر محدودیت‌های روش‌های مذکور، طراحی و پیاده‌سازی حسگرهای زیستی (بیوسنسورها) در سال‌های اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده است. بیوسسنورها ابزاری دقیق، حساس، قابل‌حمل، اختصاصی و سریع هستند. در بین انواع مختلف بیوسنسورها، نوع الکتروشیمیایی کاربردهای مختلفی در صنایع غذایی پیدا کرده است [۷].

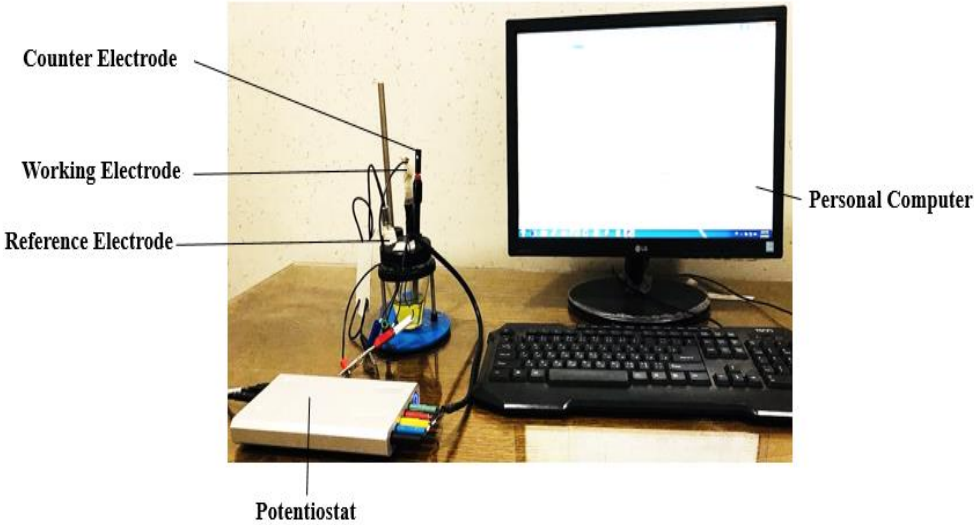
در سال‌های اخیر، استفاده از نانو مواد برای افزایش حساسیت بیوسنسورها توجه زیادی را به خود جلب کرده است. برای افزایش حساسیت بیوسنسورها، می‌توان از نامواد‌ها، مثل گرافن و نانو ذرات طلا استفاده کرد [۸]. گرافن به‌دلیل ساختار سه‌بعدی منحصربه‌فرد و سازگار بودن با محیط زیست گزینه ایده‌آل برای کاربرد در بیوسنسورهای الکتروشیمیایی به شمار می‌آید [۹]. همچنین استفاده از نانو ذرات طلا، به‌دلیل قابلیت هدایت الکتریکی بالا و اندازه کوچک به‌طور گسترده‌ای در ساخت و بهبود حساسیت بیوسنسورهای الکتروشیمیایی استفاده می‌شود [۱۴-۱۰].

امروزه با پیشرفت تکنولوژی در زمینه‌های مختلف، از جمله صنایع غذایی و دامپزشکی و همچنین لزوم نظارت بر مواد غذایی از نظر سلامت، همواره محققان در پی تکنولوژی‌های پیشرفته، دقیق، حساس، سریع و کم‌هزینه هستند. با توجه به محدودیت‌های موجود در روش‌های مرسوم شناسایی آنتی بیوتیک‌ها، از جمله اقتصادی نبودن، زمان‌بر بودن، نیازمند تجهیزات بزرگ، نیروی متخصص و آماده‌سازی پیچیده نمونه، در این مطالعه سعی شد تا با ساخت ابزاری کم‌حجم، ارزان‌قیمت، سریع و دقیق در پاسخ به این نیاز صنعت و پایش سلامت شیر، میزان باقیمانده آنتی‌بیوتیک شناسایی شود؛ لذا هدف از مطالعه حاضر، ساخت و پیاده‌سازی یک حسگر زیستی مبتنی‌بر الکترود مغز مداد گرافیتی اصلاح‌شده با نانو ورقه‌های گرافن و طلا به‌منظور شناسایی آنتی‌بیوتیک بتالاکتام در شیر خام بود.

۲. مواد و روش

۱.۲. تجهیزات مورد استفاده

به‌منظور انجام آزمایش‌های الکتروشیمیایی، از دستگاه پتانشیواستات مدل Vetrtex1 استفاده شد. در سیستم زیست‌حسگر، دستگاه پتانشیواستات نقش مبدل را ایفا می‌کند، در واقع واکنش‌های شیمیایی که در سطح الکترود کاری رخ می‌دهد را به داده‌های قابل‌تجزیه و تحلیل تبدیل می‌کند. در این مطالعه، از یک سیستم متداول سه الکترودی متصل به رایانه استفاده شد که شامل الکترودهای مغز مداد گرافیتی، نقره/نقره کلرید و پلاتین که به‌ترتیب نقش الکترودهای کاری، مرجع و کمکی را داشتند، استفاده شد. تمامی آزمایش‌ها در دمای اتاق انجام شد. در شکل (۱)، تصویر سیستم سه الکترودی، همراه با دستگاه پتانشیواستات آورده شده است.



شکل (۱) تصویر سیستم اندازه‌گیری
Fig (1) Image of the measurement system

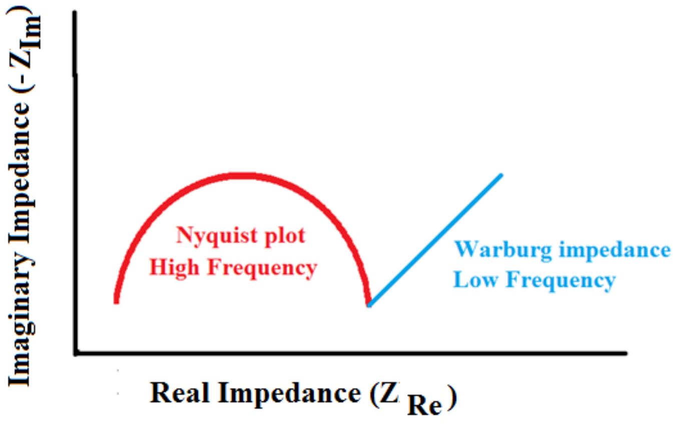
۲.۲. سنتز نانو ورقه‌های گرافن

برای سنتز گرافن از روش هامر استفاده شد [۱۵]. به‌طور خلاصه، یک گرم پودر گرافیت (با اندازه ذرات ۷۰ میکرون و درجه خلوص ۹۹/۹۹٪) به مخلوط نیتریک اسید/سولفوریک اسید غلیظ با نسبت (۱:۶ حجمی) افزوده و در حمام یخ قرار داده شد؛ سپس عامل اکسنده (در این روش از $KMnO_4$ با نسبت وزنی ۶ برابر پودر گرافیت) درحالی‌که مخلوط گرافیت/اسید هم زده می‌شد، به تدریج طی ۱۰ مرتبه با فاصله زمانی ۱۵ min افزوده شد. در پایان سوسپانسیون گرافن اکسید در حمام یخ قرار داده شد و ۱۲/۵ g سدیم بورهیدرات ($NaBH_4$) در ۵۰ ml در آب سرد تهیه شد (با نسبت وزنی ۵ برابر گرافن اکسید) و قطره‌قطره به سوسپانسیون گرافن اکسید اضافه شد (در شرایط حمام یخ) تا گرافن اکسید احیا شده به دست آید.

۳.۲. تکنیک‌های مورد استفاده

در مطالعه حاضر، از دو تکنیک ولتامتری چرخه‌ای و طیف-سنجی امپدانس الکتروشیمیایی استفاده شد. ولتامتری چرخه‌ای یک روش الکتروشیمیایی جریان مستقیم است که پاسخ یک جریان را درحالی که پتاسیل در سطح الکترود کاری اعمال می‌شود، ثبت می‌کند. در واقع پتاسیل از یک نقطه شروع می‌شود تا مقدار مشخصی پیش می‌رود و در پایان، به نقطه شروع بازمی‌گردد. این چرخه می‌تواند به تعداد دلخوه تکرار شود. در این مطالعه، از محدوده پتاسیل و سرعت روبش V ۰/۳- تا ۰/۷+ و ۵۰ mV/s ، به‌ترتیب برای تکنیک ولتامتری چرخه‌ای استفاده شد.

طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی یکی از مهم‌ترین روش‌های مشخصه‌یابی، شامل مطالعه سرعت انتقال الکترون و پدیده انتشار در واکنش‌های الکتروشیمیایی است. ماهیت امپدانس، مقاومت مختلطی است که به‌صورت مقاومت موهومی برحسب مقاومت واقعی تحت نام منحنی نیکوییست رسم می‌شود. بخش نیم‌دایره‌ای در فرکانس‌های بالاتر به فرایند انتقال الکترون و قسمت خطی (امپدانس واربرگ) در فرکانس‌های پایین‌تر به پدیده انتشار مربوط می‌شود [۱۶]. برای تکنیک امپدانس از محدوده فرکانس Hz ۱۰۰۰۰۰-۰/۰۱ و دامنه پتانسیل ۱۵۰ mV استفاده شد [۱۷]. در شکل (۲) شماتیک طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی نشان داده شده است.



شکل (۲) شماتیک طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی
Fig (2) Schematic of electrochemical impedance spectroscopy

۴.۲. ساخت زیست‌حسگر

به‌منظور فعال‌سازی الکترود کاری از تکنیک ولتامتری چرخه‌ای استفاده شد. برای این منظور، پتانسیل V ۱/۵+ در سرعت روبش mV/s ۴۰) با تعداد ۱۰ سیکل به سطح الکترود مغز مداد گرافیتی در محلول M ۱ سدیم هیدروکسید اعمال شد. برای هر آزمایش، تنها سه میلی‌متر از الکترود کاری در محلول قرار داده شد. به‌منظور تثبیت گرافن، سه میلی‌متر از الکترود کاری به‌مدت min ۹۰ در دمای اتاق در محلول گرافن قرار داده شد. سپس الکترود کاری در محلول بافر فسفات µ ۰/۱ قرار داده شد و تکنیک ولتامتری چرخه‌ای در محدوده پتانسیل V ۰/۱- تا ۰/۷+ (۱۰ سیکل) بر روی آن اعمال شد. به‌منظور تثبیت نانو ذرات طلا بر روی الکترود کاری، از روش ولتامتری چرخه‌ای در محدوده پتانسیل V ۰/۵- تا ۱/۵+ ، سرعت روبش mV/s ۵ در محلول µm ۳ محلول نمک طلا ($HAuCl_4.3H_2O$) استفاده شد.

برای استقرار DNA اختصاصی آنتی‌بیوتیک بتالاکتام از توالی 5'-SH-TTA GTT GGG GTT CAG TTG G-3' استفاده شد. غلظت و زمان آپتامر با استفاده از تکنیک امپدانس الکتروشیمیایی بهینه شدند. بعد انتخاب غلظت و زمان آپتامر بهینه بر روی سطح الکترود، آنالیت (آنتی‌بیوتیک بتالاکتام) بر روی الکترود کاری تثبیت و مدت‌زمان تثبیت آن بهینه شد.

۵.۲. شناسایی بتالاکتام در شیر

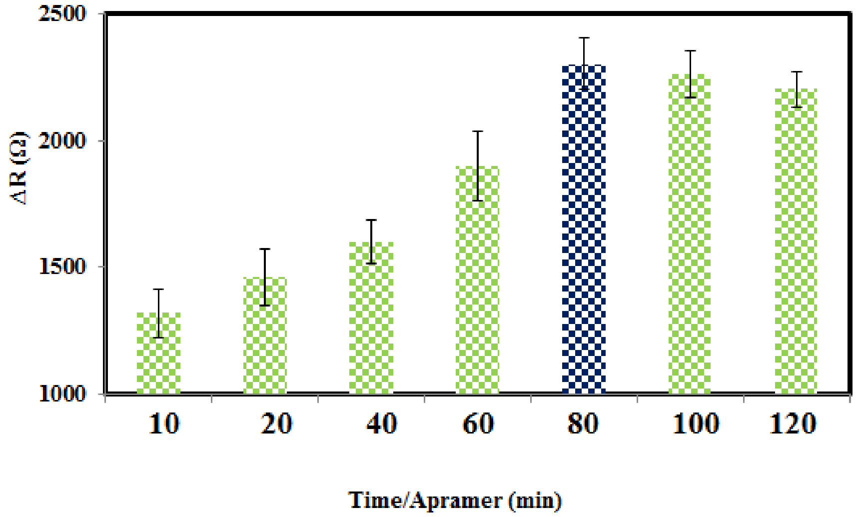
برای بررسی گزینش‌پذیری زیست‌حسگر در شناسایی دقیق بتالاکتام، از سایر آنتی‌بیوتیک‌ها مانند استرپتومایسین، تتراسایکلین و سولفادیازین نیز استفاده شد. برای این هدف، زیست‌حسگر ساخته‌شده در محلول آب تزریقی قرار داده شد. سپس الکترود به‌آرامی با آب دیونیزه شسته شد تا آنتی بیوتیک‌های جذب نشده جدا شوند. برای آماده‌سازی نمونه‌های شیر، ابتدا شیر در محلول بافر با نسبت حجمی ۱:۱۰ رقیق شد. با توجه به این‌که شیر حاوی چربی، کربوهیدرات و پروتئین است، برای حذف لایه‌های اضافی در ۳۰۰۰۰ دور بر دقیقه، به‌مدت min ۶۰ سانتریفیوژ شد. بعد از تشکیل سه لایه، لایه میانی که شیر خالص بود، برای انجام آزمایش‌های بعدی در دمای ^{o}C ۲۰- نگه‌داری شد.

۳. نتایج و بحث

۱.۳. بهینه‌سازی زمان و غلظت آپتامر

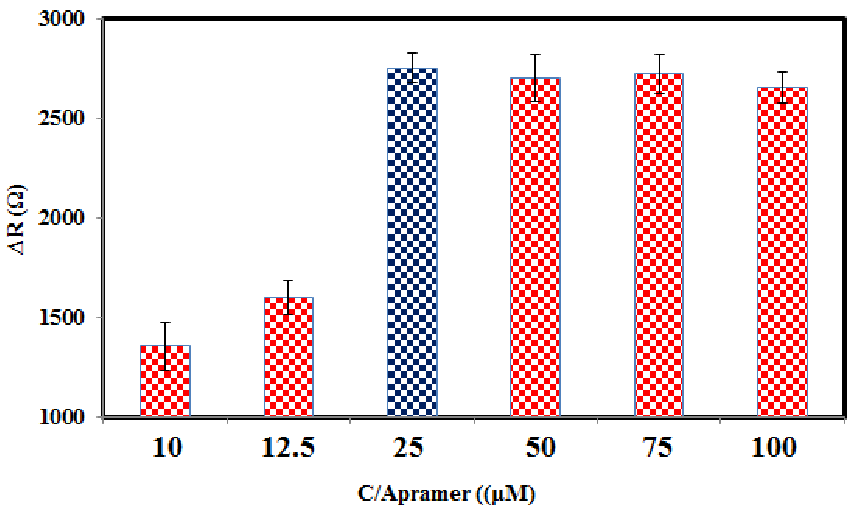
به‌منظور انتخاب زمان تثبیت آپتامر بر روی الکترود اصلاح شده با گرافن و نانو ذرات طلا، الکترود کاری در مدت زمان‌های مختلف min ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ در محلول آپتامر با غلظت مشخص قرار داده شد. سپس تکنیک امپدانس الکتروشیمیایی اعمال شد و مقاومت انتقال بار در قبل و بعد از تثبیت آپتامر بر روی الکترود کاری ثبت

شد. نتایج نشان داد که با افزایش مدت‌زمان تثبیت تا ۸۰ min مقاومت انتقال بار نیز افزایش می‌یابد و بعد از آن، تمایل به ثابت شدن دارد (شکل ۳). علت آن را می‌توان در پرشدن جایگاه‌های فعال در سطح الکترود کاری با رشته‌های آپتامر بعد از ۸۰ min جست‌وجو کرد.



شکل (۳) بهینه‌سازی زمان تثبیت آپتامر
Fig 3. Optimization of immobilization time of aptamer

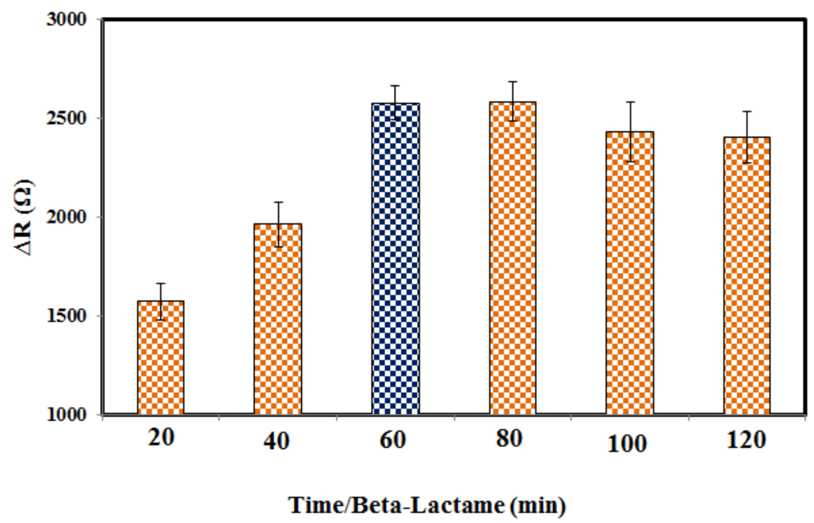
غلظت آپتامر، یکی از مهم‌ترین عامل در عملکرد زیست حسگر به شمار می‌آید. برای گزینش بهینه غلظت آپتامر، غلظت‌های مختلفی از آنتی‌بیوتیک بتالاکتام شامل ۱۰ μM، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ تهیه شد و سپس الکترود اصلاح شده با گرافن و نانو ذرات طلا، به‌مدت ۸۰ min (زمان بهینه آپتامر) در داخل ۱۰ ml از محلول آپتامر قرار گرفت. نتایج حاصل از به‌کارگیری تکنیک امپدانس الکتروشیمیایی، نشان داد که با افزایش غلظت تا ۲۵ μm، مقاومت انتقال بار افزایش می‌یابد و در غلظت‌های بالاتر از ۲۵ μm، مقاومت انتقال بار تغییر محسوسی ندارد که می‌تواند به‌دلیل اشباع شدن سطح الکترود با آپتامر در غلظت ۲۵ μm باشد. همان طور که در شکل (۴) نشان داده شده ست غلظت ۲۵ μm، به عنوان غلظت بهینه انتخاب شد.



شکل (۴) بهینه‌سازی غلظت آپتامر
Fig 4. Optimization of aptamar concentration

۲.۳. بهینه‌سازی زمان تثبیت بتالاکتام

پس از تثبیت گرافن و نانو ذرات طلا و همچنین آپتامر در شرایط بهینه بر روی الکترود کاری، لازم بود تا زمان تثبیت آنتی‌بیوتیک بهینه شود. برای این منظور، غلظت مشخصی از آنتی‌بیوتیک تهیه شد و سپس الکترود کاری در زمان‌های مختلف ۲۰ min، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ در محلول آنتی‌بیوتیک قرار داده شد. مقاومت انتقال بار در قبل و بعد از تثبیت آنتی‌بیوتیک بر روی الکترود کاری تا ۶۰ min افزایش و سپس کاهش یافت (شکل ۵)؛ بنابراین زمان ۶۰ min، به عنوان زمان بهینه تثبیت آنتی‌بیوتیک انتخاب شد.



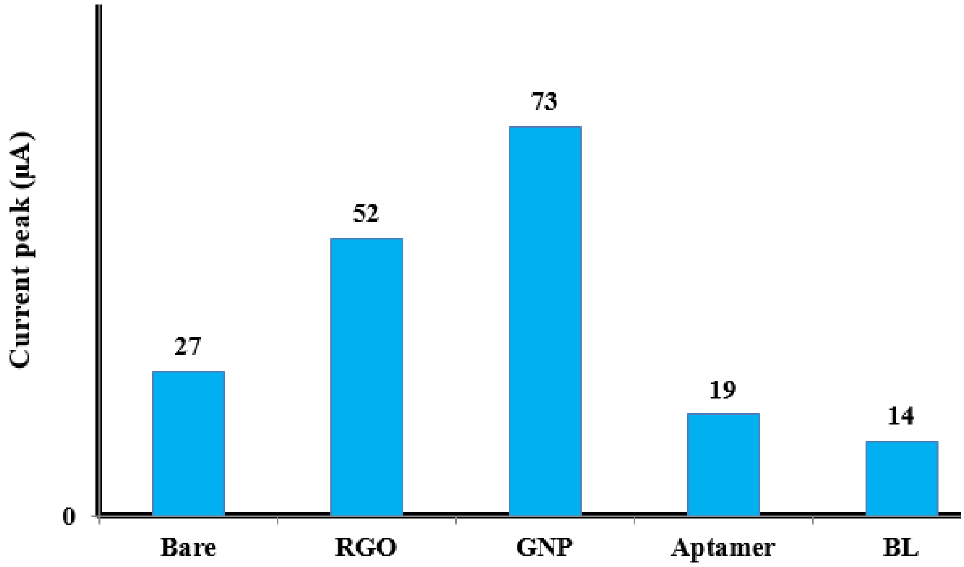
شکل (۵) بهینه‌سازی زمان تثبیت بتالاکتام

Fig 5. Optimization of immobilization time of beta-lactam

۳.۳. ارزیابی تغییرات سطح الکترود کاری با تکنیک‌های الکتروشیمیایی

به‌منظور ارزیابی عملکرد زیست‌حسگر ساخته‌شده از تکنیک‌های ولتامتری چرخه‌ای و امپدانس الکتروشیمیایی استفاده شد. در شکل (۶)، تغییرات سطح الکترود کاری در مراحل مختلف ساخت، برحسب پیک جریان به دست آمده از تکنیک ولتامتری چرخه‌ای، در محلول حاوی ۵ میلی‌مولار فری فروسیانید با ۰/۱۰ M پتاسیم کلرید، با سرعت روبش ۵۰ mV/s نشان داده شده است. بر طبق شکل (۶)، بعد از تثبیت گرافن (RGO) و نانو ذرات طلا (GPN) بر روی الکترود مغز مداد گرافیتی اصلاح‌نشده (Bare)، پیک جریان مربوط به الکترولیت فری- فروسیانید به‌علت افزایش فرایند انتقال الکترون به‌طور چشمگیری در مقایسه با حالت قبل (Bare)، افزایش پیدا کرد که علت آن را می‌توان به قابلیت هدایت الکتریکی بالای گرافن و نانو ذرات طلا ربط داد. با تثبیت آپتامر (Aptamer) و آنتی‌بیوتیک بتالاکتام (BL) بر روی سطح الکترود کاری اصلاح‌شده با گرافن و نانو ذرات طلا، پیک جریان در مقایسه با پیک جریان الکترود اصلاح نشده به‌دلیل دافعه الکترواستاتیک بین فری- فروسیانید و آپتامر که هر دو دارای بار منفی هستند، کاهش یافت.

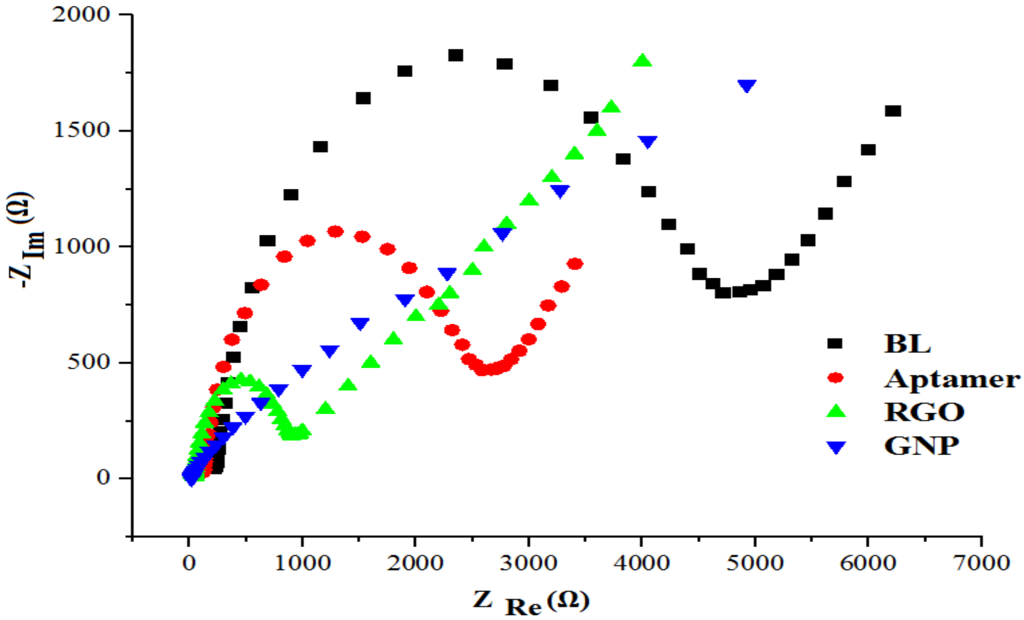
تکنیک امپدانس الکتروشیمیایی، روشی مناسب برای بررسی تغییرات سطح الکترود اصلاح‌شده است. در شکل (۷)، ولتاگرام امپدانس الکتروشیمیایی برای مراحل مختلف ساخت الکترود کاری، شامل تثبیت گرافن (RGO)، نانو ذرات طلا (GNP)، آپتامر (Aptamer) و آنتی‌بیوتیک بتالاکتام (BL)، نشان داده شده است. همان‌طور که در بخش ۲-۳ ذکر شد امپدانس شامل دو مؤلفه حقیقی (Z_{Re}) و موهومی (Z_{Im}) است. بخش نیم‌دایره‌ای در منحنی نایکویست به فرایند مقاومت انتقال الکترون در فرکانس‌های بالا و بخش خطی به پدیده انتشار در فرکانس‌های پایین ارتباط دارد [۱۸].



شکل (۶) مقایسه پیک جریان در مراحل مختلف ساخت الکترود کاری در محلول ۵ میلی‌مولار فری- فروسیانید حاوی ۰/۱۰ مولار پتاسیم کلرید

Fig 6. Comparison of current peak at various stages of fabrication the working electrode in 5.0 mM $Fe(CN)_6^{4-/3-}$ containing 0.1 M KCl

همان‌طور که در شکل (۷) مشهود است، بعد تثبیت گرافن بر روی الکترود مغز مداد گرافیتی، قسمت نیم‌دایره‌ای در مقایسه با تثبیت نانو ذرات طلا بزرگ‌تر شد که نشان می‌دهد نانو ذرات طلا مقاومت کمتری نسبت به فرایند انتقال الکترون دارد؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که رسانایی نانو ذرات طلا در مقایسه با گرافن بیشتر است که نتایج به دست آمده از تکنیک ولتامتری چرخه را تائید می‌کند [۱۷].



شکل (۷) داده‌های امپدانس الکتروشیمیایی برای الکترودهای مختلف اصلاح‌شده در محلول ۵ میلی‌مولار فری- فروسیانید حاوی ۰/۱۰ مولار پتاسیم کلرید

Fig 7. Electrochemical impedance data for different modified electrodes in 5.0 mM $Fe(CN)_6^{4-/3-}$ containing 0.1 M KCl

بعد از تثبیت آپتامر در شرایط بهینه بر روی الکترود اصلاح شده با گرافن و نانو ذرات طلا، بخش نیم‌دایره‌ای که به مقاومت انتقال بار مربوط می‌شود، در مقایسه با مرحله قبل بزرگ‌تر شد که نشان می‌دهد آپتامر به‌صورت موفقیت‌آمیز بر روی سطح الکترود کاری تثبیت شده است. علت این موضوع را می‌توان به تشکیل یک لایه منفی مقاوم بر روی سطح الکترود نسبت داد. بعد از تثبیت آنالیت (آنتی‌بیوتیک) بر روی الکترود کاری اصلاح شده با گرافن و نانو ذرات طلا و همچنین آپتامر، بخش نیم‌دایره‌ای در مقایسه با حالت قبل بزرگ‌تر شد. قرارگرفتن آنتی‌بیوتیک در جایگاه‌های فعال در سطح الکترود (رشته آپتامر) منجر به افزایش مقاومت انتقال بار در مقایسه با حالت‌های قبلی شده است. همچنین در حضور آنتی‌بیوتیک بتالاکتام، یون‌ها به سختی می‌توانند بر روی سطح الکترود قرار گیرند. این موضوع، منجر به افزایش مقاومت انتقال بار و در نتیجه کاهش جریان نسبت به حالت های قبلی می‌شود. به‌طوری کلی، نتایج تکنیک امپدانس نشان داد که گرافن و نانو ذرات طلا و همچنین آپتامر و آنتی‌بیوتیک بتالاکتام به‌درستی بر روی سطح الکترود تثبیت شده‌اند.

۴.۳. رسم منحنی کالیبراسیون

برای ارزیابی زیست‌حسگر، از تکنیک امپدانس الکتروشیمیایی استفاده شد. غلظت‌های مختلفی از بتالاکتام تهیه شد و سپس مقاومت انتقال بار در قبل و بعد از تثبیت آنتی‌بیوتیک محاسبه شد. با ترسیم نمودار خطی بین لگاریتم غلظت آنتی‌بیوتیک (محور افقی) و تغییرات مقاومت انتقال بار (محور عمودی) منحنی کالیبراسیون ترسیم شد. همان طور که در شکل (۸) نشان داده شده است، با افزایش غلظت بتالاکتام مقاومت انتقال بار به‌صورت خطی افزایش یافت. با برازش یک تابع خطی معادله رگرسیونی از رابطه (۱) تبعیت نمود:

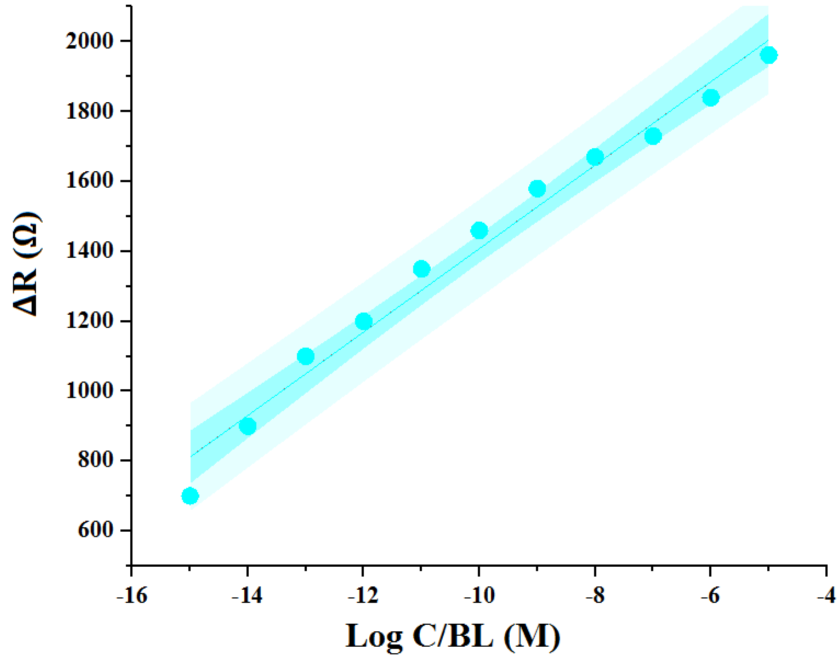
$$y = 119x + 2600,\ R^2 = 0.977 \qquad (۱)$$

در رابطه (۱)، x لگاریتم غلظت آنتی‌بیوتیک، y تغییرات مقاومت انتقال بار (قبل و بعد از تثبیت بتالاکتام بر روی سطح الکترود اصلاح‌شده با گرافن و نانو ذرات طلا) است. با توجه به این‌که رابطه بین لگاریتم غلظت آنتی‌بیوتیک و تغییرات مقاومت انتقال بار خطی است، می‌توان نتیجه گرفت که محدوده خطی زیست‌حسگر ساخته شده برای شناسایی بتالاکتام ۱×۱۰^{-۱۵} M تا ۱×۱۰^{-۵} است.

برای محاسبه کمترین مقدار قابل تشخیص توسط زیست حسگر که تحت عنوان حد تشخیص (Limit of Detection) نامیده می‌شود از رابطه (۲) استفاده شد [۱۹].

$$\text{Limit of Detection (LOD)} = 3 * SD_{\text{blank sample}}/b \qquad (۲)$$

در رابطه (۲)، LOD، حد تشخیص کمی، $SD_{\text{blank sample}}$ انحراف استاندارد نمونه شاهد (بدون حضور آنتی بیوتیک) و b شیب منحنی کالیبراسیون در رنج خطی است. برای تهیه نمونه شاهد، ۳ mm از الکترود کاری به‌مدت ۶۰ min در دمای اتاق درون آب تزریقی که برای تزریق آنتی‌بیوتیک در دامپزشکی کاربرد دارد، قرار داده شد. بر اساس رابطه (۲)، حد تشخیص کمی ۰/۸ فمتو مولار به دست آمد. تاکنون مطالعاتی در خصوص ساخت زیست حسگر الکتروشیمیایی برای شناسایی آنتی‌بیوتیک انجام شده است که می‌توان به ژائو و همکاران [۲۰] اشاره کرد که با استفاده از ساخت یک آپتاحسگر مبتنی بر نانومواد‌ها موفق به شناسایی آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین با حدّ تشخیص ۰/۰۵۷ ng/ml شدند که در راستای استفاده از نانومواد‌ها برای افزایش حساسیت سطح الکترود با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. سانگ و همکاران [۲۱] یک زیست حسگر مبتنی بر رنگ‌سنجی برای تشخیص آمپی‌سیلین توسعه دادند که نتایج حد تشخیص ۹/۸ نانومولار را نشان داد که در مقایسه با مطالعه حاضر، حد تشخیص بالاتری دارد که علت این اختلاف را می‌توان در استفاده از نانوکامپوزیت مبتنی بر نانوورقه‌های گرافن و نانو ذرات در مقایسه با نانو ذرات طلا دانست.



شکل (۸) منحنی کالیبراسیون با استفاده از تکنیک امپدانس (تفاضل تغییرات مقاومت انتقال بار در مقابل لگاریتم غلظت بتالاکتام) برای زیست‌حسگر در حضور غلظت‌های مختلف بتالاکتام (۱×۱۰^{-۱۵} تا ۱×۱۰^{-۵} مولار)

Fig 8. Calibration curve using impedance method (ΔR *vs* Log C/BL) for the biosensor in the presence of different concentrations of BL (1×10^{-15}-1×10^{-5} M).

۵.۳. ارزیابی مشخصه‌های عملکردی زیست‌حسگر

جهت ارزیابی مهم‌ترین مشخصه‌های عملکردی زیست‌حسگر شامل: تکراری پذیری، تکثیرپذیری، گزینش‌پذیری و پایداری مورد بررسی قرار گرفتند. تکراری پذیری زیست‌حسگر با اندازه‌گیری مکرر در سه مرتبه، با استفاده از تکنیک ولتامتری چرخه‌ای برای الکترود کاری ثبت شد. پیک‌های جریان در اندازه‌گیری‌های اول تا سوم، به ترتیب ۱۸ µA، ۱۹/۵ و ۱۹ به دست آمد که محاسبه انحراف استاندارد نسبی (RSD=۳/۳۱٪) حاکی از تکرارپذیری قابل‌قبول زیست‌حسگر بود.

به‌منظور بررسی تکثیرپذیری، تعداد ۵ زیست حسگر مستقل در شرایط بهینه و یکسان ساخته شد و پیک جریان آن‌ها با تکنیک ولتامتری چرخه‌ای در محلول ۵ میلی مولار فری-فروسیانید حاوی ۰/۱ مولار پتاسیم کلرید ثبت شد. پیک جریان برای الکترود ها ۱۸ µA، ۱۹، ۱۹،۲۱ و ۲۳ به دست آمد. انحراف استاندارد نسبی پیک‌های جریان ۸/۹۴ ٪ به دست آمد که نشان از تکثیرپذیری نسبتاً مطلوب زیست-حسگر دارد.

گزینش‌پذیری زیست‌حسگر برای بررسی اثرات مزاحم در شناسایی بتالاکتام انجام شد. بدین منظور سه نوع آنتی-بیوتیک دیگر شامل استرپتومایسین، تتراسایکلین و سولفادیازین، با استفاده از زیست‌حسگر ساخته‌شده تست و تکنیک امپدانس ثبت شد. همان‌طور که انتظار می‌رفت نتایج داده‌های مقاومت انتقال بار نشان داد که زیست‌حسگر نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها، پاسخ قابل‌توجهی ندارد؛ این در حالی است که آپتامر اختصاصی مربوط به بتالاکتام بر روی الکترود اصلاح‌شده با گرافن و نانو ذرات طلا تثبیت شده بود که حاکی از گزینش‌پذیربودن زیست‌حسگر نسبت به آنتی بیوتیک بتالاکتام دارد.

به‌منظور ارزیابی پایداری پنج زیست‌حسگر با تثبیت گرافن و نانو ذرات طلا و همچنین آپتامر در شرایط بهینه در دمای محیط ساخته شد. سپس به مدت ۱۸ روز در دمای ۴ °C ذخیره و سپس با استفاده از تکنیک امپدانس مقاومت انتقال بار اندازه‌گیری شد. پاسخ زیست‌حسگر به فاصله زمانی هر سه روز یک‌بار ثبت شد و با پاسخ روز اول مقایسه شد. نتایج نشان داد که پاسخ زیست‌حسگر بعد از گذشت ۱۸ روز ۶٪ در

مقایسه با روز اول، کاهش یافته است که نشان می‌دهد زیست‌حسگر پایداری مطلوبی دارد.

۶.۳. آنالیز نمونه‌های شیر

برای ارزیابی کاربرد عملی زیست‌حسگر ساخته‌شده، آنتی بیوتیک بتالاکتام در شیر خام گاو و گوسفند تزریق شد. با این هدف آنتی‌بیوتیک با غلظت‌های مشخص در دو نمونه شیر گاو و گوسفند اضافه شد. سپس الکترود کاری (به طول ۳ mm) که با گرافن و نانو ذرات طلا اصلاح شده بود و همچنین آپتامر بر روی آن تثبیت شده بود، به‌مدت ۸۰ min در داخل ۱۰ µl از شیر حاوی آنتی‌بیوتیک با غلظت‌های M 1×10^{-9} و 1×10^{-11} قرار گرفت. برای محاسبه درصد بازیابی از رابطه (۳) برای هر نمونه‌های شیر استفاده شد:

(۳) ۱۰۰×(غلظت تزریق شده/غلظت تشخیص داده شده)=درصد بازیابی

طبق جدول (۱)، محدوده درصد بازیابی برای نمونه‌های شیر در دو غلظت برای دو نمونه شیر گاو و گوسفند، در سه تکرار ۹۲/۳ تا ۱۰۴٪ به دست آمد که حاکی از درصد بازیابی قابل‌قبول برای زیست‌حسگر پیشنهاد شده دارد.

جدول (۱) شناسایی بتالاکتام در نمونه‌های شیر با استفاده از زیست‌حسگر ساخته‌شده

Table 1. Detection of Beta-Lactam in milk samples using the fabricated biosensor

Type of Milk نوع شیر	Spiked (M) تزریق‌شده (مولار)	Detected (M) تشخیص داده‌شده	Recovery (%) بازیابی (٪)	RSD[b] (%)
Cow milk شیر گاو	1×10^{-9}	$(0.96\pm0.06^{a})\times10^{-9}$	96.2	6.25
	1×10^{-11}	$(0.92\pm0.07)\times10^{-11}$	92.3	7.61
Sheep milk شیر گوسفند	1×10^{-9}	$(0.95\pm0.06)\times10^{-9}$	95.3	6.31
	1×10^{-11}	$(1.04\pm0.08)\times10^{-11}$	104.0	7.69

[a] میانگین سه اندازه‌گیری ± انحراف معیار، [b] انحراف استاندارد نسبی.

[a] Average of three measurements ± Standard Deviation, [b] Relative Standard Deviation (RSD).

۴. نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، یک زیست‌حسگر ارزان، قابل‌حمل و اختصاصی برای شناسایی سریع آنتی‌بیوتیک بتالاکتام ساخته و معرفی شد. برای ساخت زیست‌حسگر از یک الکترود مغز مداد گرافیتی به عنوان الکترود کاری که با نانو مواد شامل نانوورقه‌های گرافن و نانو ذرات طلا اصلاح شده بود، استفاده شد. بعد از تثبیت آپتامر اختصاصی مربوط به آنتی‌بیوتیک و همچنین آنتی‌بیوتیک بتالاکتام بر روی سطح الکترود اصلاح شده، از تکنیک‌های ولتامتری چرخه‌ای و طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی برای رصدکردن تغییرات سطح الکترود استفاده شد. نتایج به‌طور کلی نشان داد که نانو مواد و همچنین آپتامر به‌صورت موفقیت‌آمیزی بر روی سطح الکترود قرار گرفته‌اند. بررسی مشخصه‌های عملکردی زیست حسگر، شامل تکرارپذیری، تکثیرپذیری، گزینش‌پذیری و پایداری قابلیت زیست‌حسگر را برای شناسایی دقیق و حساس بتالاکتام تأیید کرد. آنالیز نمونه‌های شیر حاوی آنتی بیوتیک با استفاده از زیست‌حسگر نیز محدوده درصد بازیابی قابل‌قبول را نشان داد. در مجموع، می‌توان گفت که زیست-حسگر ساخته‌شده قابلیت ساخت و عرضه، به‌منظور ردیابی میزان باقیمانده آنتی‌بیوتیک بتالاکتام در مواد غذایی از جمله شیر، گوشت، مرغ، تخم مرغ را دارد.

منابع

[1]Akbari Kishi, S., Asmar, M., & Mirpur, M.S. (2017). The Study of Antibiotic Residues in Raw and Pasteurized Milk in Gilan Province. *Iran J Med Microbiol., 11 (3)*, 71-77. [In Persian]

[2]Wang, X., Dong, S., Gai, P., Duan, R., & Li, F. (2016). Highly sensitive homogeneous electrochemical aptasensor for antibiotic residues detection based on dual recycling amplification strategy. *Biosensors and Bioelectronics., 82*, 49-54.

[3]Chen, M., Gan, N., Zhou, Y., Li, T., Xu, Q., Cao, Y., & Chen, Y. (2016). An electrochemical aptasensor for multiplex antibiotics detection based on metal ions

doped nanoscale MOFs as signal tracers and RecJf exonuclease-assisted targets recycling amplification. *Talanta., 161*, 867-874.
[4]Cacciatore. G.. Petz. M.. Rachid. S.. Hakenbeck. R.. & Bergwerff, A.A. (2004). Development of an optical biosensor assay for detection of β-lactam antibiotics in milk using the penicillin-binding protein 2x. *Anal. Chim. Acta., 520 (2)*, 105-115.
[5]Moudgil, P., Bedi, J.S., Aulakh, R.S., Gill, J.P.S., & Kumar, A. (2019). Validation of HPLC Multi-residue Method for Determination of Fluoroquinolones, Tetracycline, Sulphonamides and Chloramphenicol Residues in Bovine Milk. Food Anal. Methods., 12(2), 338-346.Xu, M., Wang, R., & Li, Y. (2017). Electrochemical biosensors for rapid detection of Escherichia coli O157: H7. *Talanta., 162*, 511-522.
[6]Jiang, D., Ge, P., Wang, L., Jiang, H., Yang, M., Yuan, L., & Ju, X. (2019). A novel electrochemical mast cell-based paper biosensor for the rapid detection of milk allergen casein. *Biosens. Bioelectron., 130*, 299-306.
[7]Song, Y., Luo, Y., Zhu, C., Li, H., Du, D., & Lin, Y. (2016). Recent advances in electrochemical biosensors based on graphene two-dimensional nanomaterials. *Biosens. Bioelectron., 76*, 195-212.
[8]Chen, X., Liu, Y., Fang, X., Li, Z., Pu, H., Chang, J., & Mao, S. (2019). Ultratrace antibiotic sensing using aptamer/graphene-based field-effect transistors. *Biosens. Bioelectron., 126*, 664-671.
[9]Gupta, P., Bharti, A., Kaur, N., Singh, S., & Prabhakar, N. (2018). An electrochemical aptasensor based on gold nanoparticles and graphene oxide doped poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) nanocomposite for detection of MUC1. *J. Electroanal. Chem., 813*,102-108.
[10]Wu, B.Y., Hou, S.H., Yin, F., Li, J., Zhao, Z.X., Huang, J.D., & Chen, Q. (2007). Amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer assembly of multilayer films composed of chitosan, gold nanoparticles and glucose oxidase modified Pt electrode. *Biosens. Bioelectron., 22(6)*, 838-844.
[11]Jin, H., Zhao, C., Gui, R., Gao, X., & Wang, Z. (2018). Reduced graphene oxide/nile blue/gold nanoparticles complex-modified glassy carbon electrode used as a sensitive and label-free aptasensor for ratiometric electrochemical sensing of dopamine. *Anal. Chim. Acta., 1025*,154-162.
[12]Okoth, O.K., Yan, K., Feng, J., & Zhang, J. (2018). Label-free photoelectrochemical aptasensing of diclofenac based on gold nanoparticles and graphene-doped CdS. *Sens. Actuators B Chem., 256*, 334-341.
[13]Li, G., Li, S., Wang, Z., Xue, Y., Dong, C., Zeng, J., & Zhou, Z. (2018). Label-free electrochemical aptasensor for detection of alpha-fetoprotein based on AFP-aptamer and thionin/reduced graphene oxide/gold nanoparticles. *Anal. Biochem., 547*, 37-44.
[14]Rezaei, B., Jamei, H.R., & Ensafi A.A. (2018). An ultrasensitive and selective electrochemical aptasensor based on RGO-MWCNTs/Chitosan/carbon quantum dot for the detection of lysozyme. *Biosens. Bioelectron., 115*, 37-44.
[15]Ciucci, F. (2018). Modeling Electrochemical Impedance Spectroscopy. *Curr Opin Electrochem*, *13*, 132-139.
[16]Izadi, Z., Sheikh-Zeinoddin, M., Ensafi, A.A., & Soleimanian-Zad, S. (2016). Fabrication of an electrochemical DNA-based biosensor for Bacillus cereus detection in milk and infant formula. *Biosens. Bioelectron., 80*, 582-589.
[17]Wang, N., Lin, M., Dai, H, & Ma, H. (2016). Functionalized gold nanoparticles/reduced graphene oxide nanocomposites for ultrasensitive electrochemical sensing of mercury ions based on thymine–mercury–thymine structure. *Biosens. Bioelectron., 79*, 320-326.
[18]Ugar, M., Tufan, A.N., Altun, M., Guclu, K., & Ozyurek, M. (2018). Glutathione Peroxidase Activity of Biological Samples Using a Novel Microplate-Based Method. Curr. *Anal. Chem., 14(5)*, 512-518.
[19]Zhao, J., Guo, W., Pei, M., & Ding, F. (2016). GR–Fe_3O_4 NPs and PEDOT–AuNPs composite based electrochemical aptasensor for the sensitive detection of penicillin. *Anal. Methods, 8(22)*, 4391-4397.
[20]Song, K.M., Jeong, E., Jeon, W., Cho, M., & Ban, C. (2012). Aptasensor for ampicillin using gold nanoparticle based dual fluorescence–colorimetric methods, Anal. *Bioanal. Chem., 402 (6)*, 2153-2161.

Research Article

Fabrication and implementation of a biosensor for health evaluation in raw milk

Ayat Mohammad-Razdari[1], Sajad Rostami[2*], Zahra Izadi[3], Mahdi Ghasemi-Varnamkhasti[2], Ali A. Ensafi[4], Mojtaba Bonyadian[5]

1. Ph.D. student, Department of Mechanical Engineering of Biosystems, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord
2. Associate Professor, Department of Mechanical Engineering of Biosystems,Faculty of Agriculture, Shahrekord University
3. Assistant Professor, Department of Mechanical Engineering of Biosystems,Faculty of Agriculture, Shahrekord University
4. Professor, Department of Chemistry, Isfahan University of Technology.
5. Associate Professor, Department of Health and Food Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University

Abstract

The use of veterinary drugs, including antibiotics, leads to their aggregation in livestock products such as meat, milk, and eggs .Therefore, rapid, accurate and economy detection of antibiotics for monitoring of food security is necessary. In the current research, a biosensor based on pencil graphite electrode modified with grapheme and gold nanoparticles for detection of β-lactam antibiotic in milk samples was fabricated. Cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) techniques for evaluation of surface electrode changes were applied. Under optimal conditions, using the EIS method specified that in the ranges of 1×10^{-15} to 1×10^{-5} M, The relationship between charge transfer resistance and the logarithm of antibiotic concentration was linear and the regression equation was $y=119x+2600$ ($R^2=0.977$). The current peaks in three measures were achieved as 18, 19.5 and 19 µA. calculation of relative standard deviation (RSD=3.31%) that indicated an acceptable repeatability for biosensor. For investigating of reproducibility, RDS for current peaks was 8.94% that showed a good reproducibility for biosensor. The selectivity of a biosensor in the presence of three antibiotics including streptomycin, tetracycline, and sulfadiazine was checked. Data of charge transfer resistance was indicated that biosensor has non-significant the response towards the other antibiotics. The results showed that biosensor response decreased by 6% after 18 days compared with the first day, which indicates good stability for biosensor. The percentage recovery range for milk samples at concentrations of 1×10^{-9} and 1×10^{-11} M for two samples of cow and sheep milk was obtained as 92.3 to 104% in three replications, which indicates an acceptable recovery range for proposed biosensor.

Keywords: Antibiotic, Milk, Biosensor, Gold Nanoparticles, Electrochemical Impedance Spectroscopy.

* corresponding author: rostami.sajad@yahoo.com