پژوهش های شیمی
C
R

طراحی زیست حسگر کاغذی آنزیم استیل‌کولین استراز برای اندازه گیری باقیمانده سموم در محصولات کشاورزی

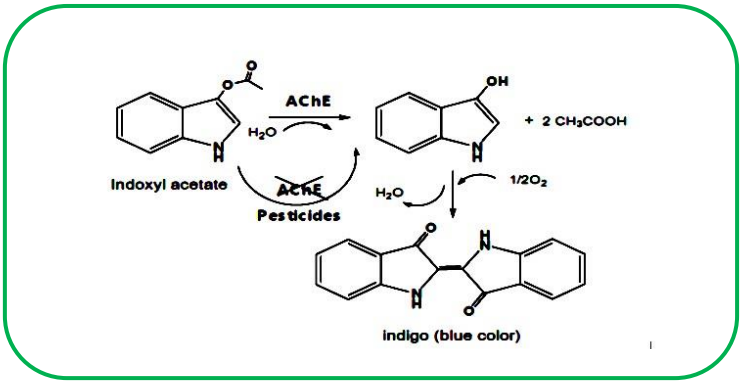
محسن مروتی*

موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ولنجک، تهران

تاریخ دریافت: ۹ بهمن ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۷ خرداد ۱۴۰۲

چکیده: مصرف بی رویه آفت‌کش‌ها در کشاورزی و در راستاي سلامت جامعه، محصولات تولیدشده باید به طور پیوسته پایش و ردیابی شوند. روش‌های فعلی اندازه‌گیری باقی‌مانده سموم در بهترین شرایط ۲ الی ۳ روز به طول خواهد انجامید و نیاز به دستگاه های پیشرفته و هزینه‌های بالا دارد. طرح فعلی با استفاده از روش حسگرهای نواری-کاغذی روشی سریع، آسان و کم هزینه جهت ردیابی آفت‌کش‌های گروه ارگانوفسفره و کاربامات با بازداری فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز را ارائه می‌دهد. نتایج به‌دست آمده با استفاده از ۷ غلظت مختلف (۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱ ، ۵ و ۱۰ میکروگرم/میلی لیتر) از آفت‌کش‌های دیازینون، تری‌کلروفن، کاربوفوران و پیریمیکارب در نمونه کاهوي آلوده‌شده که با زیست حسگر کاغذی آزمایش شدند، نشانگر حد کمی (LOQ) حشره‌کش‌های مورد نظر به ترتیب ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۱ میکروگرم/میلی‌لیتر می‌باشد. با توجه به نتایج به‌دست آمده، این روش می‌تواند به عنوان یک روش سریع، کم هزینه و در محل جهت پایش باقیمانده سموم ارگانوفسفره و کاربامات در محصولات کشاورزی پیشنهاد گردد. این روش نیاز به تکنسین های آموزش دیده ندارد.

کلید واژه: سم ارگانوفسفره، کاربامات، روش نوین سریع، آفت‌کش‌ها، آزمایش در محل



۱- مقدمه

افزايش بي رويه مصرف آفت‌كش‌ها و كودهاي شيميايي به منظور افزايش ميزان محصولات باغي و زراعي، در كنار صنعتي‌شدن كشورها، دنيا را با خطر آلودگي محصولات غذايي و محيط زيست روبرو كرده است. بدون كنترل آفات ۵۶ تا ۷۳ درصد محصولات كشاورزي از بين مي‌روند در حاليكه با استفاده از روشهاي مختلف كنترل آفات مي‌توان ۴۰ تا ۶۰ درصد اين خسارت را كاهش داد. در بين روش‌هاي كنترل آفات، استفاده از آفت‌كش‌ها چه به صورت يك روش منحصر و چه در قالب برنامه‌هاي مديريت تلفيقي آفات اهميت خاصي دارد. بيش از ۵۰ درصد از سموم مورد استفاده در زيست‌بوم روي منطقه هدف يعني گياهان قرار نمي‌گيرد و به دوش‌هاي مختلف وارد محيط-زيست مي‌شود. قسمتي از سموم مصرفي درون گياه سم-پاشي شده باقي مي‌ماند كه چنانچه اين مقدار پس از گذشت زمان معين، از حد مجاز شناخته‌شده بالاتر باشد، به‌عنوان باقي‌مانده خطرناك محسوب مي‌شود. اين مشكل به‌ويژه در مورد محصولاتی كه به صورت تازه خوری مصرف می‌شوند (مانند خيار، گوجه‌فرنگی، كاهو و ديگر سبزی‌ها) اهميت بيشتری پيدا می‌كند. طبق آمارهاي رسمي، در سال-هاي ۱۳۶۵ تا ۱۳۷۰، سالانه بين ۳۵ تا ۶۰ هزار تن از انواع مختلف آفت‌كش‌ها در بخش كشاورزي كشور مصرف گرديده است [۱ و ۲]. ميزان مصرف آفت‌كش‌ها در سال ۱۴۰۰ به حدود ۱۹ هزار تن رسيده است [۳].

آفت‌کش‌های شیمیائی می‌توانند باعث بروز بیماری‌های عصبی نظیر پارکینسون [۴ و ۵]، انواع سرطان در کودکان [۶]، سقط جنین و ناقص الخلقه بودن [۷] گردند. بنابراین، تعیین باقی‌مانده سموم در این محصولات و مقایسه آن با حد مجاز استاندارد ملی از نظر بهداشت عمومی جامعه اهمیت به‌سزائی دارد. در حال حاضر بالاترین میزان مصرف آفت‌کش‌ها شامل دو خانواده عمده ارگانوفسفره و کاربامات است که اثرهاي سمی آن‌ها با بازداری فعالیت آنزیم استیل-کولین استراز در سامانه عصب مرکزی آغاز می‌گردد که منجر به تجمع انتقال‌دهنده‌هاي عصبي استیل‌کولین در محل سیناپس‌ها می‌گردد [۸ و ۹]. این عمل باعث ایجاد علایم مسمویت شامل سردرد، افزایش ترشح بزاق دهان، تشنج، کاهش تنفس و در آخر مرگ می‌شود.

در حال حاضر نمونه‌برداری و اندازه‌گیری آفت‌کش‌ها در محصولات کشاورزی در بهترین شرایط ۲ الی ۳ روز به طول خواهد انجامید و نیاز به هزینه‌های بالای مواد شیمیایی و دستگاه‌های پیشرفته و گران قیمتی مانند کروماتوگرافي گازي/طیف‌سنجي جرمي و کروماتوگرافي مایع/طیف‌سنجي جرمي دارد [۱۲-۱۰]. اگرچه این روش-ها، دقت و حساسیت بالایی دارند، اما مدت‌زمان طولانی، هزینه بالا، کارشناسان ماهر و روش‌های آماده‌سازی وقت-گیر آن، محصولات را از تازگی می‌اندازد (به‌ویژه محصولاتی که به‌صورت تازه‌خوری مصرف می‌شوند و امکان ارسال محموله‌های تولیدشده به مصرف‌کننده در زمان مقرر میسر نیست). در چند دهه اخیر، روش‌های زیادي شامل زیست‌حسگرهای الکتروشیمیایی و نورشناختی به عنوان روش جایگزین ساخته و بررسی شده‌اند [۲۰-۱۳]. با این وجود، این زیست‌حسگرها نیز نیاز به کارشناسان کارآزموده و ماهر و دستگاه‌های مختلف دارد که برای استفاده در محل و میادین میوه و تره‌بار مناسب نمی باشد. به همین دلیل امکان آزمایش سریع، در محل، ساده و کم‌هزینه آفت‌کش‌ها امری ضروری می‌باشد. این پژوهش سعي دارد با استفاده از حسگرهای نواری-کاغذی، روشی سریع، آسان و کم‌هزینه براي ردیابی آفت‌کش‌های گروه ارگانوفسفره و کاربامات با بازداری فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز ارائه کند.

روش‌های دیگری نیز بر پایه ایمونوکروماتوگرافی وجود دارد که در آن از آنتی‌بادی‌های اختصاصی که برای بعضی آفت‌کش‌ها ساخته شده، استفاده گردیده است که متاسفانه، به‌دلیل محدودیت قابلیت شناسایی آفت‌کش‌ها و عدم تشخیص آفت‌کش‌های مجهول و هزینه بالای آنتی‌بادی‌ها، خیلی کاربردی نمی‌باشد [۲۳-۲۱]. در حال حاضر، فناوری جدید نوارهای حسگر کاغذی یا شبیه کاغذ به عنوان روشی سریع و ارزان مورد بررسی قرار گرفته است [۲۷-۲۴]. این نوع پژوهش‌ها بر پایه بازداری فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز در مواجهه با آفت‌کش‌ها روی کاغذ و اندازه‌گیری ماده رنگی ایجادشده توسط واکنش آب‌کافت کاتالیزشده با این آنزیم با مواد رنگ‌زا می‌باشد. در این‌گونه روش‌ها، مواد رنگ‌زای مختلفی مانند ۵′،۵-دي‌تیوبیس(۲-نیتروبنزوییک اسید)، ایندوفنیل استات و ایندوکسیل استات روی انواع مختلف کاغذ استفاده شده است [۳۲-۲۸]. هزینه پایین تولید و مصرف، قابلیت تجزیه در محیط و دوست‌دار محیط‌زیست بودن، آساني استفاده بدون نیاز به استفاده از الکتریسیته یا منبع تغذیه بیرونی توجه پژوهشگران را به خود جلب کرده است [۳۳ و ۳۴]. تاریخچه استفاده از حسگرهای کاغذی به سال ۱۹۵۶ زمانی که ماریون و همکارانش گزارش ساخت حسگر کاغذی جهت اندازه‌گیری گلوکز در ادرار را دادند، برمی‌گردد [۳۵]. با توسعه مکرر این روش در دهه‌های اخیر به همراه دیگر روش‌های ردیابی، حسگرهای نواری از جایگاه خاصی در آزمون‌های آلاینده‌ها در غذا برخوردار شده‌اند. حسگرهای نواری-کاغذی یک روش ردیابی است که بر اساس مشاهده عینی یا آنالیز کمی به صورت رنگ، فلورسنس یا تغییرهاي مغناطیسی وقتی که نوار آماده‌شده در تماس با نمونه مورد آزمایش قرار می‌گیرد، عمل می‌نماید [۳۳ و ۳۶-۳۸]. روش حسگرهای نواری-کاغذی نسبتا ساده می‌باشد. معمولا یک حسگر نواری به مواد شیمیایی مورد نظر آغشته و با روش خاصی خشک می‌گردد. به راحتی با ریختن قطره‌ای از نمونه بر روی آن و یا با فرو بردن نوار در محلول نمونه قابل استفاده می‌باشد. بنابراین، مصرف‌کنندگان می‌توانند به-راحتی و بدون هیچ‌گونه آموزشی از آن استفاده کنند. در مجموع، این روش به آسانی انجام‌پذیر است، سریع انجام می‌گیرد، به لوازم و دستگاه‌های گران‌قیمت و پیچیده نیازی ندارد و نتایج در مدت زمان کوتاهی آماده بهره‌برداری هستند. مطالعه‌هاي متعددی درباره استفاده از حسگرهای کاغذی جهت ردیابی پاتوژن‌ها، زهرابه و سموم در غذا، آب و محیط‌زیست انجام و گزارش شده‌اند. بیشتر این حسگرها با غیرفعال‌کردن زیست‌حسگرها/ زیست‌نشانگرها روی کاغذ ساخته شده‌اند. زیست‌حسگرهای مختلفی برای انجام این‌گونه آزمون‌ها انتخاب شده‌اند که شامل آنزیم‌ها، آپتامرهای دی.ان.آ، فازها و یاخته‌ها می‌باشند [۲۹ و ۳۹-۴۶].

۲- روش تحقیق

۲-۱- مواد شیمیایی مورد نیاز

سدیم لوریل سولفات، ایندوکسیل استات، آنزیم استیل‌کولین استراز (EC 3.1.1.7, *Electrophorus electricus*)، سوکروز و کزین، چهار استاندارد سموم شامل دو حشره‌کش ارگانوفسفره دیازینون و تریکلرفن و دو حشره‌کش کاربامات کاربوفوران و پریمیکارب از شرکت زیگما-آلدریچ خریداری گردید. مواد شیمیایی دیگر مانند متانول، دی‌سدیم هیدروژن اورتوفسفات، سدیم دی-هیدروژن‌فسفات از شرکت مرک خریداری گردید. بوریک

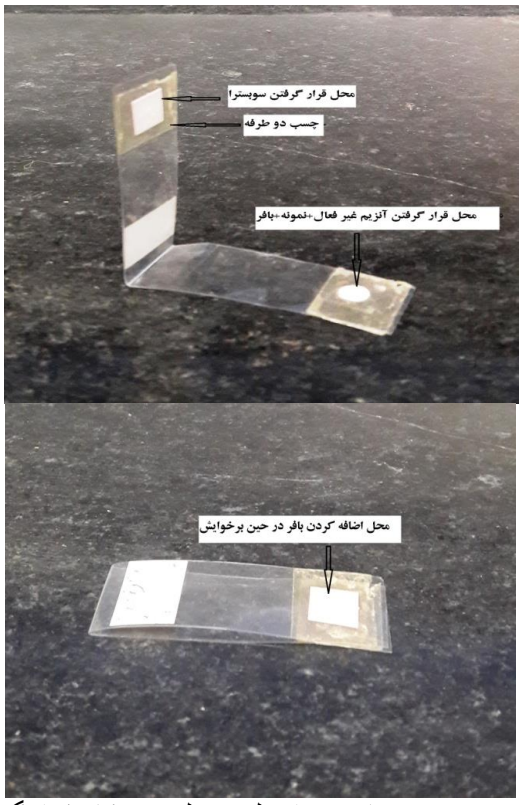
اسید و سدیم دودسیل سولفات نیز از شرکت بیوساین خریداری شد. در این آزمایش‌ها، از کاغذ صافي واتمن شماره ۱ و از ورقه‌های پلی پروپیلین برای ساخت نوار استفاده گردید .

۲-۲- روش تهیه مواد شیمیایی

آنزیم استیل‌کولین استراز با غلظت ۸۰۰ واحد در میلی-لیتر در بافر فسفات/سالین (۲۰ میلي‌مولار با pH برابر ۷/۴) تهیه گردید. در این پژوهش، سوبسترا با غلظت ۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر ایندوکسیل استات در متانول آماده و از دو محلول بازدارنده و محلول شست‌وشو نیز برای مراحل بعدی استفاده گردید. محلول بازدارنده شامل بافر بوریک اسید (۵۰ میلي-مولار با pH برابر ۸/۳) به همراه ۰/۵ درصد (w/v) کزین و محلول شست‌وشو شامل بافر فسفات (۵۰ میلي‌مولار با pH برابر ۷/۵) به همراه ۰/۰۱ درصد (w/v) سدیم دودسیل سولفات می‌باشد. محلول مادر حشره‌کش‌های مورد آزمایش (۱۰۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) در متانول آماده گردید. براي رقیق‌کردن و ساخت غلظت‌های مختلف از این محلول مادر، از بافر فسفات/سالین ۲۰ میلي‌مولار استفاده گردید. در این پژوهش، هفت غلظت از سم‌ها (۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱ ، ۵ و ۱۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) تهیه و استفاده شد.

در این روش از نوار پلاستیکی پلی‌پروپیلین که صورت پوشه‌ای تاشده بود استفاده گردید. جهت آماده‌سازی نوارهای پلی‌پروپیلین، قطعات ۲×۱۰ سانتی‌متر بریده، از وسط تا و دو سر آن بر روی هم قرار داده شد. سپس، در دو سر این نوار دو پانچ به قطر ۶ میلیمتر ایجاد شد به طوری که زمان تاکردن این دو پانچ مقابل یکدیگر قرار بگیرند. از محل پانچ برای ریختن بافر استفاده گردید. در یک سر این نوار، یک عدد کاغذ صافي دایره‌ای حاوی آنزیم و در سر دیگر آن یک عدد کاغذ صافي مربع شکل حاوی سوبسترا قرار داده شد. کاغذهای صافي توسط چسب‌های نواری دو طرفه که قبلا در دوسر نوارها قرار داده شده بود، در جای خود نصب شدند (تصویر ۱).کاغذهای صافي دایره‌ای با قطر ۶ میلی‌متر برای قرار دادن آنزیم استیل-کولین استراز آماده و مقدار ۵ میکرولیتر از آنزیم (۸۰۰ واحد/ میلی‌لیتر) بروی آن قرار داده شد و جهت خشک شدن به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. سپس این کاغذها به مدت ۲۰ دقیقه در محلول بازدارنده در دمای اتاق قرار گرفت و بعد از آن به مدت ۳۰ دقیقه در محلول شست و شو گذاشته شد و سپس به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق خشک گردیدند. کاغذهای حاوی آنزیم در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان استفاده نگهداری شدند [۴۷]. کاغذهای صافي دیگری به صورت مربع و با ابعاد ۱۰×۱۰ میلی‌متر جهت قراردادن سوبسترا آماده گردیدند. سپس، ۲۰ میکرولیتر از ایندوکسیل استات (۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر در متانول) روی هرکدام از این کاغذهای مربع شکل قرار داده شد و پس از خشک‌شدن در درون نایلون‌های زیپ‌دار در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان مصرف قرار داده شد. در زمان استفاده، این دو کاغذ صافي در دو سر نوار پلاستیکی تاشده قرار داده شد و از آن برای اندازه‌گیری میزان باقی‌مانده آفت‌کش‌ها در محصولات استفاده گردید.

براي اندازه‌گیری باقی‌مانده سم‌ها با نوارهای حسگر، در وهله اول نیاز به تایید عملکرد آنزیم و بهینه‌سازی مقدار آن می‌باشد که از نوار شاهد با دو غلظت ۵ و ۱۰ میکرولیتر آنزیم استیل کولین استراز استفاده گردید. پس از آماده‌سازی بستر، مقدار ۱۰ میکرولیتر از بافر فسفات/سالین بروی کاغذ صافي حاوی آنزیم چکانده شد و براي فعال‌کردن آنزیم به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در دمای محیط برخواب شد.



تصویر ۱. نحوه ساخت نوار پلی‌پروپلین و مکان قرارگرفتن کاغذ آغشته به آنزیم و سوبسترا را نشان می‌دهد.

سپس دو لبه نوار بهم چسبانده شد و سپس در پانچ ایجادشده، دو بار و به فاصله ۵ دقیقه، ۱۰ میکرولیتر از بافر فسفات/سالین چکانده شد تا واکنش آنزیم و ایندوکسیل استات کامل گردد. سپس رنگ ایجادشده حاصل از آب‌کافت ایندوکسیل استات توسط آنزیم بررسی گردید. این رنگ به صورت آبی/سبز نمایان می‌گردد و شدت رنگ ایجادشده نشانه فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز می‌باشد، بدین معنی که هرچه رنگ ایجادشده بیشتر باشد، فعالیت آنزیم بیشتر و هرچه کمرنگ تر باشد، آنزیم فعالیت کمتری داشته است.

پس از حصول اطمینان از فعالیت آنزیم، در مرحله بعد تاثیر سم‌هاي مورد آزمایش در جلوگیری از فعالیت آنزیم مورد شد. برای این منظور، هفت غلظت (۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۵ و ۱۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) از محلول استاندارد آفت‌کش‌های ارگانوفسفره (دیازینون و تریکلروفن) و کاربامات (کاربوفوران و پریمیکارب) در بافر فسفات/سالین آماده شدند. در این مرحله طبق روش بالا، نوارهای داراي آنزیم و ایندوکسیل استات با غلظت‌های مختلف آفت‌کش آغشته شد. پس از برخوابش به مدت ۱۰ دقیقه، دو لبه نوار به‌هم چسبیده شد تا آنزیم و سوبسترا در تماس با هم قرار گیرند. پس از آن، دو بار و با فاصله ۵ دقیقه، مقدار ۱۰ میکرولیتر بافر فسفات/سالین از محل پانچ نوار روی کاغذهای صافي چکانده شد تا محل آزمایش مرطوب بماند. سپس میزان رنگ ایجادشده بررسی شد. در این قسمت میزان رنگ ایجادشده با غلظت استاندارد سم‌هاي استفاده شده بررسی و به عنوان درجه آلودگی تعیین شد. جهت سهولت در کار و در محل اندازه‌گیری میزان باقی‌مانده سم‌ها، می‌توان رنگ ایجادشده را همانند کاغذ pH با مقدار از قبل کالیبره‌شده غلظت‌های مختلف مقایسه نمود [۴۷-۴۹].

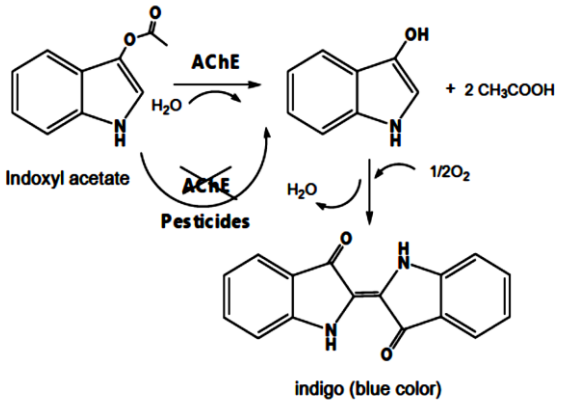
۳-۲- روش اندازه گیری چهار آفت‌کش در نمونه کاهو

پس از آماده‌سازی مراحل اولیه آزمایش و آزمون‌های اولیه روی استاندارد آفت‌کش‌های مدنظر، با تهیه کاهوي ارگانیک و آلوده کردن آن با مقدارهاي گفته‌شده از هفت غلظت چهار آفت‌کش تحت آزمایش، مرحله آلوده‌سازی مصنوعی محصول نیز انجام شد. جهت آلوده‌سازی کاهوی ارگانیک و اندازه‌گیری میزان آلودگی، غلظت‌های گفته‌شده از آفت‌کش‌های مدنظر به کاهوی کاملا ریز و خرد شده اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری گردید. روز بعد ۱ گرم از این کاهو در داخل بافر فسفات/سالین به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری و پس از صاف‌کردن عصاره، ۱۰ میکرولیتر از محلول به‌دست آمده،روی نوارهای آماده-شده چکانده و بر اساس روش‌هاي بالا مورد بررسی قرار گرفت.

۳- نتایج و بحث

استفاده از زیست حسگر کاغذی برای اندازه گیری کمی و کیفی آفت‌کش‌های ارگانوفسفره و کاربامات یک روش نوین است که برای اولین بار در کشور آزمایش می شود. در این روش، از کاغذ صافي (واتمن شماره ۱) به عنوان محل نگهدارنده آنزیم استیل‌کولین استراز و سوبسترای آن یعنی ایندوکسیل استات استفاده گردید. سوبستراهای متفاوتی وجود دارد اما به دلیل قیمت مناسب و عملکرد قابل قبول از ایندوکسیل استات در پژوهش فعلی استفاده گردید. در این روش آب‌کافت ایندوکسیل استات به ایندیگو توسط استیل‌کولین استراز باعث ایجاد رنگ آبی طی فرآیند نشان داده شده در تصویر ۲ می‌گردد.

شناسایی و ردیابی حشره‌کش‌ها در این روش براساس بازداری آنزیم استیل‌کولین استراز با آفت‌کش‌های ارگانوفسفره و کاربامات می‌باشد که باعث کاهش فعالیت آنزیم و کاهش میزان آب‌کافت ایندوکسیل استات و در نهایت کاهش میزان رنگ تولید شده توسط ایندوکسیل استات آب-کافت‌شده می‌باشد که می‌توان با چشم غیرمسلح نیز آن را مشاهده نمود.



تصویر ۲. سازکار آب-کافت ایندوکسیل استات کاتالیزشده توسط آنزیم استیل‌کولین استراز.

حساسیت روش نوارحسگر حاوی استیل‌کولین استراز توسط عامل‌های مختلفی تاثیر می‌پذیرد که شامل غلظت‌های متفاوت آنزیم و سوبسترای آن ایندوکسیل استات، میزان رطوبت کاغذها و زمان برخوابش می‌باشد. بنابراین، بررسي‌هايي برای انتخاب شرایط بهینه که در بالا گفته شد، انجام پذیرفت. نتایج نشان داد که مقدار ۸۰۰ واحد/میلی‌لیتر آنزیم استیل‌کولین استراز و ۵ میکرولیتر آنزیم روی کاغذ صافي مقدارهاي بهینه بودند. میزان ۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر ایندوکسیل استات نیز بهترین غلظت برای این ماده بود زیرا کمتر و بیشتر از این میزان باعث ایجاد رنگ کمتری می‌شد. پس از تعیین شرایط بهینه آزمایش، کارایي زیست‌حسگر کاغذی برپایه آنزیم استیل‌کولین استراز با استاندارد دو حشره‌کش ارگانوفسفره دیازینون و تریکلروفن و دو حشره-کش کاربامات کاربوفوران و پریمیکارب آزمایش شد. در این مرحله هفت غلظت (۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱ ، ۵ و ۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) از هرکدام از استانداردها در بافرفسفات /سالین آماده شدند. همان‌طور که گفته شد، برای کالیبره کردن میزان مناسب آنزیم، از دو میزان ۵ و ۱۰ میکرولیتر جهت انجام آزمایش‌ها استفاده گردید. نتایج نشانگر عملکرد خوب هر دو غلظت بودند و میزان رنگ به‌دست آمده در هر دو غلظت واضح و کافی بود. اگرچه رنگ ایجاد شده در نوار حاوی ۱۰ میکرولیتر آنزیم به

مراتب پررنگ‌تر بود (تصویرهاي ۳ الف و ب)، اما در نتایج به‌دست آمده در بررسی تاثیر سموم مورد استفاده هیچ‌گونه تفاوت فاحشی دیده نشد. بنابراین جهت صرفه‌جویی در میزان مصرفی آنزیم، در همه آزمایش‌هاي بعدی از مقدار ۵ میکرولیتر آنزیم برای هر نوار استفاده گردید. نکته قابل توجه دیگر در این روش میزان رطوبت محل واکنش آنزیم و سوبسترا می‌باشد. برای این‌که بتوان این محل را در مدت زمان آزمایش مرطوب نگه داشت از محل پانچ روی نوار بافر فسفات/سالین اضافه گردید. در این راستا، زمان‌های مختلف و میزان بافر مختلف نیز مورد آزمایش قرار گرفت و مقدار بهینه آن ۱۰ میکرولیتر از بافر فسفات/سالین به فاصله ۵ دقیقه بود تا واکنش بین آنزیم و سوبسترا به خوبی انجام پذیرد.

الف ب

تصویر۳. الف: ۵ میکرولیتر آنزیم و **ب:** ۱۰ میکرولیتر آنزیم.

در این پژوهش، براي تعیین زمان مناسب برخوابش استاندارد سموم و آنزیم استیل‌کولین استراز، از حشره‌کش پریمیکارب استفاده گردید. مقدار ۱۰ میکرولیتر از غلظت های ۱، ۱۰ و ۵۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر از این حشره‌کش روی محل آزمون اضافه گردید (کاغذ صافي دایره‌اي شکل که حاوی آنزیم است) و در زمان‌های ۰، ۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه عمل برخوابش اجرا گردید. طی مدت برخوابش دو بار بافر فسفات/سالین از محل پانچ‌شده به محل آزمون اضافه شد. نتایج نشانگر کاهش رنگ ایجادشده با افزایش غلظت حشره‌کش پریمیکارب بود. زمان برخوابش نیز تا ۱۰ دقیقه افزایش داشت و با افزایش این زمان، تغییر قابل ملاحظه‌ای مشاهده نگردید. بنابراین زمان برخوابش ۱۰ دقیقه به عنوان زمان بهینه انتخاب شد. حد تشخیص براي حشره‌کش‌های دیازینون، تریکلروفن، کاربوفوران و پریمیکارب به ترتیب ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۱میکروگرم/ میلی‌لیتر تشخیص داده شد. تفاوت بین حد تشخیص‌های به‌دست آمده به‌دلیل مقدار ثابت نرخ زیست‌مولکولی بازداری آنزیم استیل‌کولین استراز توسط حشره‌کش‌ها می‌باشد.

تصویر ۴، آزمون استفاده از زیست حسگر کاغذی برای حشره‌کش دیازینون برای هفت غلظت ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۵ و ۱۰میکروگرم/میلی‌لیتر در کاهوي آلوده‌شده می‌باشد. در کنار آنها نیز نوار شاهد جهت مقایسه آورده شده است. شایان ذکر است که تغییر فاحشي در رنگ نوار با غلظت ۰/۰۵ میکروگرم/میلی‌لیتر از حشره‌کش دیارینون مشاهده می‌شود و در نوارهایی که غلظت‌های ۱ تا ۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر در آنها استفاده شده، هیچگونه رنگی مشاهده نشد که نشانگر جلوگیری کامل فعالیت آنزیم توسط حشره‌کش دیازینون می‌باشد.

C 0.01 0.05 0.1 0.5 1 5 10

تصویر۴. تغییر رنگ زیست حسگر کاغذی نسبت به غلظت‌های مختلف حشره‌کش دیازینون (میکروگرم/میلی‌لیتر) در کاهوي آلوده‌سازی شده و تاثیر آن در جلوگیری از فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز.

تصویر ۵ فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز در مواجهه با غلظت‌های مختلف حشره‌کش تریکلروفن در کاهوي آلوده‌شده را نشان می‌دهد. کاهش فاحش و قابل مشاهده در رنگ ایجادشده از ترکیب آنزیم استیل‌کولین استراز و ایندوکسیل استات در غلظت ۰/۱ میکروگرم/میلی‌لیتر از حشره‌کش تریکلروفن با چشم قابل تشخیص می‌باشد و با افزایش این غلظت کاهش رنگ مشاهده می‌گردد. از غلظت ۱ تا ۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر تقریبا رنگی دال بر فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز دیده نمی‌شود.

C 0.01 0.05 0.1 0.5 1 5 10

تصویر ۵. تغییر رنگ زیست حسگر کاغذی نسبت به غلظت‌های مختلف استاندارد حشره‌کش تریکلروفن (میکروگرم/میلی‌لیتر) در کاهوي آلوده‌سازی‌شده و تاثیر آن در جلوگیری از فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز.

در مقایسه با دو حشره‌کش ارگانوفسفره، نتایج نشان‌دهنده قابلیت بالاتر حشره‌کش‌های کاربامات وکاربوفوران در جلوگیری از فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز می‌باشد و در عمل کاهش چشمگیر ایجاد رنگ حاصل از ترکیب آنزیم و ایندوکسیل استات را می توان از غلظت ۰/۰۱ میکروگرم/میلی‌لیتر کاربوفوران مشاهده نمود. از این غلظت به بالا می‌توان بلوکه‌شدن کامل آنزیم که باعث عدم ایجاد رنگ در حسگرها می‌باشد را مشاهده کرد (تصویر ۶).

تصویر ۶. تغییر رنگ زیست حسگر کاغذی نسبت به غلظت‌های مختلف حشره‌کش کاربوفوران (میکروگرم/میلی‌لیتر) در کاهوي آلوده‌سازی‌شده و تاثیر آن در جلوگیری از فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز.

حشره‌کش پریمیکارب نیز که از خانواده کارباماتها می‌باشد، رفتاري مانند حشره‌کش کاربوفوران روی آنزیم نشان می‌دهد به‌طوری‌که از پایین‌ترین غلظت یعنی ۰/۰۱ میکروگرم/میلی‌لیتر از حشره‌کش کاهش فاحش رنگ و در غلظت‌های بعدی عملا فقدان رنگ را می‌توان مشاهده کرد (تصویر ۷).

تصویر ۷. تغییر رنگ زیست حسگر کاغذی نسبت به غلظت‌های مختلف حشره‌کش پریمیکارب (میکروگرم/میلی‌لیتر) در کاهوي آلوده‌سازی‌شده و تاثیر آن در جلوگیری از فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز.

نوارهای زیست‌حسگر کاغذی فناوری جدیدی است که یک روش کامل اندازه‌گیری را شامل می‌شود که روی نوار کاغذی انجام می‌شود [۲۷-۲۴]. اینگونه نوارها به‌دلیل سهولت در کاربرد، ارزان بودن، قابل‌حمل و سریع بودن توانایي کاربرد برای اندازه‌گیری باقی‌مانده آفت‌کش‌ها در آزمایشگاه را دارند. در حال حاضر، پژوهش‌هاي زیادی مربوط به اندازه‌گیری بازداری آنزیم استیل‌کولین استراز روی کاغذ برای تجزیه آفت‌کش‌ها با استفاده از روش کمی-سازی رنگ‌سنجی آب‌کافت استیل‌کولین استراز انجام شده است. میزان رنگ ایجادشده بستگی به غلظت حشره‌کشی دارد که باعث بازداری فعالیت استیل‌کولین استراز می‌گردد. این آزمایش‌ها با استفاده از مواد شیمیایی کروموژنیک مختلفی انجام می‌شود که بهترین آن ایندوکسیل استات است باشد [۵۰ و ۵۱]. اگرچه نوارهای کاغذی مزایای بسیاری (به عنوان نمونه، معرف‌ها می‌توانند از قبل روي نوار قرار داده شوند و بلافاصله با نمونه ترکیب شوند) دارند، اما به دلیل قابلیت اختلاط کم معرف‌ها روی کاغذ، حساسیت تشخیص پایینی دارند. اما در این پژوهش، از روش مرطوب کاغذ استفاده شده تا این عیب برطرف گردد و داکنش‌هاي شیمیایی روی کاغذ به‌صورت کامل انجام پذیرد. برای این کار، سوراخی در روی نوار نگهدارنده پلی‌پروپیلین پانچ شد که از آن سوراخ قطره‌هاي بافر با فاصله زماني ۵ دقیقه جهت مرطوب نگهداشتن محل واکنش افزوده شد. این‌کار روش جدیدی است که به فعالیت کامل آنزیم و آفت‌کش‌ها کمک به‌سزایی می‌کند. حساسیت روش نوارحسگر حاوی استیل‌کولین استراز توسط عامل‌های مختلفی تحت تاثیر قرار می‌گیرد که شامل غلظت آنزیم و سوبسترای آن ایندوکسیل استات، میزان رطوبت کاغذها و زمان برخوابش می‌باشد. نتایج بهینه‌سازی عامل‌های مختلف نشانگر غلظت ۸۰۰ واحد/میلی‌لیتر آنزیم استیل‌کولین استراز و میزان ۵ میکرولیتر آنزیم روی کاغذ صافي بود. میزان ۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از ایندوکسیل استات نیز بهترین غلظت برای این ماده بود. آزمایش‌ها در مرحله نخست براي بررسي کارایی زیست‌حسگر کاغذی و میزان حساسیت آن به غلظت‌های مشخص از حشره‌کش‌های مختلف انجام گردید و بنابر این در آن فقط از حشره‌کش‌های مورد نظر با ۷ غلظت ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۵ و ۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر استفاده شد و بعد از مشاهده عملکرد آن‌ها، از همین غلظت‌ها براي آلوده‌سازي کاهوی ارگانیک استفاده و توسط نوارها بررسي شد. نتایج به‌دست آمده حاکی از کارایی خوب این نوارها برای تشخیص باقی‌مانده چهار آفت‌کش مورد آزمایش بود و مشاهده نوارها پس از آزمایش-ها نشانگر حد کمی ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۱ میکروگرم/میلی‌لیتر به ترتیب برای دیازینون، تری کلروفن، کاربوفوران و پریمیکارب بود (تصویرهاي ۷-۴). تفاوت بین حد کمی‌های به‌دست آمده به‌دلیل مقدار ثابت نرخ زیست مولکولی بازداری آنزیم استیل‌کولین استراز توسط حشره‌کش‌ها می‌باشد. در بررسي‌هایی که توسط دیگر پژوهشگران انجام شده نشان‌دهنده کارایی خوب این روش براي اندازه‌گیری کمی و کیفی باقی‌مانده آفت‌کش‌های ارگانوفسفره و کارباماتها است [۲۴، ۲۸، ۳۰، ۴۱، ۴۳ و ۵۲]. در این روش مي‌توان از نرم‌افزار ImageJ، میزان باقی‌مانده آفت‌کش‌ها را پس از کالیبره کردن میزان رنگ و غلظت مشخص به صورت کمی نیز مشخص نمود [۴۹-۴۷].

۴- نتیجه گیری

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده و مقایسه آن با دیگر پژوهش‌هاي انجام‌شده در دنیا، می توان نتیجه گرفت که روش اندازه‌گیری باقی‌مانده آفت‌کش‌ها با زیست‌حسگر کاغذی می‌تواند به عنوان یک روش سریع، کم‌هزینه و در محل براي پایش باقی‌مانده سم‌ها در محصولات کشاورزی پیشنهاد گردد.

سپاسگزاری

نویسنده مقاله از حمایت صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور در انجام این پژوهش صمیمانه قدردانی میکند.

مراجع

[1] Anonymous, J. Zeitoon, 1:**4** (**1995 a**).
[2] Anonymous, J. Zeitoon, 1:**5** (**1995 b**).
[3] Agricultural statistics, Vol. 2, Ministry of Agriculture, I.R. Iran, (**2021**).
[4] J. A. Firestone, T. Smith-Weller, G. Franklin, P. Swanson, W.T. Longstreth, H. Checkoway, Arch. Neur, **62**, 91-5 (**2005**).
[5] A. Ascherio, H. Chen, M. G. Weisskopf, E. O'Reilly, M. L. McCullough, E. E. Calle, M. A. Schwarzschild, M.J. Thun, Ann. Neur. **60**, 197-203 (**2006**).
[6] J. L. Daniels, A. F. Olshan, D. A. Savitz, Environ. Heal. Persp, **105**, (1997) 1068–77.
[7] B. Eskenazi, A. Bradman, R. Castorina, Environ. Heal. Persp, 107 Supplement **3**, 409-419 (**1999**).
[8] S. Chapalamadugu, G. R. Chaudhry. Crit Rev. Biotechnol. **12**, 357-89 (**1992**).
[9] D. Du, J. Ding, Y. Tao, X. Chen. Sen. Act. B. Chem. **134**, 908-12 (**2008**).
[10] J. Fenik, M. Tankiewicz, M. Biziuk, Tren. Anal. Chem. **30**, 814-826 (**2011**).
[11] Y. Zhao, P. Chen, L. Lin, J. N. Harnly, L. Yu, Z. Li, Food Chem. **126**, 1269-1277 (**2011**).
[12] D. Sharma, Y. B. Pakade, A. Nagpal, J. K. Katnoria, Tlanta **82**, 1077-1089 (**2010**).
[13] S. Andreescu, J. L. Marty, Biomol. Eng., **23**, 1-15 (**2006**).
[14] S. Liu, Z. Zheng, X. Li, Anal Bioanal. Chem., **405**, 63-90 (**2013**).
[15] A. Mulchandani, W. Chen, P. Mulchandani, J. Wang, K. P. Rogers, Biosens. Bioelectron. **16**, 225-30 (**2001**).
[16] B. Prieto-Simón, M. Campàs, S. Andreescu, J. L. Marty, Sensors. **6**, 1161-86 (**2006**).
[17] A. Vakurov, C. E. Simpson, C. L. Daly, T. D. Gibson, P. A. Millner, Biosens. Bioelectron. **20**, 1118-25 (**2004**).
[18] S. Jin, Z. Xu, J. Chen, X. Liang, Y. Wu, X. Qian, Anal Chim. Acta. **523**, 117-23 (**2004**).
19) S. O. Obare, C. De, W. Guo, T. L. Haywood, T. A. Samuels, C. P. Adams, Sensors. **10**, 7018-43 (**2010**).
[20] A. L. Simonian, T. A. Good, S. S. Wang, J. R. Wild, Anal. Chimi. Acta. **534**, 69-77 (**2005**).
[21] F. Ling, L. Xiaofang, J. Boyu, S. Linchun, K. Linzhi, Z. Lidong, Biosen. And Bioelect. **164**, 112255 (**2020**).
[22] S. Liu, Z. Zheng, X. Li, Anal Bianal. Chem. **405**, 60-63 (**2013**).
[23] E. Mallat, D. Barcelo, C. Barzen, G. Gaulitz, R. Abuknesha, TrAC-Trend Anal. Chem. **20**, 124-132 (**2001**).
[24] A. Apilux, W. Siangproh, N. Praphairaksit, O. Chailapakul, Talanta. **97**, 388-394 (**2012**).
[25] X. Chen, J. Chen, F. Wang, X. Xiang, M. Luo, X. Ji, et al., Biosens. Bioelectron. **35**, 365-368 (**2012**).
[26] W. Dungchai, O. Chailapakul, C. S. Henry, Anal Chim. Acta. **674**, 227-233 (**2010**).
[27] J. Hu, S. Wamg, L. Wang, F. Li, B. Pingguan-Murphy, T. J. lu, et al., Biosens. Bioelectron. **54**, 585-597 (**2014**).
[28] N. Nagatani, A. Takeuchi, M. Anwar Hossain, T. Yuhi, K. Kerman, et al., Food Cont. **18**, 917-920 (**2007**).
[29] S. M. Z. Hossein, R. E. Luckham, M. J. McFadden, J. D. Brennan, Anal Chem. **81**, 9055-9064 (**2009**).
[30] H. Y. No, Y. A. Kim, Y. T. Lee, H. S. Lee, Anal. Chim. Acta, **594**, 37-43 (**2007**).
[31] X. Guo, X. Zhang, Q. Cai, T. Shen, S. Zhu, Food Cont. **30**, 15-23 (**2013**).
[32] Z. Han, C. Chi, B. Bai, G. Liu, Q. Rao, S. Peng, et al., Anal Chim. Acta, **720**, 126-133 (**2012**).
[33] C. Parola, S. M. Medina, A. De La Escosura-Muniz, A. Merkoci, Lab Chip. **13**, 386-390 (**2013**).
[34] D. De Souza, D. Goncalves-Filho, D. L. Franco, Chap. 1, Part of the Sust. Agri. Rev. book series, 48 **2020**.
[35] A. H. Free, E. C. Adams, M. L. Kercher, H. M. Free, M. H. Cook, Clin. Chem. **3**, 163-168 (**1957**).
[36] S. Mukherjee, K. Ghosh, S. Bhattacharyya, B. K. Behera, K. Sing, S. Pal, Food Anal. Meth. **15**, 3416-3434 (**2022**).
[37] M. Fuyal, B. Giri, Talan. **103**, 1492-1502 (**2020**).
[38] G. Fu, W. Chen, X. Yue, X. Jiang, Talan **103**, 110-115 (**2013**).
[39] S. Di Risio, N. Yan, Macromol. Rap. Commun. **28**, 1934-1940 (**2007**).
[40] S. X. Su, R. Nutiu, C. D. Filipe, R. Pelton, Langmuir **23**, 1300-1302 (**2007**).
[41] C. M. Tsen, C. W. Yu, S. Y. Chen, C. L. Lin, C. Y. Chuang, Appl. Surf. Sci. **558**, 149740 (**2021**).
[42] L. Jin, Z. Hao, Q. Zheng, H. Chen, L. Zhu, C. Wang, et. al., Anal. Chim. Acta. **1100**, 215-224 (**2020**).
[43] R. Umapathi, S. Sonwal, M. J. Lee, G. M. Rani, E. S. Lee, T. J. Jeon, S. M. Kang, M. H. Oh, Y. S. Huh, Coord. Chem. Rev. **446**, 214061 (**2021**).
[44] U. Reddicherla, P. Bumjun, S. Sonam, R. Gokana Mohana, C. Youngjin, H. Yun Suk, Trends F. Sci. Tech. (2021), available online www.elsevier.com/locate/tifs
[45] S. Yunling, W. Mia0, C. Jing, S. Yongxin, C. Zhen, H. Zhenxia, J. Fen, W. Jing, A. M. Ebd El-Aty, Food Chem. **416**, 135822 (**2023**).

[49] N. Hwa-Young, A.K. Young, T.L. Yong, L. Hye-Sung, Analytica Chimica Acta. **13**, 37-43 (**2007**).
[50] X. Guo, X. Zhang, Q. Cai, T. Shen, S. Zhu, Food Control. **30**, 15-23 (**2013**).
[51] Z. Han, C. Chi, B. Bai, G. Liu, Q. Rao, S. Peng, Anal Chim Acta. **720**, 126-33 (**2012**).
[52] A. Apilux, C. Isarankura-Na-Ayudhya, T. Tantimongcolwat, V. Prachayasittikul, EXCLI J. **14**, 307-319 (**2015**).
[46] G. C. Mohanta, D. Bhatt, A. Deep, S. Kumar Pandey, Chap. 1, Part of the Environ Chem for a Sust. World book series, **43** (**2012**).
[47] A. Amara, I. Chartchalerm, T. Tanawut, P. Virapong, EXCLI Journal, **14**, 307-319 (**2015**).
[48] G. Xishan, Z. Xueyin, C. Qiang, S. Tao, Z. Songming, Food Control. **30**, 15-23 (**2013**).