



<https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en>

Journal of Microbial Biology

E-ISSN: 3060-7647

13th Year, Vol. 13, No. 49, 2024 pp. 131-158

Received: 02/01/2023

Accepted: 29/04/2023

(Research Paper)

Comparison of Rapid Detection of *E. coli* by Metallic Nanoparticles and Carbon Nanotubes

Rafieh Meraat Haghi

Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran

rafia.merat@yahoo.com

Khosro Issazadeh 

Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran

issa_kaam@yahoo.com

Ali Abdolazadeh Ziabari

Nano Research Lab, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran

ali.abd.ziabari@gmail.com

Mohammad Faezi Ghasemi

Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran

faezi_m@yahoo.com

Abstract

The development of rapid and highly sensitive diagnostic methods has received significant attention. Enzymatic nanobiosensors are a promising approach, offering fast results based on specific interactions between nanoparticles, enzyme, and target molecules. This study investigated the potential of ZnO nanoparticles, SnO, and multiwall carbon nanotubes (MWCNTs) as marker molecules in a system using beta-galactosidase enzyme for bacterial detection. Following nanoparticle synthesis, their structure was confirmed using XRD, FTIR, UV-DRS analyses. Enzyme activity was evaluated in the presence of the substrate ONPG. Different nanoparticle concentrations were tested with a constant amount of enzyme to determine the optimal concentration for inhibiting lactase activity. Subsequently, varying concentrations of *Escherichia coli* were introduced, and the ability of each nanoparticle type to detect bacteria was compared. Due to their small size, high surface area, and strong reactivity, these nanomaterials demonstrated the potential to detect low

* Corresponding Author

3060-7647/ © 2024 The Authors

This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



Merat Haghi, R., Issazadeh, K., Abdolazadeh Ziabari, A., & Faezi Ghasemi, M. Comparison of rapid detection of *e. coli* by metallic nanoparticles and carbon nanotubes/. *Journal of Microbial Biology*, 2024; 13 (49): 131-158.

<http://dx.doi.org/10.22108/BJM.2023.136296.1517>

bacterial concentrations in the environment. Bacteria likely attached to the nanoparticles, hindering their interaction with the enzyme and consequently affecting enzyme activity. The results revealed MWCNTs to be most effective for bacterial identification, detecting as low as 10 CFU/mL bacteria within 15 min. This approach has promising applications in the food industry for rapid detection of low-level bacterial contamination.

Keywords: *Enzymatic nanobiosensors, ZnO NPs, SnO NPs, MWCNTs, E. coli.*

Introduction

Microbial pathogens have been a major cause of infections, diseases, and even deaths worldwide for decades. Traditional culture methods for detecting microbial contaminations are time-consuming and require delicate equipment. *E. coli* serves as an indicator of microbial contamination, making its diagnosis a crucial health criterion in food industries. Recent advancements in nanotechnology have led to the development of novel diagnostic systems with high specificity and sensitivity for pathogen detection. Enzymatic nanobiosensors, for example, utilize advanced interactions between nanoparticles, enzymes, and target molecules to rapidly detect microbial contamination in food. These biosensors are analytical tools composed primarily of a bioreceptor and a transducer. In electrochemical biosensors, immobilized enzymes are commonly used. The hydrolytic enzyme beta-galactosidase (β -gal) is a valuable diagnostic tool. Nanostructured materials have recently gained significant interest in point-of-care diagnostics due to their superior chemical, mechanical, and thermal stability. . This study investigates the use of cationic nanostructures of zinc oxide (ZnO), SnO, and MWCNTs to inhibit β -gal activity. The primary objective of this research is to develop a selective and sensitive method for *E. coli* detection using ZnO nanoparticles (NPs), SnO NPs, and MWCNTs.

Materials and Methods

ZnO and SnO NPs were synthesized using sol-gel wet chemical method. . The structural properties of the samples were characterized using XRD, FTIR, and UV-DRS. To enhance the reactivity of MWCNTs for β -galactosidase immobilization, glutaraldehyde was employed as a linker. Enzyme activity measurement was performed following the method referenced by Sigma-Aldrich Company. Briefly, β -Gal activity was evaluated in the presence of nanoparticles. The assay was carried out in a 96-well plate. Various concentrations of nanoparticles (10–120 μ l) were mixed with 60 μ l of β -gal solution. Each mixture was then diluted to a final volume of 200 μ l with phosphate-buffered saline (PBS). After incubation, a constant volume (10 μ l) of ONPG substrate was added to each well. The absorbance of each well was subsequently monitored at 405 nm every 20 seconds for 30 minutes. The nanoparticle concentration that effectively inhibited enzyme activity was chosen for the bacterial identification and diagnostic step. For bacterial detection, a separate mixture of β -galactosidase enzyme (60 μ l) and NPs was prepared each well of a 96-well plate. Subsequently, different concentrations of *E. coli* (10^1 – 10^8 CFU/mL) were inoculated into each well. Following incubation, a constant amount of ONPG substrate was added to each well. Finally, the absorption spectra were recorded at 405 nm after 15 and 30 minutes of incubation.

Discussion of Results and conclusions

Structural & optical characterization of the synthesized ZnO, SnO NPs, and MWCNTs revealed promising results. The estimated grain sizes using the Scherrer equation were 23 nm, 25 nm, and 10 nm for ZnO, SnO NPs, and MWCNTs, respectively. Glutaraldehyde, a well-suited crosslinker for β -galactosidase molecules, was employed to enhance the reactivity of MWCNTs for enzyme immobilization. In the enzyme activity evaluation step, 60 μ l of β -gal was determined to be sufficient for complete ONPG substrate hydrolysis. This concentration was then used for the β -gal activity assay in the presence of NPs. The results demonstrated that MWCNTs were significantly more effective than ZnO and SnO NPs in inhibiting β -gal activity. As the NP concentration increased, enzyme activity progressively decreased. This inhibition can be attributed to the positively charged NPs electrostatically attracting the negatively charged enzyme, thereby hindering its interaction with the substrate. The strong interaction between MWCNTs and the enzyme is mediated by hydrophobic interactions involving hydrophobic amino acids in enzymatic accumulation. This is likely due to the inherent hydrophobicity of MWCNTs. Following incubation of the NPs/ β -gal/bacteria complex, bacteria preferentially bind to the nanoparticle surface due to stronger electrostatic interactions compared to the enzyme-NP interaction. Consequently, the enzyme desorbs from NPs and re-attaches to the substrate, initiating substrate degradation. Notably, MWCNTs displayed superior performance in this study. At equivalent concentrations and incubation time (15 min), MWCNTs enabled detection of bacteria at a very low concentration of 10 CFU/ml, whereas ZnO and SnO NPs required a minimum of 100 CFU/mL. Furthermore, the presence of bacteria hindered enzyme-mediated substrate degradation. Over time, the inhibitory effect of nanomaterials on enzyme activity weakens, as evidenced by the increasing absorbance. ZnO and SnO NPs possess several characteristics that make them suitable for biosensor applications, including high surface-to-volume ratio, nontoxicity, good compatibility, chemical stability, and efficient electron transfer. In contrast, carbon nanotubes boast an ultrahigh surface area, exceptional mechanical strength, and outstanding electrical conductivity, which contribute to their high reactivity and diverse applications. Most importantly, their ability to interact more efficiently with both bacteria and enzymes significantly accelerates bacterial detection. In conclusion, the prepared nanostructures facilitated rapid *E. coli* detection, as evidenced by the short detection time and low bacterial concentration required for successful detection.

مقایسه توانایی نانوذرات فلزی و نانولوله‌های کربنی در شناسایی سریع *اشرشیا کلای* (*Escherichia coli*)*

رافیه مرآت حقی: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران، rafia.merat@yahoo.com
خسرو عیسی زاده* ID: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران، issa_kaam@yahoo.com
علی عبدالله زاده ضیابری: استادیار آزمایشگاه تحقیقاتی نانو، دانشکده علوم پایه، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران، ali.abd.ziabari@gmail.com
محمد فائزی قاسمی: دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران، faezi_m@yahoo.com

چکیده

مطالعه و شناسایی روش‌های تشخیصی سریع با حساسیت بالا، بسیار شایان توجه قرار گرفته است؛ ازجمله نانویوسنسورهای آنزیمی که به سرعت، نتایج را براساس یک واکنش آلی پیشرفته بین نانوذره، آنزیم و سوبسترا نشان می‌دهند. در این مطالعه، نانوذرات اکسید روی، اکسید قلع و نانولوله‌های کربنی چندجداره ساده و عامل دار، به عنوان مولکول‌های مارکر به همراه آنزیم بتاگالاکتوزیداز استفاده شدند. پس از سنتز، ساختار نانوذرات با آنالیزهای XRD، FTIR و UV-DRS تأیید شد. فعالیت آنزیمی بتاگالاکتوزیداز در حضور ONPG تعیین شد. مقادیر مختلف نانوذرات در حضور آنزیم با مقدار ثابت، استفاده و بهترین مقدار، در مهار فعالیت لاکتازی آنزیم تعیین شد. در مرحله بعد، غلظت‌های مختلفی از باکتری *اشرشیا کلای* (10^1 – 10^8) به محیط، اضافه و توانایی هریک از نانوذرات در تشخیص باکتری با هم مقایسه شد. این ترکیبات به دلیل اندازه کوچک، مساحت سطحی و واکنش‌پذیری بالا، قادر به تشخیص کمترین مقدار باکتری در محیط بودند. درواقع باکتری‌ها پس از حضور در محیط به نانوذرات، متصل و مانع از اتصال آنها به آنزیم شدند که این امر به شروع فعالیت آنزیمی منجر شد. نتایج نشان دادند نانولوله‌های کربنی، قدرت بیشتری در شناسایی باکتری هدف دارند و توانستند حداقل غلظت 10 CFU/ml از باکتری را در کمتر از ۱۵ دقیقه شناسایی کنند. از نانوذرات می‌توان برای تشخیص حداقل آلودگی‌های میکروبی در کمترین زمان، به‌ویژه در صنعت مواد غذایی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: نانویوسنسور آنزیمی، نانوذرات اکسید روی، اکسید قلع، نانولوله‌های کربنی چندجداره، *اشرشیا کلای*

* نویسنده مسئول مکاتبات

مرآت حقی، رافیه، عیسی زاده، خسرو، عبدالله زاده ضیابری، علی، فائزی قاسمی، محمد. مقایسه توانایی نانوذرات فلزی و نانولوله‌های کربنی در شناسایی سریع *اشرشیا کلای* (*Escherichia coli*). *زیست‌شناسی میکروبی*. ۱۳، ۱۴۰۳، (۴۹): ۱۳۱-۱۵۸. <http://dx.doi.org/10.22108/BJM.2023.136296.1517>

مقدمه

بیمارگرهای میکروبی در چند دهه گذشته، عامل بسیاری از عفونت‌ها، بیماری‌ها و حتی مرگ‌ومیر در سراسر دنیا بوده‌اند. این امر، آسیب‌های جبران‌ناپذیری به سلامت عمومی وارد کرده است (۱، ۲). به همین دلیل، تشخیص و شناسایی عوامل میکروبی در زمینه‌های پزشکی، صنایع غذایی و محیط زیست بسیار مهم است (۳). استفاده از روش‌های سنتی در تشخیص آلودگی‌های میکروبی، حساس، ارزان و در عین حال بسیار وقت‌گیر است (۴). این روش‌ها شامل کشت در پلیت، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز^۱، کروماتوگرافی^۲، کمی لومیننس^۳، اسپکتروسکوپی جرمی و الایزا^۴ هستند که به ابزارها و تنظیمات آزمایشگاهی پیشرفته وابسته‌اند (۵). /شرشیا کلای شاخصی از آلودگی میکروبی است که به راحتی در غذاهایی مانند گوشت خوک، گاو و مرغ یافت می‌شود. شناسایی و اندازه‌گیری /شرشیا کلای در منابع آبی، برای ردیابی آلودگی مدفوعی با منشأ انسانی و حیوانی و به حداقل رساندن شیوع بیماری‌های عفونی از جمله اسهال خونی، نارسایی کلیه و تشخیص آن در صنعت مواد غذایی به‌عنوان یکی از معیارهای بهداشتی مطرح است؛ زیرا ممکن است در صورت درمان‌نشدن به مرگ منجر شود (۶)؛ بنابراین، شناسایی این باکتری، به‌ویژه در مواردی که غلظت آن در نمونه ناچیز است، به روش‌هایی با دقت و سرعت بالاتر نیاز دارد.

پیشرفت‌های اخیر در نانوتکنولوژی، به توسعه و پیدایش سیستم‌های تشخیصی جدید با حساسیت و اختصاصیت بالا برای شناسایی عوامل بیماری‌زا منجر شده است؛ از جمله بیوسنسورها که می‌توانند آلودگی میکروبی را در مواد غذایی، طی یک دوره کوتاه،

براساس واکنش‌های آلی پیشرفته تشخیص دهند (۷، ۸). بیوسنسورها، ابزارهای تحلیلی‌اند که از دقت بالا برخوردارند و عوامل محیطی نظیر دما و pH بر آنها تأثیری ندارند (۹).

جفت‌شدن مولکول‌های تشخیصی و انتقال‌دهنده، اغلب یک مرحله اصلی و تعیین‌کننده در سنسورها بوده است که می‌تواند با واسطه به دام‌اندازی غشایی، جذب فیزیکی، به دام انداختن ماتریکسی یا اتصال کوالانسی با سایر اجزا انجام شود (۱۰، ۱۱). بیوسنسورها شامل دو جزء اصلی هستند که در نزدیکی هم واقع شده‌اند: یک عامل تشخیصی که قادر به واکنش با مولکول هدف بوده است و یک انتقال‌دهنده که این واکنش را به یک سیگنال قابل اندازه‌گیری تبدیل می‌کند (۱۲). در بیوسنسورها معمولاً از آنزیم‌ها استفاده می‌شود؛ زیرا اختصاصیت بالا دارند. درواقع به کارگیری بیوسنسورها نیازمند یک سیستم آنزیمی ثابت‌شده با فعالیت بالا است که به حفظ اتصال مناسب بین مولکول هدف و بخش انتقال‌دهنده کمک می‌کند (۱۳). از جمله آنزیم‌های تشخیصی، آنزیم بتاگالاکتوزیداز است که یک آنزیم هیدرولیزکننده است و سبب شکسته‌شدن لاکتوز به گلوکز و گالاکتوز می‌شود. این آنزیم از قارچ‌ها (مانند *آسپرژیلوس اریزا* و *آسپرژیلوس نایجر*)، مخمرها (مانند *کلوروومایسس نایجر* و *کلوروومایسس فراجیلیس*)، باکتری‌ها (مانند /شرشیا کلای، *لاکتوباسیلوس ترموفیلوس* و *باسیلوس سرکولانس*)، گیاهان و جانوران به‌صورت نو ترکیب به دست می‌آید (۱۴). ایموبلیزه کردن این آنزیم‌ها در بیوسنسورها سبب بهبود مقاومت و استفاده مجدد از آنها می‌شود. این امر از طریق جذب با واسطه سطوح آلی و غیرآلی، اتصال کوالانسی و تجمع شیمیایی، میکروانکپسوله کردن و به دام انداختن صورت

می‌گیرد (۱۵). از جمله روش‌های ایموبلیزه کردن، استفاده از نانوساختارها است که نسبت سطح به حجم بالا دارد و این ویژگی سبب بالابردن حساسیت در شناسایی مولکول هدف می‌شود؛ زیرا سطح وسیع‌تری در اتصال آنزیم به ماتریکس دخالت می‌کند و از واسرشت شدن پروتئین جلوگیری می‌کند و انعطاف‌پذیری بیشتری به فعالیت آنزیمی می‌بخشد (۱۶). در سال‌های اخیر، نانوذرات مغناطیسی توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. از جمله نانوذرات اکسید روی که با گاف انرژی برابر با $3/37\text{ eV}$ ، خاصیت نیمه‌رسانایی، مساحت سطحی بالا، ویژگی‌های پیزوالکتریک و پیروالکتریک، نقش مهمی در سنسورهای نوری و مکانیکی دارند. نانوساختارهای اکسید روی علاوه بر سازگار بودن با محیط، غیرسمی بودن و داشتن پایداری شیمیایی، ویژگی‌های بیومتریک و انتقال الکترونی بالا را نیز نشان می‌دهند (۱۷). اکسید قلع یک اکسید فلزی نیمه‌رسانای In-TiP با یک گاف انرژی وسیع است که کاربردهای فراوان در زمینه‌های سنجش گاز و انرژی خورشیدی دارد. چند منظوره بودن کاربرد نانوساختارهای SnO_2 به علت مساحت سطحی بالا، شکاف باند بزرگ، نیمه‌رسانایی بالا به اندازه 130 meV در دمای اتاق (300 K)، مقاومت چشمگیر در برابر تغییرات در محیط گازی، ثبات مکانیکی، حرارتی، شیمیایی و غیره است (۱۸، ۱۹). در میان تمامی نانوساختارها، نانولوله‌های کربنی (CNTs) توجه بسیاری از متخصصان آنزیمولوژی را به خود معطوف کرده است و این امر به دلیل ویژگی‌های منحصربه‌فرد آنهاست که شامل مساحت سطحی بالا، مقاومت دمایی و مکانیکی زیاد، توزیع منظم منفذ با اندازه مناسب، ظرفیت جذبی بالا و نفوذپذیری کنترل‌شده برای انتشار

آزادانه سوبستراها و محصولات واکنش دهنده است. علاوه بر این، ویژگی‌های الکتریکی فوق‌العاده، سازگاری زیستی عالی، حساسیت و دقت بیشتر، محدودیت‌های کمتر در آشکارسازی و ترابرد یا انتقال الکترونی سریع‌تر، آنها را در زمینه‌های زیست پزشکی کاربردی می‌کند (۲۰).

هدف پژوهش حاضر، تبیین یک روش حساس برای پایش/شرشیا کلای مبتنی بر نانوساختارهای اکسید روی، اکسید قلع و نانولوله‌های کربنی ساده و عامل دار است.

مواد و روش‌ها

از زینک استات دی‌هیدرات ($\text{cat.no. } 108802$)، متانول ($\text{cat. No. } 106007$) و دی‌اتانول آمین ($\text{cat. no. } 803116$) برای سنتز نانوذرات اکسید روی و از تین کلراید دی‌هیدرات ($\text{cat. no. } 107815$)، اتانول ($\text{cat. no. } 102371$) و اتیلن گلیکول ($\text{cat. no. } 100949$) برای سنتز نانوذرات اکسید قلع استفاده شد که از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. نانولوله‌های کربنی چند دیواره ساده و عامل دار (کربوکسیله) از شرکت نانوبازار و بتاگالاکتوزیداز (cat. no. N1127)، گلو تار آلدهید ($\text{cat. no. } 354400$) و اورتو-نیترو فیل-بتاگالاکتوزیداز ($\text{cat. no. } 48277$) از شرکت سیگما الدریج آمریکا خریداری شدند. برای رشد باکتری‌ها از محیط‌های کشت EMB آگار ($\text{cat. no. } 1.01347$)، LB برات ($\text{cat. no. } 1.10283$) و LB آگار ($\text{cat. no. } 1.10283$) استفاده شد که از شرکت مرک خریداری شدند.

سنتز نانوذرات اکسید روی: به روش سُل-ژل

انجام شد (۲۱). ابتدا $2/5$ گرم پیش‌ماده روی (Zn) یعنی استات روی دوآبه در 30 میلی لیتر حلال متانول اضافه شد. محلول به دست آمده در دمای اتاق به کمک همزن

خشک مخلوط شد تا به صورت پودر نرم و یکنواخت درآید و با فشار زیاد به یک قرص نازک و شفاف تبدیل شد. سپس قرص در مقابل تابش اشعه مادون قرمز در محدوده طول موج‌های ۴۰۰-۴۰۰۰ نانومتر قرار داده شد تا تغییرات درون ساختاری نانوپودر سنتز شده آشکار شود (۲۴). همچنین آنالیز جذب UV با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری اسپکتروفتومتر مدل UV-2550 ساخت شرکت Shimadzu ژاپن انجام شد. به این ترتیب که از نمونه‌های پودری به همراه ماده مرجع (سولفات باریم) به نسبت ۱:۱۰، قرصی به ضخامت کمتر از ۱/۵ میلی‌متر ساخته شد و تحت تابش نور قرار گرفت. برای هر نمونه، طیف‌های بازتاب / عبور پخش‌ی در ناحیه ۳۰۰ تا ۹۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شدند (۲۵).

آماده‌سازی نانوذرات اکسید روی و اکسید

قلع: از هر کدام از نانوپودرهای اکسید روی و اکسید قلع پس از توزین کردن به مقدار ۰/۰۶ میلی‌گرم، در ۶ میلی‌لیتر آب مقطر استریل ریخته و برای دستیابی به هموژنیزه کردن بیشتر، مخلوط به مدت زمان ۶۰ دقیقه روی همزن برقی (استیرر) قرار داده شد؛ بدین ترتیب، غلظت ۰/۰۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (mg/ml) به دست آمد (۲۶).

فعال کردن نانولوله‌های کربنی ساده و عامل

دار: ابتدا یک کاغذ صافی روی یک بشر قرار داده و یک گرم از نانولوله‌های کربنی ساده و عامل دار به کاغذ اضافه شد و پس از دو بار شست و شو با آب مقطر، به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. سپس محتویات لوله درون گلو تار آلدهید ۰/۵ مولار در rpm ۱۵۰ توزین شدند و به مدت ۶ ساعت روی استیرر قرار گرفتند. پس از این مدت، بار دیگر به مدت ۱۰ دقیقه در rpm ۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. سپس محتویات لوله با آب

مغناطیسی به مدت ۳۰ دقیقه مخلوط شد تا استات روی به خوبی در متانول حل شود. پس از آن، به منظور افزایش چسبندگی سُل تهیه شده و نیز انجام فرایند ژلاسیون از ۱ میلی‌لیتر پایدار ساز دی‌اتانول آمین، استفاده و با همزن مغناطیسی به مدت یک ساعت مخلوط شد و فرایند حلالیت به خوبی صورت گرفت و سُل شفاف و بدون رنگ به دست آمد. برای پیشرفت فرایند هیدرولیز و پیش‌آغاز ژلاسیون، محلول به دست آمده به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. سپس داخل بوتله چینی ریخته و در کوره پس از رسیدن به دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت دو ساعت حرارت داده شد. پس از عمل پخت در کوره، نانوپودرهای سفید رنگ ZnO به دست آمد.

سنتز نانوذرات اکسید قلع: از روش سُل-ژل

استفاده شد (۲۲). ابتدا مقدار ۳/۴ گرم از پیش‌ماده اکسید قلع وزن شد و به ۳۰ میلی‌لیتر اتانول افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه استیرر شد. سپس مقدار ۳ میلی‌لیتر اتیلن گلیکول به آن اضافه شد و بار دیگر به مدت ۲ ساعت روی استیرر قرار گرفت. در مرحله بعد، به مدت ۵ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد ریفلاکس شد. در نهایت، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۵۰ درجه سانتی‌گراد کوره‌گذاری شد.

آنالیز نانوذرات: برای انجام آنالیز XRD، مقدار

۰/۱ میلی‌گرم از نانوپودر به صورت یک قرص نازک درآورده شد و در جا نمونه‌ای تحت تابش پرتوی X در محدوده ۹۴<2θ<10 قرار گرفت (۲۳). مطالعه بیناب‌نگاری (FTIR) نانوپودرها به منظور بررسی تغییرات درون ساختاری و همچنین وجود مولکول‌های آب در درون ساختار صورت گرفت. ابتدا ۱۵-۵ میلی‌گرم نانوپودر با ۴۰۰ میلی‌گرم از KBr خالص و

مقطر دو بار شست و شو داده شد تا بقایای گلو تار آلد هید متصل نشده از محیط خارج شوند. در نهایت، نانولوله‌های کربنی فعال شده با بافر پتاسیم فسفات ($\text{pH}=7$ ، $0/1$ مولار) شست و شو داده و درون بافر در دمای 4°C درجه سانتی گراد تا زمان انجام آزمون نگهداری شدند. برای تهیه غلظت $0/001$ میلی گرم بر میلی لیتر (mg/ml)، مقدار $0/06$ میلی گرم از نانولوله‌های کربنی فعال به 6 میلی لیتر از بافر پتاسیم فسفات اضافه شد ($27-30$).

سنجش فعالیت آنزیمی: فعالیت یک واحد (1U) از آنزیم بتا گالاکتوزیداز به مقداری از آنزیم گفته می‌شود که یک میکرومول از ONPG را در هر دقیقه در دمای 25°C درجه سانتی گراد و در $\text{pH}=7$ تجزیه کند که براساس روش ارجاع داده شده از شرکت سیگما آلد ریچ انجام شد (31). مطابق با پروتوکل شرکت سیگما آلد ریچ برای هر مرحله از خواندن جذب، ابتدا

در هر کووت طبق جدول ۱، واکنشگرهای A (بافر فسفات 100 میلی مولار با $\text{pH}=7$)، C (محللول 30 میلی مولار سدیم کلراید)، D (محللول $3/36$ میلی مولار مرکاپتو اتانول) و E (محللول حاوی 2U/ml آنزیم بتا گالاکتوزیداز) افزوده شدند. سپس در یک دستگاه اسپکتروفتومتر، دما در 37°C درجه سانتی گراد و طول موج در 405 نانومتر تنظیم شد و پس از ثابت شدن، از واکنشگر B (محللول 68 میلی مولار ONPG) بر طبق جدول در هر کووت و در شاهد اضافه شد. حجم کل 200 میکرولیتر در نظر گرفته شد. مواد حاصل بلافاصله مخلوط شدند و جذب در طول موج 405 نانومتر ثبت شد. از آنجایی که این آنزیم وقتی رقیق می‌شود از مقاومت کمی برخوردار است، بلافاصله آزمون شد. تمامی واکنش‌ها در دمای 37°C درجه سانتی گراد و $\text{pH}=7$ انجام شدند.

جدول ۱- مقادیر افزوده شده از واکنشگرهای A تا E برای سنجش فعالیت بتا گالاکتوزیداز

Table 1- Added values of reactants (A-E) for beta galactosidase activity

شاهد	مقدار (میکرولیتر)													ماده
۱۷۰	۴۰	۵۰	۶۰	۷۰	۸۰	۹۰	۱۰۰	۱۱۰	۱۲۰	۱۳۰	۱۴۰	۱۵۰	۱۶۰	واکنشگر A(بافر)
۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	واکنشگر B (ONPG)
۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	واکنشگر C (سدیم کلراید)
۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	واکنشگر D (مرکاپتو اتانول)
–	۱۳۰	۱۲۰	۱۱۰	۱۰۰	۹۰	۸۰	۷۰	۶۰	۵۰	۴۰	۳۰	۲۰	۱۰	واکنشگر E (آنزیم بتاگالاکتوزیداز)

سنجش فعالیت آنزیم بتا گالاکتوزیداز در حضور نانوذره: سنجش فعالیت آنزیم بتا گالاکتوزیداز به‌طور جداگانه در حضور هریک از نانوذرات مطالعه شده انجام شد؛ به این ترتیب که درون پلیت 96 خانه‌ای، مقادیر مختلف (10 تا 120 میکرو لیتر) از نانوذره با غلظت $0/001$ میلی گرم بر میلی لیتر و مقدار ثابتی از آنزیم بتا گالاکتوزیداز (60 میکرو لیتر) اضافه شد. سپس

با بافر پتاسیم فسفات به حجم 200 میکرو لیتر رسیدند. پلیت‌ها در دمای ثابت 37°C درجه سانتی گراد به مدت 30 دقیقه برای اتصال آنزیم انکوبه شدند. بعد از گذشت این مدت زمان به هریک از خانه‌ها مقدار ثابتی از ONPG (10 میکرو لیتر) افزوده شد. سپس هر 20 ثانیه جذب هریک از خانه‌ها در طول موج 405 نانومتر به مدت 30 دقیقه در دستگاه میکرو پلیت ریدر (شرکت واریان

استرالیا) ثبت شد (جدول ۲). مقداری از نانوذره که سبب مهار فعالیت آنزیم شد، انتخاب و برای مرحله

جدول ۲- مقادیر افزوده شده از واکنشگرها برای سنجش فعالیت بتاگالاکتوزیداز در حضور نانوذره

Table 2- Added values of reactants for beta galactosidase activity in the presence of nanoparticle

واکنشگر	مقدار (میکرولیتر)												شاهد
بافر	۱۲۰	۱۱۰	۱۰۰	۹۰	۸۰	۷۰	۶۰	۵۰	۴۰	۳۰	۲۰	۱۰	۱۳۰
نانوذره	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰	۶۰	۷۰	۸۰	۹۰	۱۰۰	۱۱۰	۱۲۰	-
ONPG	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
بتاگالاکتوزیداز	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰

کشت و تهیه غلظت‌های مختلف از باکتری:

در این مطالعه باکتری هدف/شرشیا کلای بوده است که از کلکسیون باکتری‌ها و قارچ‌های سازمان پژوهش‌های علمی - صنعتی ایران تهیه شد (PTCC No: ۱۵۳۳) و برای اطمینان از خالص بودن باکتری، رنگ آمیزی گرم انجام گرفت و در محیط انتخابی EMB، پرگنه‌های این باکتری با جلای فلزی جداسازی شد. به ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت برین هرت براث، یک پرگنه از باکتری، تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور شیکردار انکوبه شد (۲۰۰ rpm). کدورت‌های مختلف از استوک با بافر پتاسیم فسفات تهیه شدند و پس از تکرار چندین مرحله کشت از سوسپانسیون میکروبی و خواندن جذب در میکروپلیت ریدر، لوله حاوی سوسپانسیون باکتری با جذب ۰/۱۲۹ در طول موج ۶۰۰ نانومتر روی محیط تریپتیکاز سوی آگار (TSA) تعداد CFU/ml 2×10^8 از باکتری به دست آمد. سپس با افزودن یک میلی لیتر از آن به ۹ میلی لیتر بافر، سوسپانسیونی برابر CFU/ml 2×10^7 حاصل شد. در نهایت، سری رقت‌های CFU/ml $10^1 - 10^8$ از باکتری تهیه شدند تا آنالیز شوند.

شناسایی باکتری با استفاده از هریک از

نانوذرات: بدین منظور، درون پلیت ۹۶ خانه‌ای مقادیر یکسان از نانوذره (مقداری که در مرحله قبل تعیین شد و از آن مقدار به بعد آنزیم بتاگالاکتوزیداز دیگر فعالیتی از خود نشان نداد) و مقادیر ثابتی از آنزیم بتاگالاکتوزیداز (۶۰ میکرولیتر) اضافه شدند. سپس به هریک از خانه‌ها غلظت‌های مختلف از باکتری ($10^1 - 10^8$) تلقیح شدند. برای زمان دادن به محیط واکنش برای رقابت بین باکتری و آنزیم بر سر اتصال به نانوذره، پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس ONPG با مقدار ثابت (۱۰ میکرولیتر) به هریک از خانه‌ها اضافه شد. در نهایت، جذب در زمان‌های ۱۵ و ۳۰ دقیقه در طول موج ۴۰۵ نانومتر در دستگاه میکروپلیت ریدر خوانده شد.

در این پژوهش، از طرح آماری ANOVA، برای آنالیز آماری فاکتورهای غلظت و زمان استفاده شد و داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS 16.0 تجزیه و تحلیل شدند. برای مقایسه میانگین مقادیر در سطح ۹۵ درصد ($p < 0.05$) از آزمون چند گانه دانکن استفاده شد.

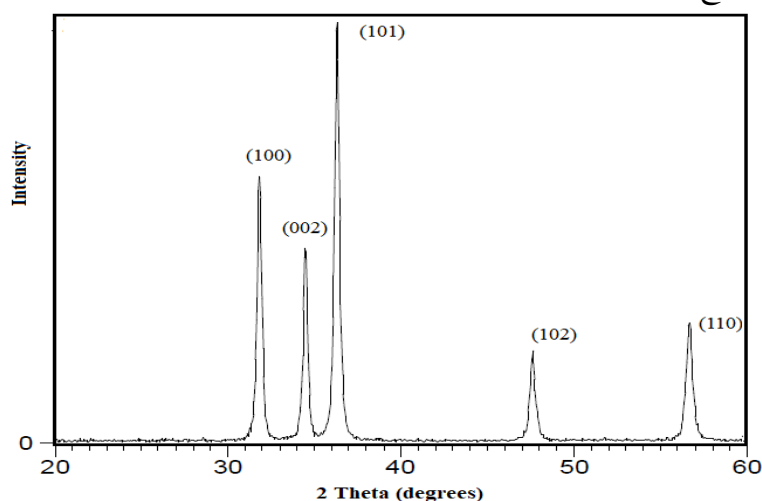
نتایج

اندازه بلورهای نانوذرات اکسید روی براساس نتایج حاصل از XRD ([شکل ۱](#)) و به کمک رابطه شرر برحسب پهنای پیک ماکزیمم پراش اشعه X در نصف ارتفاع و سایر شرایط محاسبه شدند ([۳۶](#)).

با توجه به [شکل ۱](#)، سه پیک پراش (۱۰۰)، (۰۰۲) و (۱۰۱) مربوط به ساختار کریستالی نانوذرات ZnO غالب بودند. پیک‌های شارپ مشاهده‌شده نشان‌دهنده ساختار بلوری خوب نمونه بودند و با استاندارد JCPDS 05-0664 مطابقت داشتند. اندازه دانه بررسی‌شده توسط فرمول شرر ۲۳ نانومتر محاسبه شد.

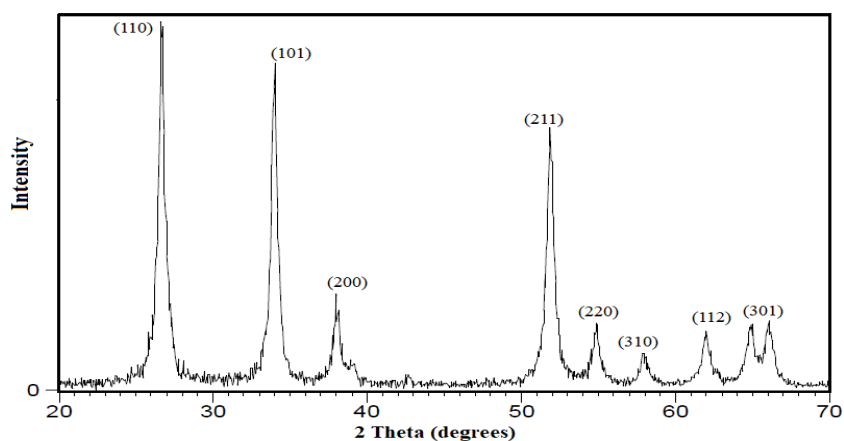
اندازه بلورهای نانوذرات اکسید قلع براساس نتایج حاصل از XRD ([شکل ۲](#)) و به کمک رابطه شرر محاسبه شد. تشکیل ساختار کریستالی نانوذرات اکسید قلع با مشاهده پیک‌های شارپ تأیید شد. نتایج تجزیه و تحلیل پراش پرتو ایکس، توزیع تقریباً یکنواخت اندازه

ذرات را نشان داد. سه پیک پراش (۱۱۰)، (۱۰۱)، (۲۰۰)، (۲۱۱)، (۲۲۰)، (۳۱۰)، (۱۱۲) و (۳۰۱) مربوط به ساختار کریستالی نانوذرات اکسید قلع غالب بودند و با استاندارد JCPDS 77-0452 مطابقت داشتند. اندازه دانه بررسی‌شده توسط فرمول شرر ۲۵ نانومتر محاسبه شد. اندازه بلورهای MWCNT ساده و عامل‌دار براساس نتایج حاصل از XRD (شکل‌های ۳ و ۴) و به کمک رابطه شرر، ۱۰-۸ نانومتر محاسبه شدند. الگوهای پراش نانولوله‌های کربنی ساده و عامل‌دار، پیک قوی را در $2\theta = 26^\circ$ (۰۰۲) نشان دادند. پیک‌های پراش (۱۰۰) و (۱۰۱) با شدت کم در اطراف 43° و 44° نیز مشاهده شدند ([۳۶](#)). شدت پیک پراش (۰۰۲) در MWCNT های عامل‌دار، به مراتب قوی‌تر از MWCNT های اولیه بود. الگوهای XRD برای نمونه‌ها نشان دادند ناخالصی در آنها نبوده است و ساختار آنها به خوبی شکل گرفتند.



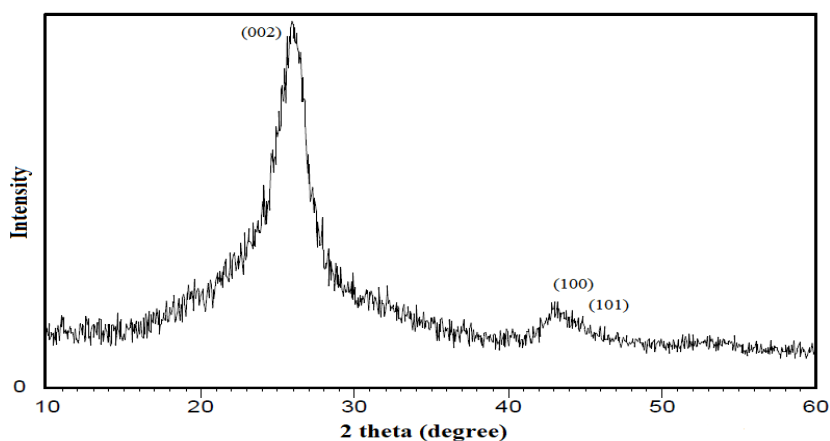
شکل ۱- نتایج آنالیز الگوی پراش پرتو ایکس (XRD) نانوذرات اکسید روی

Fig 1- X-ray diffraction patterns for ZnO NPs



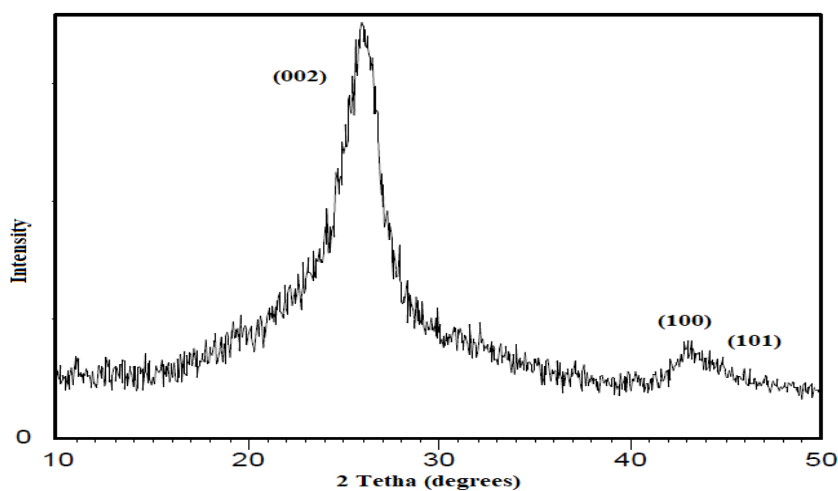
شکل ۲- نتایج آنالیز الگوی پراش پرتو ایکس (XRD) نانوذرات اکسید قلع

Fig 2- X-ray diffraction patterns for SnO NPs



شکل ۳- نتایج آنالیز الگوی پراش پرتو ایکس (XRD) مربوط به MWCNT های ساده

Fig 3- X-ray diffraction patterns for pristine MWCNTs

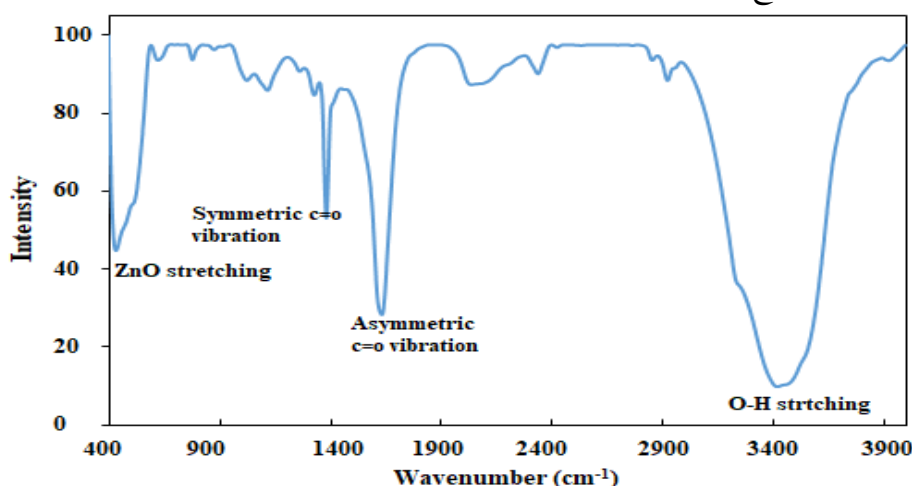


شکل ۴- نتایج آنالیز الگوی پراش پرتو ایکس (XRD) مربوط به MWCNT های عامل دار شده

Fig 4- X-ray diffraction patterns for carboxyl functionalized MWCNTs

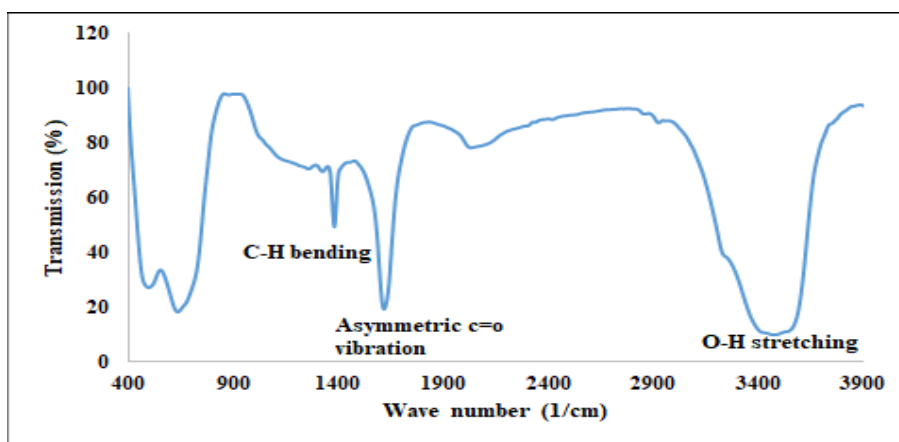
پیک 1384 cm^{-1} مربوط به تشکیل پیوند C-H بودند. **شکل ۷** (a و b)، طیف‌های FTIR را برای MWCNT‌های خالص و عامل‌دار نشان می‌دهد. پیک مشاهده شده در بازه زمانی 1390 cm^{-1} مربوط به پیوند C-N بود (۳۷). پیک قوی در 1630 cm^{-1} مربوط به پیوند دوگانه C=C بوده است که تشکیل دیوار کناری چارچوب نانولوله کربنی را تأیید کرد (۳۸). نتایج نشان دادند پیک‌های FTIR برای نمونه عامل‌دار، قوی‌تر از نمونه‌های خالص بوده که بیان‌کننده افزودن مؤثر گروه کربوکسیل است.

طیف FTIR نانوذرات اکسید روی در محدوده cm^{-1} ۴۰۰-۴۰۰۰ در **شکل ۵** نشان داده شده است. پیک قوی 3430 cm^{-1} مربوط به پیوند OH و جذب مولکول‌های آب روی ZnO و پیک‌های موجود در اطراف 1632 cm^{-1} و 1381 cm^{-1} به ترتیب مربوط به ارتعاشات نامتقارن و متقارن بودند (۲۶). **شکل ۶**، طیف‌های FTIR را برای اکسید قلع، در محدوده cm^{-1} ۴۰۰-۴۰۰۰ نشان می‌دهد. پیک قوی تقریباً 3482 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات جذب مولکول‌های آب روی اکسید قلع و ایجاد پیوند OH و



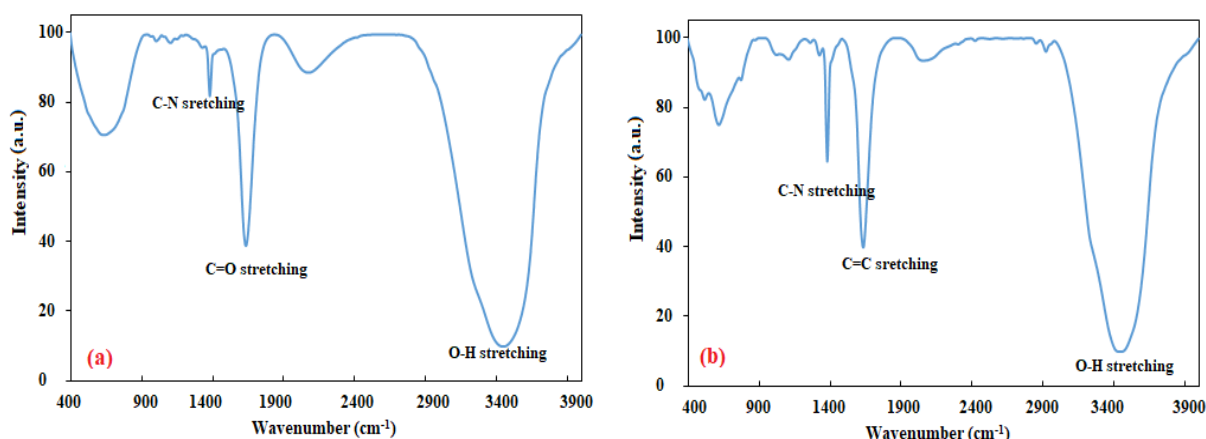
شکل ۵- نتایج آنالیز بیناب‌نگاری (FTIR) نانوذرات اکسید روی

Fig 5- FTIR spectra for ZnO NPs



شکل ۶- نتایج آنالیز بیناب‌نگاری (FTIR) نانوذرات اکسید قلع

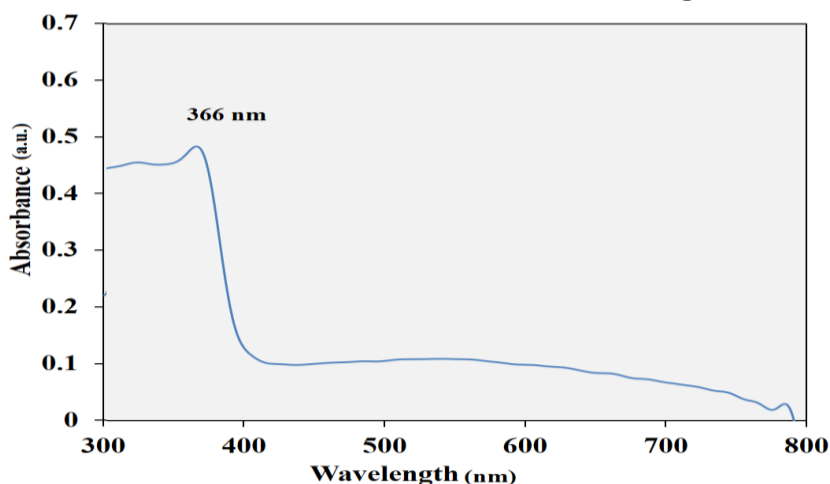
Fig 6- FTIR spectra for SnO NPs



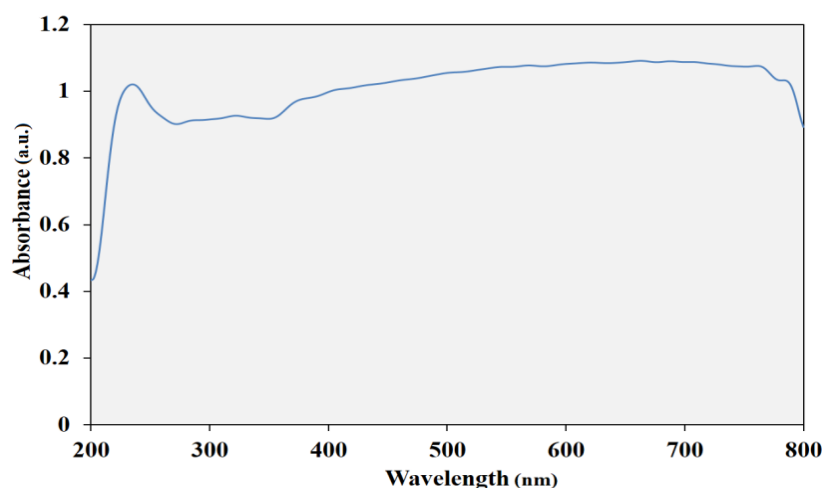
شکل ۷- نتایج آنالیز بیناب‌نگاری (FTIR) مربوط به MWCNT های ساده (a) و عامل دار شده (b)
Fig 7- FTIR spectra for (a) pure MWCNTs and (b) carboxyl functionalized MWCNTs

پیک دیده شد. [شکل ۱۰](#)، مربوط به طیف جذبی MWCNT های ساده و عامل دار است. ساده یک پیک جذب عمده را در ۲۳۴ نانومتر مطابق با مقدار استاندارد نشان دادند ([۳۹](#)). پیک جذب در حدود ۲۲۹ نانومتر پس از افزودن گروه کربوکسیل به MWCNT های اولیه، تحت یک انتقال آبی قرار گرفت. این امر نشان داد در شکل عامل دار شده، MWCNT ها توانستند دامنه وسیعی از طیف UV- vis را پوشش دهند.

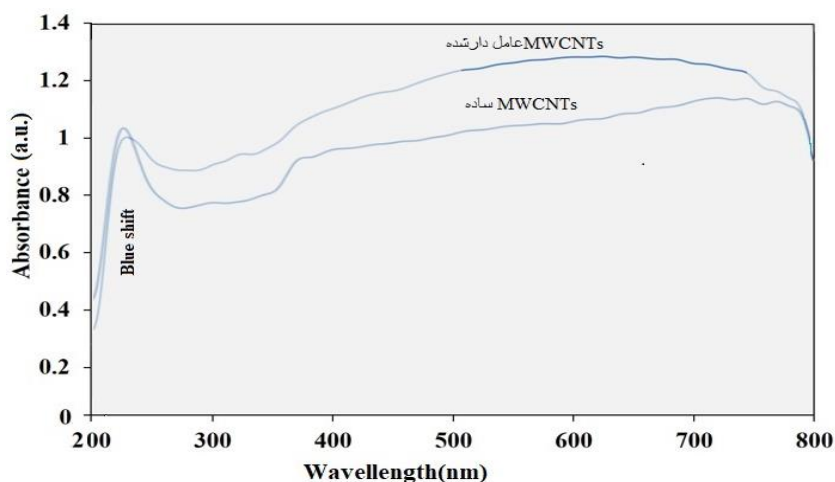
نتایج آنالیز جذب UV برای نانوذرات ZnO ([شکل ۸](#)) نشان دادند جذب در ۳۶۶ نانومتر مطابق با ۳/۳۹ eV اتفاق افتاد که نشان‌دهنده یک انتقال آبی در مقایسه با مقدار بولک ZnO یعنی مقدار ۳/۳ eV بود. ایجاد این اثر کوانتومی نشان داد ساختار نانوذرات شکل گرفت. [شکل ۹](#)، مربوط به آنالیز UV نانوذرات اکسید قلع بوده است که یک پیک جذب را در ۲۳۴ نانومتر نشان داد. در طول موج ۲۴۰ نانومتر، بدون هیچ فرایند هیدروترمال



شکل ۸. نتایج آنالیز جذب UV نانوذرات اکسید روی
Fig 8- UV-Vis DRS of ZnO nanoparticles



شکل ۹- نتایج آنالیز جذب UV نانوذرات اکسید قلع
Fig 9- UV-Vis DRS of SnO nanoparticles



شکل ۱۰- نتایج آنالیز جذب UV مربوط به MWCNT های ساده و عامل دار
Fig 10- UV-Vis DRS results of pristine and carboxyl functionalized MWCNTs

جذب پس از این مقدار با اختلاف معنادار ($p < 0.05$) ثابت ماند. این مقدار برای انجام مراحل بعدی آزمون استفاده شد و دیگر سوبسترای برای تجزیه نمانده بود.

نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم
بتاگالاکتوزیداز در حضور نانوذرات: با توجه به **جدول ۳** مقداری از آنزیم که قادر به تجزیه کامل سوبسترای ONPG شد، برابر ۶۰ میکرولیتر بود؛ زیرا

جدول ۳- مقادیر جذب حاصل از تجزیه سوسترای ONPG توسط بتاگالاکتوزیداز

Table 3- Absorbance values of ONPG degradation via beta galactosidase

بتاگالاکتوزیداز (میکرولیتر)	۰	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰	۶۰	۷۰	۸۰	۹۰	۱۰۰	۱۱۰	۱۲۰	۱۳۰
جذب	۰	۰/۰۵۱	۰/۱۱۲	۰/۱۹۲	۰/۲۵۱	۰/۳۲۱*	۰/۴۷۰	۰/۴۷۰	۰/۴۷۱	۰/۴۷۱	۰/۴۷۲	۰/۴۷۲	۰/۴۷۲	۰/۴۷۳
	۰	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	۰	۰/۱۹	۰/۸۵۵	۰/۴۵	۰/۱۳۰	۰/۰۱۵	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱

نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم

بتاگالاکتوزیداز در حضور نانوذرات اکسید روی:

جدول ۴ نشان می‌دهد نانوذرات اکسید روی در تمامی زمان‌ها، با مقدار ۸۰ میکرولیتر قادر به مهار کامل آنزیم بتاگالاکتوزیداز بودند. در زمان ۳۰ دقیقه در مقدار ۵۰ میکرولیتر مقدار زیادی از

سوستر تجزیه شده بود؛ زیرا در هیچ یک از زمان‌ها از این مقدار به بعد، تغییر محسوسی در کدورت به صورت معنادار مشاهده نشد ($p > 0.05$)؛ بنابراین ما مقدار ۸۰ میکرولیتر را در نظر گرفتیم.

جدول ۴- نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز در حضور نانوذرات اکسید روی

Table 4- Results of β -Gal Activity Assay in the Presence of ZnO NPs

نانوذره (میکرولیتر) زمان (دقیقه)	۰	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰	۶۰	۷۰	۸۰	۹۰	۱۰۰	۱۱۰	۱۲۰	۱۳۰
۰	۰/۴۷	۰/۴۵	۰/۴۵	۰/۴۵	۰/۴۴	۰/۴۳	۰/۴۳	۰/۴۳	۰/۴	۰/۳۵	۰/۳۲	۰/۳۱	۰/۳۱	۰/۳
۵	۰/۵۶	۰/۵۳	۰/۵۱	۰/۴۹	۰/۴۸	۰/۴۵	۰/۴۴	۰/۴۲	۰/۴	۰/۳۶	۰/۳۴	۰/۳۳	۰/۳۳	۰/۳۳
۱۰	۰/۷۳	۰/۶۷	۰/۶۱	۰/۵۸	۰/۵۵	۰/۵۲	۰/۵۱	۰/۴۸	۰/۴۳	۰/۳۷	۰/۳۶	۰/۳۵	۰/۳۴	۰/۳۴
۱۵	۰/۸۵	۰/۷۹	۰/۷۲	۰/۶۹	۰/۶۶	۰/۶۳	۰/۶۱	۰/۵۹	۰/۵۳	۰/۳۷	۰/۳۶	۰/۳۵	۰/۳۴	۰/۳۴
۲۰	۰/۹۲	۰/۸۶	۰/۸۱	۰/۷۶	۰/۶۹	۰/۶۵	۰/۶	۰/۵۶	۰/۵۴	۰/۳۸	۰/۳۷	۰/۳۶	۰/۳۵	۰/۳۴
۲۵	۱/۰۹	۰/۹۸	۰/۹	۰/۸۱	۰/۷۷	۰/۷	۰/۶۵	۰/۵۸	۰/۵۵	۰/۳۸	۰/۳۷	۰/۳۶	۰/۳۵	۰/۳۵
۳۰	۱/۲۸	۱/۱۲	۱/۰۳	۱/۰۱	۰/۹۵	۰/۹۱	۰/۸۹	۰/۸۸	۰/۸۶	۰/۳۸	۰/۳۷	۰/۳۷	۰/۳۶	۰/۳۵

نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم

بتاگالاکتوزیداز در حضور نانوذرات اکسید قلع:

نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز در حضور نانوذرات اکسید قلع در جدول ۵ آمده‌اند. برای این نانوذرات، در زمان ۱۵ دقیقه اولین تفاوت معنادار در مقدار ۱۰۰ میکرولیتر مشاهده شد. با گذشت زمان این نانوذرات توانستند در مقادیر کمتری با اختلاف معنادار سوستر را

تجزیه کنند ($p < 0.05$)؛ برای مثال، در زمان ۲۵ و ۳۰ دقیقه در مقدار ۸۰ میکرولیتر مقدار زیادی از سوستر تجزیه شده بود و ما مقدار ۹۰ میکرولیتر را در نظر گرفتیم؛ زیرا در هیچ یک از زمان‌ها از این مقدار به بعد، تغییر کدورت محسوسی با اختلاف معنادار مشاهده نشد ($p > 0.05$).

جدول ۵- نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز در حضور نانوذرات اکسید قلع

Table 5- Results of β -Gal Activity Assay in the Presence of SnO NPs

نانوذره (میکرولیتر) زمان (دقیقه)	۰	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰	۶۰	۷۰	۸۰	۹۰	۱۰۰	۱۱۰	۱۲۰	۱۳۰
۰	۰/۴۷	۰/۴۵	۰/۴۶	۰/۴۵	۰/۴۵	۰/۴۵	۰/۴۴	۰/۴۴	۰/۴۴	۰/۴۳	۰/۳۳	۰/۳۳	۰/۳۲	۰/۳۲
۵	۰/۵۶	۰/۵۵	۰/۵۳	۰/۵۲	۰/۵	۰/۴۹	۰/۴۷	۰/۴۶	۰/۴۳	۰/۴۲	۰/۳۵	۰/۳۴	۰/۳۴	۰/۳۴
۱۰	۰/۸۳	۰/۷	۰/۶۶	۰/۶۱	۰/۵۷	۰/۵۵	۰/۵۳	۰/۵۱	۰/۵	۰/۴۹	۰/۳۷	۰/۳۵	۰/۳۵	۰/۳۴
۱۵	۰/۸۵	۰/۸۱	۰/۸۸	۰/۸۵	۰/۸۲	۰/۶۹	۰/۶۶	۰/۶۳	۰/۵۸	۰/۵۵	۰/۳۷	۰/۳۶	۰/۳۵	۰/۳۴
۲۰	۰/۹۲	۰/۹۱	۰/۸۸	۰/۸۲	۰/۸۸	۰/۸۳	۰/۶۹	۰/۶۲	۰/۵۸	۰/۵۵	۰/۳۷	۰/۳۶	۰/۳۶	۰/۳۵
۲۵	۱/۰۹	۱/۰۵	۱	۰/۹۶	۰/۸۹	۰/۸۲	۰/۸۷	۰/۸۲	۰/۶۶	۰/۶۱	۰/۳۷	۰/۳۷	۰/۳۶	۰/۳۵
۳۰	۱/۲۸	۱/۱۲	۱/۰۸	۱/۰۵	۱/۰۳	۱/۰۱	۱/۹۵	۰/۹	۰/۸۸	۰/۸۶	۰/۴۱	۰/۳۸	۰/۳۶	۰/۳۵

نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز در حضور نانولوله‌های کربنی: نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز در حضور نانولوله‌های کربنی در

جداول ۶ و ۷ آمده‌اند. مقدار نانولوله‌های کربنی ساده با خاصیت مهارکنندگی برابر ۶۰ میکرولیتر بود. در زمان ۱۵ دقیقه، اولین تفاوت معنادار در مقدار ۷۰ میکرولیتر مشاهده شد ($p < 0.05$).

جدول ۶- نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز در حضور نانولوله‌های کربنی ساده

Table 6- Results of β -Gal Activity Assay in the Presence of pristine MWCNTs

نانوذره (میکرولیتر) زمان (دقیقه)	۰	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰	۶۰	۷۰	۸۰	۹۰	۱۰۰	۱۱۰	۱۲۰	۱۳۰
۰	۰/۴۷	۰/۴۳	۰/۴۳	۰/۴۳	۰/۴۲	۰/۴۱	۰/۴	۰/۳۳	۰/۳۲	۰/۳۲	۰/۳۱	۰/۳۱	۰/۳۱	۰/۳۱
۵	۰/۵۷	۰/۴۷	۰/۴۶	۰/۴۳	۰/۴۱	۰/۴	۰/۴۲	۰/۳۳	۰/۳۲	۰/۳۲	۰/۳۱	۰/۳۱	۰/۳	۰/۳۱
۱۰	۰/۸۳	۰/۵۸	۰/۴۹	۰/۴۹	۰/۴۳	۰/۴۳	۰/۴۲	۰/۳۳	۰/۳۲	۰/۳۲	۰/۳۱	۰/۳۱	۰/۳۱	۰/۳۱
۱۵	۰/۸۵	۰/۶۶	۰/۶۳	۰/۵۸	۰/۵۶	۰/۵۳	۰/۵۱	۰/۳۴	۰/۳۳	۰/۳۳	۰/۳۲	۰/۳۲	۰/۳۱	۰/۳۱
۲۰	۰/۹۲	۰/۸۴	۰/۸۲	۰/۶۶	۰/۶۳	۰/۶	۰/۵۹	۰/۳۵	۰/۳۵	۰/۳۵	۰/۳۴	۰/۳۴	۰/۳۴	۰/۳۲
۲۵	۱/۰۹	۰/۸۵	۰/۸۹	۰/۸۵	۰/۸۴	۰/۸۱	۰/۶۹	۰/۳۶	۰/۳۵	۰/۳۵	۰/۳۳	۰/۳۴	۰/۳۳	۰/۳۳
۳۰	۱/۲۸	۰/۹۷	۰/۹	۰/۸۸	۰/۸۶	۰/۸۵	۰/۸۱	۰/۳۷	۰/۳۵	۰/۳۵	۰/۳۴	۰/۳۲	۰/۳۱	۰/۳۳

برای نانولوله‌های کربنی عامل‌دار، در زمان ۱۵ دقیقه اولین تفاوت معنادار در مقدار ۶۰ میکرولیتر مشاهده شد و با گذشت زمان توانست سوبسترا در مقادیر کمتری با اختلاف معنادار ($p < 0.05$) تجزیه کند؛ برای مثال، در زمان ۳۰ دقیقه در مقدار ۴۰

میکرولیتر مقدار زیادی از سوبسترا تجزیه شده بود و ما مقدار ۵۰ میکرولیتر را در نظر گرفتیم؛ زیرا از این مقدار به بعد در هیچ یک از زمان‌ها، تغییر محسوسی در کدورت با اختلاف معنادار مشاهده نشد ($p > 0.05$).

جدول ۷- نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم بتا گالاکتوزیداز در حضور نانولوله‌های کربنی عامل دار شده

Table 7- Results of β -Gal Activity Assay in the Presence of carboxyl functionalized MWCNTs

نانوذره (میکرو لیتر) زمان (دقیقه)	۰	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰	۶۰	۷۰	۸۰	۹۰	۱۰۰	۱۱۰	۱۲۰	۱۳۰
۰	۰/۴۷	۰/۴۱	۰/۴۱	۰/۴۱	۰/۳۹	۰/۳۸	۰/۳۲	۰/۳۱	۰/۳۱	۰/۳۱	۰/۳۱	۰/۳	۰/۳	۰/۳
۵	۰/۵۶	۰/۴۵	۰/۴۶	۰/۴۳	۰/۴۱	۰/۴	۰/۳۲	۰/۳۲	۰/۳۲	۰/۳۲	۰/۳۲	۰/۳۱	۰/۳	۰/۳
۱۰	۰/۸۳	۰/۴۹	۰/۴۹	۰/۴۹	۰/۴۳	۰/۴۱	۰/۳۲	۰/۳۲	۰/۳۲	۰/۳۲	۰/۳۱	۰/۳۱	۰/۳۱	۰/۳
۱۵	۰/۸۵	۰/۵۵	۰/۵۵	۰/۵۳	۰/۵	۰/۴۳	۰/۳۵	۰/۳۴	۰/۳۲	۰/۳۲	۰/۳۱	۰/۳۱	۰/۳۱	۰/۳۱
۲۰	۰/۹۲	۰/۶۵	۰/۶۲	۰/۶۱	۰/۵۸	۰/۵۲	۰/۳۸	۰/۳۶	۰/۳۴	۰/۳۴	۰/۳۱	۰/۳۱	۰/۳۱	۰/۳۱
۲۵	۱/۰۹	۰/۷۴	۰/۷۱	۰/۶۹	۰/۶۵	۰/۶	۰/۴	۰/۳۹	۰/۳۷	۰/۳۵	۰/۳۲	۰/۳۱	۰/۳۱	۰/۳
۳۰	۰/۲۸	۰/۸۷	۰/۸۶	۰/۸۴	۰/۷۶	۰/۷۱	۰/۴۲	۰/۴۱	۰/۳۹	۰/۳۶	۰/۳۲	۰/۳۱	۰/۳	۰/۳۴

۱۰ cfu/ml تفاوت معنادار نسبت به غلظت ۱۰۰ cfu/ml مشاهده شد ($p < 0.05$). نانوله‌های کربنی عامل دار نیز در غلظت ۱۰۰ cfu/ml از باکتری با اختلاف معناداری جذب آنها افزایش یافت ($p < 0.05$) و این یعنی باکتری در غلظت ۱۰ cfu/ml شناسایی شد؛ اما برخلاف نانولوله‌های کربنی ساده با گذشت زمان ۱۵ دقیقه، کدورت محیط یا جذب خوانده شده، با حضور باکتری با اختلاف معنادار افزایش یافت که به دلیل تفاوت در واکنش پذیری آنهاست.

نتایج حاصل از شناسایی باکتری با استفاده از

نانوذرات: در شناسایی باکتری/شرشیا کلای توسط نانوذرات اکسیدروی، در زمان ۱۵ و ۳۰ دقیقه، شناسایی با غلظت ۱۰۰ cfu/ml و با اطمینان ۹۵ درصد صورت گرفت ($p < 0.05$) که مشابه با نتایج نانوذرات اکسید قلع بود (جدول ۸ و ۹). نتایج حاصل از شناسایی باکتری با استفاده از نانولوله‌های کربنی در جداول ۱۰ و ۱۱ آمده‌اند. با توجه به جداول مربوط به نانولوله‌های کربنی، باکتری/شرشیا کلای در غلظت ۱۰ cfu/ml ردیابی شد؛ زیرا در غلظت

جدول ۸- نتایج حاصل از شناسایی باکتری با استفاده از نانوذرات اکسید روی

Table 8- Results of Bacteria detection using ZnO NPs

باکتری (میلی لیتر/cfu) زمان (دقیقه)	۰	۱۰	۱۰۰	۱۰۳	۱۰۴	۱۰۵	۱۰۶	۱۰۷	۱۰۸
۰	۰/۳۶	۰/۳۶	۰/۴۱	۰/۴۲	۰/۴۲	۰/۴۳	۰/۴۳	۰/۴۳	۰/۴۴
۱۵	۰/۴۳	۰/۴۳	۰/۵۳	۰/۵۹	۰/۶۴	۰/۶۷	۰/۷۲	۰/۷۵	۰/۸
۳۰	۰/۷۳	۰/۷۳	۰/۷۶	۰/۸۱	۰/۸۷	۰/۸۹	۰/۹۶	۱/۰۸	۱/۱۹

جدول ۹- نتایج حاصل از شناسایی باکتری با استفاده از نانوذرات اکسید قلع

Table 9- Bacteria detection using SnO NPs

باکتری (میلی لیتر/cfu) زمان (دقیقه)	۰	۱۰	۱۰۰	۱۰۳	۱۰۴	۱۰۵	۱۰۶	۱۰۷	۱۰۸
۰	۰/۳۶	۰/۳۶	۰/۳۹	۰/۴	۰/۴	۰/۴۱	۰/۴۱	۰/۴۲	۰/۴۲
۱۵	۰/۴۳	۰/۴۳	۰/۵۱	۰/۵۷	۰/۵۷	۰/۶۵	۰/۶۸	۰/۷۲	۰/۷۹
۳۰	۰/۷۳	۰/۷۳	۰/۷۵	۰/۸	۰/۸	۰/۸۷	۰/۹۲	۰/۹۴	۱/۱۵

جدول ۱۰- نتایج حاصل از شناسایی باکتری با استفاده از نانولوله‌های کربنی ساده

Table 10- Results of Bacteria detection using pristine MWCNTs

باکتری (میلی لیتر/ cfu) زمان (دقیقه)	۰	۱۰	۱۰۰	۱۰۳	۱۰۴	۱۰۵	۱۰۶	۱۰۷	۱۰۸
۰	۰/۳۶	۰/۳۶	۰/۴۴	۰/۴۴	۰/۴۴	۰/۴۴	۰/۴۵	۰/۴۵	۰/۴۶
۱۵	۰/۴۳	۰/۴۴	۰/۵۵	۰/۶۲	۰/۶۸	۰/۷۳	۰/۷۸	۰/۷۹	۰/۸۳
۳۰	۰/۷۳	۰/۷۵	۰/۸	۰/۸۵	۰/۹	۰/۹۳	۱/۰۹	۱/۱۸	۱/۲۱

جدول ۱۱- نتایج حاصل از شناسایی باکتری با استفاده از نانولوله‌های کربنی عامل‌دار

Table 11- Results of Bacteria detection using carboxyl functionalized MWCNTs

باکتری (میلی لیتر/ cfu) زمان (دقیقه)	۰	۱۰	۱۰۰	۱۰۳	۱۰۴	۱۰۵	۱۰۶	۱۰۷	۱۰۸
۰	۰/۳۶	۰/۴۴	۰/۴۵	۰/۴۵	۰/۴۵	۰/۴۶	۰/۴۷	۰/۴۷	۰/۴۷
۱۵	۰/۴۳	۰/۵۲	۰/۶۲	۰/۶۶	۰/۷۵	۰/۸	۰/۸۲	۰/۸۳	۰/۸۳
۳۰	۰/۷۳	۰/۸۱	۰/۸۹	۰/۹۴	۰/۹۹	۱/۱۶	۱/۲۱	۱/۲۲	۱/۲۲

بحث و نتیجه‌گیری

سنتر و مطالعه ساختاری و نوری نانوذرات: استفاده

از روش سُل-ژل در سنتر نانوذرات بسیار شایان توجه قرار می‌گیرد؛ زیرا در تولید نانوپودرهای با خلوص بالا با استفاده از یک پیش‌ماده خالص بسیار مؤثر است. مزایای دیگر آن، سنتر در دماهای نسبتاً پایین و قابلیت کنترل سنتتیک مراحل مختلف واکنش‌های شیمیایی مانند هیدرولیز، چگالش، جوانه‌زنی و رشد ذرات اولیه کلونیدی برای به دست آوردن نانوساختار با اندازه و توزیع خاص است. همچنین، این روش به کنترل همه فرایندها و حفظ همگنی مقیاس اتمی کمک می‌کند (۴۰)؛ به همین دلیل، از روش سُل-ژل برای سنتر نانوذرات استفاده شد. نتایج حاصل از آنالیز نانوذرات نشان دادند نانومواد به کاررفته از ساختار قابل قبولی برخوردار و قادر به ارائه ویژگی‌های منحصر به فرد خود در اندازه نانو بودند.

آماده‌سازی نانوذرات: راجع به توزیع نانوذرات فلزی

در مایعات اطلاعات کمی وجود دارد. برای اصلاح سطح نانوذرات، توزیع مناسب و حفظ ماهیت شیمیایی آنها، از

دستگاه‌های توزیع کننده‌ای مانند همزن چرخشی، هم‌زن‌نایزر اولتراسونیک، دیسک میل و اس-رولرمیل استفاده می‌شود. استفاده از مواد شیمیایی مانند عوامل توزیع کننده به خوبی مطالعه نشده است. این عوامل سبب پایداری و جلوگیری از تجمع نانوذرات بعد از مراحل توزیع می‌شود (۴۱، ۴۲). در مطالعه ما برای کاهش ممانعت فضایی الکترواستاتیک بین نانوذرات و آزاد شدن سطح قابل قبولی از یون‌ها، از استیرر یا همزن مغناطیسی، طبق بررسی که قبلاً صورت گرفت، استفاده شد (۲۶).

در این مطالعه، از گلاتارالدهید به عنوان لینکر برای بهبود واکنش‌پذیری MWCNT استفاده شد. گلاتارالدهید یک لینکر مناسب برای اتصال متقابل مولکول‌های آنزیم بتا گالاکتوزیداز است. MWCNT‌های پیوند یافته با گلاتارالدهید، قادر به اتصال به ترکیبات آنیونی هستند که گروه آمین آنزیم نیز در این اتصال شرکت می‌کند. به دلیل خاصیت آبگریزی MWCNT‌ها، واکنش‌پذیری آنها با آنزیم در تجمع آنزیمی، با واسطه آمینواسیدها انجام می‌شود. این امر در یک

محیط هیدروفیلیک مثل یک بافر آبی به دلیل اثر جداسازی (Partitioning effect) شدت می‌یابد. علاوه بر برهمکنش هیدروفوبیک، الکترون‌های سطح MWCNT با الکترون‌های مقابل خود در حلقه آروماتیک اسیدهای آمینه مانند فنیل آلانین و تریپتوفان واکنش می‌دهد و سبب جذب آنزیم در MWCNT می‌شود (۴۳). مورفولوژی MWCNT‌ها قبل و بعد از عامل دار شدن تغییر می‌کند. این تغییرات با کاهش طول همراه است. حضور گروه‌های کربوکسیل روی سطح CNT، انحلال‌پذیری آنها را از حالت هیدروفوبیک به هیدروفیلیک تغییر می‌دهد که در واقع با تسهیل پراکندگی نانولوله‌ها در محلول آبی همراه است. این امر در انتشار بهتر آنها در بافر تأثیر گذار است. MWCNT‌ها با طول کوتاه‌تر تمایل کمتری به ایجاد تجمعات بزرگ دارند و استفاده از آنها برای آماده‌سازی یک سوپانسیون یکدست آسان‌تر است.

سنجش فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز در حضور

نانوذرات: در شکل ۱۱ (a) نشان داده شده است که آنزیم بتاگالاکتوزیداز با اتصال سوپسترا (ONPG) به جایگاه فعالش، عمل تجزیه را انجام می‌دهد؛ اما پس از ورود نانوذرات به محیط، نانوذرات دارای بار مثبت به آنزیم با بار منفی متصل می‌شوند. یک شارژ منفی در نزدیکی محل اتصال گالاکتوز (جایگاه فعال) وجود دارد. این بار منفی به کربن آنومری این آنزیم نزدیک است (۴۴)؛ بنابراین، پس از اتصال به آنزیم، مانع اتصال سوپسترا به جایگاه فعال و کاهش فعالیت کاتالیتیکی بتاگالاکتوزیداز می‌شود. با افزایش مقدار نانوذرات و با گذشت زمان، این ممانعت افزایش می‌یابد و در نهایت فعالیت آنزیم متوقف خواهد شد. در یک مقدار مشخص از نانوذره، فعالیت آنزیم کاملاً مهار می‌شود.

بار سطحی ZnO در pH خنثی، مثبت است و از طریق انحلال به صورت Zn^{2+} و ZnO تغییر می‌یابد (۴۵). در تمام مراحل آزمایش pH=۷ نیز با افزودن بافر تسهیل شد. یون‌های

Zn^{2+} آزاد شده در معرض مولکول‌های بتاگالاکتوزیداز با بار منفی قرار گرفتند و به آنها متصل شدند و مقدار جذب سوپسترا و فعالیت آنزیمی را کاهش دادند. با توجه به جدول ۴، با افزایش مقدار نانوذرات اکسید روی، در مقدار ۸۰ میکرولیتر، فعالیت آنزیمی کاملاً مهار شد. این همان مقدار لازم برای مهار کامل فعالیت آنزیم هدف بود. این فرایند در مورد نانوذرات اکسید قلع و MWCNT‌های ساده و عامل دار نیز صادق بود. با توجه به جدول ۵ مقدار مهار کنندگی نانوذرات اکسید قلع برابر ۹۰ میکرولیتر بود که از آن مقدار به بعد، عدد جذب تقریباً ثابت شد. این امر ناشی از برهمکنش یون‌های Sn^{2+} با بار منفی سطح بتاگالاکتوزیداز بود؛ زیرا نانوذرات اکسید قلع پس از توزیع در محیط، به صورت یون‌های Sn^{2+} و O^{2-} دیده می‌شوند که قابلیت سریع واکنش با هم را دارند. با توجه به جدول ۶ و ۷ مقدار مهار کنندگی MWCNT‌های ساده و عامل دار به ترتیب برابر ۶۰ و ۵۰ میکرولیتر بود و مقدار جذب در مقادیر بعدی ثابت ماند. نتایج نشان می‌دهند MWCNT‌ها در مهار فعالیت بتاگالاکتوزیداز، نسبت به نانوذرات ZnO و SnO عملکرد بهتری از خود نشان دادند؛ زیرا در مقادیر پایین‌تری توانستند مانع از تجزیه سوپسترا شوند و این به دلیل خواص ساختاری و شیمیایی آنهاست که به آنها اشاره می‌کنیم. گفتنی است با توجه به سطح انرژی بالای نیروی واندروالس در سطح نانوذرات اکسید روی و اکسید قلع، آنها تمایل به تجمع دارند؛ بنابراین، مراحل واکنش‌ها و خواندن جذب در کمترین زمان، با سرعت مناسب و به صورت پی‌درپی انجام گرفت.

علاوه بر شکل، اندازه و مقدار نانوذره، از سایر فاکتورهای محیطی مؤثر بر واکنش فوق می‌توان به دما، pH و زمان اشاره کرد. pH پتیمم برای فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز کلوروومایسس فرالجلس در دمای بهینه ۳۵-۳۰ درجه سانتی گراد به میزان ۶/۵، ۶/۶ و ۷ است (۴۶). از طرفی دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز مناسب

است و در این شرایط بیشترین فعالیت را از خود نشان می‌دهد (۴۷). بدین منظور، پلیت‌ها با $\text{pH}=7$ در انکوباتوری قرار داده شد که دارای دمای کنترل‌شده و ثابت ۳۷ درجه سانتی‌گراد بوده است و واکنش‌ها در آن صورت گرفت.

شناسایی باکتری با استفاده از نانوذرات: از/شرشیا

کلای به عنوان باکتری هدف استفاده شد؛ زیرا تشخیص سریع آن می‌تواند برای سلامت عمومی مفید باشد. تحقیقات بسیاری حاکی از آن است که باکتری‌ها دارای سطح شارژ منفی هستند که اولین بار توسط بچه‌لد در سال ۱۹۰۴ مطرح شد. این امر به وسیله کروماتوگرافی با اثر الکترواستاتیک اثبات شد. دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت، متشکل از یک لایه ضخیم پپتیدوگلیکان هستند که تیکوئیک‌اسید یکی از اجزای آن است. در باکتری‌های گرم منفی، پپتیدوگلیکان دارای لیپوبلی ساکارید است. در حقیقت، بار منفی باکتری به دلیل وجود این ترکیبات بوده است و نانوذرات با بار مثبت می‌توانند با واکنش‌های الکترواستاتیک به باکتری متصل شوند (۴۸).

در این مطالعه، پس از انکوباسیون نانوذرات / آنزیم / باکتری، اتصال بین باکتری و نانوذرات صورت گرفت و این امر مانع از اتصال نانوذرات به آنزیم آزاد موجود در محیط شد؛ بنابراین، پس از افزودن ONPG، سوبستراها به جایگاه فعالشان روی آنزیم‌ها متصل شدند و فعالیت آنزیمی آغاز شد. شروع فعالیت آنزیمی نشان‌دهنده وجود باکتری در محیط بوده است و بنابراین با گذشت زمان، تعداد بیشتری از میکروارگانیسم‌ها شناسایی شدند و تعداد مولکول‌های NPG در محیط و در نتیجه شدت جذب افزایش یافت. گفتنی است نانوذرات با بار مثبت، دارای فعالیت باکتریوسیدالی و باکتریواستاتیکی هستند که این فعالیت‌ها، وابسته به مقدار نانوذرات و مدت زمان مواجه شدن آنها با باکتری یا به عبارت دیگر، مدت انکوباسیون است (۲۶)؛ بنابراین، اتصال نانوذرات به باکتری سبب مهار فعالیت باکتریایی /شرشیا کلای می‌شود؛ از جمله آنها، فعالیت بتاگالاکتوزیدازی

این باکتری است که با اتصال ذرات با بار مثبت به آنزیم باکتریایی متوقف می‌شود (۴۹). از طرفی ژن کدکننده این فعالیت در نبود سوبسترا خاموش است و پس از حضور سوبسترا در محیط بیان می‌شود (۵۰). در این مطالعه پس از انکوباسیون نانوذرات / آنزیم / باکتری به مدت ۳۰ دقیقه و پس از اتصال یافتن نانوذرات به سطح باکتری، سوبسترا اضافه شد؛ بنابراین، با این دلایل می‌توان از نقش آنزیم بتاگالاکتوزیدازی باکتری /شرشیا کلای چشم‌پوشی کرد. این مراحل در شکل ۱۱ (b) به صورت شماتیک بیان شده است.

طبق جدول ۱۰ و ۱۱، MWCNT‌ها نتایج بهتری نسبت به سایر نانوذرات داشتند. آنها در مقدار مشابه و در زمان ۱۵ دقیقه توانستند حداقل غلظت باکتری (10 CFU/ml) در محیط را شناسایی کنند. این مقدار برای نانوذرات اکسید روی و اکسید قلع، 100 CFU/ml تعیین شد. پس از افزودن غلظت‌های مختلف از باکتری، کدورت محیط افزایش یافت و فعالیت آنزیمی آغاز شد. در واقع شناسایی باکتری زمانی صورت گرفت که نرخ جذب افزایش یافت. در حضور نانوذرات ZnO، میزان جذب خوانده‌شده در غیاب باکتری و در غلظت 10 CFU/ml از آن تقریباً ثابت بود. یعنی پس از افزودن 10 CFU/ml از باکتری /شرشیا کلای، تغییر چشمگیری در کدورت و میزان جذب در حضور نانوذرات اکسید روی و اکسید قلع مشاهده نشد. با افزایش غلظت باکتری (CFU/ml) ۱۰۰ کدورت افزایش یافت. این تغییر در کدورت برای MWCNT‌ها در پایین‌ترین غلظت (10 CFU/ml) مشاهده شد. میزان جذب در غلظت 10 CFU/ml از باکتری در حضور MWCNT‌ها و در غلظت 100 CFU/ml از باکتری در حضور نانوذرات ZnO، از جذب در غیاب باکتری بالاتر بود؛ بنابراین، MWCNT‌ها توانایی بالاتری در شناسایی باکتری هدف داشتند؛ زیرا دارای اندازه کوچک‌تر، نسبت سطح به حجم بالاتر و سطوح دسترسی وسیع‌تر در واکنش با آنزیم بودند.

تحقیقات نشان می‌دهند با کاهش اندازه ذره به مقیاس نانومتر، خواص پارامغناطیسی نیز افزایش می‌یابد (۵۱). بنابراین هرچه اندازه نانوذره کوچکتر باشد، حرکت الکترون‌ها و واکنش‌پذیری آنها افزایش می‌یابد. مهم‌تر از همه، توانایی اتصال آنها به باکتری و آنزیم را به‌طور مؤثر و گسترده فراهم می‌آورد و در نهایت سرعت تشخیص باکتری‌ها را بهبود می‌دهد. با وجود این، نانوذرات اکسید روی و اکسید قلع نیز از قدرت شناسایی قابل قبولی در تشخیص باکتری برخوردار بودند که به دلیل خواص منحصر به فرد آنهاست. نانوذرات اکسید روی به نسبت نانوذرات اکسید قلع، غلظت مشابهی از باکتری هدف را در مدت زمان کمتر تشخیص دادند و نرخ افزایش کدورت در آن بالاتر بود. در واقع نسبت سطح به حجم بالا، سازگاری خوب، حداقل سمیت، پایداری شیمیایی و تبادل زیاد و مناسب الکترون، نقطه ایزوالکتریک بالا، حضور اتم‌های Zn^{2+} و O^{2-} در ساختار بلوری نانوذرات ZnO، آنها را بسیار کارآمد کرده است؛ زیرا مساحت سطحی بالا به جذب آسان‌تر پروتئین‌ها (مانند آنزیم‌ها) منجر می‌شود. یک ماده نیمه‌رسانا که خواص نوری، الکترونیکی و کاتالیتیکی عالی دارد (۵۲، ۵۳).

نیمه‌رساناها انواع مختلفی از ساختارهای کریستالی دارند که منجر به خواص الکترونیکی و اپتیکی متفاوتی می‌شوند. نانوذرات اکسید قلع نیز از جمله آنهاست که دارای خواص مشابهی با نانوذرات اکسید روی هستند. آنها مزایای زیادی در مقایسه با نیمه‌رساناهای غیراکسیدی دارند. SnO یک ماده نیمه‌رسانا با گاف انرژی نسبتاً وسیع است که آنها را مناسب برای انواع واکنش می‌کنند (۵۴). اندازه بزرگ‌تر نانوذرات اکسید قلع و مساحت سطحی پایین‌تر از جمله علل تفاوت آن در مقایسه با نانوذرات اکسید روی در تشخیص باکتری است. از سوی دیگر، نانولوله‌های کربنی دارای مساحت سطحی بسیار بالاتر، مقاومت مکانیکی و رسانایی الکتریکی عالی هستند که آنها را در واکنش‌پذیری و کاربرد در زمینه‌های مختلف مؤثر می‌کنند

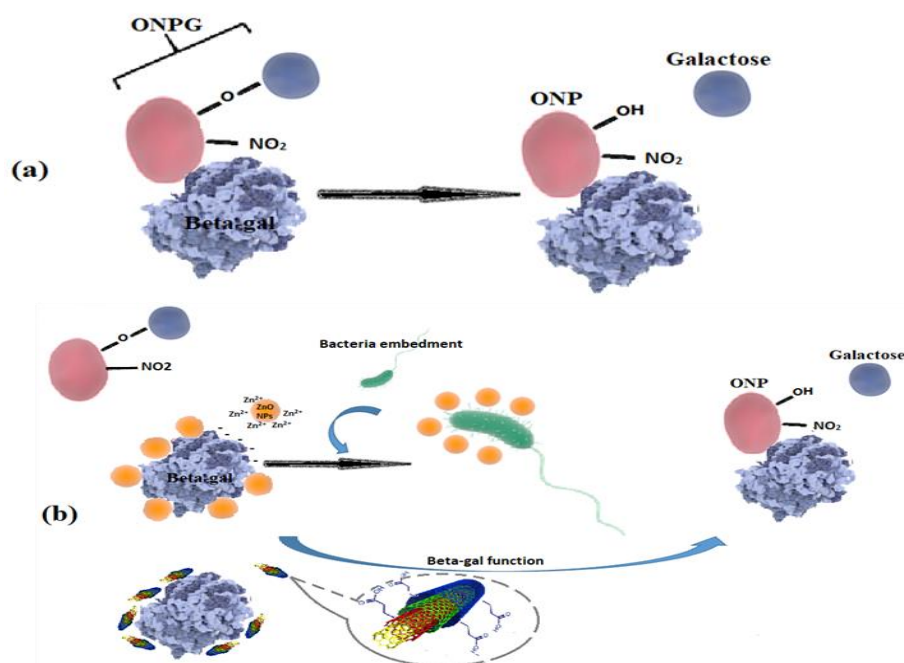
(۵۵). رسانایی الکتریکی بالا و مقاومت بالای آنها نسبت به دماهای بالا در CNTهای فلزی به دلیل حضور حداقل الکترون‌ها در آنهاست (۵۶). همچنین دارای ویژگی‌های منحصر به فردی از جمله مساحت سطحی، مقاومت حرارتی و مکانیکی، توزیع منظم منافذ با اندازه مناسب، قابلیت جذب، حساسیت و دقت بالا، محدودیت‌های کمتر در تشخیص نفوذپذیری کنترل شده در بسیاری از زمینه‌ها هستند. مساحت سطحی بالای نانولوله‌های کربنی، توانایی حرکت تعداد زیادی از ترکیبات را در سطح آنها فراهم می‌کند. MWCNTها قطر بین ۲ و ۱۰۰ نانومتر دارند و برای تشخیص مولکول‌های هدف بر اساس واکنش‌های الکتروشیمیایی مناسب هستند؛ زیرا قادر به اتصال و تجمع آنالیت‌ها یا مولکول‌های هدف هستند (۵۷).

اصلاح ساختار CNTها با گروه‌های مختلف شیمیایی برای افزایش حلالیت و سازگاری زیستی آنها استفاده می‌شود. عامل دار کردن کووالانسی به وسیله اکسیداسیون برای افزودن گروه‌های کربوکسیلیک اسید یا گروه‌های کربوکسیله شده در سطح CNT، یکی از پرکاربردترین استراتژی‌های استفاده شده است. مولکول‌های مختلف را می‌توان بیشتر به سطح CNTها (CNTs - COOH) برای کاربردهای مدنظر پیوند داد (۵۸)؛ بنابراین، افزودن گروه کربوکسیل در مطالعه ما، از دلایل افزایش واکنش‌پذیری نانولوله‌های کربنی عامل دار است.

همچنین می‌توان از ترکیب نانوذرات اکسید روی، اکسید قلع با نانولوله‌های کربنی به نتایج بسیار بهتری دست یافت. سنتز ساختارهای نانو با ابعاد پایین‌تر برای پژوهش‌های بنیادی و کاربردی مهم است. رشد نانو ساختارها با پایداری مورفولوژیکی و ثبات شیمیایی، اهمیت بسیار زیادی دارد. انتظار می‌رود اصلاح اندازه، آلیاژ و تشکیل ساختار هسته سبب اصلاح خواص ساختاری، نوری و الکترونیکی نانوذرات شود. ترکیب شدن با یک ماده مناسب دیگر نیز منجر به افزایش پایداری در ویژگی‌های ساختاری و اکسیداسیون نوری آنها می‌شود.

فلزی با ماتریس کربن یا لایه‌های کامپوزیت کربن - کربن به دلیل افزایش تخلخل و نسبت سطح به حجم، خواص جدیدی از خود بروز خواهد داد (۵۹).

گزارش شده است که پوشش‌های کربن در نانوذرات نیمه‌رسانا سبب افزایش پایداری، بهبود ظرفیت جذب و فعالیت فتوکاتالیتیک آنها خواهد شد. همچنین ترکیب شدن نانوذرات



شکل ۱۱- یک نمای شماتیک از فعالیت آنزیمی بتاگالاکتوزیداز (a) و تشخیص باکتری در محیط با استفاده از نانوذرات (b)
Fig 11- Schematic illustration of (a) enzymatic function of β -galactosidase and (b) bacteria detection using nanoparticles

لیئوپلی ساکارید در سطح/شرشیا کلای استفاده کردند. بتاگالاکتوزیداز روی نانوذرات طلا از طریق فعل و انفعالات الکترواستاتیک، جذب و بعد از حضور/شرشیا کلای، نانوذرات طلا به باکتری متصل شد و آنزیم شروع به فعالیت کرد (۶۱).

مطالعه کریان و همکاران^۷ روی روش‌های تشخیص کم‌هزینه آلودگی آب انجام شد. آنها از یک واکنش کالرومتریک استفاده کردند که اجازه تشخیص چشمی آلودگی با باکتری‌ها را داد (۶۲).

بنابراین از نانوذرات استفاده شده در این مطالعه نیز می‌توان برای تشخیص آلودگی مدفوعی انواع آب‌ها استفاده کرد. از طرف دیگر، باکتری‌های گرم مثبت،

برخی مطالعات، تشخیص سریع باکتری‌ها را با به کارگیری مواد نانو گزارش کرده‌اند؛ برای مثال، میراندا و همکاران^۵ یک روش کالرومتریک براساس نانوذرات طلا و بتاگالاکتوزیداز گزارش کردند. در مطالعه آنها، ابتدا اتصال نانوذرات طلا و مهار فعالیت آنزیمی آنالیز شد و سپس سوبسترای آنزیم بازنشانی شد. با استفاده از این روش، آنها توانستند باکتری را در غلظت‌های 10^2 CFU/ml در محلول شناسایی کنند (۶۰) که در مقایسه، مطالعه ما نتایج بهتری از خود نشان داد و MWCNTها حداقل غلظت را تشخیص دادند.

در مطالعه‌ای که توسط ورما و همکاران^۶ صورت گرفت، از نانوذرات طلا برای برهمکنش با

بالای خود، دارای قابلیت تشخیص باکتری‌ها در غلظت کم و در کمترین زمان بودند و این امر می‌تواند زمینه‌ساز تحقیقات بیشتر در این حوزه شود. همچنین ارزیابی این توانایی در نانوذرات اکسید روی، اکسید قلع و نانولوله‌های کربنی ساده و عامل‌دار نشان داد MWCNTها از قدرت شناسایی بیشتری برخوردارند که به دلیل نسبت سطح به حجم و واکنش پذیری بالاتر آنهاست. به طور کلی این مکانیزم تشخیصی می‌تواند پس از بهبود، توسعه و تبدیل آنها به نانویوسنسورها، جایگزین مناسبی برای روش‌های شناسایی و تشخیصی سنتی شود که بسیار زمان‌بر است و در صورت بهینه‌سازی می‌توان انتظار داشت حتی در غلظت‌های پایین‌تر بتواند به نحو مؤثر، آلودگی‌ها را تشخیص دهد؛ از این رو انتظار می‌رود در آینده، پس از انجام آزمون‌های تکمیلی به عنوان یک دستگاه بیوسنسور تشخیصی در صنعت غذا و دارو استفاده شود.

References

- (1) Yasmin J, Ahmed MR, Cho BK. Biosensors and their applications in food safety: A review. *Journal of Biosystems Engineering*. 2016;41(3):240–54. <http://dx.doi.org/10.5307/JBE.2016.41.3.240>
- (2) Mehrotra P. Biosensors and their applications: A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*. 2016 May 1;6:153-9. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>
- (3) Furst AL, Francis MB. Impedance-based detection of bacteria. *Chemical Reviews*. 2018 Dec 17;119(1):700–6. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00381>
- (4) Davenport M, Mach KE, Shortliffe LM, Banaei N, Wang TH, Liao JC. New and developing diagnostic technologies for urinary tract infections. *Nature Reviews*
- تیکوئیک‌اسید و لیپوتیکوئیک‌اسید در لایه پتیدوگلاایکان و دیواره سلولی دارند (۵۷)؛ بنابراین، ما می‌توانیم از نانوذرات کاتیونی برای تشخیص باکتری‌های گرم مثبت نیز استفاده کنیم. گفتنی است تجزیه ONPG به NPG با تغییر رنگ همراه است (تغییر کیفی) و می‌توان در بررسی آلودگی‌ها از روش کیفی استفاده کرد؛ اما از آنجایی که کار انجام‌شده در مطالعه ما، یک روش مقایسه‌ای بود، استفاده از نتایج کیفی برای مقایسه قابل استناد نبود.
- به‌طور کلی نانومواد، ترکیبات بسیار جذاب و کاربردی هستند. به دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی و نسبت سطح به حجم بالا در آنها، واکنش‌پذیری آنها بالا بوده و به‌عنوان یک مبدل عمل می‌کنند و حساسیت و محدودیت تشخیص آنالیت را افزایش می‌دهند و استفاده از آنها در بیوسنسورها بسیار کاربردی است.
- نتایج این تحقیق نشان دادند نانوذرات به دلیل حضور مقادیر بالای بار مثبت در آنها و نسبت سطح به حجم
- Urology. 2017 May;14(5):296-310. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.20>
- (5) Bordbar MM, Tashkhourian J, Tavassoli A, Bahramali E, Hemmateenejad B. Ultrafast detection of infectious bacteria using optoelectronic nose based on metallic nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2020 Sep 15;319:128262. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128262>
- (6) Choi Y, Lee S, Lee H, Lee S, Kim S, Lee J, Ha J, Oh H, Lee Y, Kim Y, Yoon Y. Rapid detection of Escherichia coli in fresh foods using a combination of enrichment and PCR analysis. *Korean journal for food science of animal resources*. 2018 Aug;38(4):829. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2018.e19>
- (7) Yamada K, Kim CT, Kim JH, Chung JH, Lee HG, Jun S. Single walled carbon nanotube-based junction biosensor for detection of Escherichia coli. *PLoS One*.

- 2014 Sep 18;9(9):e105767.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105767>
- (8) Ali MA, Eldin TS, Moghazy GE, Tork IM, Omara II. Original research article detection of *E. coli* O157:H7 in feed samples using gold nanoparticles sensor. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2014; 3(6):697–708.
https://www.academia.edu/download/34853932/M.A.Ali_et_al_Detection_of_E_coli_nanogold.PDF
- (9) Nguyen HH, Lee SH, Lee UJ, Fermin CD, Kim M. Immobilized enzymes in biosensor applications. *Materials*. 2019 Jan 2;12(1):121.
<https://doi.org/10.3390/ma12010121>
- (10) Metzger J, Von Landenberg P, Kehrel M, Buhl A, Lackner KJ, Luppia PB. Biosensor analysis of β 2-glycoprotein I-reactive autoantibodies: evidence for isotype-specific binding and differentiation of pathogenic from infection-induced antibodies. *Clinical chemistry*. 2007 Jun 1;53(6):1137–43.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.079632>
- (11) Tian Y, Cuneo MJ, Changela A, Höcker B, Beese LS, Hellinga HW. Structure-based design of robust glucose biosensors using a *Thermotoga maritima* periplasmic glucose-binding protein. *Protein science*. 2007 Oct;16(10):2240–50.
<https://doi.org/10.1110/ps.072969407>
- (12) Hutter E, Maysinger D. Gold-nanoparticle-based biosensors for detection of enzyme activity. *Trends in pharmacological sciences*. 2013 Sep 1;34(9):497–507.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.07.002>
- (13) Kotia N, Vasileva N. Biosensors for determination of lactose by immobilized beta-galactosidase: A Review. *Sci. Pap. Univ. Russ.* 2010;49:23–30.
<https://www.researchgate.net/publication/265083501>
- (14) Husain, Q. β Galactosidases and their potential applications: A review. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2010 Mar 1;30(1):41–62.
<https://doi.org/10.3109/07388550903330497>
- (15) Ansari SA., Satar R., Chibber S., Khan MJ. Enhanced stability of *Kluyveromyces lactis* galactosidase immobilized on glutaraldehyde modified multiwalled carbon nanotubes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2013 Dec 15;97:258–63.
<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.09.008>
- (16) Taft BJ, Lazareck AD, Withey GD, Yin A, Xu JM, Kelley SO. Site-specific assembly of DNA and appended cargo on arrayed carbon nanotubes. *Journal of the American Chemical Society*. 2004 Oct 13;126(40):12750–1.
<https://doi.org/10.1021/ja045543d>
- (17) Zhao Z, Lei W, Zhang X, Wang B, Jiang H. ZnO-based amperometric enzyme biosensors. *Sensors*. 2010 Feb 1;10(2):1216–31.
<https://doi.org/10.3390/s100201216>
- (18) Chopra KL, Major S, Pandya DK. Transparent conductors—a status review. *Thin solid films*. 1983 Apr 8;102(1):1–46.
[https://doi.org/10.1016/0040-6090\(83\)90256-0](https://doi.org/10.1016/0040-6090(83)90256-0)
- (19) Aziz M, Abbas SS, Baharom WR. Size-controlled synthesis of SnO₂ nanoparticles by sol–gel method. *Materials Letters*. 2013 Jan 15;91:31–4.
<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2012.09.079>
- (20) Hwang JY, Eltohamy M, Kim HW, Shin US. Self assembly of positively charged carbon nanotubes with oppositely charged metallic surface. *Applied surface science*. 2012 Jun 15;258(17):6455–9.
<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.03.060>
- (21) Khan MF, Ansari AH, Hameedullah M, Ahmad E, Husain FM, Zia Q, Baig U, Zaheer MR, Alam MM, Khan AM, AlOthman ZA. Sol-gel synthesis of thorn-like ZnO nanoparticles endorsing mechanical stirring effect and their

- antimicrobial activities: Potential role as nano-antibiotics. *Scientific reports*. 2016 Jun 28;6(1):27689. <https://doi.org/10.1038/srep27689>
- (22) Alias SS, Ismail AB, Mohamad AA. Effect of pH on ZnO nanoparticle properties synthesized by sol-gel centrifugation. *Journal of Alloys and Compounds*. 2010 Jun 11;499(2):231-7. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2010.03.174>
- (23) Brady JB, Boardman SJ. Introducing mineralogy students to x-ray diffraction through optical diffraction experiments using lasers. *Journal of Geological Education*. 1995 Nov 1;43(5):471-6. <https://doi.org/10.5408/0022-1368-43.5.471>
- (24) Bellamy LJ. *Advances in infrared group frequencies*. London: Methuen; 1968. <https://doi.org/10.1021/ed046pA380.1>
- (25) Abbas Q. Understanding the UV-Vis spectroscopy for nanoparticles. *J. Nanomater. Mol. Nanotechnol*. 2019 Dec 17;8(3):1-3. <https://doi.org/10.4172/2324-8777.1000268>
- (26) Meraat R, Ziabari AA, Issazadeh K, Shadan N, Jalali KM. Synthesis and characterization of the antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles against *Salmonella typhi*. *Acta Metallurgica Sinica (English Letters)*. 2016 Jul;29:601-8. <https://doi.org/10.1007/s40195-016-0439-5>
- (27) Andrade CA, Nascimento JM, Oliveira IS, de Oliveira CV, de Melo CP, Franco OL, Oliveira MD. Nanostructured sensor based on carbon nanotubes and clavanin A for bacterial detection. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015 Nov 1;135:833-9. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.03.037>
- (28) Kim BC, Lee I, Kwon SJ, Wee Y, Kwon KY, Jeon C, An HJ, Jung HT, Ha S, Dordick JS, Kim J. Fabrication of enzyme-based coatings on intact multi-walled carbon nanotubes as highly effective electrodes in biofuel cells. *Scientific reports*. 2017 Jan 5;7(1):40202. <https://doi.org/10.1038/srep40202>
- (29) Tîlmaciu CM, Morris MC. Carbon nanotube biosensors. *Frontiers in chemistry*. 2015 Oct 27;3:59. <https://doi.org/10.3389/fchem.2015.00059>
- (30) Verma ML, Naebe M, Barrow CJ, Puri M. Enzyme immobilisation on amino-functionalised multi-walled carbon nanotubes: structural and biocatalytic characterisation. *PloS one*. 2013 Sep 12;8(9):e73642. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073642>
- (31) Bahl OP, Agrawal KM. Glycosidases of *Aspergillus niger*: I. Purification and characterization of α - and β -galactosidases and β -N-acetylglucosaminidase. *Journal of Biological Chemistry*. 1969 Jun 10;244(11):2970-8. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)91719-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)91719-9)
- (32) Chen J, Jiang Z, Ackerman JD, Yazdani M, Hou S, Nugen SR, Rotello VM. Electrochemical nanoparticle-enzyme sensors for screening bacterial contamination in drinking water. *Analyst*. 2015;140(15):4991-6. <https://doi.org/10.1039/C5AN00637F>
- (33) Rabbani G, Khan MJ, Ahmad A, Maskat MY, Khan RH. Effect of copper oxide nanoparticles on the conformation and activity of β -galactosidase. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014 Nov 1;123:96-105. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.08.035>
- (34) Ansari SA, Satar R, Zaidi SK. Carboxylation of silver nanoparticles for the immobilization of β -galactosidase and its efficacy in galacto-oligosaccharides production. *Química Nova*. 2015;38:387-92. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150006>

- (35) Khan M, Husain Q, Bushra R. Immobilization of β -galactosidase on surface modified cobalt/multiwalled carbon nanotube nanocomposite improves enzyme stability and resistance to inhibitor. *International journal of biological macromolecules*. 2017 Dec 1;105:693-701. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.088>
- (36) Cullity BD. *Elements of X-ray diffraction*. Second Edition. Philippines : Addison-Wesley Publishing; 1978. <https://search.worldcat.org/title/elements-of-x-ray-diffraction/oclc/3672627>
- (37) Garg P, Singh BP, Kumar G, Gupta T, Pandey I, Seth RK, Tandon RP, Mathur RB. Effect of dispersion conditions on the mechanical properties of multi-walled carbon nanotubes based epoxy resin composites. *Journal of Polymer Research*. 2011 Nov;18:1397-407. <https://doi.org/10.1007/s10965-010-9544-8>
- (38) Hu CY, Xu YJ, Duo SW, Zhang RF, Li MS. Non-covalent functionalization of carbon nanotubes with surfactants and polymers. *Journal of the Chinese Chemical Society*. 2009 Apr;56(2):234-9. <https://doi.org/10.1002/jccs.200900033>
- (39) Kavinkumar T, Manivannan S. Synthesis, characterization and gas sensing properties of graphene oxide-multiwalled carbon nanotube composite. *Journal of Materials Science & Technology*. 2016 Jul 1;32(7):626-32. <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2016.03.017>
- (40) Aminirastabi H, Xue H, Peng D, Ji G. Sol-Gel Process and Engineering Nanostructure. In *Sol-Gel Method-Design and Synthesis of New Materials with Interesting Physical, Chemical and Biological Properties* 2018 Dec 7. IntechOpen. <https://B2n.ir/n07930>
- (41) Schilde C, Mages-Sauter C, Kwade A, Schuchmann HP. Efficiency of different dispersing devices for dispersing nanosized silica and alumina. *Powder technology*. 2011 Feb 15;207(1-3):353-61. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2010.11.019>
- (42) Luo Z, Zhu M, Guo M, Lian Z, Tong W, Wang J, Zhang B, Wei W. Ultrasonic-assisted dispersion of ZnO nanoparticles and its inhibition activity to *Trichoderma viride*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2018 Apr 1;18(4):2352-60. <https://doi.org/10.1166/jnn.2018.14397>
- (43) Ong CB, Annuar MS. Immobilization of cross-linked tannase enzyme on multiwalled carbon nanotubes and its catalytic behavior. *Preparative biochemistry & biotechnology*. 2018 Feb 7;48(2):181-7. <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1425707>
- (44) Huber RE., Gaunt MT. The inhibition of β -galactosidase (*Escherichia coli*) by amino sugars and amino alcohols. *Canadian Journal of Biochemistry* 1982; 60(6): 608–12. <https://doi.org/10.1139/o82-075>
- (45) Ma L, Liu B, Huang PJ, Zhang X, Liu J. DNA adsorption by ZnO nanoparticles near its solubility limit: implications for DNA fluorescence quenching and DNase activity assays. *Langmuir*. 2016 Jun 7;32(22):5672-80. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b00906>
- (46) Rosenberg ZM. Current trends of β -galactosidase application in food technology. *J Food Nutr Res*. 2006;45(2):47-54. <https://www.vup.sk/en/download.php?bulID=8>
- (47) Singh B, Katiyar D, Chauhan RS, Kharwar RK, Lall AM. Influence of UV Treatment on β -galactosidase Produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 2013 Mar;7(1):595-601. https://www.academia.edu/download/37403544/PAPER_IV..pdf
- (48) Li Z, Ma J, Ruan J, Zhuang X. Using

- positively charged magnetic nanoparticles to capture bacteria at ultralow concentration. *Nanoscale research letters*. 2019 Dec;14:1-8.
<https://doi.org/10.1186/s11671-019-3005-z>
- (49) Cui M, Chang H, Zhong Y, Wang M, Wu T, Hu X, Xu ZJ, Xu C. Detection of Bacteria in Water with β -Galactosidase-Coated Magnetic Nanoparticles. *SLAS TECHNOLOGY: Translating Life Sciences Innovation*. 2018 Dec;23(6):624-30.
<https://doi.org/10.1177/2472630318773407>
- (50) Nivetha A, Mohanasrinivasan V. Mini review on role of β -galactosidase in lactose intolerance. *In IOP Conference Series. Materials Science and Engineering* 2017 Nov 1 (Vol. 263, No. 2). IOP Publishing.
<https://doi.org/10.1088/1757-899X/263/2/022046>
- (51) Kanayeva DA, Wang R, Rhoads D, Erf GF, Slavik MF, Tung S, Li Y. Efficient separation and sensitive detection of *Listeria monocytogenes* using an impedance immunosensor based on magnetic nanoparticles, a microfluidic chip, and an interdigitated microelectrode. *Journal of food protection*. 2012 Nov 1;75(11):1951-9.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-516>
- (52) Lin SY, Chang SJ, Hsueh TJ. ZnO nanowires modified with Au nanoparticles for nonenzymatic amperometric sensing of glucose. *Applied Physics Letters*. 2014 May 12;104(19).
<https://doi.org/10.1063/1.4875028>
- (53) Marsalek R. Particle size and zeta potential of ZnO. *APCBEE procedia*. 2014 Jan 1;9:13-7.
<https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2014.01.003>
- (54) Manouchehri S, Boroojerdian P, Marasi A, Amoo M, Yousefi MH. Synthesis of single phase tin (ii) oxide nanoparticles by microwave-assisted hydrothermal technique. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE)*. 2018 Dec 1;37(6):1-8.
<https://doi.org/10.30492/ijcce.2018.29059>
- (55) Mohana Priya S, Geetha A, Ramamurthi K. Structural, morphological and optical properties of tin oxide nanoparticles synthesized by sol-gel method adding hydrochloric acid. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. 2016 May;78:365-72.
<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.03.060>
- (56) Sadeh H, Zare K, Maazinejad B, Shahryari-Ghoshekandi R, Tyagi I, Agarwal S, Gupta VK. Synthesis of MWCNT-COOH-Cysteamine composite and its application for dye removal. *Journal of Molecular Liquids*. 2016 Mar 1;215:221-8.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.12.042>
- (57) Percy MG, Gründling A. Lipoteichoic acid synthesis and function in gram-positive bacteria. *Annual review of microbiology*. 2014 Sep 8;68:81-100.
<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091213-112949>
- (58) Dong X, Liu L, Zhu D, Zhang H, Li Y, Leng X. Effects of Carboxylated Multiwalled Carbon Nanotubes on the Function of Macrophages. *Journal of Nanomaterials*. 2015 May 20;2015:1-8.
<https://doi.org/10.1155/2015/638760>
- (59) Bhatnagar M, Kaushik V, Kaushal A, Singh M, Mehta BR. Structural and photoluminescence properties of tin oxide and tin oxide: C core-shell and alloy nanoparticles synthesised using gas phase technique. *AIP Advances*. 2016 Sep 29;6(9):095321.
<https://doi.org/10.1063/1.4964313>
- (60) Miranda OR, Li X, Garcia-Gonzalez L, Zhu ZJ, Yan B, Bunz UH, Rotello VM. Colorimetric bacteria sensing using a supramolecular enzyme-nanoparticle biosensor. *Journal of the American Chemical Society*. 2011 Jun 29;133(25):9650-3.
<https://doi.org/10.1021/ja2021729>
- (61) Verma MS, Rogowski JL, Jones L, Gu FX. Colorimetric biosensing of pathogens

using gold nanoparticles. *Biotechnology advances*. 2015 Nov 1;33(6):666-80. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.003>

(62) Creran B, Li X, Duncan B, Kim CS, Moyano DF, Rotello VM. Detection of

bacteria using inkjet-printed enzymatic test strips. *ACS applied materials & interfaces*. 2014 Nov 26;6(22):19525-30. <https://doi.org/10.1021/am505689g>

¹. Polymerase Chain Reaction

². Chromatography

³. Chemiluminescence

⁴. Elisa

⁵. Miranda et al.

⁶. Verma et al.

⁷. Creran et al.