

مجله ایمنی زیستی

دوره ۱۷، شماره ۱، بهار ۱۴۰۳

ISSN 2716-9804 الکترونیکی، ISSN 2717-0632 چاپی

ساخت بستر کامپوزیت پلیمر- نانوذره طلا حاوی اپتامر به منظور جذب اختصاصی باکتری سالمونلا از محیط آبی

نوع مقاله: پژوهشی

احسان شکری^{۱*}، مریم اثنی عشری^۲، نجمه نصیری^۳، سعید سهیلی وند^۴

۱- استادیار، بخش تحقیقات نانوتکنولوژی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۲- استادیار، بخش تحقیقات فرآوری تولیدات دامی، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۳- دانش‌آموخته دکترای تخصصی مهندسی ژنتیک و ژنتیک مولکولی گیاهی

۴- استادیار، بخش تحقیقات بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

e.shokri@abrii.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۲۲، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۰۲

صفحه ۱-۱۶

چکیده

تأثیرات اقتصادی و بهداشت عمومی آلودگی با سالمونلا در سطح ملی و جهانی قابل توجه است. به همین دلیل ردیابی و پایش مستمر آلودگی با انواع سروارهای سالمونلا در آب، غذا و محیط از منظر امنیت غذایی و ایمنی زیستی از درجه اهمیت بالایی برخوردار است. متأسفانه سهل‌انگاری و عدم دسترسی به روش‌های ساده و ارزان در زمینه تشخیص سالمونلا به‌ویژه در کشورهای متوسط و با درآمد پایین، منجر به بیش مصرفی و استفاده بی‌هدف از انواع آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد شیمیایی در بخش‌های بهداشت و درمان و صنایع مختلفی مثل پرورش دام، طیور و آبزیان شده است. به‌گونه‌ای که امروزه با بروز مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در برخی سروارهای مهاجم و خسارت بار سالمونلا تهدیدکننده ایمنی زیستی است. در این پژوهش، امکان جداسازی باکتری سالمونلا با استفاده از یک نوع بستر جاذب ساخته شده در آزمایشگاه بررسی شد. نتایج نشان داد که فیلم پلیمری آگاروز ۲ درصد حاوی ۴۰ درصد گلیسرول که با نانوذرات طلا متصل به اپتامر زیست‌فعال شده، می‌تواند باکتری سالمونلا را از نمونه آب جداسازی کند. استفاده از این روش جداسازی، می‌تواند باعث بهبود روش‌های تشخیصی موجود و کاهش هزینه‌ها و زمان بررسی شود.

واژه‌های کلیدی: اپتامر، ایمنی زیستی، کامپوزیت، بیمارگر سالمونلا.

مقدمه

باتوجه به پژوهش‌ها و اطلاعات آماری، پرندگان به‌ویژه مرغ‌ها از مهمترین منابع آلودگی هستند و بیش از دام‌ها در انتقال و انتشار سالمونلاها دخالت دارند (Antunes et al. 2016; Dar et al. 2017).

در اکثر کشورهای آلوده بیش از ۷۰ درصد عفونت‌های سالمونلایی در انسان با مصرف گوشت ماکیان، بوقلمون و تخم مرغ آلوده مرتبط است (Antunes et al. 2016) همچنین عفونت‌های سالمونلایی یکی از مهمترین عوامل زیستی خسارت‌زا بوده و تهدیدکننده صنعت تولید گوشت و تخم مرغ هستند. با این حال به‌طور بالقوه هر نوشیدنی و خوردنی خامی که از حیوانات به دست آمده باشد، می‌تواند دارای سالمونلا باشد. باکتری سالمونلا در روده حیوانات مانند خوک و ماکیان یافت می‌شود و از طریق مدفوع گسترش پیدا می‌کند. اگر مدفوع به آب‌های آبیاری محصولات کشاورزی ریخته شود، باکتری می‌تواند خودش را به محصولات کشاورزی رسانده و آن‌ها را نیز آلوده کند. در سال‌های اخیر گزارش‌های متعددی در مورد ابتلا به سالمونلا از طریق خوردن سالاد، کره بادام‌زمینی، خیار، گوجه‌فرنگی، پیاز و سایر انواع محصولات کشاورزی منتشر شده است (Barak and Liang, 2008; Nithya and Babu, 2017; Smolinski and Ryser, 2018; Barrere et al. 2020; Xie et al. 2023). از طرفی، سروارهای

سالمونلوز یکی از بیماری‌های شایع منتقله از طریق غذا است که توسط باکتری‌های جنس سالمونلا (*Salmonella*) متعلق به خانواده انتروباکتریاسه ایجاد می‌شود. عامل این بیماری باکتری‌های جنس سالمونلا متعلق به خانواده انتروباکتریاسه هستند که برخی سروارهای آن بین انسان و حیوان مشترک بوده و سالانه موجب ابتلا و مرگ افراد زیادی از جمعیت‌های انسانی، دامی و طیور می‌شوند (Herrera and Jabib 2015). در اغلب نقاط جهان، بررسی‌های اپیدمیولوژیک انجام گرفته، حاکی از افزایش عفونت‌های ناشی از سروارهای سالمونلا است (Papa and 2018; Besser. 2018).

گاستروانتریت (*gastroenteritis*) شایع‌ترین و متداول‌ترین عفونت سالمونلایی در انسان است که اغلب توسط سالمونلا انتروتیتیدیس (*Salmonella enteritidis*) و سالمونلا تیفی‌موریوم (*Salmonella typhimurium*) ایجاد می‌شود. طبق ارزیابی مراکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها (CDC: centers for disease control and prevention) آمار سازمان بهداشت جهانی، سالانه ۱/۳ بلیون گاستروانتریت حاد به دلیل سالمونلوزیس غیرتیفوئیدی گزارش می‌شود که ۳ میلیون آنها منجر به مرگ می‌شود (Nwabor et al. 2015).

"شکری و همکاران، ساخت بستر کامپوزیت پلیمر- نانوذره طلا حاوی اپتامر به منظور جذب اختصاصی ..."

آزمایش‌های بیوشیمیایی متنوع است (Nwabor et al. 2015).

استفاده از روش‌های کشت جهت جداسازی عامل بیماری نیاز به ۲ تا ۱۰ روز عملیات آزمایشگاهی دارد. روش‌های سنتی کشت زمانبر و پرهزینه هستند و امروزه سعی می‌شود با تکنیک‌های سریع‌تر با امکان پایش‌های گسترده جایگزین شوند. از آن جمله می‌توان به روش‌های بر پایه جداسازی ایمنوگنتیک (IMS: separation (immunomagnetic PCR، polymerase chain reaction) و روش‌های مبتنی بر فناوری نانو اشاره کرد (Wang et al. 2015).

در دهه اخیر، فناوری نانو پیشرفت‌های چشمگیری در زمینه شناسایی عوامل بیماری‌زا از جمله سالمونلا داشته است. استفاده از انواع نانوذرات به عنوان نشانگرهای نورتاب، پلاسمون و عوامل جداساز مغناطیسی در تلفیق با آشکارسازهای نوین، باعث افزایش ظرفیت شناسایی میکروبه‌ها و بهبود اختصاصیت/حساسیت روش‌های زیست‌سنجی و توسعه نانوحسگرها شده است (Xu et al. 2023). با این حال، روش‌های نوین هم اگرچه باعث بهبود اکثر شاخص‌های تشخیصی شده‌اند اما همواره با چالش‌ها و دشواری‌هایی برای استانداردسازی و تکرارپذیری نتایج مواجه هستند.

باکتری سالمونلا از لحاظ پدافندی و نظامی اهمیت زیادی دارند و شاخصی برای سلامت آب و غذای مصرفی یک کشور محسوب می‌شوند. سالمونلا به دلیل سهولت انتقال و همه‌گیری توسط آب و غذا در لیست ارگانسیم‌های کاندید بیوتروریسم (طبقه B) است، گزارشاتی از حملات تروریستی با استفاده از سروارهای این بیماری توسط برخی گروهک‌ها و فرقه‌های افراطی با هدف فشار بر دولت‌ها، ایجاد رعب و تحمیل خسارت‌های اقتصادی در برخی کشورهای دنیا از جمله آمریکا وجود دارد (Tin et al. 2022; O'Neill et al. 2024).

امروزه با پیشرفت مهندسی ژنتیک و فناوری‌های زیستی امکان بهره‌برداری افراد شرور از پایه ژنتیکی میکروب‌های سریع‌الانتشار مثل سالمونلا وجود دارد و بنابراین ردیابی، تشخیص و کنترل سالمونلا علاوه بر جنبه اقتصادی/صنعتی از لحاظ امنیتی و پدافند غیرعامل نیز اهمیت زیادی دارد. آب، خوراک دام و طیور، گوشت سفید و قرمز، تخم مرغ، مواد لبنی، میوه‌ها، سبزیجات و بسیاری از محصولات فرآوری شده منبع عفونت هستند و بایستی به دقت آزمایش شوند (Ehuwa et al. 2021). روش استاندارد برای تشخیص این نمونه‌ها جداسازی و شناسایی عامل بروز بیماری با استفاده از کشت باکتری در انواع محیط‌های کشت غنی‌سازی، انتخابی، افتراقی و انجام

مواد و روش‌ها

سنتز و مشخصه‌یابی نانوذرات طلا

۵۰ میلی‌لیتر محلول آبی ۱ میلی‌مولار کلرید طلا ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)، تا رسیدن به نقطه جوش در حین هم‌خوردن با یک مگنت حرارت داده شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر محلول تری‌سدیم سیترات ($38/8$ میلی‌مولار) به سرعت به محلول اضافه شد و اجازه داده شد تا ده دقیقه دیگر بجوشد. در این حین، رنگ محلول از زرد به قرمز تیره تغییر کرد. سپس حرارت دادن متوقف شده، اما هم‌زدن آن تا رسیدن به دمای اتاق ادامه یافت (Dong et al. 2020).

محلول نانوذرات طلا برای استفاده بعدی در یخچال در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. برای ثبت طیف‌های جذبی از دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل Lambda 25 شرکت PerkinElmer آمریکا و سل‌های کوآرتز با قطر ۱ سانتی‌متر با ظرفیت ۵۰ و ۳۰۰ میکرولیتر استفاده شد.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار UV Winlab بررسی شد. از میکروسکوپ الکترونی عبوری TEM برای تعیین قطر و وضعیت پراکنش نانوذرات طلا سنتز شده استفاده شد. برای این منظور نمونه‌ها به میزان لازم رقیق شده و قطره‌ای از آن (۱۰ میکرولیتر) بر روی شبکه مسی پوشیده شده با کربن گذاشته شد و در معرض هوا خشک

به‌عنوان مثال در رابطه با شناسایی سالمونلا در نمونه‌های متنوع، اگر هدف کاهش زمان آزمایش و افزایش دقت نتایج باشد، بهتر است قبل از شروع فرآیند تشخیص، بتوان به شکلی جرم باکتری را از نمونه جداسازی کرد تا پیچیدگی‌های ماتریکس‌های زیستی و آشفته‌گی‌های زمینه باعث اختلال در کار حسگرها و کیت‌های تشخیصی نشود. مزیت استفاده از روش‌های جداسازی در ساختار زیست حسگرها و یا فرآیند شناسایی باکتری‌ها شامل کاهش زمان آزمایش و هزینه‌ها، تغلیظ آنالیت، سهولت اجرا و افزایش حد تشخیص است (Chircov et al. 2019).

جداسازی باکتری از محیط می‌تواند با انواع روش‌های فیزیکی مثل سانتریفیوژ یا شیمیایی مثل استفاده از نانوذرات مغناطیسی زیست فعال قبل از شروع فرآیند تشخیصی یا هم‌زمان با آن انجام شود. در این پژوهش، هدف معرفی روشی جدید و کاربردی بر پایه فناوری نانو به منظور جداسازی ساده و ارزان باکتری *S. typhimurium* از نمونه است. برای این منظور ابتدا سطح نانوذرات طلا با اپتامرهای ضد سالمونلا زیست‌زوجی (bioconjugation) شدند. سپس نانوذرات کانژوگه در بستری پلیمری تثبیت شدند تا فیلم جاذب سالمونلا (نانوکامپوزیت طلا-پلیمر) ساخته شود. در ادامه از این فیلم به‌عنوان بستری فعال برای جذب باکتری از نمونه آب آلوده استفاده شد.

"شکری و همکاران، ساخت بستر کامپوزیت پلیمر- نانوذره طلا حاوی اپتامر به منظور جذب اختصاصی ..."

اندازه‌گیری ضخامت فیلم

ضخامت فیلم در ۱۰ نقطه تصادفی توسط ریزسنج دیجیتالی Mitutoyo (ساخت ژاپن) با دقت ۰/۱ میلی‌متر در دمای اتاق و رطوبت نسبی ۵۰ درصد اندازه‌گیری شد. برای ایجاد رطوبت نسبی $50 \pm 5\%$ قطعات 10×10 سانتیمتری فیلم‌ها در دسیکاتور حاوی محلول اشباع نیترات منیزیم در دمای اتاق به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند تا از نظر میزان رطوبت و سایر شرایط به تعادل برسند.

آنالیز میزان حلالیت فیلم در آب

حلالیت در آب عبارت است از درصد ماده خشک فیلم که پس از ۲۴ ساعت غوطه‌وری در آب مقطر به حالت محلول در می‌آید. ابتدا نمونه‌هایی به ابعاد 20×20 میلیمتر تهیه کرده، سپس برای رسیدن به وزن خشک اولیه به مدت ۲۴ ساعت در آن ۱۰۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند. در ادامه وزن خشک اولیه نمونه‌ها را تعیین کرده و بعد هر قطعه از آنها را در داخل ظرف درب‌دار حاوی ۵۰ سی‌سی آب مقطر به مدت یک روز غوطه‌ور شدند. در نهایت فیلم‌ها دوباره به مدت ۲۴ ساعت در آن ۱۰۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند تا به وزن ثابت برسند. سپس با توزین مجدد نمونه‌ها وزن خشک نهایی به دست آمد. درصد کل ماده حل شده (TSM) از رابطه زیر به دست می‌آید:

شد. سپس باقیمانده نمونه توسط یک کاغذ صافی به آرامی از روی شبکه مسی جمع‌آوری شد و نمونه تحت آنالیز با میکروسکوپ الکترونی قرار گرفت.

تهیه فیلم‌های پلیمری

به منظور تهیه فیلم، ۲ گرم از پودر خشک آگاروز به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه به آرامی اضافه و به طور پیوسته تا تشکیل حالت سوسپانسیون ابری همزده شد. سپس گلیسرول با غلظت ۴۰ درصد (مقدار وزنی نسبت به آگاروز) به تدریج به ظرف اضافه و دمای سوسپانسیون تا نقطه جوش افزایش یافت تا محلول شفاف شود. حرارت‌دهی محلول تا تغلیظ به حجم ۵۰ میلی‌متر در دمای ۶۰ درجه سلسیوس ادامه یافت.

برای تهیه فیلم نشاسته و ژلاتین، ۵ گرم از این مواد به همراه ۲ گرم از پلی‌ونیل‌الکل به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب ۸۰ درجه سلسیوس افزوده شد و به آرامی همزده شد تا ژله‌ای شود. سپس در ادامه گلیسرول با غلظت ۴۰ درصد اضافه و محلول ۱۰ دقیقه دیگر همزده شد.

در نهایت ژل‌های تشکیل شده پس از سرد شدن (تا دمای ۴۰ درجه سلسیوس) در پلیت آزمایشگاهی توزیع (۴۰ میلی‌لیتر) و به آرامی در مجاورت هوای محیط به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت خشک شدند.

$$TSM\% = [(وزن خشک نهایی - وزن خشک اولیه) / (وزن خشک اولیه \times 100)]$$

خواص مکانیکی فیلم

به این منظور از فیلم‌ها قطعاتی به اندازه ۱۰×۱۰ سانتیمتر مربع بریده شد و سپس برای تأمین رطوبت و احراز شرایط استاندارد به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در دسیکاتور با رطوبت نسبی $50 \pm 5\%$ (محلول اشباع نیترات منیزیم) نگهداری شد. سپس ویژگی‌های استحکام کششی (TS)، درصد کشش‌پذیری یا ازدیاد طول تا نقطه پارگی (%E) و مدول یانگ بر اساس استاندارد ASTM D882-09 با اندکی تغییرات به وسیله دستگاه بافت‌سنج LLOYD مدل RS232 ساخت شرکت AMETEK آمریکا اندازه‌گیری شد.

تثبیت اپتامرهای سالمونلا روی سطح نانوذرات طلا

به منظور اتصال اپتامرهای سالمونلا به نانوذرات طلا، ابتدا نانوذرات سنتز شده با لینکر تیوله (الیگو dt18) عامل‌دار شدند. برای این منظور احیاء لینکر با استفاده از محلول ضعیف DTT انجام شد و سپس ۶۰ میکرولیتر از بافر HEPES یک میلی مولار $pH = 7$ به ویال اضافه و برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. در ادامه ۲۵۰

میکرولیتر نانوذره طلا به ویال لینکر اضافه شد و برای افزایش پوشش اپتامرها روی سطح از محلول کلرید سدیم (۰/۰۲ مولار) به صورت تدریجی استفاده شد. در هر بار افزایش نمک، محتوای واکنش به مدت ۲۵ ثانیه مخلوط و سپس ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. در انتها با استفاده از سانتریفیوژ (۱۴۰۰۰rpm، ۱۵ دقیقه) مایع رویی حذف شد و به رسوبات (نانوذرات طلا اصلاح با لینکر) بافر HEPES افزوده شد. در ادامه به محلول نانوذرات طلا پوشیده با لینکر، ۱۰ میکرومولار اپتامر سالمونلا اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه به مدت دو ساعت برای تکمیل هیبریداسیون اپتامر-لینکر نگهداری شد. اپتامرهای سالمونلا طوری تغییر داده شده بودند که در سمت ۵ پریم خود واجد دنباله پلی آدنین (dA18) باشند. برای تأیید فرآیند اتصال اپتامر به نانوذرات طلا از روش‌های آنالیز طیف جذب UV-Vis و پراکندگی دینامیکی نور (DLS) با دستگاه زتاسایزر مدل Malvern Ltd Instruments استفاده شد. در جدول ۱ مترادف لینکر و اپتامر سالمونلا نمایش داده شده است.

جدول ۱- مترادف لینکر و اپتامر سالمونلا

عنوان	5- sequence -3	طول (جفت باز)
لینکر	Thiol-(CH ₂) ₆ -TTTTTTTTTTTTTTTTTT	۱۸
اپتامر سالمونلا	(A) ₁₈ TATGGCGGGCGTCACCCGACGGGGACTTGACATTATGACAG	۵۸

"شکری و همکاران، ساخت بستر کامپوزیت پلیمر- نانوذره طلا حاوی اپتامر به منظور جذب اختصاصی ..."

تهیه نانو کامپوزیت (نانوفیلم پلیمری حاوی

نانوذرات زیست فعال)

برای تهیه نانو کامپوزیت؛ نانوذرات طلا زیست فعال (حاوی اپتامر) به فیلم ژله‌ای آگاروز- گلیسرول حاوی ۰/۰۱ گرم پیروفسفات سدیم اضافه شد و تا سفت شدن کامل فیلم در دمای اتاق نگهداری شد.

بررسی جذب سطحی باکتری

همچنین برای بررسی امکان جذب باکتری روی سطح فیلم از آنالیز میکروسکوپ SEM استفاده شد. برای این منظور ابتدا نانوفیلم روی اسلاید شیشه‌ای کوت شد. سپس در مجاورت نمونه آب آلوده به سالمونلا (۱۰۳cfu/mL) به مدت ۶۰ دقیقه قرار داده شد تا باکتری جذب سطح فیلم شود. سپس سطح اسلاید چندین مرتبه با بافر فسفات شستشو داده شد تا اتصال‌های غیراختصاصی حذف شود. در ادامه با استفاده از محلول فیکساتیو (گلو تار آلدئید ۳ درصد) سطح نانوفیلم تیمار شد و بعد شستشو با بافر فسفات در چند مرحله با اتانول آب‌گیری شد. نمونه تهیه شده قبل از تصویربرداری به طور کامل خشک بود و در دستگاه اسپاترینگ با لایه نازکی (۳-۱/۵ نانومتر) از طلا روکش دار شد (Tan et al. 2020).

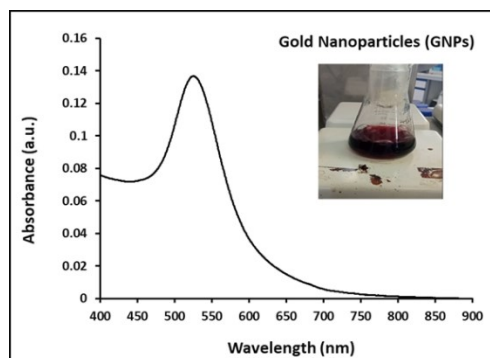
نتایج و بحث

سنتز و مشخصه‌یابی نانوذرات طلا

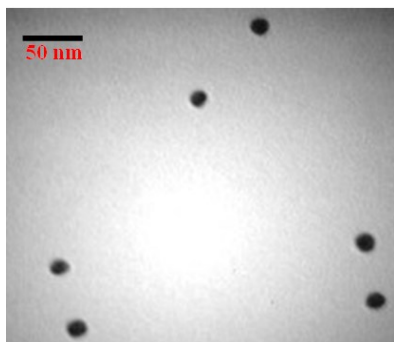
شکل ۱-الف، محلول نانوذرات طلا بلافاصله پس از اتمام سنتز نشان می‌دهد. همان طوری که در شکل دیده می‌شود در نور مرئی اتاق رنگ محلول واکنش شرابی تیره است که مطابق انتظار است. همچنین شکل ۱-الف، طیف جذب نانوذرات طلا ساخته شده به روش شیمیایی با عامل کاهنده تری سدیم سیترات دوآبه را نشان می‌دهد. ظاهر شدن قله تشدید پلاسמוنی در طول موج ۵۲۵ نانومتر، تشکیل نانوذرات طلا را تأیید می‌کند (Sangwan and Seth, 2021). مشاهده یک قله جذبی در طیف‌های جذبی بیانگر کروی یا شبه کروی بودن نانوذرات است. تصاویر میکروسکوپ TEM نیز نشان می‌دهد که ذرات کروی شکل هستند و توزیع همگنی در محیط آبی دارند. اندازه میانگین برای این ذرات حدود ۱۸-۱۳ نانومتر برآورد شد (شکل ۱-ب). همچنین شکل ۱-ج، الگوی پراش اشعه ایکس نانوذرات طلا سنتز شده است که با مشاهده بزرگترین و اصلی‌ترین قله‌ها در زاویه ۲θ برابر با ۳۸/۳۸، ۴۵/۵۲، ۵۶/۵۰، ۶۶/۴۱ و ۷۵/۴۲ درجه که به ترتیب برای صفحات بلوری ۱۱۱، ۲۰۰، ۲۲۰ و ۳۱۱ نمایه می‌شوند، ساختار FCC طلا را تأیید

می کند (Usman et al. 2019).

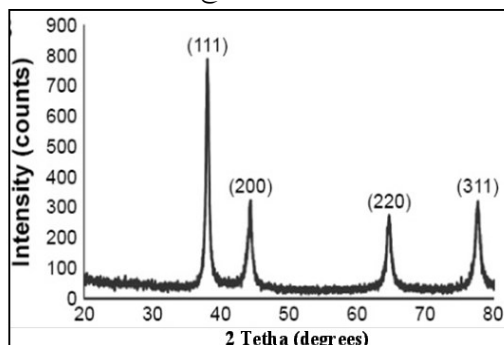
(الف)



(ب)



(ج)



شکل ۱- الف) محلول کلوئید نانوذرات طلا سنتز شده در نور اتاق و طیف جذبی نانوذرات طلا در بازه ۳۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر. ب) تصویر TEM نانوذرات طلا کروی با پراکنش مناسب و اندازه تقریبی ۱۸-۱۳ نانومتر. ج) طیف XRD نانوذرات طلا

در مجاورت هم قرار گرفتند. همان طوری که در شکل ۲-الف و ب نشان داده شده، افزایش اپتامر به محلول کلوئید طلا باعث جابه‌جایی قرمز در طیف و افت سیگنال پلاسمون سطحی نانوذرات طلا پوشیده و همچنین تغییر رنگ (ارغوانی شدن) در مقایسه با نانوذرات طلا غیر پوشیده می‌شود که مطابق انتظار بوده و بیانگر تثبیت و

تثبیت اپتامر روی سطح نانوذرات طلا- بررسی

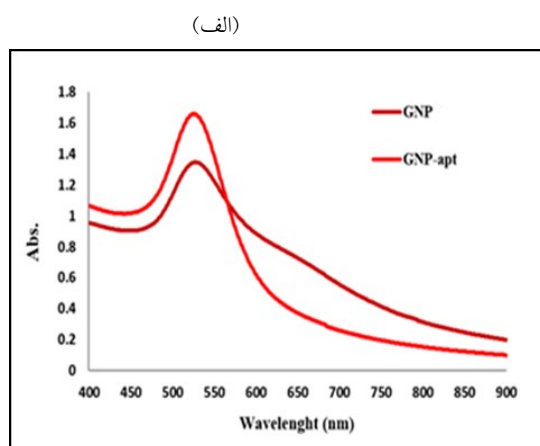
طیف جذبی

به‌منظور اتصال اپتامر سالمونلا به سطح نانوذرات طلا، نانوذرات پوشیده با لینکر الیگو dT و اپتامر سالمونلا (دارای دنباله آدنین در سمت ۵ پریم)، در شرایط محلول در بافر هیبریداسیون تحت شرایط (دمای ۳۷ درجه به مدت دو ساعت)

"شکری و همکاران، ساخت بستر کامپوزیت پلیمر- نانوذره طلا حاوی اپتامر به منظور جذب اختصاصی ..."

اندازه‌گیری کند. بر این اساس قطر هیدرودینامیکی و پتاسیل زتا میانگین برای نانوذرات طلا قبل از اتصال لینکر و هیبریداسیون با اپتامر سالمونلا به ترتیب $14/62\text{nm}$ و $-21/6\text{mV}$ - به دست آمد. همچنین بعد از هیبریداسیون قطر نانوذرات $17/11\text{nm}$ و پتانسیل زتا $-34/1$ - ثبت شد. این نتایج نشان می‌دهد که اپتامرهای سالمونلا می‌توانند با لینکرهای الیگو dT هیبرید شده و روی سطح نانوذرات طلا قرار بگیرند.

اتصال لینکرها روی سطح نانوذرات است. همچنین برای بررسی اتصال از آنالیز DLS استفاده شد. یکی از روش‌های آنالیز نانوذرات روش پراکندگی دینامیکی نور است که توانایی اندازه‌گیری ذرات در داخل محلول را به صورت سریع، ساده و بدون نیاز به آماده سازی نمونه، دارا است. می‌توان با تفرق نور دینامیکی توسط اندازه‌گیری حرکت براونی ذرات پی به اندازه آنها برد. همچنین دستگاه DLS می‌تواند پتانسیل زتای ذرات معلق یا محلول در یک مایع را نیز

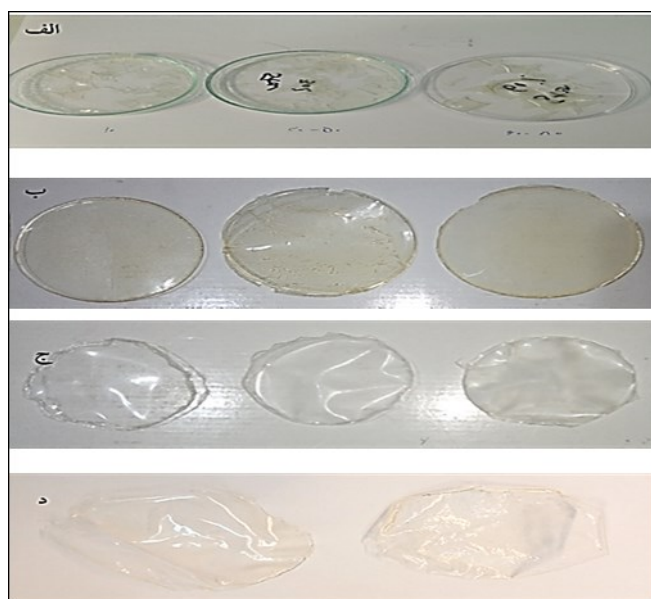


شکل ۲- الف) طیف جذبی پلاسمون های سطحی نانوذرات طلا (GNP) و نانوپروب سالمونلا (GNP-apt). ب) تفاوت رنگ نانوذرات طلا و نانوپروب سالمونلا در نور اتاق.

همچنین بجز فیلم نشاسته که یکپارچگی نداشت و پس از خشک شدن خرد می‌شد، بقیه فیلم‌ها کامل و بدون پارگی بودند. همه فیلم‌های تولید شده دارای سطوح نسبتاً صافی بودند و به آسانی از سطح پلیت جدا شدند (شکل ۳).

آنالیز خواص مکانیکی فیلم‌های پلیمری

شکل ۳، تصاویر فیلم‌های پلیمری تهیه شده در این پژوهش را نشان می‌دهد. همان‌طوری‌که مشاهده می‌شود فیلم‌ها از لحاظ خصوصیات ظاهری مثل میزان شفافیت، انعطاف‌پذیری، شکنندگی، رنگ و بافت با هم تفاوت دارند.



شکل ۳- الف) فیلم نشاسته: تردی و شکنندگی زیاد، ب) فیلم ژلاتین، ج) فیلم پلی‌ونیل الکل، د) فیلم آگاروز

خصوصیات مکانیکی از مهمترین ویژگی‌های مواد پلیمری هستند. مقاومت مکانیکی بالا باعث می‌شود که فیلم در اثر وارد شدن تنش‌های مکانیکی هنگام نگهداری، جابه‌جایی و استفاده دچار خوردگی، فرسایش یا پارگی نشده و خصوصیات سطحی آن حفظ شود. همچنین میزان بازدارندگی فیلم نسبت به آب، بخار، گازها و

ترکیبات فرار بسیار مهم است. در این مطالعه برخی خصوصیات ظاهری و فیزیکی و پارامترهای مکانیکی شامل استحکام کششی (TS)، حداکثر کشش‌پذیری یا ازدیاد طول تا نقطه پارگی (%E)، سفتی و مدول یانگ برای فیلم‌های پلیمری تهیه شده (ژلاتین، پلی‌ونیل الکل و آگاروز) اندازه‌گیری شد (جدول ۲).

جدول ۲- خصوصیات مکانیکی فیلم‌های پلیمری تهیه شده. ضخامت (thickness)، حلالیت در آب (water solubility)، درصد افزایش طول تا نقطه پارگی (elongation)، استحکام کششی (tensile strength) و مدول یانگ (Young's modulus)

Young's modulus (Mpa)	tensile strength (Mpa)	Elongation (%)	Water solubility (%)	thickness (mm)	فیلم پلیمری
-	-	-	-	-	نشاسته
۱۸/۳۵	۲۲/۹۰	۱۴۱/۰۶	۶۳/۵	۰/۰۹۹	ژلاتین
۹۴/۹۲۳	۴۱/۷۵۰	۳۱۰/۴۱۵	۳/۷۵	۰/۰۸۲	پلی‌ونیل الکل
۴۴/۴۶	۱۸/۰۳	۲۲/۶۵	۳۲/۳	۰/۰۹۱	آگاروز

"شکری و همکاران، ساخت بستر کامپوزیت پلیمر- نانوذره طلا حاوی اپتامر به منظور جذب اختصاصی ..."

یانگ به ترتیب بیشتر از ۲۲/۶۵٪، ۱۸/۰۳Mpa و ۴۴/۴۶Mpa است. این مقادیر خیلی به مشخصات سایر فیلم‌های پلیمری مثل رزین اپوکسی و پلی پروپیلین نزدیک است و نشان می‌دهد که فیلم آگاروز استحکام و انعطاف‌پذیری خوبی دارد. این ویژگی مکانیکی مطلوب نتیجه ساختار سه بعدی فشرده شده ژل آگاروز است. از آنجایی که حسب کاربرد مورد نظر در این پروژه، انحلال‌پذیری خیلی زیاد یا خیلی کم در آب برای فیلم پلیمری جاذب باکتری یک ویژگی نامطلوب محسوب می‌شود، حساسیت به رطوبت فیلم‌های ساخته شده بررسی شد. نتایج نشان داد که درصد کل حلالیت در آب برای فیلم‌های ژلاتین، آگاروز و پلی‌ونیل الکل به ترتیب ۶۳/۵، ۳۲/۳ و ۵/۴۵ درصد است.

تهیه نانوکامپوزیت پلیمر با نانوذرات طلا

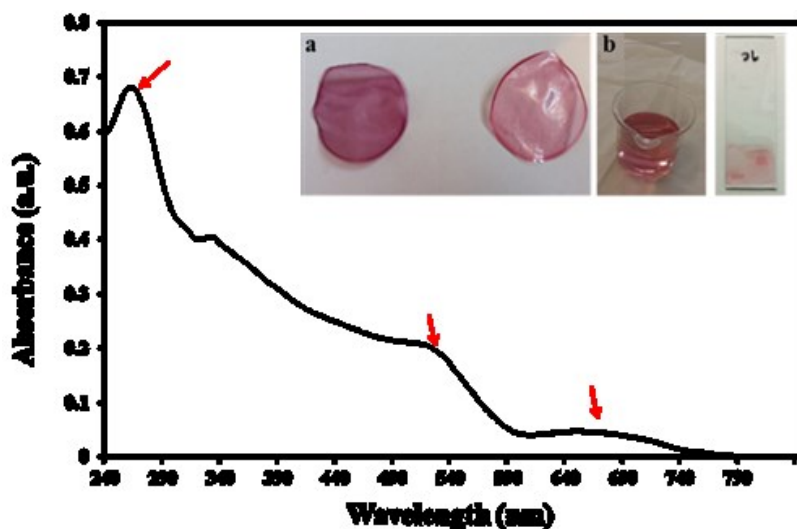
زیست فعال کردن فیلم آگاروز با نانوذرات طلا حاوی اپتامر با استفاده از طیف‌سنجی نوری بررسی شد. همان‌طوری که در شکل ۴ نشان داده شده، تثبیت اپتامر روی سطح نانوفیلم باعث جابه‌جایی قرمز در طیف و افت سیگنال پلاسمون سطحی نانوذرات طلا شده است که مطابق انتظار بوده و بیانگر تثبیت و اتصال اپتامرها روی سطح نانوفیلم است. جذب فیلم جاذب سالمونلا حاوی نانوذرات طلا سه پیک جذب در ۲۶۰، ۵۴۰ و ۶۶۰ نانومتر نشان داد (شکل ۴). باندهای جذب در ۲۶۰

برای اندازه‌گیری ضخامت فیلم‌ها از ریزسنج دستی استفاده شد. همان‌طوری که مشاهده می‌شود بر پایه نتایج به دست آمده مقایسه فیلم‌های پلیمری تفاوت چندانی از لحاظ میزان ضخامت فیلم نشان نمی‌دهند. بر پایه ویژگی‌های مکانیکی، حداکثر استحکام کششی به ترتیب مربوط به فیلم‌های پلی‌ونیل الکل (PVA)، آگاروز و ژلاتین است. نیروهای درون مولکولی سبب تردی و شکنندگی فیلم‌ها می‌شود و با اضافه کردن نرم‌کننده‌ها این نیروها کاهش یافته و هم‌چنین سیالیت زنجیره‌های پلیمری افزایش می‌یابد (Ben et al. 2022). همان‌طوری که از نتایج برمی‌آید اضافه کردن گلیسرول باعث می‌شود سیالیت پلیمرها افزایش یابد که به نوبه خود باعث افزایش درصد کشش‌پذیری (ازدیاد طول) نیز می‌شود. از این نظر فیلم پلیمری PVA بیشترین درصد ازدیاد طول (۳۱۰Mpa) و بیشترین انعطاف‌پذیری را از خود نشان داد.

همچنین فیلم‌های پلیمری از لحاظ میزان مدول الاستیکی به ترتیب از زیاد به کم به صورت پلی‌ونیل الکل > آگاروز > ژلاتین دسته‌بندی شدند. بر این اساس بیشترین حساسیت به تغییر فرم الاستیک را فیلم ژلاتینی در مقایسه با سایر فیلم‌ها داشت. همان‌طوری که مشاهده می‌شود، نتایج نشان می‌دهد که برای فیلم آگاروز مقادیر حداکثر کشش‌پذیری، استحکام کششی و مدول

نانوذره طلا زیست فعال (عامل دار شده با اپتامر سالمونلا) نشان می دهد. همان طوری که دیده می شود نسبت به فیلم آگاروز شفافیت نانوفیلم کاهش یافته و صورتی رنگ است که به دلیل حضور نانوذرات طلا است. همچنین انتقال لایه ای از این فیلم را روی سطح اسلاید شیشه ای برای مطالعه میکروسکوپی تهیه شد.

نانومتر مربوط به مولکول های اپتامر تثبیت شده روی سطح فیلم و باند جذبی در ۵۴۰ و ۶۶۰ نانومتر نیز به ترتیب ناشی از پلاسمون سطحی الکترون ها در نانوذرات طلا پراکنده و مجتمع است (Sangwan and Seth, 2021; Wani et al., 2020). این نتایج به روشنی گواه حضور نانوذرات طلا و اپتامر سالمونلا در بستر فیلم است. تصویر داخلی شکل ۴ نانوفیلم جاذب سالمونلا را حاوی



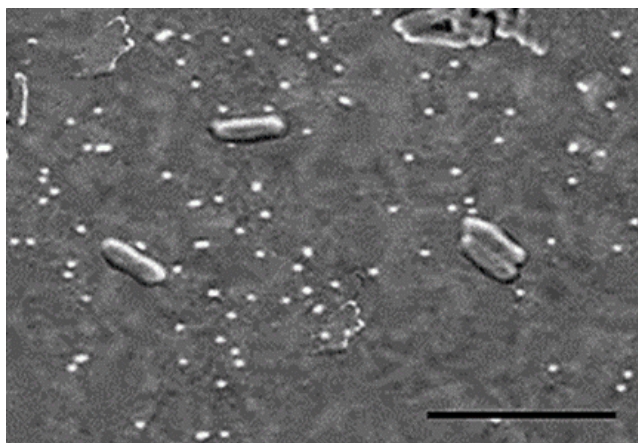
شکل ۴- طیف ماوراء بنفش- مرئی نانوفیلم جاذب سالمونلا. تصویر داخلی: نمونه نانوفیلم زیست فعال سالمونلا تهیه شده در قالب پتری دیش و انتقال لایه نازک از فیلم روی اسلاید میکروسکوپی

شد و سپس تصاویر میکروسکوپی تهیه شدند. همان طوری که در تصویر زیر (شکل ۵) مشاهده می شود، اتصال باکتری سالمونلا روی سطح نانوفیلم نشان می دهد که فرآیند زیست فعال کردن نانوفیلم موفقیت آمیز بوده است.

بررسی جذب باکتری روی سطح نانوفیلم

در ادامه برای تأیید جذب باکتری سالمونلا روی نانوفیلم از تصویربرداری با میکروسکوپ FESEM استفاده شد. برای این منظور نانوفیلم جاذب در سوسپانسیون باکتری به مدت ۶۰ دقیقه غوطه ور ماند و سپس چندین دفعه با بافر شستشو

"شکری و همکاران، ساخت بستر کامپوزیت پلیمر- نانوذره طلا حاوی اپتامر به منظور جذب اختصاصی ..."



شکل ۵- جذب باکتری روی سطح نانوفیلم در آب آلوده به سالمونلا (10^3 cfu/mL)؛ خط مقیاس ۵ میکرومتر است.

عملکرد نشان داد که نانوفیلم کامپوزیتی ساخته شده می تواند باکتری سالمونلا را به طور اختصاصی از نمونه آب آلوده جداسازی کند. دستاورد این پژوهش می تواند برای کاهش زمان و هزینه آزمایش های تشخیصی، کاهش مصرف محیط کشت، افزایش سادگی کار و توسعه آزمایش های سریع به منظور ردیابی در محل با کمترین امکانات، مورد بهره برداری و توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در قالب پروژه ۸۴۹-۰۰۰-۰۱۰-۰۵-۰۵ در محل پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی اجرا و همچنین تحت حمایت مادی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) برگرفته شده از طرح شماره ۴۰۲۰۵۲۵ انجام شده است.

References

نتیجه گیری

بیوپلیمرها موادی ایده آل برای افزودن ترکیبات عمل گرایی مانند، آنتی بادی ها، کاوشگرهای دی.ان.ا، آنزیم ها، آنتی اکسیدان ها، ضد میکروب ها و نانوذرات هستند و به خوبی قابلیت کامپوزیت شدن را دارند. در این پژوهش فیلم جاذب باکتری سالمونلا از ترکیب آگاروز، گلیسرول و نانوذرات طلا زیست فعال ساخته شد. نتایج نشان داد که خصوصیات مکانیکی فیلم ساخته شده خیلی به مشخصات سایر فیلم های پلیمری مثل رزین اپوکسی و پلی پروپیلین نزدیک بوده و نشان می دهد که فیلم آگار استحکام و انعطاف پذیری خوبی دارد. همچنین از مزیت های دیگر آگاروز می توان به زیست سازگاری، بی اثری، ژله ای شدن و محتوای زیاد آب که به هیدراتاسیون سلول های باکتریایی کمک می کند، اشاره کرد. ارزیابی

فهرست منابع

- Antunes P, Mourão J, Campos J, Peixe L. 2016.** Salmonellosis: the role of poultry meat. *Clinical microbiology and infection*. 22: 110-121.
- Barak JD and Liang AS. 2008.** Role of soil, crop debris, and a plant pathogen in *Salmonella enterica* contamination of tomato plants. *Plos one*. 3(2): e1657.
- Barrere V, Tompkins E, Armstrong M, Bird P, Bastin B, Goodridge L. 2020.** Optimization of *Salmonella* detection in garlic, onion, cinnamon, red chili pepper powders and green tea. *International journal of food microbiology*. 316: 108440.
- Ben ZY, Samsudin H, Yhaya MF. 2022.** Glycerol: Its properties, polymer synthesis, and applications in starch based films. *European Polymer Journal*. 175: 111377.
- Besser JM. 2018.** *Salmonella* epidemiology: A whirlwind of change. *Food microbiology*. 71: 55-59.
- Chircov C, Grumezescu AM, Holban AM. 2019.** Magnetic particles for advanced molecular diagnosis. *Materials*. 12(13):2158.
- Dar MA, Ahmad SM, Bhat SA, Ahmed R, Urwat U, Mumtaz PT, Bhat SA, Dar TA, Shah RA, Ganai NA. 2017.** *Salmonella typhimurium* in poultry: A review. *World's Poultry Science Journal*. 73: 345-354.
- Dong J, Carpinone PL, Pyrgiotakis G, Demokritou P, Moudgil BM. 2020.** Synthesis of precision gold nanoparticles using Turkevich method. *KONA Powder and Particle Journal*. 37: 224-232.
- Ehuwa O, Jaiswal AK, Jaiswal S. 2021.** *Salmonella*, food safety and food handling practices. *Foods*. 10(5):907.
- Herrera BY and Jabib RL. 2015.** Salmonellosis, avian zoonosis and a very particular pathogenesis. *REDVET. Electronic Veterinary Journal*. 16(1): 1-19.
- Mayahi M, Talazadeh F, Jafari RA, Zamanian VK. 2017.** Isolation of *Salmonella* from Iranian broiler breeder farms and feed. *Journal of Veterinary Clinical Pathology*. 11(3): 263-275. (In Farsi with English abstract)
- Nithya A and Babu S. 2017.** Prevalence of plant beneficial and human pathogenic bacteria isolated from salad vegetables in India. *BMC Microbiology*. 17: 1-16.
- Nwabor OF, Dickson ID, Ajibo QC. 2015.** Epidemiology of *Salmonella* and salmonellosis. *International letters of natural sciences*. 47.
- O'Neill A, Alesa SA, Proano L. 2024.** *Salmonella* (salmonellosis and typhoid fever) attack. In *Ciottone's Disaster Medicine* (pp. 772-774). Elsevier.
- Popa GL and Papa MI. 2021.** *Salmonella* spp. infection-a continuous threat worldwide. *Germs*. 11(1): 88.
- Sangwan S and Seth R. 2021.** Synthesis, characterization and stability of gold nanoparticles (AuNPs) in different buffer systems. *Journal of Cluster Science*. 1-16.
- Smolinski H and Ryser ET. 2018.** Microbiology of fresh and processed vegetables. *Handbook of Vegetables and Vegetable Processing*. 1: 915-940.
- Tan L, Ray Jones T, Poitras J, Xie J, Liu X, Southam G. 2020.** Biochemical synthesis of palladium nanoparticles: The influence of chemical fixatives used in electron microscopy on nanoparticle formation and catalytic performance. *Journal of Hazardous Materials*. 398: 122945.
- Tin D, Sabeti P, Ciottone GR. 2022.** Bioterrorism: An analysis of biological agents used in terrorist events. *American journal of emergency medicine*. 54: 117-121.
- Usman AI, Aziz AA, Noqta OA. 2019.** Green sonochemical synthesis of gold nanoparticles using palm oil leaves extracts. *Materials Today: Proceedings*. 7: 803-807.
- Wang M, Zhang Y, Tian F, Liu X, Du S, Ren G. 2021.** Overview of rapid detection methods for *Salmonella* in foods: Progress and challenges. *Foods*. 10: 2402.

"شکری و همکاران، ساخت بستر کامپوزیت پلیمر- نانوذره طلا حاوی اپتامر به منظور جذب اختصاصی ..."

Wani TA., Alsaif N, Bakheit AH, Zargar S, Al-Mehizia AA, Khan AA. 2020. Interaction of an abiraterone with calf thymus DNA: Investigation with spectroscopic technique and modelling studies. *Bioorganic Chemistry*. 100: 103957.

Xie Y, Nitin N, Harris L.J. 2023. Transfer of *Enterococcus faecium* and *Salmonella enterica* during simulated postharvest handling of yellow onions (*Allium cepa*). *Food Microbiology*. 115: 104340.

Xu Y, Hassan MM, Sharma AS, Li H, Chen Q. 2023. Recent advancement in nano-optical strategies for detection of pathogenic bacteria and their metabolites in food safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 63(4):486-504.

The Development of a Composite Substrate of Polymer and Gold Nanoparticles, Integrated with Aptamers, Aimed at the Capture of Salmonella Bacteria from Aquatic Environment

Ehsan Shokri^{1*}, Maryam Asnaashari², Najmeh Nasiri³, Saeed Soheilvand⁴

1- Assistant Professor, Department of Nanotechnology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

2- Assistant Professor, Department of Animal Processing, Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

3- PhD Candidate in Molecular Plant Breeding and Genetic Engineering

4- Assistant Professor, Department of Microbial Biotechnology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

e.shokri@abrii.ac.ir

Abstract

The implications of *salmonella* contamination extend significantly across both economic and public health domains at both national and global scales. Consequently, the ongoing surveillance and assessment of *Salmonella* presence in water, food products and environmental contexts are crucial for ensuring food safety and enhancing biosecurity measures. Regrettably, the prevalence of negligence and the limited availability of affordable and straightforward detection techniques for *Salmonella*, particularly in middle- and low-income nations, contribute to excessive and inappropriate utilization of antibiotics and chemicals within healthcare and agricultural sectors, including livestock, poultry, and aquaculture. Presently, the rise of antibiotic resistance among certain invasive and harmful organisms renders salmonella a considerable biosecurity concern. This study explored the feasibility of isolating *Salmonella* bacteria utilizing a laboratory-developed absorbent substrate. The findings indicated that a 2% agarose polymer film infused with 40% glycerol and bio-activated with gold nanoparticles linked to an aptamer can effectively isolate *Salmonella* bacteria from water samples. This innovative separation technique has the potential to enhance current diagnostic practices while simultaneously reducing both costs and the duration of investigations.

Keywords: Aptamer, Biosecurity, Composite, *Salmonella* Pathogen.