

Application of *Pseudomonas.GSN23* Bacterium and Electrochemical Methods for the Identification of Phenol Contaminant

Narjes kolahchi

Department of Microbiology and Microbial Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran, narges_kolahchi@yahoo.com

Gholamhossein Ebrahimipour*

Department of Microbiology and Microbial Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran, g-ebrahimi@sbu.ac.ir

Seyed Omid Ranaei Siadat

Department of Biotechnology, Faculty of Energy Engineering and New Technologies, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran, o_ranaei@sbu.ac.ir

Nicole Jaffrezic-Renault

Institutes of Analytical Sciences, University of Lyon, Lyon, France, nicole-jaffrezic@univ-lyon1.fr

Abstract

Introduction: Phenol is considered to be an important pollutant in the environment and is steadier than other aromatic compounds in industrial treatment. There are several methods for detecting phenol in the wastes. In spite of the high accuracy of these methods, they are time-consuming and complex. The utilization of enzymatic biosensors for the identification of phenolic compounds is one of the options and successful techniques. However, the weaknesses of enzymes and high financial expenses cannot be ignored. One of the alternative solutions to overcome the shortcomings of working with enzymes is the utilization of microbial cells in biosensors. In this study, microbial cells were used to design a reasonable and accurate biosensor.

Materials and methods: In this survey, designing a biosensor was examined using a phenol consuming bacterium. *Pseudomonas. GSN23* was acclimatized to high phenol concentrations and immobilized by forming physical and chemical links on working electrodes (glassy carbon and gold interdigitated microelectrodes). Two electrochemical methods (square wave voltammetry and conductometric) were utilized to measure the phenol.

Results: In the presence of 1 gram per liter phenol, as the only source of carbon and energy, *Pseudomonas. GSN23* consumed 73% of the initial phenol concentration at 32 hours and phenol was consumed completely at 72 hours. This bacterium had positive and repeatable responses in conductometric method for phenol detection in the range of 1-300 milligram per liter. The phenol selectivity of the designed biosensor was estimated 5 times more than other aromatic compounds.

Discussion and conclusion: Microbial biosensors are practical, stable and resistant to the changes of the experimental media. In this study, *Pseudomonas.GSN23* was utilized as a phenol consuming bacterium and by conductivity measurement; repeatable responses were acquired in detecting this contaminant.

Key words: Phenol, Biosensor, *Pseudomonas.GSN23*, Conducti, Square Wave Voltammetry

* Corresponding author

Received: November 9, 2018 / **Accepted:** May 22, 2019

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله: پژوهشی)

سال هشتم، شماره ۳۱، پائیز ۱۳۹۸، صفحه ۱۹-۳۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۰۱

Doi: [10.22108/BJM.2019.113064.1159](https://doi.org/10.22108/BJM.2019.113064.1159)

کاربرد باکتری سودوموناس. GSN23 و روش‌های الکتروشیمیایی در شناسایی آلاینده فنل

نرجس کلاه‌چی: دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی و زیست‌فناوری میکروبی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران، narges_kolahchi@yahoo.com
غلامحسین ابراهیمی‌پور*: دانشیار، گروه میکروبیولوژی و زیست‌فناوری میکروبی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران، g-ebrahimi@sbu.ac.ir
سید امید رعنائی سیادت: دانشیار گروه زیست‌فناوری، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران، o_ranaei@sbu.ac.ir
نیکول جافرژیک-رنو: استادیار دانشگاه لیون، مؤسسه علوم آنالیز، لیون، فرانسه، nicole-jaffrezic@univ-lyon1.fr

چکیده

مقدمه: امروزه، فنل آلاینده مهم محیط‌زیست است و در تصفیه پساب‌های صنعتی، پایداری بیشتری نسبت به سایر ترکیبات آروماتیک حلقوی نشان می‌دهد. روش‌های متعددی برای شناسایی فنل در پساب‌ها وجود دارند که با وجود دقت زیاد، وقت‌گیر و پیچیده‌اند. استفاده از زیست‌حسگرهای آنزیمی برای تشخیص ترکیبات فنلی، یکی از روش‌های جایگزین و مؤثر در سنجش این آلاینده است؛ هرچند نقاط ضعف کاربرد آنزیم‌ها و هزینه‌های اقتصادی زیاد را نمی‌توان نادیده گرفت. کاربرد سلول‌های میکروبی در زیست‌حسگرها یکی از راهکارهای جایگزین برای غلبه بر نقاط ضعف کار با آنزیم‌هاست. در پژوهش حاضر نیز با هدف طراحی زیست‌حسگری مقرون‌به‌صرفه و دقیق از سلول‌های میکروبی استفاده شد.

مواد و روش‌ها: باکتری گرم منفی سودوموناس. GSN23 در حضور غلظت‌های زیاد فنل سازگار و با ایجاد پیوندهای فیزیکی و شیمیایی روی الکترودهای کار (کربن شیشه‌ای و میکروالکترودهای مرکب طلا) تثبیت شد و روش‌های الکتروشیمیایی (ولتامتری موج مربعی و هدایت‌سنجی) برای سنجش فنل استفاده شدند.

نتایج: باکتری سودوموناس. GSN23 در حضور ۱ گرم در لیتر فنل توانست تا ساعت ۳۲ رشد خود، ۷۳ درصد از غلظت اولیه فنل را مصرف کند و میزان فنل در محیط را در ساعت ۷۲ به صفر برساند؛ این باکتری پاسخ‌های مثبت و تکرارپذیری را در روش هدایت‌سنجی برای شناسایی فنل در گستره تشخیص ۱ تا ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر نشان داد و میزان انتخاب‌پذیری زیست‌حسگر طراحی شده به پیش‌ماده فنل در مقایسه با سایر ترکیبات آروماتیک تک‌حلقه‌ای ۵ برابر بیشتر تخمین زده شد.

بحث و نتیجه‌گیری: زیست‌حسگرهای میکروبی صرفه اقتصادی و پایداری ساختار دارند و نسبت به تغییرات محیطی مقاومند. در پژوهش حاضر، باکتری سودوموناس. GSN23 مصرف‌کننده فنل در نظر گرفته شد و با روش هدایت‌سنجی پاسخ‌های تکرارپذیری در سنجش این آلاینده به دست آمدند.

واژه‌های کلیدی: فنل، زیست‌حسگر، سودوموناس. GSN23، هدایت‌سنجی، ولتامتری موج مربعی

* نویسنده مسئول مکاتبات

Copyright©2019, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

بر مبنای گزارش سازمان جهانی بهداشت، ترکیبات آروماتیک برای انسان و محیط‌زیست بسیار خطرناکند و به آسانی تجزیه نمی‌شوند. درحقیقت انرژی زیاد رزونانس بنزن و مشتقات آن سبب پایداری این ترکیبات می‌شود و شکست حلقه را دشوار می‌کند (۱).

فنل یکی از اجزای اصلی پساب بیشتر پالایشگاه‌ها، مجتمع‌های پتروشیمی، صنایع تبدیل زغال‌سنگ، صنایع کاغذ و ریخته‌گری فلزات است. منابع آلودگی فنل در پساب‌های صنعتی عبارتند از: استخراج سوخت‌های فسیلی، فرایندهای شیمیایی نظیر واحد تولید فنل، صنایع دارویی، صنایع چوب و کارخانجات تولید حشره‌کش‌ها. فنل به علت قابلیت فراریت کم و انحلال‌پذیری زیاد، مهم‌ترین خطر آلودگی آب برای انسان محسوب می‌شود (۲).

راه‌های مختلفی برای بررسی حضور و ارزیابی زیست‌محیطی آلاینده‌ای مانند فنل وجود دارند و اگرچه گاز کروماتوگرافی، اسپکتروفوتومتری و کروماتوگرافی مایع با طیف‌سنجی جرمی کاربرد وسیع و دقت زیادی در تشخیص حضور این آلاینده دارند، این گونه روش‌ها از نظر آماده‌سازی نمونه، سخت و پیچیده و از نظر اجرا، گران‌قیمت و وقت‌گیرند (۳).

امروزه، فناوری زیست‌حسگرها این امکان را فراهم کرده است که از اجزای زیستی یا محصولات آنها برای اندازه‌گیری مواد شیمیایی استفاده شود. بیشتر زیست‌حسگرهای گزارش شده برای تشخیص ترکیبات فنلی بر پایه آنزیم‌هایی مانند تیروزیناز^۱، لاکاز^۲ و پراکسیداز ترب کوهی^۳ هستند. دقت زیاد و عملکرد دقیق آنزیم‌ها در شناسایی ترکیبات فنلی، آنها را به گزینه‌ای مناسب در طراحی زیست‌حسگرها تبدیل کرده است؛

هرچند نقاط ضعف کاربرد آنزیم‌ها را نمی‌توان نادیده گرفت. هزینه استخراج، جداسازی و خالص‌سازی آنزیم‌ها زیاد است و تعدادی از آنزیم‌ها طی جداسازی، تخلیص یا تثبیت روی الکترودها فعالیت خود را از دست می‌دهند؛ زیرا ساختار مولکولی آنها تغییر می‌کند. یکی از راهکارهای جایگزین برای غلبه بر موانع یادشده و نقاط ضعف آنزیم‌ها، کاربرد سلول‌های میکروبی در زیست‌حسگرهاست (۳). نقاط ضعف زیست‌حسگرهای سلولی مانند حساسیت کمتر نسبت به آنزیم‌ها را نیز می‌توان با روبه‌رو کردن سلول میکروبی با پیش‌ماده مد نظر تا حد زیادی بهبود بخشید (۴).

ریز موجوداتی که برای آشکارسازی ترکیبات فنلی در زیست‌حسگرها گزارش شده‌اند شامل جنس‌های رودوکوکوس^۴، سودوموناس^۵، موراکسلا^۶، آرتروباکتر^۷ و تریکوسپورون^۸ هستند (۳).

از میان روش‌های مختلف طراحی زیست‌حسگرها، روش‌های الکتروشیمیایی پرکاربردترین و تجاری‌ترین روش به شمار می‌آیند. این دسته از زیست‌حسگرها قابلیت تلفیق آسان با روش‌های الکترونیک را دارند و انرژی کمی مصرف می‌کنند که از نظر اقتصادی به صرفه است (۵). در این روش، واکنش‌های شیمیایی بین مولکول‌های زیستی و آنالیت سبب تولید یا مصرف الکترون یا یون‌هایی می‌شوند که روی ویژگی‌های الکتریکی محلول مانند جریان الکتریکی یا پتانسیل تأثیر می‌گذارند؛ سپس سیگنال‌های الکتروشیمیایی تولیدشده برای تخمین میزان آنالیت موجود در محیط استفاده می‌شوند.

در روش ولتامتری (زیرمجموعه‌ای از روش‌های الکتروشیمیایی) می‌توان جریان را به‌عنوان تابعی از ولتاژ در طول فرایند مطالعه کرد. در طول آزمایش، ولتاژ ثابت یا متغیر به سامانه اعمال و جریان ثبت می‌شود.

زیست حسگرها را افزایش می دهند. این الکترودها شامل دو میکروالکتروده هستند که کنار یکدیگر جفت می شوند و محل قرارگیری نمونه مساحتی حدود ۱ میلی متر مربع دارد که امکان قرارگیری حجم های بسیار کمی از نمونه را روی آرایش نواری الکترودها فراهم می کند. سطح الکترودهای مرکب از پراکندگی منظم یا تصادفی منطقه رسانایی مانند طلا، ایریدیوم و پلاتین روی بدنه عایق (مانند شیشه) تشکیل می شود (۶).

در پژوهش حاضر، به منظور دستیابی به روشی مقرون به صرفه و سریع برای سنجش فنل از دو روش الکتروشیمیایی (ولتامتری موج مربعی و هدایت سنجی) استفاده شد. باکتری سودوموناس. GSN23 که از خاک آلوده به پساب پالایشگاه نفت تهران جداسازی شده بود، عامل شناساگر در پژوهش حاضر انتخاب شد. استفاده از روش های الکتروشیمیایی دقیق در صرف زمان و استفاده از زیست حسگرهای میکروبی در مقایسه با انواع آنزیمی در هزینه ها صرفه جویی می کند. در مطالعه حاضر، باکتری مدنظر روی الکترودهای کار- الکترودهای کربن شیشه ای و میکروالکترودهای بهم جفت شده طلا- تثبیت و پاسخ در حضور پیش ماده فنل ثبت شد.

مواد و روش ها

سازگار کردن باکتری مصرف کننده فنل با غلظت های زیاد پیش ماده: باکتری سودوموناس. GSN23 به شکل ویال لیوفیلیزه (خشک شده در خلأ و منجمد) از آزمایشگاه ملی میکروبیولوژی صنعتی^۱ تحویل گرفته و روی محیط آگار مغذی^{۱۱} کشت داده شد. تک کلنی های ایجاد شده به محیط پایه معدنی با غلظت ۱ میلی مولار فنل منتقل شدند؛ این محیط دارای فنل (تنها منبع کربن) و سایر

در روش هدایت سنجی^۹، تغییر مقدار یون های موجود در محیط به سبب واکنش های انجام شده سنجیده می شود؛ با تغییر میزان یون ها، هدایت الکتریکی در محلول واکنش تغییر می کند که قابل اندازه گیری است. محلول های حاوی یون ها جریان الکتریسیته را از خود عبور می دهند؛ میزان این هدایت جریان بسته به حضور یک ماده شیمیایی یا یک واکنش تغییر می کند. ارتباط هدایت جریان و غلظت به ماهیت واکنش بستگی دارد و اندازه گیری آن امکان پذیر است (۵).

امروزه، الکترودهای بر پایه کربن در سطح وسیع برای بررسی های الکتروشیمیایی استفاده می شوند. دامنه وسیع پتانسیل آنها با جریان زمینه ای کمتر، ارزان قیمت بودن و بی اثر بودن شیمیایی از جمله مزایای این الکترودها برای کاربردهای تشخیصی اند؛ هرچند در این الکترودها، سرعت انتقال الکترون در سطح کربن از سرعت مشاهده شده در الکترودهای فلزی کمتر است. کربن شیشه ای به علت داشتن ویژگی های مکانیکی و الکترونیکی مناسب، گستره وسیع پتانسیلی، بی اثر بودن از نظر شیمیایی و قابلیت استفاده مکرر معروف است. ساختار کربن شیشه ای شامل نوارهای ظریف و درهم پیچیده ای متشکل از صفحه های گرافیت با اتصال عرضی است. گسترش و توسعه میکروالکترونیک باعث ایجاد میکروالکترودهایی با طول عمر بیشتر شده است که نسبت سیگنال به نویز را بهبود و هزینه راه اندازی سیستم را کاهش داده اند. میکروالکترودها نسبت به الکترودهای بزرگ تر مزایایی دارند که سازگاری زیستی، آسانی کار برای مشاهده زیر میکروسکوپ، استفاده بلندمدت و زیاد بودن سرعت انتقال ماده مورد سنجش به الکترودها از جمله مزایای این گونه میکروالکترودها به شمار می روند و دقت کار در طراحی

۸ ساعت ثبت و منحنی‌های مربوطه رسم شدند (۷). در فواصل زمانی ۸ ساعت از محیط‌های کشت که فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت (۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل) بودند، نمونه گرفته شد. ۱ میلی‌لیتر از نمونه گرفته شده به مدت ۲۰ دقیقه در ۸۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد؛ مایع رویی برای سنجش فنل استفاده و رسوب سلولی در آب مقطر حل شد و جذب نوری آن در برابر شاهد آب مقطر در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. در تمام مراحل، دما ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۱۳۰ دور در دقیقه تنظیم شد. در تمام مراحل که سنجش فنل در آنها انجام شد، محیط‌های شاهدی نیز وجود داشتند که سلول‌های باکتری را نداشتند، اما در آنها نیز سنجش فنل باقیمانده انجام شد تا اگر مقداری از فنل از طریق سایر واکنش‌ها و بدون دخالت باکتری حذف شده است، مشخص شود (۸).

بررسی میزان رشد به روش اسپکتروفوتومتری:

باتوجه به اینکه فنل تنها منبع کربن و انرژی در محیط پایه معدنی است، می‌توان رشد ریزموجودات را شاخصی از تجزیه فنل و استفاده ریزموجودات از آن به عنوان منبع کربن و انرژی در نظر گرفت؛ با این پیش فرض، تغییرات میزان جذب نوری محیط کشت پایه در طول موج ۶۰۰ نانومتر (A₆₀₀) در فواصل زمانی معین اندازه‌گیری و از آن برای رسم نمودار رشد بر حسب زمان استفاده شد (۸).

بررسی میزان تجزیه فنل با روش اسپکتروفوتومتری:

به منظور به دست آوردن مقدار فنل حذف شده توسط باکتری از روش رنگ‌سنجی مستقیم با معرف ۴-آمینوآنتی‌پیرین بر اساس روش استاندارد D 5530 استفاده شد (۹). محلول‌های لازم عبارتند از:

ترکیبات آن شامل ۳۲۵ سولفات آمونیوم^{۱۲}، ۹/۴۵ میلی‌گرم در لیتر سولفات منگنز^{۱۳}، ۱۳۳/۰۷ میلی‌گرم در لیتر سولفات منیزیم با هفت مولکول آب همراه^{۱۴}، ۳/۳۳ میلی‌گرم در لیتر کلرید آهن با سه مولکول آب همراه^{۱۵}، ۱۶۱۱/۹۱ میلی‌گرم در لیتر کلرید کلسیم با دو مولکول آب همراه، ۲۶۲۷ میلی‌گرم در لیتر فسفات هیدروژن پتاسیم^{۱۷} و ۱۴۳۶ میلی‌گرم در لیتر فسفات دی‌هیدروژن پتاسیم^{۱۸} بود و ۲ درصد وزنی آگار-آگار شسته شده و دارای درصد خلوص زیاد برای جامد کردن محیط استفاده شد. در مرحله بعد، باکتری به فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل) به مقداری که کدورت اولیه ۰/۱ را ایجاد کند، تلقیح شد. شرایط بررسی ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۱۳۰ دور در دقیقه در نظر گرفته شد. پس از ثابت شدن جذب نوری^{۱۹} در طول موج ۶۰۰ نانومتر، تمام حجم فلاسک به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و دور ۸۰۰۰ دور در دقیقه و در شرایط استریل سانتریفیوژ و سپس رسوب سلولی به محیط جدید تلقیح شد. محیط جدید دارای غلظت فنل بیشتری (۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بود و میزان کدورت ابتدایی در این بررسی نیز ۰/۱ تنظیم شد. همانند مرحله پیش، پس از ثابت شدن جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر، انتقال به محیط کشت دارای ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل انجام شد. مراحل یاد شده تا غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل تکرار شدند. سویه‌های سازگار شده روی محیط کشت معدنی دارای ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۷).

به منظور دستیابی به اطلاعاتی در زمینه میزان کمی رشد و تجزیه فنل سویه سازگار شده با گذشت زمان، میزان رشد و سنجش فنل باقیمانده در محیط سنتزی هر

فنتل محاسبه شد؛ این منحنی کالیبراسیون برای غلظت های صفر تا ۵ میلی گرم در لیتر فنتل تهیه شده است و با استناد به معادله $Y=0.108x-0.0027$ و توجه به ضریب همبستگی زیاد آن (0.994)، غلظت های مجهول فنتل در محیط های کشت محاسبه می شوند. نمونه هایی که جذب نوری آنها خارج از این محدوده باشد، غلظت آنها پس از رقیق کردن محاسبه می شود. دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و دور شیکر ۱۳۰ دور در دقیقه، شرایط گرما گذاری در تمام مراحل بود.

آماده سازی باکتری برای استفاده روی

الکتروود کربن شیشه ای: باکتری مصرف کننده فنتل در محیط پایه معدنی حاوی ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر فنتل کشت داده شد، به مدت ۳۰ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و دور شیکر ۱۳۰ دور در دقیقه گرما گذاری شد و با سانتریفوژ کردن محیط کشت در فاز نمایی رشد به دست آمد و در بافر فسفات ۵ میلی مولار (اسیدیته ۷) به حالت سوسپانسیون درآمد. کدورت استفاده شده برای بار گذاری روی الکتروود با استاندارد ۴ مک فارلند با کدورت ۰/۴ در طول موج ۶۰۰ نانومتر در بافر فسفات ۵ میلی مولار (اسیدیته ۷) تنظیم شد.

الکتروود کربن شیشه ای اصلاح شده با پلی آنیلین -

کیتوسان: شکل نانوفیبری پلی آنیلین به واسطه واکنش پلیمریزاسیون شیمیایی آنیلین از طریق اضافه کردن آمونیوم پروکسی دی سولفات^{۲۱} به عنوان اکسید کننده تهیه شد. درون بشر، ۳/۲ میلی لیتر آنیلین در ۶/۸ میلی لیتر کلریدریک اسید ۱ مولار حل و سپس ۲ میلی گرم آمونیوم پراکسی دی سولفات به محلول اضافه شد و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد روی همزن مغناطیسی با یکدیگر ترکیب شدند. رسوب سبزرنگ حاصل در ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ، با

۱- NH_4OH (0.5 N): ۳۵ میلی لیتر از NH_4OH غلیظ تا ۱ لیتر رقیق شد.

۲- محلول بافر فسفات: ۱۰۴/۵ گرم از K_2HPO_4 و ۷۲/۳ گرم از KH_2PO_4 تا ۱ لیتر رقیق و اسیدیته آن روی ۶/۸ تنظیم شد.

۳- معرف ۴ آمینوآنتی پیرین: ۰/۵ گرم از این ماده در آب حل و تا ۲۵ میلی لیتر رقیق شد؛ این معرف ناپایدار است.

۴- معرف پتاسیم فری سیانید: ۸ گرم از $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ در آب حل و تا ۱۰۰ میلی لیتر رقیق شد.

محلول ۱۰۰ میلی گرم در لیتر فنتل به عنوان محلول ذخیره^{۲۰} ساخته و محلول های ۱ تا ۵ میلی گرم در لیتر فنتل به کمک بالن ژوژه ۱۰۰ میلی لیتری تهیه شدند.

محلول های تهیه شده در ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری ریخته و مراحل زیر به ترتیب انجام شدند:

۲/۵ میلی لیتر از محلول NH_4OH اضافه و اسیدیته آن بی درنگ با محلول بافری در حدود ۷/۹ تنظیم شد؛ سپس ۲ میلی لیتر از محلول معرف ۴ آمینوآنتی پیرین و ۲ میلی لیتر محلول پتاسیم فری سیانید به آن اضافه شد. رنگ محلول در این مرحله زرد تا قرمز است. محلول به خوبی هم زده شد و ۱۵ دقیقه فرصت داده شد تا واکنش کامل شود.

نمونه شاهد شامل ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر بود که مراحل یاد شده برای آن نیز تکرار شدند. جذب نمونه ها بر حسب شاهد در طول موج ۵۰۰ نانومتر اندازه گیری شد.

پس از خواندن جذب نوری، منحنی استاندارد رسم شد و از آن برای به دست آوردن غلظت مجهول فنتل در مراحل مختلف آزمایش استفاده شد. مقدار غلظت مجهول فنتل در محیط های کشت با استفاده از منحنی کالیبراسیون

۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی در غلظت‌های مختلف (استاندارد مک فارلند ۰/۵، ۳، ۴ و ۵) و در بافر فسفات ۵ میلی‌مولار (اسیدیته ۷/۲) تهیه و به این سوسپانسون‌ها، ۵ میلی‌گرم پروتئین آلبومین سرم گاوی اضافه شد. محلول دیگری شامل ۵ میلی‌گرم پروتئین آلبومین سرم گاوی در بافر فسفات ۵ میلی‌مولار (اسیدیته ۷/۲) نیز تهیه و شاهد در نظر گرفته شد.

۸ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی روی میکروالکتروود کار و ۰/۸ میکرولیتر از محلول شاهد روی میکروالکتروود شاهد قرار گرفت و پس از خشک شدن در دمای اتاق، میکروالکتروودها به مدت ۵ دقیقه در دسیکاتور حاوی بخار گلو تار آلدئید (۳ درصد گلو تار آلدئید در بافر فسفات ۵ میلی‌مولار (اسیدیته ۷/۲)) زیر هود شیمیایی قرار گرفتند؛ سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق کاملاً خشک و برای انجام بررسی‌های هدایت‌سنجی استفاده شدند. شرایط نگهداری الکتروودها برای زمان طولانی‌تر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد است.

روی هر دو میکروالکتروود کار و شاهد سری دیگری از الکتروودها، ۰/۸ میکرولیتر محلول پروتئینی آلبومین سرم گاوی در بافر فسفات ۵ میلی‌مولار (اسیدیته ۷/۲) (بدون حضور باکتری) قرار گرفت و این الکتروودها نیز پس از خشک شدن به مدت ۵ دقیقه در دسیکاتور حاوی بخار گلو تار آلدئید (۳ درصد گلو تار آلدئید در بافر فسفات ۵ میلی‌مولار (اسیدیته ۷/۲)) زیر هود شیمیایی قرار گرفتند. این سری از الکتروودها و الکتروودهای بدون پروتئین و باکتری به‌عنوان شاهد منفی در مطالعه‌های هدایت‌سنجی بررسی شدند.

استون و آب دیونیزه شسته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق خشک شد. در مرحله بعد، محلول ۰/۵ درصد وزنی کیتوسان در استیک‌اسید ۱ درصد تهیه شد (پلیمرهای کیتوسان روی رشد سلول‌ها اثر سمی ندارند و به ایجاد ساختار ژل‌مانند تمایل دارند) و پلی‌آنیلین سنتز شده به میزان ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در محلول کیتوسان پراکنده شد (۱۰). ۵۰ میکرولیتر از محلول حاصل روی سطح الکتروود کربن شیشه‌ای قرار گرفت و پس از خشک شدن کامل در دمای اتاق، سوسپانسیون باکتریایی در غلظت‌های مختلف (استاندارد مک فارلند ۰/۵، ۳، ۴ و ۵) روی سطح الکتروود پراکنده شد. الکتروودها در دمای اتاق خشک و برای انجام بررسی ولتاژمتری موج مربعی استفاده شدند.

میکروالکتروودهای به هم جفت شده^{۲۲}:

میکروالکتروودهای به هم جفت شده مورد استفاده ابعاد ۵×۳۰ میلی‌متر دارند و با قرار گرفتن لایه‌ای از بخار طلا روی سطح شیشه ساخته شده‌اند؛ لایه‌ای ۲۰ نانومتری از تیتانیوم نیز برای بهبود اتصال لایه طلا به شیشه به شکل حدواسط روی شیشه قرار گرفته است. بخش حساس الکتروودها ۲/۹ میلی‌متر مربع مساحت دارد و ارتفاع و فاصله بین آرایه‌های قرار گرفته در بخش حساس الکتروودها ۲۰ میکرومتر است. الکتروودهای استفاده شده در آزمایشگاه بیوفیزیک و سطوح دانشگاه لیون-۱ ساخته شده‌اند و به شکل تجاری در دسترس قرار دارند. الکتروودها در حمام آبی اولتراسونیک به مدت ۱۰ دقیقه در استون قرار گرفتند و سپس در حضور گاز نیتروژن خشک شدند. الکتروودها به مدت ۲ دقیقه زیر هود شیمیایی در محلول پیرانا^{۲۳} قرار گرفتند و سپس با اتانول شسته شدند؛ الکتروودها در آغاز و بین هر مرحله به‌طور کامل با آب دیونیزه آب کشی شدند (۱۱).

بررسی هدایت سنجی: در روش هدایت سنجی، اندازه گیری ها با تزریق مقادیر متفاوتی از محلول ذخیره فنل به سل الکتروشیمیایی ۵ میلی لیتری حاوی بافر فسفات ۵ میلی مولار (اسیدیته ۷) انجام شد. ولتاژ متناوبی با دامنه ۱۰ میلی ولت و فرکانس ۱۰۰ کیلوهرتز توسط مولد (SR830 Lock-in, Stanford research system) به میکروالکترودهای مرکب و سل الکتروشیمیایی اعمال شد. پس از ثابت شدن سیگنال خروجی، مقادیر مختلفی از هر پیش ماده به سل الکتروشیمیایی تزریق و نمودارهای تیپیک پاسخ هدایت سنجی توسط دستگاه ثبت شد. نمودارهای تیپیک پاسخ با توجه به نمودار کالیبراسیون به دست آمدند. با توجه به این نمودارها، میزان حساسیت در برابر پاسخ گویی، زمان پاسخ و حداقل میزان شناسایی^{۲۴} هر پیش ماده توسط باکتری های مدنظر محاسبه شد.

بررسی میزان انتخاب پذیری^{۲۵} زیست حسگر هدایت سنجی باکتریایی به پیش ماده های مشابه فنل با ساختار آروماتیک: به منظور بررسی میزان انتخاب پذیری زیست حسگر طراحی شده بر اساس روش هدایت سنجی، پیش ماده های دیگری از جمله ۲-۴-۶ تری کلرو فنل، ۲-۳-۶ تری کلرو فنل، ۴ کلرو فنل، بیس فنل آ و پارانیتروفنل نیز به شکل مجزا به سل الکتروشیمیایی تزریق شدند. محلول ذخیره از پیش ماده های یاد شده تهیه شد و با تزریق مقادیر معین، غلظت هایی در محدوده غلظت های بررسی شده برای فنل (۱ تا ۳۰۰ میلی گرم در لیتر) به دست آمد.

نتایج

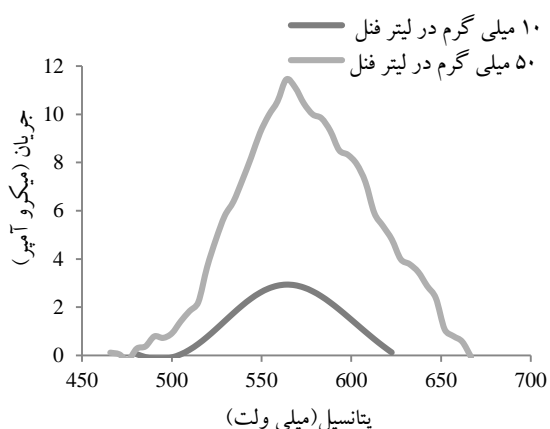
شکل ۱ میزان رشد و تجزیه فنل باکتری سودوموناس GSN23 را نشان می دهد. همان طور که در شکل دیده می شود، سرعت رشد این باکتری که مراحل

آماده سازی میکروالکترودها برای مشاهده با میکروسکوپ الکترونی نگاره: دو میکروالکترودها از میکروالکترودهای آماده شده به منظور بررسی هدایت سنجی برای مشاهده با میکروسکوپ الکترونی نگاره آماده شدند. میکروالکترودهای مدنظر به مدت ۴۵ دقیقه در گلو تار آلدئید ۳ درصد (گلو تار آلدئید خالص شده مخصوص تثبیت کردن نمونه های میکروسکوپ الکترونی) غوطه ور شدند؛ سپس مرحله آب گیری انجام شد؛ به طوری که، میکروالکترودها در اتانول - آب با درصد به ترتیب ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ و هر کدام به مدت ۱۰ دقیقه غوطه ور شدند. در مرحله پایانی، میکروالکترودها در دمای اتاق کاملاً خشک و برای بررسی میکروسکوپی استفاده شدند (۱۱).

بررسی ولتامتری موج مربعی: تجزیه و تحلیل های ولتامتری موج مربعی به کمک دستگاه پتانسیواستات (Ultra Lab Micro System.Co) مجهز به نرم افزار Ultrateklab انجام شد. سل به کار رفته از نوع سل های الکتروشیمیایی سه الکترودی شامل الکتروود مرجع از جنس کلرید نقره Ag/AgCl، الکتروود کمکی از جنس گرافیت و الکتروود کار کربن شیشه ای اصلاح شده با پلی آنیلین - کیتوسان و دارای باکتری بود. در این روش، اندازه گیری ها با تزریق مقادیر متفاوتی از محلول ذخیره پیش ماده فنل به سل الکتروشیمیایی ۵ میلی لیتری حاوی بافر فسفات ۵ میلی مولار (اسیدیته ۷) انجام شد.

هر الکتروود کار در محلول الکتروولیت (بافر فسفات ۵ میلی مولار (اسیدیته ۷)) قرار گرفت و پس از تزریق فنل، مقدار پتانسیل در بازه ۵۰۰- تا ۱۰۰۰ میلی ولت و فرکانس ۸۸ هرتز اسکن شد.

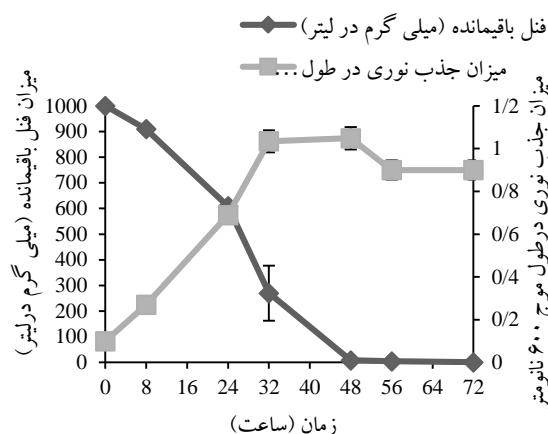
میلی‌ولت با این مراجع تطابق دارد و با فعالیت باکتری روی سطح الکتروود مرتبط نیست (۱۰ و ۱۲)؛ از سویی، با بررسی دقیق سطح الکتروودها پس از آزمون‌های مکرر مشخص شد غشای فرار گرفته روی سطح الکتروود ثبات ندارد و به مرور در محلول الکتروولیت شسته خواهد شد. با توجه به مشاهده‌های یاد شده و بررسی الکتروودهای کربن شیشه‌ای به تنهایی در حضور فنل، ولتاموگرام مشاهده شده در شکل ۲ حاصل فعالیت باکتری در حضور پیش‌ماده مدنظر (فنل) نیست، بلکه حاصل واکنش الکتروود کربن شیشه‌ای با فنل است.



شکل ۲- ولتاموگرام به دست آمده از الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با پلی‌آنیلین - کیتوسان در حضور فنل

هدایت سنجی: در روش هدایت سنجی، اندازه‌گیری‌ها با سل الکتروشیمیایی ۵ میلی‌لیتری حاوی بافر فسفات ۵ میلی‌مولار (اسیدیته ۷) و با تزریق مقادیر مختلفی از پیش‌ماده فنل انجام شدند. ولتاژ متناوبی با دامنه ۱۰ میلی‌ولت و فرکانس ۱۰۰ کیلوهرتز توسط مولد (SR830 Lock-in, Stanford research system) میکروالکتروودهای مرکب و سل الکتروشیمیایی اعمال شد.

سازگارشدن با فنل را پشت‌سر گذاشته است، در حضور پیش‌ماده فنل (تنها منبع کربن و انرژی) زیاد است؛ به طوری که در ساعت ۳۲، این باکتری ۷۳ درصد از غلظت اولیه فنل را مصرف کرده و در ساعت ۴۸، میزان فنل باقیمانده در محیط به حداقل ممکن و نزدیک به صفر رسیده است.



شکل ۱- میزان رشد و تجزیه فنل باکتری سودوموناس GSN23.

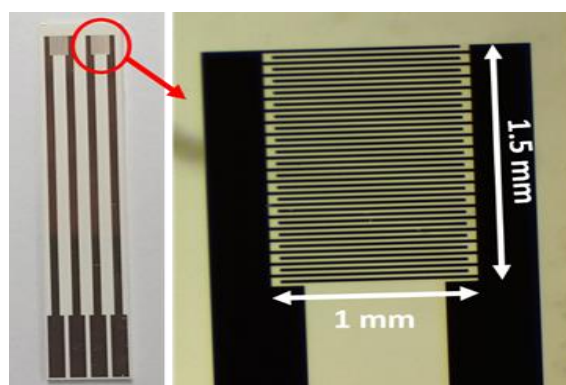
ولتامتری موج مربعی: در این روش، اندازه‌گیری‌ها با تزریق مقادیر متفاوتی از محلول ذخیره پیش‌ماده فنل به سل الکتروشیمیایی ۵ میلی‌لیتری (سل سه الکتروودی با الکتروود مرجع کلرید نقره Ag/AgCl، الکتروود کمکی گرافیتی و الکتروود کار کربن شیشه‌ای اصلاح شده با پلی‌آنیلین - کیتوسان و دارای باکتری سودوموناس GSN23) حاوی بافر فسفات ۵ میلی‌مولار (اسیدیته ۷) انجام شد.

شکل ۲ ولتاموگرام موج مربعی مربوط به غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر فنل را نشان می‌دهد، قله مشاهده شده در هر دو غلظت، ولتاژ حدود ۵۵۰ میلی‌ولت است. با توجه به پژوهش‌های انجام شده در حوزه سنسورهای شیمیایی، قله مشاهده شده در ۵۵۰

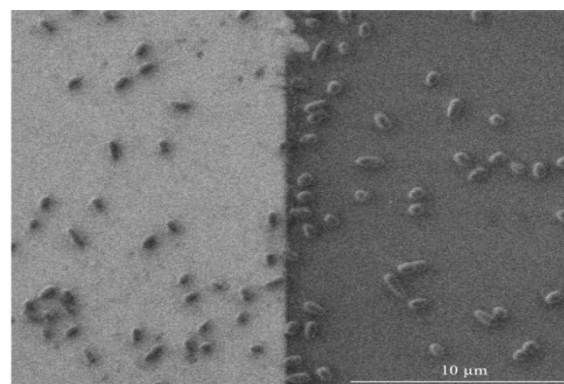
ابتدا الکترودهای بدون باکتری تثبیت شده با اعمال ولتاژ متناوبی با دامنه ۱۰ میلی ولت و فرکانس ۱۰۰ کیلوهرتز در سل الکتروشیمیایی به عنوان شاهد منفی بررسی و مقادیر متفاوتی از فتل به سل الکتروشیمیایی تزریق شدند. در مرحله بعد، الکترودهایی بررسی شدند که باکتری نداشتند، اما در حضور بخار گلو تار آلدهید قرار گرفته بودند. در هر دو مورد، از غلظت نخست فتل تا غلظت های نهایی این پیش ماده، پاسخ درخور گزارشی مشاهده نشد؛ در نتیجه، الکترودها به تنهایی پاسخی با پیش ماده ایجاد نمی کنند. در مرحله بعد، الکترودهای دارای باکتری تثبیت شده آزمایش شدند. نمودار تیپیک پاسخ هدایت سنجی برای باکتری سودوموناس GSN23 در شکل ۵ دیده می شود. مطابق شکل، تزریق مقادیر مختلفی از فتل به شکلی انجام شده است که غلظت های نهایی ۱، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میلی گرم در لیتر را در سل ایجاد کند و پس از هر تزریق به سل الکتروشیمیایی زمان داده شده است تا نمودار به حالت ثابت درآید و سپس تزریق بعدی برای به دست آوردن غلظت بیشتر انجام شده است. در مقادیر کمتر و بیشتر از مقادیر یاد شده، پاسخ درخور گزارشی در سل ایجاد نشد و محدوده ۱ تا ۳۰۰ میلی گرم در لیتر، محدوده خطی پاسخ به حضور فتل در سل گزارش شد. بررسی ها به کمک ۱۲ میکروالکتروود مشابه که درصد انحراف معیار نسبی^{۲۶} حساسیت زیست حسگر برای آنها ۸/۴۱ درصد محاسبه شده بود، انجام و سه تکرار برای هر غلظت در نظر گرفته شد. حد تشخیص با استفاده از رابطه مربوطه محاسبه و زمان پاسخ به پیش ماده فتل تخمین زده شد. به منظور به دست آوردن حد تشخیص، سه برابر میزان نویز بر حساسیت (شیب خط نمودار کالیبراسیون به دست آمده) تقسیم و عدد به دست آمده ۰/۲ میلی گرم بر لیتر و زمان پاسخ ۱۲۰ ثانیه تخمین زده شد.

مقادیر متفاوتی از باکتری سودوموناس GSN23

باتوجه به استاندارد مک فارلند در فاز نمایی به همراه پروتئین آلبومین سرم گاوی روی سطح میکروالکتروود (شکل ۳) در حضور بخار گلو تار آلدهید تثبیت شد؛ تعداد باکتری های موجود روی سطح الکتروود، عامل بسیار مهمی در پاسخ سل الکتروشیمیایی است. پس از تکرارهای متعدد از الکترودهای مختلف، میزان مناسب تعداد باکتری ها برای داشتن پاسخ هدایت سنجی مناسب، استاندارد ۴ مک فارلند با جذب نوری ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر برآورد شد. تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره از سطح الکتروود کار در شکل ۴، تراکم مناسب باکتری ها روی سطح الکتروود را نشان می دهد.



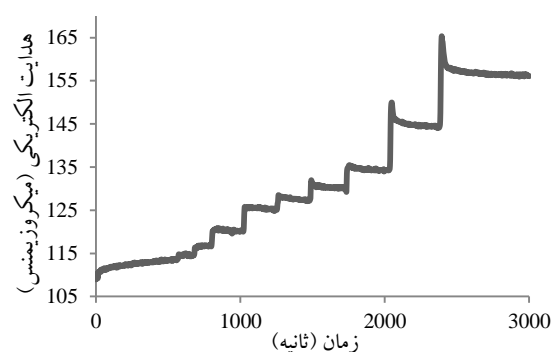
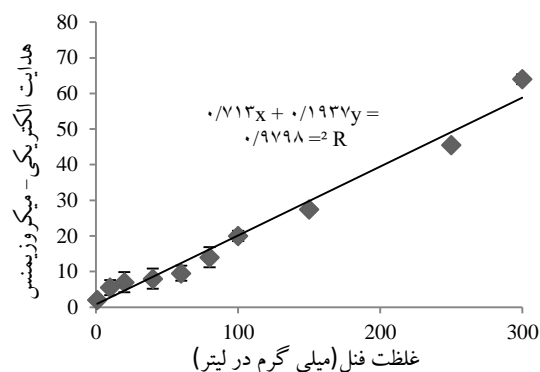
شکل ۳- آرایش محل قرارگیری نمونه روی الکترودهای مرکب



شکل ۴- تراکم مناسب باکتری سودوموناس GSN23 روی سطح الکتروود

نیز به‌طور مجزا به سل الکتروشیمیایی تزریق شدند. محلول ذخیره از پیش‌ماده‌های یادشده تهیه شد و با تزریق مقادیر معین، غلظت‌هایی در محدوده غلظت‌های بررسی‌شده برای فنل به دست آمد. بررسی‌ها در سه تکرار برای هر پیش‌ماده انجام شدند. نمودار کالیبراسیون برای پیش‌ماده‌های کلرینه فنل خطی بود، اما میزان حساسیت در برابر فنل بسیار کمتر مشاهده شد. نمودار کالیبراسیون برای پیش‌ماده‌های پارانیتروفنل و بیس‌فنل آ تا غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر خطی بود و در غلظت‌های بیشتر از ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، وجود پیش‌ماده گزارش نشد. درصد حساسیت نسبی این زیست‌حسگرها (در مقایسه با فنل)، ۲۵ درصد برای پیش‌ماده پارانیتروفنل و ۱۶ درصد برای پیش‌ماده بیس‌فنل آ برآورد شد.

درصد حساسیت نسبی در زمینه پیش‌ماده‌های دیگری مانند ۲-۴-۶-تری‌کلروفنل، ۲-۳-۶-تری‌کلروفنل و ۴ کلروفنل به ترتیب ۲۰، ۲۲ و ۲۶ درصد محاسبه شد. در جدول ۱، شاخص‌های مختلف زیست‌حسگر مدنظر بر اساس سلول باکتریایی سودوموناس GSN-23 برای سایر پیش‌ماده‌های بررسی‌شده ارائه شده است.



شکل ۵- نمودار کالیبراسیون زیست‌حسگر فنل بر پایه سلول باکتریایی سودوموناس GSN-23 (شکل بالا) و نمودار تیپیک هدایت‌سنجی (شکل پایین)

بررسی میزان انتخاب‌پذیری زیست‌حسگر باکتریایی

به پیش‌ماده‌های مشابه فنل با ساختار آروماتیک: به‌منظور بررسی میزان انتخاب‌پذیری زیست‌حسگر طراحی‌شده، پیش‌ماده‌های دیگری از جمله ۲-۴-۶-تری‌کلروفنل، ۲-۳-۶-تری‌کلروفنل، ۴ کلروفنل، بیس‌فنل آ و پارانیتروفنل

جدول ۱- مقایسه شاخص‌های مختلف در زیست‌حسگر فنل در حضور پیش‌ماده‌های آروماتیک

ضریب همبستگی نمودار کالیبراسیون (در محدوده خطی نمودار)	میزان حساسیت ($\mu\text{S ppm}^{-1}$)	محدوده تشخیص زیست‌حسگر (mg L^{-1})	محدوده خطی نمودار (mg L^{-1})	پیش‌ماده بررسی‌شده
۰/۹۷۸۱	۰/۵۴۲۳	۱-۳۰۰	۱-۳۰۰	فنل
۰/۹۸۱۵	۰/۰۴۷۵	۱-۳۰۰	۱-۳۰۰	۲-۴-۶ تری‌کلروفنل
۰/۹۶۷۸	۰/۰۴۳۷	۱-۳۰۰	۱-۳۰۰	۲-۳-۶ تری‌کلروفنل
۰/۹۸۷۷	۰/۰۵۵۱	۱-۳۰۰	۱-۳۰۰	۴ کلروفنل
۰/۹۶۱۵	۰/۱۰۱۹	۱-۸۰	۱-۱۰۰	بیس‌فنل آ
۰/۹۵۹۹	۰/۱۵	۱-۸۰	۱-۱۰۰	پارانیتروفنل

بحث و نتیجه گیری

ترکیبات آروماتیک موجود در پساب کارخانه های پتروشیمی بیشتر شامل ترکیبات فنلی و مشتقات بنزن است. از آنجا که فتل در بافت های بدن انسان و دیگر موجودات زنده تجمع می یابد، حتی مقادیر بسیار ناچیز آن در خروجی پساب صنایع مختلف مشکلی جهانی تعبیر می شود و فزون سازی زیستی^{۲۷} در زنجیره های غذایی سبب تشدید نگرانی های مجامع بین المللی در این زمینه شده است (۱۳).

در زیست حسگرهای تشخیص فنل بر اساس سلول های باکتریایی، تمرکز پژوهشگران روی کاربرد باکتری های گرم منفی و به ویژه جنس سودوموناس بوده است. Skla'dal و همکاران در سال ۲۰۰۲، باکتری هایی از جنس سودوموناس را برای بررسی آمپرومتری و تشخیص فنل استفاده کردند و نتیجه گرفتند از بین تعداد متعددی از این باکتری ها، تنها سه گونه می توانند در بررسی آمپرومتری روی اسکرین پرینت الکتروود کربنی^{۲۸} و با استفاده از میانجی فروسن، پاسخ مثبت داشته باشند؛ در مطالعه های این گروه، میزان اختصاصیت زیست حسگر طراحی شده نسبت به سایر ترکیبات آروماتیک در غلظت مشخص (۵/۰ میلی مولار) نیز بررسی شد، ترکیباتی مانند کتکول، وانیلین، پنتافلوئوروفنل و ترکیبات کلرینه فنل بررسی شدند و درصد پاسخ نسبی در مقایسه با فنل گزارش شد. در تمام موارد (به جز وانیلین) و در هر سه باکتری (سودوموناس. ۳۹۳۹۴، سودوموناس. IV-83، سودوموناس. III-74) پاسخ زیست حسگر به فنل بیشتر از سایر پیش ماده ها بود (۱۴). در سال ۲۰۰۶، Kirgöz و همکاران از باکتری سودوموناس پوتیلدا. DSM 50026^{۳۳} در روش آمپرومتری و با

به کاربرد الکتروود کار کامپوزیت گرافیت اپوکسی استفاده کردند (۱۵). Timur و همکاران نیز باکتری سودوموناس پوتیلدا. DSM 50026 را در مطالعه های آمپرومتری خود مدنظر گرفتند و الکتروود کلارک، اسکرین پرینت الکتروودهای گرافیتی و الکتروود خمیر کربن را به عنوان الکتروود کار استفاده کردند (۱۶-۱۹). در زیست حسگرهای طراحی شده برای تشخیص فنل و با استفاده از باکتری ها، روش های جذب سطحی (۱۵-۱۷)، به دام اندازی در میکروکپسول ها با استفاده از استات سلولز و ژلاتین (۱۸ و ۱۹) و اتصال عرضی با استفاده از گلو تار آلدئید برای ثابت کردن جزء زیستی روی مبدل کاربرد داشته اند (۱۹). در جذب سطحی، پیوندهای فیزیکی ایجاد شده بین سطح مدنظر و جزء زیستی ضعیفند و بر اساس پیوندهای واندروالس، میان کنش های یونی یا پیوندهای هیدروژنی اند. در پژوهش حاضر، روش جذب سطحی روی الکتروودهای بر پایه کربن استفاده شد. در روش جذب سطحی، فعالیت جزء زیستی به میزان زیادی حفظ می شود، اما اتصال ضعیف است و بسیار تابع دما، اسیدیته محیط و حضور یون های مختلف در محیط است. زیست حسگرهای طراحی شده با این روش تثبیت را نمی توان بلندمدت نگهداری کرد که ضعف بزرگی برای این روش به شمار می آید؛ زیرا پس از چندین بار استفاده از زیست حسگر، آنزیم یا جزء زیستی به علت اتصال ضعیف از روی سطح مدنظر شسته می شود (۱۶). ایجاد اتصال عرضی توسط یک ماده دو عاملی مانند گلو تار آلدئید، گلی اکسال^{۳۳} یا هگزامتیلن دی آمین^{۳۴} باعث ایجاد شبکه ای ثابت و غیر محلول می شود؛ در این روش، جزء زیستی به طور مستحکم در شبکه ایجاد شده قرار می گیرد و امکان نشت آن در محلول بسیار ضعیف

بیشتری دارد. زیست‌حسگر طراحی شده بر پایه باکتری گرم منفی سودوموناس. GSN23، پاسخ‌های تکرارپذیری در گستره تشخیص ۱ تا ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر (۱۰ تا ۳۱۸۷ میکرومولار) نشان داد. پاسخ باکتری سودوموناس. GSN23 نسبت به سایر پیش‌ماده‌های آروماتیک (۲-۴-۶ تری کلروفلن، ۲-۳-۶ تری کلروفلن، ۴ کلروفلن، بیس‌فنل آ و پارانیتروفنل) به مراتب کمتر از فنل (۵ برابر) گزارش شد که با مطالعه های Skla'dal و همکاران روی سایر گونه‌های سودوموناس همخوانی دارد (۱۴).

کاربرد سلول‌های میکروبی یکی از گزینه‌های جایگزین آنزیم‌ها در زیست‌حسگرها به شمار می‌آید و از آنجا که صرفه اقتصادی بسیار زیادی در مقایسه با آنزیم‌ها دارد، مدنظر پژوهشگران قرار گرفته است. با سازگار کردن ریزموجودات با پیش‌ماده موردسنجش، میزان حساسیت این گونه زیست‌حسگرها به میزان زیادی افزایش می‌یابد.

طراحی زیست‌حسگرهای بر پایه سلول‌های پروکاریوتی علاوه بر کاربرد در مقیاس آزمایشگاهی، گزینه‌ای نویدبخش در طراحی زیست‌حسگرهایی پیچیده‌تر و با همراهی سیستم‌های میکروفلوئیدیک به شمار می‌رود.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله حاضر از همکاری اعضای محترم گروه خانم پروفسور نیکول جافرزیک - رنو (مؤسسه علوم آنالیز - دانشگاه کلودبرنارد لیون ۱ - فرانسه) در بخش الکتروشیمی و بخش علوم و سطوح برای تهیه تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره سپاسگزاری می‌کنند.

است. اکثراً پروتئینی خنثی مانند سرم آلبومین گاوی برای تشکیل شبکه با جزء زیستی به کار می‌رود (۲۰). در پژوهش حاضر نیز باکتری سودوموناس. GSN23 - جداسازی شده از خاک آلوده به پساب پالایشگاه نفت تهران (۲۱) - برای تشخیص فنل استفاده شد. این باکتری قابلیت استفاده از فنل به عنوان تنها منبع کربن و انرژی را از خود نشان داد و قادر به تجزیه فنل در غلظت‌های زیاد بود. در روش نخست، ابتدا ولتاژتری موج مربعی با الکتروود کار بر پایه کربن (کربن شیشه‌ای) و بستر تثبیت پلی‌آنیلین - کیتوسان انتخاب شد. در این روش، الکتروودهای کربن شیشه‌ای با پیش‌ماده فنل واکنش دادند و از سوی دیگر، باتوجه به پیوندهای ضعیف جذب سطحی باکتری و غشای قرار گرفته روی الکتروود، ثبات و ماندگاری طولانی مدت نداشت. در مرحله بعد، بررسی‌های هدایت‌سنجی مدنظر پژوهش حاضر قرار گرفتند. این سیستم‌ها مزیت‌هایی از جمله هزینه استفاده و انرژی لازم کم، تشخیص طیف گسترده‌ای از مواد در محیط‌های گوناگون، استفاده از الکتروودهای مینیاتوری و نیازنداشتن به الکتروودهای مرجع دارند (۲۲). با تغییر میزان یون‌ها، هدایت الکتریکی در محلول واکنش تغییر می‌کند که قابل اندازه‌گیری است؛ از سوی دیگر، کار با الکتروودهای به هم جفت شده^{۳۵} که از آنها با عنوان الکتروودهای مجتمع یا مرکب نیز یاد می‌شود، بهترین طراحی در سنجش‌های هدایت‌سنجی است (۶، ۱۱ و ۲۳). در پژوهش حاضر، از گلو تار آلدئید به عنوان ماده دو عاملی برای ایجاد شبکه‌ای ثابت و غیرمحلول استفاده شد (۱۷). نتایج و تصویر میکروسکوپ الکترونی، ایجاد شبکه‌ای پایدار را روی سطح میکروالکتروودها نشان می‌دهند که در مقایسه با روش جذب سطحی ثبات

References

- (1) Arutchelvan V., Kanakasabai V., Elangovan R., Nagarajan S., Muralikrishnan V. Isolation and identification of novel high strength phenol degrading bacterial strains from phenol- formaldehyde resin manufacturing industrial wastewater. *Journal of Hazardous Materials* 2005; 127(1-3): 238-243.
- (2) Prpich G., Daugulis AJ. Enhanced biodegradation of phenol by a microbial consortium in a solid- liquid two phase partitioning bioreactor. *Biodegradation* 2005; 16(4): 329-339.
- (3) Karim F., Fakhruddin ANM. Recent advances in the development of biosensor for phenol: A review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 2012; 11(3): 261-274.
- (4) Lagard F., Jaffrezic-Renault N. Cell-based electrochemical biosensors for water quality assessment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2011; 400(4): 947-964.
- (5) Kimmel DW., LeBlanc G., Meschievitz ME., Cliffel DE. Electrochemical sensors and biosensors. *Analytical Chemistry* 2012; 84(2): 685-707.
- (6) Jr FA., Price DT., Bhansali S. Optimization of interdigitated electrode (IDE) arrays for impedance based evaluation of Hs 578T cancer cells. *Journal of Physics* 2010; Conference Series 224: 1-4.
- (7) Arutchelvan V., Kanakasabai V., Elangovan R., Nagarajan S., Muralikrishnan V. Isolation and identification of novel high strength phenol degrading bacterial strains from phenol- formaldehyde resin manufacturing industrial wastewater. *Journal of Hazardous Materials* 2005; 27(1-3): 238-243.
- (8) Soudi MR. Kolahchi N. Bioremediation potential of a phenol degrading bacterium, *Rhodococcus erythropolis* SKO-1. *Progress in Biological Sciences* 2011; 1(1): 31-40.
- (9) Franson MAH. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th ed. Washington, DC: American Public Health Association; 1994.
- (10) Shamloo A., Vossoughi M., Alemzadeh I., Tavakoli AN., Mahdi Darvish M. Two nanostructured polymers: Polyaniline nanofibers and new linear-dendritic matrix of poly (citric acid)-block-poly(ethylene glycol) copolymers for environmental monitoring in novel biosensors. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 2013; 62.
- (11) Hnaien M., Lagard F., Bausells J., Errachid A., Jaffrezic-Renault N. A new bacterial biosensor for trichloroethylene detection based on a three-dimensional carbon nanotubes bioarchitecture. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2010; 400(4): 1083-1092.
- (12) Negash N., Alemu H., Tessema M. Flow injection amperometric determination of phenol and chlorophenols at single wall carbon nanotube modified glassy carbon electrode. *American Journal of Analytical Chemistry* 2014; 5(3): 188-198.
- (13) Dos Santos VL., de Souza Monteiro A., Braga DT., Santoro MM. Phenol degradation by *Aureobasidium pullulans* FE13 isolated from industrial effluents. *Journal of Hazardous Materials* 2009; 161 (2-3): 1413-1420.
- (14) Sklađal P., Morozova N., Reshetilov O. Amperometric biosensors for detection of phenol using chemically modified electrodes containing immobilized bacteria. *Biosensor Bioelectronic* 2002; 17(10): 867-873.
- (15) Kırgöz Ü., Odacı D., Timur S., Merkoçi A., Pazarlıoğlu N., Telefoncu A., Alegret A. Graphite epoxy composite electrodes modified with bacterial cells. *Bioelectrochemistry* 2006; 69: 128-131.
- (16) Datta S., Rene Christena L., Rajaram YRS. Enzyme immobilization: An overview

- on techniques and support materials. *3 Biotech* 2013; 3(1): 1-9.
- (17) Timur S., Anik U., Odaci D., Gorton L. Development of a microbial biosensor based on carbon nanotube (CNT) modified electrodes. *Electrochemistry Communications* 2007; 9: 1810-1815.
- (18) Timur S., Pazarlioglu N., Pilloton R., Telefoncu A. Detection of phenolic compounds by thick film sensors based on *Pseudomonas putida*. *Talanta* 2003; 61(2): 87-93.
- (19) Timur S., Seta Della L., Pazarlioglu N., Pilloton R., Telefoncu A. Screen printed graphite biosensors based on bacterial cells. *Process Biochemistry* 2004; 39: 1325-1329.
- (20) Barbosa O., Ortiz C., Berenguer-Murcia A., Torres R., Rodrigues RF., Fernandez-Lafuente R. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme Immobilization. *RSC Advances* 2014; 4: 1583-1600.
- (21) Nafian F., Gharavi S., Soudi MR. Degenerate primers as biomarker for gene-targeted metagenomics of the catechol 1, 2-dioxygenase-encoding gene in microbial populations of petroleum-contaminated environments. *Annals of Microbiology* 2016; 66(3): 1127-1136.
- (22) Jaffrezic-Renault N., Dzyadevych SV. Conductometric microbiosensors for environmental monitoring. *Sensors* 2008; 8(4): 2569-2588.
- (23) Jiang M., Braiek M., Farre C., Bonhomme A., Chaix C., Chateaux JF., Zhang A., Jaffrezic-Renault N. Effect of perfluorinated-hexaethylene glycol functionalization of gold nanoparticles on the enhancement of the response of an enzymatic conductometric biosensor for urea detection, *Current biotechnology* 2015; 1: 110-115.
- 6- *Moraxella* spp.
 7- *Arthrobacter* spp.
 8- *Trichosporon*
 9- conductometry
 10- National Laboratory Of Industrial Microbiology
 11- NA(Nutrient Agar)
 12- (NH₄)₂SO₄
 13- MnSO₄.H₂O
 14- MgSO₄.7H₂O
 15- FeCl₃.3 H₂O
 16- CaCl₂.2H₂O
 17- K₂HPO₄
 18- KH₂PO₄
 19- Optical Density(OD)
 20- Stock
 21- (NH₄)₂S₂O₈
 22- Interdigitated electrodes
 23- H₂O₂:H₂SO₄ (3:7 v/v)
 24- Limit of Detection(LOD)
 25- selectivity
 26- RSDV%
 27- Biomagnification
 28- Screen printed Electrodes
 29- *Pseudomonas* sp. 394
 30- *Pseudomonas* sp. 83-IV
 31- *Pseudomonas* sp. 74-III
 32- *Pseudomonas putida* DSM 50026
 33- glyoxal
 34- Hexamethylenediamine
 35- Interdigitated electrodes

1- tyrosinase

2- laccase

3- Horseradish peroxidase(HRP)

4- *Rhodococcus* spp.5- *Pseudomonas* spp.