بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده علوم
گروه شیمی

پایان‌نامه جهت اخذ مدرک کارشناسی‌ارشد
رشته زیست‌شناسی گرایش بیوشیمی

عنوان:

تثبیت باکتری بیولومینسانس با کاربری به عنوان بیوسنسور

اساتید راهنما:
دکتر محمد رضا حسین‌دخت
دکتر احمد آسوده

استاد مشاور:
دکتر منصور مشرقی

نگارنده:
پروانه پردلی

شهریور ۱۳۹۱

چکیده فارسی

ایمنی مواد غذایی یک موضوع مهم جهانی محسوب می‌شود. تشخیص پاتوژن‌ها و ترکیبات توکسیک در مواد غذایی، نقش مهمی در حفظ سلامتی جامعه دارد. در سال‌های اخیر، استفاده از بیوسنسورهای میکروبی به عنوان یک رویکرد جدید برای کنترل ترکیبات سمی مطرح شده است. بیوسنسور میکروبی لومینسانس، ابزاربیولوژیکی مناسب در حفظ محیط زیست است. این نوع از بیوسنسورها، به عنوان ابزار سریع، حساس و ارزان در شناسایی آلاینده‌های محیطی در مقادیر حد میکرو استفاده شده است. در این مطالعه باکتری بیولومینسانس ویبریو فیشری (*V.fischeri* NRRL-B 11177) تثبیت شده به روش سل–ژل، برای طراحی کیت تشخیصی سورفکتانت سدیم دودسیل سولفات (SDS) و آفلاتوکسین M_1 استفاده شده است. ابتدا منحنی رشد باکتری ویبریوفیشری رسم و زمان نشر نور ماکزیمم بررسی شد. مقادیر حجمی مختلفی از باکتری (۲۰، ۵۰ و ۱۰۰میکرولیتر) جهت بهینه‌سازی بررسی شد. باکتری بر بستر سیلیکا به روش سل –ژل تثبیت شد. برطبق نتایج بدست آمده از این تجربیات، آزمایشی برای تعیین دوز پاسخ دهی به غلظت‌های مختلف آنالیت طراحی شد. اثرات مهاری محلول‌های سدیم دودسیل سولفات در محدوده غلظتی ۲ میکرو مولار تا ۱ میلی‌مولار و آفلاتوکسین M_1 در غلظت ۰/۰۰۸ تا ۲ نانوگرم در میلی لیتر بر نشر نور باکتری بررسی شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان دادند که زمان منحنی رشد باکتری ۲۷ ساعت است و کشت ۱۲ ساعته از باکتری، ماکزیمم نشر را نشان داد. همچنین در طی آزمایشات مقدار ۲۰ میکرولیتر از ماتریکس باکتری، بستر سل–ژل بهترین پاسخ‌دهی را نشان داد.

کلمات کلیدی: سل–ژل، بیوسنسورسل–ژل لومینسانس، ویبریوفیشری، ، سدیم دودسیل سولفات، آفلاتوکسینM1

سپاس خداوند بلندمرتبه را

آن نخستین بی آغاز و آن واپسین بی انجام

چگونه می توان نعمت اش را سپاس گفت

تقدیم به

روح بلند پدر عزیزم که اسطوره محبت و مهربانی بود

مادر عزیزم که وجودش برایم همه عشق است

فرزندم امین، بهار زندگی ام که همواره حضورش به من انرژی می دهد.

تشکر و سپاس

تشکر فراوان از کمک بی شائبه مادر عزیزم؛ که وجودش برایم همه عشق است و وجودم برایش همه رنج توانش رفت تا به توانایی رسیدم و رویش سپیدی گرفت تا رو سپید بمانم. آن که فروغ نگاهش، گرمی کلامش و روشنی رویش، سرمایه جاودانه زندگانی من است. در برابر وجود گرامیت زانوی ادب بر زمین می نهم و با دلی مالامال از عشق و محبت بر دستانت بوسه می زنم

تقدیر و تشکر از پدر و مادر همسرم عزیزانی که دعای خیرشان همواره بدرقه راهم بوده است.

در پایان از همسر و خانواده عزیزم که حمایت هایشان همیشه موجب دلگرمی ایجانب بوده و همچنین از برادران گرامیم و خواهر عزیزم که همیشه لطفشان شامل حال بنده بوده سپاسگزارم و از درگاه خداوند برای ایشان طول عمر با عزت و سلامتی خواستارم.

تشکر و سپاس

سپاس از اساتید گرانقدرم آنان که روشنایی بخش تاریکی جان هستند و ظلمت اندیشه را نور می بخشند، چگونه سپاس گویم تاثیر علم آموزی شان را که چراغ روشن هدایت را بر کلبه محضر وجودم فروزان ساخته اند. در مقابل این همه عظمت و شکوه، مرا نه توان سپاس است و نه کلام وصف.

زحمات و حمایت های بی دریغ اساتید، راهنمای بزرگوارم جناب آقای دکتر محمدرضا حسین دخت و دکتر احمد آسوده که افتخار شاگردی ایشان نصیبم گردید را ارج می نهم، به پاس نظرات ارزشمندشان، صبر و مهربانی و محبت بی دریغشان.

از راهنمایی های ارزنده استاد مشاورم جناب آقای دکتر منصور مشرقی که بی دریغ مرا از نظرات ارزشمندشان بهره مند ساختند کمال تقدیر و تشکر را دارم.

از اساتید گرانقدر سرکار خانم دکتر راضیه جلال و سرکار خانم دکتر معصومه بحرینی که قبول زحمت نموده و داوری این پایان نامه را به عهده گرفتند سپاسگزارم و از پروردگار متعال برایشان آرزوی سلامتی و بهورزی دارم.

از استاد گرامی و بزرگوارم سرکار خانم دکتر مریم مقدم متین که مرا یاری نمودند، تقدیر و تشکر می نمایم و از پروردگار متعال برای ایشان آرزوی سلامتی و بهورزی دارم.

تقدیر و تشکر

مدیریت محترم گروه زیست شناسی جناب آقای دکتر فرهنگ حدادو مدیریت محترم گروه شیمی جناب آقای دکتر حسین عشقی کمال تشکر دارم.

سرکار خانم دکتر بحرینی، سرکار خانم دکتر شهنواز، سرکار خانم مهندس عروجعلیان، جناب آقای دکتر مخدومی و سایر اساتید گروه زیست شناسی کمال تشکر و تقدیر را دارم.

همکارانم در گروه زیست شناسی و سرکار خانم یاقوتی، جناب آقای نخعی و جناب آقای بصیری و همکارانم دانشکده علوم و آزمایشگاه مرکزی و دوستان گرامیم سرکار خانم پروین مهاجرنیا، آزاده طاهرنیا به پاس زحمات فراوانشان تشکر می نمایم.

سرکار خانم شجاعی، جناب آقای جعفری و سرکا خانم حبیبی به پاس زحمات فراوانشان تشکر می نمایم.

فهرست مطالب

فصل اول: کلیات

۱-۱-تعریف بیوسنسور ۲

۱ـ۲ـ اجزاء بیوسنسور ۲

۱ـ۲ـ۱ـ بیورسپتور(عناصر فعال زیستی)..... ۲

۱ـ۲ـ۲ـ مبدل ۳

۱ـ۲ـ۳ـ آمپلی فایر ۳

۱ـ۳ ـ طبقه‌بندی بیوسنسورها ۳

۱ـ۳-۱- طبقه‌بندی براساس اجزای زیستی..... ۳

۱-۳-۱-۱- بیوسنسورهای آنزیمی ۳

۱-۳-۱-۲- ایمونوبیوسنسور ۴

۱-۳-۱-۳- سنسورهای سلولی ۴

۱-۳-۱-۴- بیوسنسور DNA ۵

۱-۳-۲- انواع مبدل..... ۵

۱ـ۳-۲ـ۱ـ مبدل الکتروشیمیائی ۵

۱ـ۳ـ۲ـ۲ مبدل‌های نوری..... ۶

۱-۴- بیوسنسور میکروبی..... ۷

۱-۵- انواع بیوسنسورمیکروبی ۷

۱-۵-۱- بیوسنسورهای میکروبی الکتروشیمیائی ۷

۱-۵-۱-۱- بیوسنسور میکروبی آمپرومتری..... ۸

۱-۵-۱-۲- بیوسنسور میکروبی کنداکتومتری ۸

۱-۵-۱-۳- بیوسنسور میکروبی پتانسیومتری..... ۸

۱-۵-۱-۴- بیوسنسور میکروبی ولتامتری..... ۸

۱-۵-۲- تکنیک‌های نوری..... ۹

۱-۵-۲-۱- تکنیک‌های فلوئورسانس ۹

۱-۵-۳- تکنیک حسی کالرومتری ۱۰
۱-۶- کاربرد بیوسنسورهای میکروبی ۱۰
۱-۶-۱- تشخیص آفت‌کش‌های دارای ترکیب آلی فسفردار ۱۱
۱-۶-۲- تشخیص سورفکتانت ها ۱۲
۱-۶-۳- تشخیص فلزات سنگین ۱۲
۱-۷- بیوسنسور میکروبی بیولومینسانس ۱۲
۱-۷-۱- باکتری‌های بیولومینسانس ۱۲
۱_۷_۲- سیستم بیولومینسانس ۱۳
۱-۷-۳- ترکیبات اصلی شرکت کننده در واکنش بیولومینسانس ۱۳
۱-۷-۳-۱- آنزیم لوسیفراز ۱۴
۱-۷-۳-۲- آلدئید ۱۵
۱-۷-۳-۳- تشکیلات ژن *lux* ۱۵
۱-۷-۴- ویبریو فیشری (*V.fischeri*) ۱۶
۱-۷-۴-۱- توصیف پدیده Quorum sensing ۱۶
۱-۷-۵- کاربرد باکتریهای بیولومینسانس ۱۸
۱-۷-۶- روش‌های نگهداری باکتری‌ها در بیوسنسورمیکروبی ۱۸
۱-۷-۶-۱- خشک کردن تحت فریز ۱۹
۱-۷-۶-۲- خشک کردن تحت خلاء ۱۹
۱-۷-۶-۳-کشت مداوم ۱۹
۱-۷-۶-۴- تثبیت و کپسوله شدن ۱۹
۱-۷-۶-۴-۱- تثبیت به روش سل – ژل ۲۰
۱-۷-۶-۴-۲- ساخت شیشه‌های سل – ژل ۲۰
۱-۷-۶-۴-۳- مراحل تهیه فیلم سل – ژل ۲۱
۱-۷-۶-۴-۴- معایب و مزایای فرایند سل – ژل ۲۲
۱-۷-۶-۴-۵- مزایای گیرانداختن پروتئین‌ها در شیشه‌های سل – ژل ۲۳
۱-۷-۶-۴-۶- فاکتورهای تأثیرگذار بر فرآیند سل – ژل در بیوسنسورهای میکروبی ۲۳

۱-۷-۷- سورفکتانت سدیم دودسیل سولفات ۲۵
۱-۷-۷-۸- آفلاتوکسین M_1 ..... ۲۶
۱-۸ هدف پروژه ۲۹

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد و وسایل مورد استفاده ۳۱
۲-۲- روش کار ۳۳
۲-۲-۱- استریل کردن وسایل آزمایشگاهی ۳۳
۲-۲-۳- محیط کشت باکتریاییSWC ۳۳
۲-۲-۴- کشت باکتری ۳۴
۲-۲-۵ رنگ آمیزی گرم ۳۴
۲-۳- آزمایشات تجربی ۳۵
۲-۳-۱- بهینه سازی شدت نشر باکتری درفاز محلول ۳۵
۲-۳-۱-۱- تغییرات جذب همگام با رشد باکتری ۳۵
۲-۳-۱- ۲- شدت نشر بیولومینسانس باکتری ۳۶
۲-۳-۱-۳-اثر پارامترهای موجود در محیط کشت باکتری ۳۶
۲-۳-۲- رفتار باکتری در بازه زمانی کوتاه مدت ۳۸
۲-۳-۲-۱- اثر دما ۳۸
۲-۳-۲-۲- اثر حجم ۳۸
۲-۳-۲-۳- اثر زمان فریز ۳۸
۲-۳-۳- سنجش آنالیت‌ها ۳۹
۲-۳-۳-۱- سنجش سورفکتانت آنیونی سدیم دودسیل سولفات ۳۹
۲-۳-۳-۲- سنجش آفلاتوکسینM_1 ..... ۴۰
۲-۴- آزمایشات تجربی در فاز تثبیت ۴۲
۲-۴-۱- تثبیت باکتری ویبریو فیشری ۴۲
۲-۴-۱-۱- محلول مورد استفاده برای تثبیت باکتری ۴۲

۲-۴- ۱-۲- تهیه محلول‌های سل-ژل ۴۲
۲-۴-۱-۳- تهیه محلول‌های شستشوی سطح لامل ۴۳
۲-۴-۱-۴- تهیه بستر به روش سل-ژل ۴۳
۲-۴-۱-۵- تثبیت باکتری ۴۴
۲-۴-۱-۶- مشخصات بستر و نمونه باکتری تثبیت شده در بستر سل-ژل ۴۴
۲-۴-۲- اثر پارامترهای مختلف بر رفتار باکتری تثبیت شده ۴۵
۲-۴-۲-۱- اثر دما ۴۵
۲-۴-۲-۲- اثر زمان فریز ۴۵
۲-۴-۲-۳- اثر حجم بستر ۴۵
۲-۴-۲-۴- اثر زمان ژله‌ای شدن ۴۶
۲-۴-۲-۵- اثر حجم آنالیت ۴۶
۲-۴-۳ سنجش آنالیت‌ها ۴۶
۲-۴-۳-۱ سنجش سورفکتانت آنیونیSDS ۴۶

فصل سوم: نتایج و بحث

۳-۱- مقدمه ۴۹
۳-۲- کشت باکتری ویبریو فیشری ۴۹
۳-۳- رنگ آمیزی گرم ۵۰
۳-۴- آزمایشات تجربی در فاز محلول ۵۱
۳-۴-۱- بهینه سازی نشر باکتری ۵۱
۳-۴-۱-۱- کنترل رشد باکتری به روش سنجش جذب ۵۱
۳-۴-۲ کنترل رشد باکتری به روش سنجش نشر نور ۵۲
۳-۴-۳- بررسی پارامترهای مختلف بر شدت نشر باکتری در واحدزمان ۵۳
۳ -۴-۳- ۱- اثررقت باکتری ۵۳
۳-۴-۳-۲- اثر حجم ۵۵
۳-۴-۳-۳- اثر پارامترهای موجود در ترکیب محیط کشت باکتری ۵۶

۳-۴-۴ - رفتار باکتری در بازه زمانی کوتاه مدت ۶۱
۳-۴-۴-۱- اثر دما ۶۲
۳-۴-۴-۲- اثر زمان فریز ۶۳
۳-۴-۵- سنجش آنالیت‌ها ۶۴
۳-۴-۵-۱-سنجش سورفکتانت آنیونی سدیم دودسیل سولفات ۶۴
۳-۴-۵-۱-۱-سنجش سورفکتانت در نمونه باکتری غیرفریز ۶۴
۳-۴-۵-۱-۲-سنجش سورفکتانت در نمونه باکتری ۸ روز فریز ۶۸
۳-۴-۵-۲- سنجش آفلاتوکسینM1 ..... ۷۱
۳-۴-۵-۳- سنجش آفلاتوکسین M1 در نمونه طبیعی شیر ۸۰
۳-۵- آزمایشات بررسی رفتار باکتری در فاز تثبیت ۸۴
۳-۵-۱- مطالعات میکروسکوپ الکترونی (SEM) ۸۴
۳-۵-۲- تعیین اندازه ذرات سیلیکا ۸۵
۳-۵-۳- نتایج پارامترهای مختلف بررسی شده بر رفتار باکتری در فاز تثبیت ۸۵
۳-۵-۳-۱- اثرحجم نمونه تثبیت شده حاوی باکتری ۸۶
۳-۵-۳-۲- اثر زمان فریز ۸۷
۳-۵-۳-۳-اثر زمان ژله‌ای شدن بر بستر ۸۸
۳-۵-۳-۴- اثرحجم آنالیت ۸۹
۳-۵-۳-۴- سنجش آنالیت‌ها ۹۱
۳-۵-۳-۵ سنجش سورفکتانت آنیونیSDS ۹۱
۳-۵-۳-۵ سنجش سورفکتانت SDS درنمونه شیر ۹۳
۳- ۶- نتیجه گیری کلی ۹۷
۳-۷- پیشنهادات ۹۹

فصل چهارم: منابع و مأخذ

References ۱۰۱

فهرست جداول

جدول ۱- ۱: حداکثر مقدار آفلاتوکسین M1 در کشورهای مختلف ۲۷

جدول ۲- ۱. فهرست مواد و ترکیبات شیمیایی مورد استفاده ۳۱

جدول ۲- ۲ فهرست دستگاه‌ها و وسایل آزمایشگاهی مورد استفاده ۳۲

جدول ۲-۳: ترکیبات تشکیل دهنده محیط کشت SWCمایع ۳۴

جدول ۳- ۱: مقایسه زمان ماندگاری نشر در نمونه‌های رقیق شده (۱:۲۰) باکتری ویبریوفیشری در محیط‌های کشت با نسبت متغیر پپتون به گلیسرول در بازه زمانی ۳۰ ساعت از رشد باکتری. ۵۷

جدول ۳- ۲: در صد مهار شدگی نشر بیولومینسانس باکتری ویبریو فیشری(*V.fischeri*) در نمونه های تیمارشده درغلظت های مختلفآفلاتوکسین M1. ..... ۷۶

جدول ۳- ۳: مقایسه رفتار خطی شدت نشر بیولومینسانس در باکتری نمونه شاهد و طبیعی شیرپاستوریزه تیمارشده با آفلاتوکسین M_1 در زمان‌های پاسخ دهی مختلف. ۸۱

جدول ۳- ۴: مقایسه رفتار خطی شدت نشر بیولومینسانس باکتری با غلظت SDS در نمونه شاهد و طبیعی در زمان‌های پاسخ دهی مختلف ۹۶

فهرست اشکال

شکل ۱- ۱: طرح شماتیک یک بیوسنسور ۲

شکل ۱- ۲: ساختار آنزیم لوسیفراز..... ۱۴

شکل ۱- ۳: ترتیب قرارگیری ژن ساختاری در اپرون *lux* ۱۵

شکل ۱- ۴: مولکول‌های خود القاء در باکتری بیولومینسانس ویبریو فیشری(*V.fischeri*)، ویبریوهاروی (*V.harveyi*) ۱۶

شکل ۱- ۵: مراحل ساخت مونولیت سل ـ ژل ۲۱

شکل ۱- ۶: ساختار سورفکتانت سدیم دودسیل سولفات..... ۲۵

شکل ۱- ۷: ساختار شیمیایی آفلاتوکسینB_1 و M_1 ..... ۲۶

شکل ۳-۱: نمایی ازکشت زیگزاکی باکتری ویبریو فیشری (*V.fischeri*) درمحیط کشت جامد SWC ۴۹

شکل ۳-۲: تولید نور لومینسانس توسط باکتری ویبریو فیشری (*V.fischeri*) درمحیط کشت مایع SWC ۵۰

شکل ۳-۳: نمایی ازمرفولوژی و شکل باکتری ویبریو فیشری (*V.fischeri*) پس از رنگ آمیزی گرم ۵۰

شکل ۳-۴: نمودار کنترل رشد باکتری ویبریو فیشری (*V.fischeri*) به روش سنجش جذب در بازه زمانی ۳۲ ساعت .. ۵۲

شکل ۳-۵ : نمودار کنترل رشد باکتری به روش سنجش نشر بیولومینسانس باکتری*V.fischeri* در بازه زمانی ۳۲ ساعت ۵۳

شکل ۳-۶: تغییر شدت نشر بیولومینسانس باکتری*V.fischeri* در بازه زمانی ۳۲ ساعت انکوباسیون ۵۴

شکل ۳-۷: تغییر شدت نشر بیولومینسانس در حجم‌های مختلف ازنمونه باکتری *V.fischeri* رقیق شده در بازه زمانی ۳۰ ساعت ۵۵

شکل ۳-۸: اثر تغییر نسبت وزنی پپتون به گلیسرول بر شدت نشر بیولومینسانس باکتری *V.fischeri* در بازه زمانی۳۰ ساعت از رشد ۵۶

شکل ۳- ۹: اثر تغییر نسبت وزنی پپتون بر شدت نشر بیولومینسانس باکتری *V.fischeri* در بازه زمانی۳۰ ساعت از رشد ۵۹

شکل ۳-۱۰: شدت نشر باکتری ویبریوفیشری (*V.fischer*) دربازه زمانی ۳۰ ساعت ازرشد در محیط کشت با درصد متفاوت گلیسرول ۶۱

شکل ۳-۱۱: اثر دماهای مختلف (۲۰- ، ۴و ۲۵درجه سانتیگراد) بر نشر باکتری در بازه زمانی ۱۵دقیقه..... ۶۲

شکل ۳-۱۲: شدت نشر بیولومینسانس باکتری ویبریو فیشری (*V.fischeri*) در زمان مختلف فریز(۱، ۲، ۳، ۴، ۶ و ۸ روز) ۶۳

شکل ۳-۱۳: اثر پاسخ‌دهی باکتری ویبریو فیشری (*V.fischeri*) غیر فریز به سدیم دودسیل سولفات (SDS) در غلظت‌های مختلف (۰، ۰/۲، ۰/۴ و ۱/۶میلی مولار) در بازه زمانی ۳۰ دقیقه..... ۶۵

شکل ۳– ۱۴: اثر پاسخ‌دهی باکتری ویبریو فیشری (*V.fischeri*) غیر فریز به سدیم دودسیل سولفات (SDS) در غلظت‌های مختلف (۰، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۸و ۱/۶)میلی مولار در بازه زمانی ۲۰ دقیقه ۶۶

شکل ۳–۱۵: تغییرات شدت نشر بیولومینسانس باکتری ویبریو فیشری(*V.fischeri*) کشت ۱۸ ساعته در بازه زمانی ۱۰ دقیقه نسبت به غلظت‌های مختلف(۰/۰۰۲، ۰/۰۲، ۰/۲ میلی مولار)از SDS..... ۶۷

شکل ۳– ۱۶: تغییرات شدت نشر باکتری ویبریو فیشری (*V.fischeri*) در نمونه کشت ۱۸ ساعته تیمار شده در غلظت‌های مختلف (۰ ، ۰/۰۰۲، ۰/۰۲، ۰/۲ میلی مولار) از سورفکتانت سدیم دودسیل سولفات (SDS) در بازه زمانی تیمار۱۰ دقیقه.....۶۸

شکل ۳–۱۷ : نمودارپاسخ دهی باکتری ویبریو فیشری (*V.fischer*) در نمونه‌های۸ روز فریز تیمارشده با غلظت‌های مختلف (۰، ۰/۰۰۰۲، ۰/۰۰۲، ۰/۰۲، ۰/۲ میلی مولار) از سدیم دودسیل سولفات (SDS) در بازه زمانی ۱۵ دقیقه تیمار ۶۹

شکل ۳–۱۸: نمودار شدت نشر باکتری ویبریو فیشری (*V.fischeri*) در نمونه‌های فریز شده (۸ روز) تیمارشده با غلظت‌های مختلف (۰/۰۰۰۲، ۰/۰۰۲، ۰۲ /۰و ۰/۲ میلی مولار) سورفکتانت SDS در زمانهای تیمار مختلف..... ۷۰

شکل ۳– ۱۹: تاثیر محلول آفلاتوکسین M1 درغلظت ۰/۰۱ نانوگرم در میلی لیتر (ppt) بر نمونه‌های باکتری ویبریوفیشری (*V.fischeri*) تیمارشده در دماهای مختلف ۷۲

شکل ۳ -۲۰: نمودار پاسخ دهی باکتری ویبریو فیشری (*V.fischeri*) بر نمونه فریز شده (۸ روز) در بازه زمانی۱۰ دقیقه تیمار با محلول آفلاتوکسین در غلظت‌های ۰/۰۱ ۰و۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر (ppt)..... ۷۴

شکل ۳– ۲۱: نمودار بررسی پاسخ دهی نمونه‌های ۸ روز باکتری ویبریو فیشری (*V.fischeri*) نسبت به غلظت‌های مختلف (۰، ۰/۰۰۸، ۰/۰۴، ۰/۲و ۲)نانو گرم در میلی لیتر(ppt) از آفلاتوکسین M1 در بازه زمانی ۱۵ دقیقه..... ۷۵

شکل ۳–۲۲: در صد مهار شدگی نشر باکتری ویبریو فیشری (*V.fischeri*) در نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف (۰، ۰/۰۰۸، ۰/۰۴، ۰/۲و ۲) نانو گرم در میلی لیتر(ppt)) از آفلاتوکسین M1 در بازه زمانی ۱۵ دقیقه تیمار.....۷۶

شکل ۳–۲۳: پاسخ دهی باکتری ویبریو فیشری ۸ روز فریز نسبت به غلظت‌های۰/۰۰۸، ۰/۰۴و ۰/۲ نانوگرم در میلی لیتر (ppt) در زمان تیمارمختلف ۱تا ۱۵ دقیقه تیمار..... ۷۷

شکل ۳–۲۴: شدت نشر بیولومینسانس باکتری ویبریو فیشری ۸ روز فریز در زمان ۱۵ دقیقه انکوباسیون با نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف(۰، ۰/۰۰۸، ۰/۰۴، ۰/۲و ۲) نانو گرم در میلی لیتر(ppt) از آفلاتوکسین M1..... ۸۰

شکل ۳–۲۵: نمودار تغییرات نشر باکتری ویبریوفیشری نسبت به غلظت‌های مختلف ۰/۰۰۸، ۰/۰۴، ۰/۲ نانوگرم در لیتر آفلاتوکسین M1 در زمان‌های۱۵–۱ دقیقه..... ۸۲

شکل ۳–۲۶ : میکروگراف الکترونی باکتری ویبریو فیشری (*V.fischeri*) تثبیت شده در بستر سیلیکا به روش سل–ژل ۸۴

شکل ۳-۲۷: اندازه ذرات سیلیکا در بستر تهیه شده به روش سل –ژل..... ۸۵

شکل ۳-۲۸: تاثیر حجم نمونه تثبیت شده بر ماندگاری شدت نشر باکتری ویبریوفیشری (*V.fischeri*) تثبیت شده ۸ روز فریز (C ^{o}۲۰-) در بستر سیلیکا به روش سل-ژل..... ۸۶

شکل ۳-۲۹ : اثر زمان فریز بر شدت نشر باکتری ویبریو فیشری(*V.fischeri*) دربازه زمانی ۱۵ دقیقه..... ۸۷

شکل ۳- ۳۰.: اثر زمان ژله‌ای شدن بستر سیلیکا بر شدت نشر بیولومینسانس باکتری ویبریو فیشری (*V.fischeri*) در نمونه‌های تثبیت شده ۸ روز فریز (C ^{o}۲۰-) در بازه زمانی ۲۰ دقیقه ۸۸

شکل ۳-۳۱: اثر حجم آنالیت بر پاسخ‌دهی باکتری ویبریو فیشری (*V.fischeri*) در سنجش غلظت‌های مختلف SDS در بازه زمانی ۱۵ دقیقه..... ۸۹

شکل ۳-۳۲: پاسخ دهی نمونه‌های تیمار شده باکتری ویبریو فیشری (*V.fischeri*) در غلظت‌های مختلف (۰/۰۰۰۲، ۰/۰۰۲، ۰/۰۲، ۰/۲ میلی مولار) سدیم دودسیل سولفات (SDS) در بازه زمانی ۱۵ دقیقه تیمار..... ۹۱

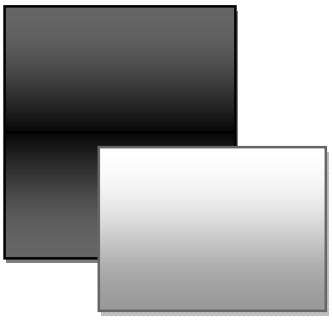
شکل ۳-۳۳: زمان پاسخ دهی نمونه‌های تیمار شده باکتری ویبریوفیشری با غلظت‌های مختلف (۰/۰۰۰۲، ۰/۰۰۲، ۰/۰۲، ۰/۲ میلی مولار) از سدیم دودسیل سولفات (SDS)..... ۹۲

شکل ۳-۳۴: زمان پاسخ دهی نمونه‌های تیمار شده باکتری ویبریوفیشری با غلظت‌های مختلف (۰/۰۰۲، ۰/۰ ۲، ۰/۲ میلی مولار) از SDS در شیر ۹۳

شکل ۳-۳۵: نمودار تغییرات نشر باکتری ویبریوفیشری تثبیت شده به روش سل- ژل نسبت به غلظت‌های مختلف (۰/۰،۰۰۲، ۰/۰۲، ۰/۲)نانوگرم در میلی لیتر (ppt) SDS در نمونه شیر و زمان‌های مختلف ۹۴

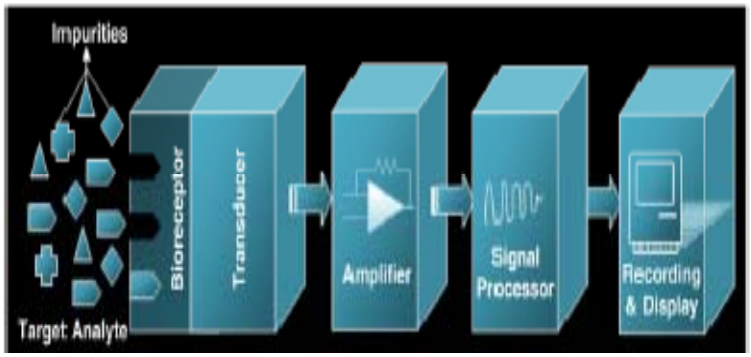
فصل اول

مقدمه



۱-۱-تعریف بیوسنسور

یک بیوسنسور[1] همگرایی دو اصطلاح متقابل را نشان می‌دهد: اختصاصی بودن و انتخاب‌پذیری سیستم‌های بیولوژیکی که با قدرت محاسباتی میکروپردازشگرها ترکیب می‌شود. بیوسنسورهای کلاسیک به عنوان ابزار آنالیز کننده‌ای تعریف می‌شوند که در آن یک جزء زیستی به یک مبدل متصل شده و یک سیگنال بیولوژیکی را به سیگنال الکتریکی قابل اندازه‌گیری تبدیل می‌کند (شکل۱-۱). در سال‌های اخیر استفاده از بیوسنسورها به عنوان ابزارهای کمی و نیمه کمی حساس، دقیق و سریع در تشخیص ترکیبات مختلف در عرصه‌های مختلف دامپزشکی، صنایع غذایی، باغبانی، داروسازی، صنعت پتروشیمی، محیط زیست، دفاع و ایمنی رو به افزایش است [۱، ۲] .



شکل ۱- ۱: طرح شماتیک یک بیوسنسور [۳]

۱ـ۲ـ اجزاء بیوسنسور

بیوسنسور دارای دو بخش اصلی یک بیورسپتور[2] (عناصر تشخیص دهنده زیستی) و مبدل است.

۱ـ۲ـ۱ـ بیورسپتور(عناصر فعال زیستی)[3]

بیورسپتورها، عناصر فعال زیستی هستند که توانایی تشخیص اختصاصی مولکول‌های هدف از سایر عناصر را دارند. یک بیورسپتور می تواند یکی از عوامل فوق باشد: آنزیم، آنتی‌بادی، میکروارگانیسم، سلول، تکه‌های بافت، تراشه‌های اسید نوکلئیک[4]، هورمون‌ها، رسپتورها، کوفاکتورها و ارگانل‌ها است. تحقیقات نشان داده است که میکروارگانیسم‌ها و آنزیم‌ها به عنوان پروب‌های بیولوژیکی مناسب در بیوسنسورها کاربردمتنوعی دارند [۴].

[1]- Biosensor
[2]- Bioreceptor
[3]- Biological elements
[4]- DNA probe

۱ـ۲ـ۲ـ مبدل[1]

مبدل بخش اصلی از یک بیوسنسور است که پدیده تشخیص داده شده زیستی را به یک سیگنال الکتریکی قابل اندازه‌گیری چون پتانسیل، جریان، جذب نور، نشر نور و غیره تبدیل می‌کند. خروجی مبدل می‌تواند بطور مستقیم نمایش داده شود یا به وسیله یک ریز پردازشگر یا آمپلی فایر یا سایر تکنیک‌ها مورد پردازش بیشتر قرار گیرد.

۱ـ۲ـ۳ـ آمپلی فایر[2]

آمپلی‌فایرها، دستگاه‌های الکترونیکی استانداردی هستند که سیگنال‌های مبدل را قبل از رساندن به نمایشگر پردازش می‌کنند.

۱ـ۳ ـطبقه‌بندی بیوسنسورها

بیوسنسورها براساس عناصر حسگر زیستی و نوع مبدل طبقه‌بندی می شوند.

۱ـ۳-۱- طبقه‌بندی براساس اجزای زیستی

بیوسنسورها براساس عناصر حسگر زیستی به انواع بیوسنسورهای آنزیمی، ایمونوسنسورهاو بیوسنسور سلولی طبقه‌بندی شده‌اند.

۱ ـ ۳ـ۱ـ۱ ـ بیوسنسورهای آنزیمی

آنزیم‌ها، جزء اولین عناصر شناساگر ملکولی در بیوسنسورها شناخته شده‌اند. بیوسنسورهای آنزیمی سیگنال‌های ناشی از فرآیندهای کاتالیتیکی آنزیم‌های تثبیت شده بر سطح الکترود و آنالیت هدف را به پاسخ‌های قابل اندازه‌گیری تبدیل می‌کند، پاسخ‌ها متناسب با غلظت آنالیت هدف است. اولین بیوسنسور آنزیمی توسط دانشمندان کلارک و لیونر در سال ۱۹۶۷به منظور تعیین میزان گلوکز خون ساخته شد که غلظت گلوگز در خون متناسب با میزان اکسیژن مصرف شده در واکنش کاتالیز شده توسط آنزیم گلوگز اکسیداز اندازه‌گیری شد. طی تحقیقات بعدی بیوسنسورهای آنزیمی دیگر چون بیوسنسور لاکتات، اوره، کراتینین وغیره برای تعیین میزان متابولیت‌های مهم لاکتات، اوره و کراتینین در مایعات بیولوژیکی بدن در زمینه پزشکی بالینی طراحی شدند. بیوسنسور لاکتات بر پایه آنزیم لاکتات دهیدروژناز تثبیت شده بر روی پلی اورتان برای تعیین لاکتات کل خون استفاده شد. مثال دیگر بیوسنسورهای آنزیمی برای تشخیص آلاینده‌های محیطی چون آفت‌کش‌ها، حشره‌کش‌ها بر پایه

[1] - Transducer
[2] - Ampilifier