

اندازه‌گیری هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای در منابع آبی با استفاده از زیست حسگر الکتروشیمیایی (DNA)

رامین مناف فرا^۱، بهارک صحت نیا^{۲*}، رضا سبزی^۳، علی احسانی^۴

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۳/۰۹

چکیده

زمینه و هدف: هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs) از جمله شایع‌ترین آلاینده‌های زیست محیطی در محیط‌های آبی هستند. این آلاینده‌ها می‌توانند از منابع مختلفی همچون نشت نفت، فاضلاب‌های صنعتی کارخانه‌ها و یا زباله‌های صنعتی ایجاد شده یا بطور طبیعی از طریق سوختن ناقص زغال‌سنگ، روغن، گاز و چوب تولید شوند. بیشتر این ترکیبات جزو مواد سرطان‌زا و جهش‌زای ژنتیکی محسوب می‌شوند. لذا شناسایی این مواد به کمک روش‌های حساس و ارزان آنالیزی، از اهمیت بالایی برخوردار است.

روش بررسی: در این تحقیق، یک حسگر الکتروشیمیایی DNA با حساسیت و توانایی تشخیص و سرعت پاسخ‌دهی بالا، برای شناسایی ترکیبات PAH مورد استفاده قرار گرفت. به این منظور DNA دو رشته‌ای تیموس گاوی بر روی الکترود چایی مسطح تثبیت شده، سپس رفتار الکتروشیمیایی الکترود مورد بررسی قرار گرفت. این زیست حسگر الکتروشیمیایی DNA، بر اساس اختلاف در سیگنال الکتروشیمیایی حاصل از پاسخ بازهای گوانین موجود در ساختار DNA در حضور و عدم حضور ترکیبات PAH عمل می‌کند. به منظور ارزیابی کارایی این زیست حسگر نتایج حاصل از زیست حسگر بر روی نمونه‌های حقیقی با روش متداول اندازه‌گیری این گونه آلاینده‌ها توسط کروماتوگرافی مایع - مایع مقایسه گردید.

یافته‌ها: شرایط بهینه برای عملکرد زیست حسگر از جمله پتانسیل فعالسازی، زمان بهبود سطح الکترود، پتانسیل اعمالی جهت تثبیت DNA و پتانسیل اندازه‌گیری مورد بررسی قرار گرفتند. در شرایط بهینه، این زیست حسگر با پیش تیمار الکترود در پتانسیل $V + 1/6$ به مدت $350 S$ و تثبیت DNA روی سطح الکترود با اعمال پتانسیل $V - 0/5$ توانست انواع مختلفی از هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای را با غلظت‌های میکرومولار در نمونه‌های حقیقی شناسایی نماید.

نتیجه‌گیری: زیست حسگرهای الکتروشیمیایی DNA، توانایی شناسایی مجموع ترکیبات پلی آروماتیک حلقوی را در نمونه‌های آبی با دقت و حساسیت بالا و صرف هزینه کمتر در مقایسه با روش‌های کروماتوگرافی دارند.

واژگان کلیدی: هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs)، زیست حسگر الکتروشیمیایی، کروماتوگرافی مایع - مایع، الکترود چایی مسطح

Bahar_sehat@yahoo.com

۱- دکتری ژنتیک آبیان، استادیار پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲- (نویسنده‌ی مسئول): دکتری شیمی تجزیه، دانشگاه پیام نور ارومیه، ارومیه، ایران

۳- دکتری شیمی تجزیه، دانشیار دانشکده شیمی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۴- دکتری دامپزشکی، دانشیار گروه بهداشت و مواد غذایی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

مقدمه

امروزه آلودگی منابع آبی با ترکیبات آلی، یکی از مشکلات مهم در تامین آب سالم برای مصارف آشامیدنی و بهداشتی است. گروهی از این ترکیبات سمی، هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAHs) هستند. ۱۶ نوع مختلف از این ترکیبات جزو مواد سرطانزا و جهش‌زای ژنتیکی به شمار می‌روند و از جمله اصلی‌ترین آلاینده‌های محیط‌های آبی محسوب می‌شوند (۱). این مواد در اثر نشست مواد نفتی به آب، تخلیه فاضلاب‌های شهری و یا احتراق ناقص سوخت‌های فسیلی ایجاد می‌شوند (۲). PAHها که در بسیاری از نمونه‌های محیطی مثل هوا، خاک، آب، نفت، دود و زباله‌های غذایی یافت شده‌اند، می‌توانند باعث آلودگی موجودات آبی و بصورت مزمن باعث ایجاد تغییرات ژنتیکی در سلول‌ها یا بافت‌ها شده و در مقادیر زیاد موجبات مرگ سلولی را فراهم نمایند (۳). علاوه بر این ترکیبات PAH خاصیت موتاژنیک دارند که می‌تواند باعث جهش در سلول‌های سوماتیک، آسیب کروموزومی در سلول‌های جنسی، تشکیل اتصال بین دو رشته DNA، تعویض کروماتیدهای خواهری، تغییر شکل سلول نئوپلاستیک و حذف‌های کروموزومی شوند (۴). به دلیل خطرناک بودن این مواد برای سلامتی انسان و جلوگیری از انتقال این مواد به زنجیره غذایی انسان‌ها، مطالعات بر روی روش‌های مختلف شناسایی و اندازه‌گیری ترکیبات PAH در محیط‌های آبی افزایش یافته است (۵).

امروزه استفاده از زیست حسگرها در کنار روش‌های متداول اندازه‌گیری (کروماتوگرافی گازی و مایع)، بدلیل ویژگی‌های منحصر به فردی از جمله حساسیت بالا، امکان ادغام با فناوری‌های نانو، سادگی سیستم‌های به کار رفته و قیمت پایین بسیار متداول شده است (۶). حسگرهای زیستی ابرازهای تجزیه‌ای هستند که دارای سه جزء اصلی عنصر زیستی (به عنوان جزء اصلی تشخیص‌دهنده یون‌ها یا مولکول‌های هدف)، مبدل و سیستم قرائت است. در حسگرهای زیستی، عضو زیستی با روش‌های مختلف روی مبدل تثبیت شده است. این عضو زیستی از گزینش‌پذیری بالایی برای برهم کنش‌های

زیستی و آشکارسازی آنالیت برخوردار است. در این راستا Cho و همکاران (۷) برای اولین بار از یک زیست حسگر بر پایه باکتری *Escherichia coli* برای اندازه‌گیری ترکیبات PAH در محیط‌های آبی استفاده کردند. علاوه بر این کارایی زیست حسگرهای الکتروشیمیایی بر پایه آنزیم در اندازه‌گیری میزان آلودگی سموم و آفت‌کش‌ها توسط Viswanathan و همکاران (۸) مورد بررسی قرار گرفته است.

استفاده از زیست حسگرهای الکتروشیمیایی DNA، از جمله سایر روش‌های تجزیه‌ای برای تشخیص سریع و دقیق انواع آلاینده‌ها هستند (۹). مطالعات انجام شده توسط Qu و همکاران (۱۰) در زمینه استفاده از DNA در ساخت زیست حسگر برای اندازه‌گیری فلزات سنگین، نشان داد که اتصال DNA دو رشته‌ای بر روی سطح الکتروود، این حسگر را به بستر مناسبی برای اندازه‌گیری فلز کادمیوم در محیط‌های آبی تبدیل می‌کند. در ساخت زیست حسگرهای الکتروشیمیایی از الکتروودهای مختلفی برای تثبیت قطعه بیولوژیکی از جمله الکتروود گرافیت، خمیر کربن، کربن شیشه‌ای، الکتروود چاپی مسطح (SPE) و غیره استفاده می‌شود (۱۱). استفاده از الکتروودهای چاپی مسطح مشکلات الکتروودهای جامد کلاسیک از جمله آلودگی سطح و مراحل پاکسازی را به همراه نداشته و بستر این الکتروودها برای ایجاد اصلاحات مختلف شامل اتصال قطعات مختلف بیولوژیکی (DNA، آنزیم، آنتی بادی-آنتی ژن) مناسب است (۱۲).

هدف از انجام تحقیق حاضر بررسی کارایی زیست حسگر DNA در شناسایی الکتروشیمیایی گروهی از آلاینده‌های پلی آروماتیک در آب‌های داخلی شهرستان ارومیه است. از آنجائی که این آلاینده‌ها نقش مهمی در آلودگی‌های محیطی داشته و از طریق آبزیان می‌توانند وارد چرخه غذایی انسان شده و موجبات انواع بیماری‌ها شوند، لذا تشخیص این مواد به کمک روش‌های تجزیه‌ای حساس و ارزان قیمت حائز اهمیت است. بدلیل حساسیت و توانایی تشخیص بالای زیست حسگرهای DNA و سرعت پاسخ‌دهی بالا برای مقادیر کم نمونه‌ها، سعی شده روش بسیار دقیق و ساده‌ای جهت تشخیص این آلاینده‌ها

اندازه‌گیری PAHs به کمک دستگاه HPLC

پس از آماده‌سازی اولیه (شامل فیلتراسیون و پیش تغلیظ نمونه‌ها با روش ذکر شده) نمونه‌ها به دستگاه HPLC تزریق شدند. جداسازی کروماتوگرافی ترکیبات PAH توسط سیستم HPLC در شرایط فاز معکوس انجام شد. اجرای برنامه گرادینت با سرعت جریان ۱ mL/min و فاز متحرک اولیه حاوی ۶۵٪ استونیتریل و ۳۵٪ آب به مدت ۸ min، تغییر به ۱۰۰٪ استونیتریل در عرض ۱ min و نهایتاً بازگشت به نسبت حلال اولیه و تثبیت به مدت ۸ min صورت گرفت (۱۴).

ساخت زیست حسگر DNA

همانطور که در بسیاری از مراجع ذکر شده سطح الکترودهای گرافیتی قبل از انجام هرگونه اندازه‌گیری نیاز به پیش تیمار دارند. اعمال پتانسیل‌های بالا در محیط اسیدی (مثل بافر استات با pH برابر ۴/۸) باعث افزایش خصلت آبدوستی سطح الکترودهای گرافیت از طریق معرفی گروه‌های عاملی اکسیژن‌دار می‌شود. بدین منظور سطح الکترودها ابتدا با القاء یک پتانسیل +۱/۶ V در محلول بافر استات ۰/۵ M با pH برابر ۴/۸ به کمک روش کرنوآمپرومتری به مدت ۳۵۰s پیش تیمار شد. سپس مرحله تثبیت DNA روی سطح الکترودها انجام شد. الکترودها با تغلیظ DNA دو رشته‌ای تیموس گاوی در ولتاژ ثابت -۰/۵ V در بافر استات ۰/۵ M حاوی ۲ μM، DNA دو رشته‌ای و ۲۰mM NaCl در مدت ۱۲۰ s بر روی الکترودهای چاپی مسطح ساخته شد (۱۵).

در خلال این مرحله از آزمایش الکترودها با استفاده از یک گیره در داخل محلول بافر استات که با سرعت ۲۰۰rpm توسط یک مغنت کوچک همزده شد، غوطه‌ور گردید. سپس الکترودها به منظور پاکسازی قطعات متصل نشده به سطح الکترودها در داخل بافر استات بدون اعمال پتانسیل قرار گرفته و نهایتاً با آب دیونیزه شستشو داده شد. تمامی شرایط آزمایشگاهی فوق بهینه‌سازی شدند. مرحله انکوباسیون با قرار دادن ۲۰ μL نمونه بر روی صفحه الکترودهای چاپی گرافیتی تکمیل شد. پس از ۲ min حسگر شسته شده و در داخل بافر استات غوطه‌ور گردید. اندازه‌گیری الکتروشیمیایی با پالس ولتامتری تفاضلی

بوسیله زیست حسگر الکتروشیمیایی بهینه‌سازی شده و نتایج حاصل با سایر روش‌های اندازه‌گیری مقایسه شود (۱۳).

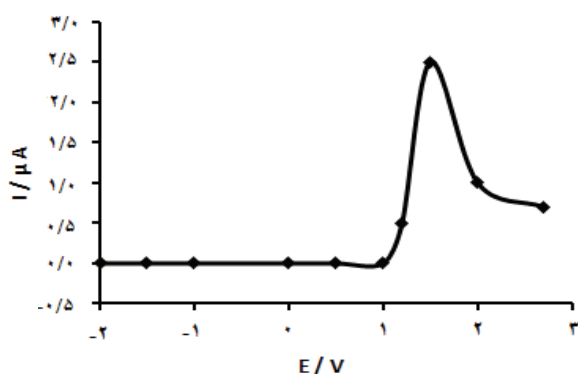
مواد و روش‌ها

مواد و تجهیزات

PAHهای مورد مطالعه شامل آنتراسن (A)، فنانترن (Phe)، بنزوآ آنتراسن (BaA)، فلورن (F) و پیرن (PY) و تمامی حلال‌ها مورد استفاده از خلوص بالایی برخوردار بوده و از شرکت سیگما خریداری شدند. استات سدیم، کلرید سدیم، استیک اسید و کلرید پتاسیم نیز از شرکت مرک خریداری شدند. DNA دو رشته‌ای تیموس گاوی (DM۸۹۹) از شرکت سیگما خریداری شد. در این تحقیق به منظور بررسی میزان آلودگی PAH در نمونه‌ها از یک سیستم HPLC مجهز به پمپ با لویی به حجم ۲۰ μL، آشکارساز فلورسانس (Shimadzu)، یک ستون C18 با مشخصات (۲۵۰×۴/۶ mm, ۵ μm) برای اندازه‌گیری‌های کروماتوگرافی استفاده شد. اندازه‌گیری الکتروشیمیایی بوسیله دستگاه میکروآتولب دارای یک نرم‌افزار GPES ۴.۵ متعلق به کمپانی Ecochemie انجام شد. سل زیست حسگر الکتروشیمیایی، الکترودهای چاپی مسطح حاوی الکترودهای گرافیکی، الکترودهای کمی و الکترودهای مرجع Ag/AgCl است که بصورت آماده خریداری شد.

تهیه نمونه‌های واقعی

مطابق با پروتکل پنج نمونه آب از آبگیرها و منابع آبی اطراف شهرستان ارومیه شامل سد شهرچای (S_۱)، رودخانه شهرچای (S_۲)، نازلوچای (S_۳)، سد حسنلو-۱ (S_۴) و سد حسنلو-۲ (S_۵) در دو فصل تابستان و پاییز سال ۹۱ تهیه شد. نمونه‌برداری توسط بطری‌های شیشه‌ای استریل درب دار که با استون و هگزان شستشو شده بودند، صورت گرفت. پس از نمونه‌برداری نمونه‌ها بلافاصله در داخل یخدان (+۴ °C) به دور از نور به آزمایشگاه انتقال داده شدند. پیش از آنالیز نمونه‌ها توسط صافی ۰/۴۵ μm فیلتر شدند. برای پیش تغلیظ نمونه‌ها قبل از اندازه‌گیری از کارتریج‌های ۳۰۰ mg (Bond Elute ۱۸) با حجم ۳ mL استفاده شد.



شکل ۱: منحنی تغییرات شدت جریان برحسب پتانسیل‌های فعال‌سازی مختلف

آندی در داخل بافر استات $0.5 M$ و با اسکن پتانسیل از $1.2 V - 0.5$ صورت گرفت. به کمک این اندازه‌گیری الکتروشیمیایی، میزان اکسیداسیون گوانین سطح الکتروود قبل و بعد از قرار گرفتن نمونه در سطح الکتروود ارزیابی شد. تغییر سطح زیر منحنی گوانین (در حدود $1.0 V$) بیانگر میزان حضور آلاینده‌های PAH و مواد سمی موجود در آب است. این تغییر را می‌توان با بررسی تغییرات پاسخ $\% R$ (Removal) دنبال کرد که در حقیقت نسبت سطح زیر منحنی گوانین پس از واکنش با ترکیب مورد نظر GPA_s (Guanin peak areas of sample) بر منحنی گوانین پس از واکنش با محلول بافر GPA_b (Guanin peak areas of buffer) هست. آنالیز نمونه‌ها می‌تواند در مدت 8 min انجام شود.

$$\% R = [(GPA_s / GPA_b) - 1] \times 100$$

تعیین بهینه زمان فعال‌سازی الکتروشیمیایی الکتروود

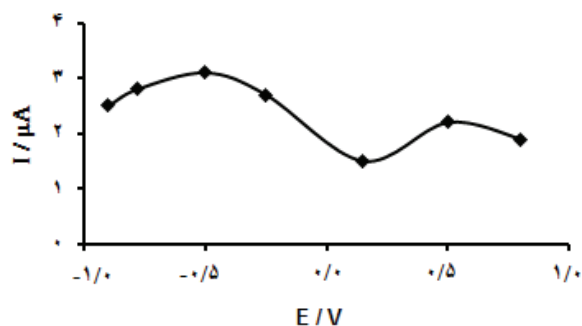
بعد از اعمال پتانسیل‌های مختلف و مشخص شدن پتانسیل بهینه جهت تعیین زمان مناسب اعمال پتانسیل، پتانسیل الکتروود در پتانسیل $1.6 V +$ در مدت زمان‌های مختلف $150, 250, 350, 450, 550 s$ فعال‌سازی شده و مراحل تثبیت و اندازه‌گیری مطابق بخش‌های قبلی، انجام گردید. با توجه به منحنی شکل ۲، بهترین زمان لازم برای فعال‌سازی الکتروود $350 s$ بود چرا که در این زمان، بیشترین سیگنال برای اکسیداسیون بازهای گوانین حاصل شد و فعال‌سازی در مدت زمان‌های کمتر از $350 s$ باعث کاهش سیگنال گردید. دلیل این امر را می‌توان به ناکافی بودن زمان برای اکسید شدن تمام سطح الکتروود و عدم امکان اتصال مناسب قطعه DNA با سطح الکتروود مربوط دانست. از طرفی در زمان‌های بیشتر، افزایش محسوسی در شدت سیگنال‌های حاصل از بازهای گوانین مشاهده نشد. چراکه اکسیداسیون سطح الکتروود گرافیتی به صورت کامل انجام گرفته بود. از طرفی اعمال زمان‌های بیشتر نیز ممکن است تا حدی باعث تخریب سطح الکتروود گرافیتی نیز گردد. لذا $350 s$ به عنوان بهینه زمان فعال‌سازی انتخاب شد.

یافته‌ها

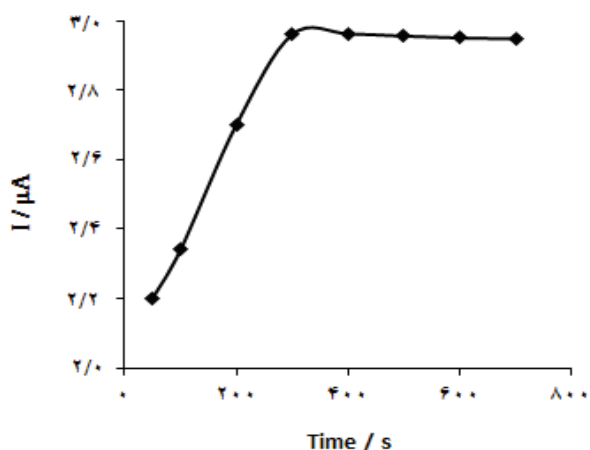
شرایط فعال‌سازی الکتروشیمیایی الکتروود

بهترین پتانسیل برای فعال‌سازی الکتروود، با فعال‌سازی الکتروود با اعمال پتانسیل‌هایی در محدوده $0.2 V +$ تا $0.2 V -$ ($2, -1, 0.5, +1, +1.5, +2$) در داخل بافر استات $0.5 M$ حاوی 20 mM NaCl بدون هم زدن محلول بررسی شد. سپس مرحله تثبیت مطابق بخش‌های قبلی، انجام شده و در آخر با استفاده از ولتامتری موج مربعی میزان تثبیت پروب بر روی الکتروود فعال‌سازی شده در پتانسیل‌های مختلف در محلول $0.2 M \text{ Tris-HCl}$ حاوی 20 mM NaCl و $2 \mu M \text{ DNA}$ اندازه‌گیری شد.

همانگونه که در شکل (۱) مشخص شده است با افزایش پتانسیل فعال‌سازی سیگنال مربوط به اکسیداسیون بازهای گوانین هم افزایش یافته و به حداکثر میزان خود در $1.6 V +$ رسید و بعد شروع به کاهش یافت. بنابراین، بهترین پتانسیل برای فعال‌سازی الکتروود $1.6 V +$ انتخاب شد چرا که در این پتانسیل بالاترین سیگنال مربوط به اکسیداسیون بازهای گوانین بر روی سطح الکتروود مشاهده شد.



شکل ۳: منحنی تغییرات شدت جریان اکسیداسیون گوانین بر حسب پتانسیل‌های مختلف جهت تثبیت پروب



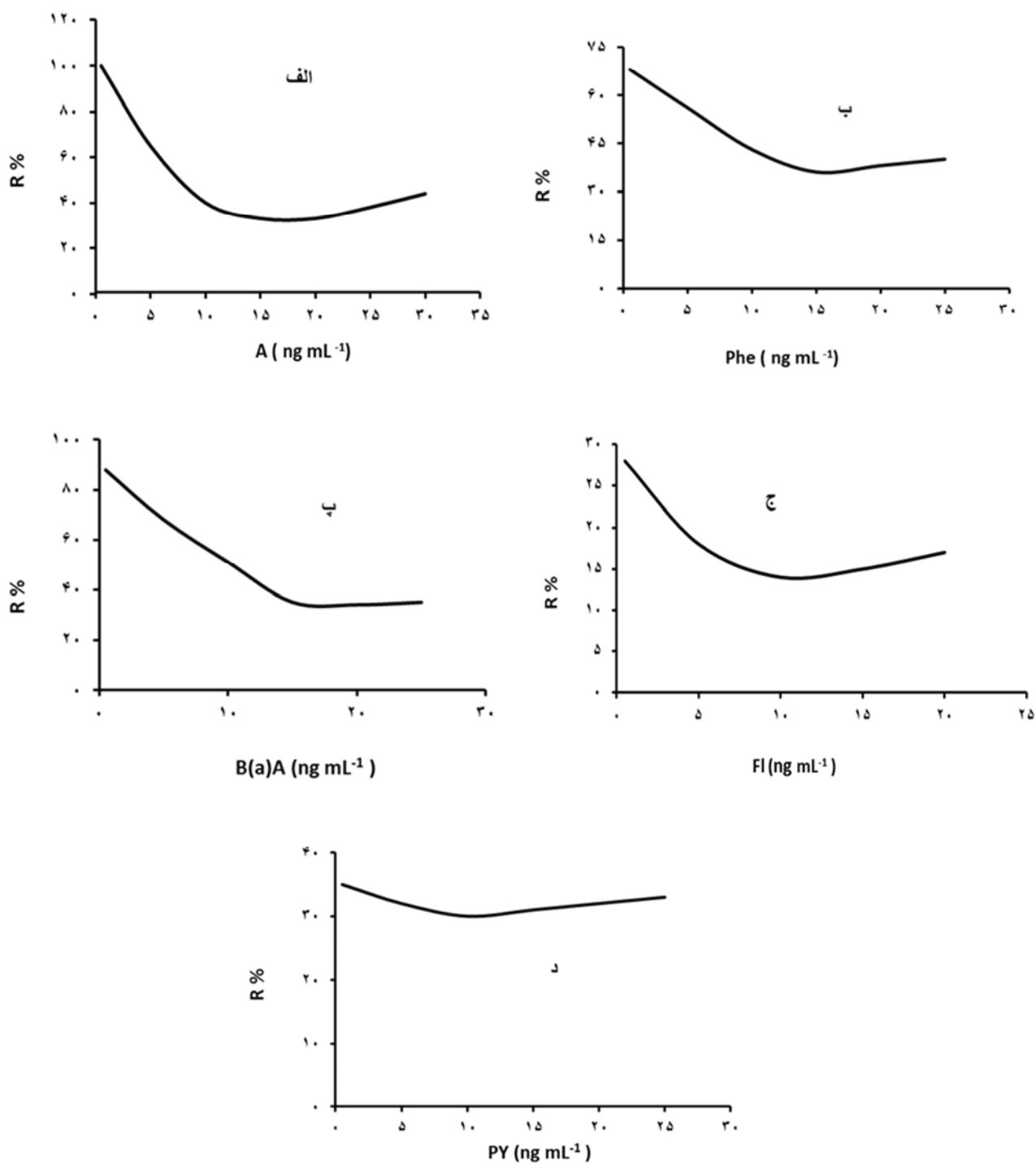
شکل ۲: منحنی تغییرات شدت جریان اکسیداسیون بازهای گوانین بر حسب زمان‌های فعال‌سازی مختلف

اندازه‌گیری PAH در محلول‌های استاندارد

منحنی‌های کالیبراسیون برای PAH‌های مختلف در غلظت‌های مختلف و در شرایط بهینه به ترتیب در شکل (۴) (الف) آنتراسن (ب) فنانترن (پ) بنز (a) آنتراسن (ج) فلورن و (د) پیرن، ترسیم شده‌اند.

همانطور که از منحنی‌های کالیبراسیون مشهود است پیک اکسیداسیون گوانین در حضور آلاینده‌های مختلف کاهش یافت. رگراسیون فنانترن و بنزو (a) آنتراسن به ترتیب برابر ۰/۹۸۱ و ۰/۹۹۴ است و برای آنتراسن و پیرن این مقدار در محدوده خطی برابر ۰/۹۸۴ و ۰/۹۷۹ است. همانطور از منحنی کالیبراسیون نیز مشخص هست فلورن در غلظت‌های مورد آزمایش حالت خطی از خود نشان نداده است. بدین منظور در تحقیق حاضر از زیست حسگر الکتروشیمیایی DNA برای بررسی چهار هیدروکربن آروماتیک فنانترن، بنزو (a) آنتراسن، آنتراسن و پیرن استفاده شد.

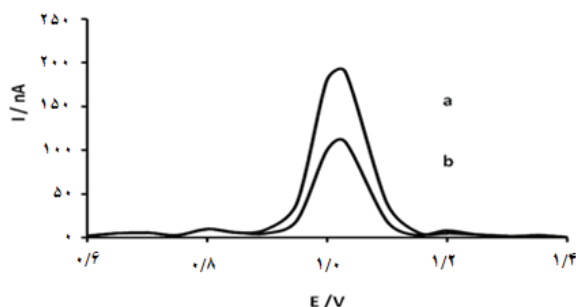
تاثیر پتانسیل اعمالی برای تثبیت پروب بر روی الکتروده یکی از فاکتورهای موثر در تثبیت پروب بر روی الکتروده، پتانسیل اعمالی آن است. در این بخش تثبیت پروب بر روی الکتروده فعال‌سازی شده با اعمال پتانسیل‌های مختلف در محدوده $V +0.8$ تا -0.8 به مدت ۵ min انجام شد. سپس اندازه‌گیری الکتروشیمیایی صورت گرفت. نتایج حاصل مطابق شکل (۳) نشان داد که جریان حاصل از تثبیت پروب در سطح الکتروده با اعمال پتانسیل‌های منفی افزایش یافته و در پتانسیل $-0.5V$ به حداکثر مقدار خود رسید. تحقیقات قبلی در این زمینه نشان داده است که اعمال پتانسیل‌های منفی در تثبیت قطعه DNA بر روی سطح الکتروده گرافیتی با بار مثبت، باعث تسهیل تثبیت DNA بر روی سطح الکتروده گرافیتی می‌شود که با یافته‌های این تحقیق همخوانی دارد (۹). بر اساس مطالعات انجام گرفته مقدار این پتانسیل به طول رشته DNA و ویژگی‌های آن بستگی دارد. از این رو با توجه به شکل ۳، پتانسیل $-0.5V$ به عنوان پتانسیل بهینه در تثبیت DNA دو رشته‌ای تیموس گاوی در سطح الکتروده گرافیتی مورد استفاده قرار گرفت.



شکل ۴: منحنی کالبراسیون (الف) آنتراسن (ب) فناترون (پ) بنز (a) آنتراسن (ج) فلورن (د) پیرن در شرایط بهینه بر اساس %R نسبت به غلظت PAHs.

اندازه‌گیری نمونه‌های حقیقی

نتایج آنالیز آلودگی‌های PAH پنج نمونه حقیقی شامل نمونه‌های سد شهرچای (S₁)، رودخانه شهرچای (S₂)، نازلو چای (S₃)، سد حسنلو-۱ (S₄) و سد حسنلو-۲ (S₅) با دو بار نمونه‌برداری در دو فصل پاییز و تابستان بر حسب % R در مقایسه با بافر فسفات ۰/۱ M (pH برابر ۴/۷) و پس از پیش تغلیظ در شکل ۵ بیان شد. به کمک این اندازه‌گیری الکتروشیمیایی میزان اکسیداسیون گوانین بر سطح الکتروود قبل (a) و بعد از قرار گرفتن نمونه (b) در سطح الکتروود ارزیابی شد. تغییر سطح زیر منحنی گوانین (در حدود +۱/۰ V) بیانگر میزان حضور آلاینده‌های PAH و مواد سمی موجود در آب است.

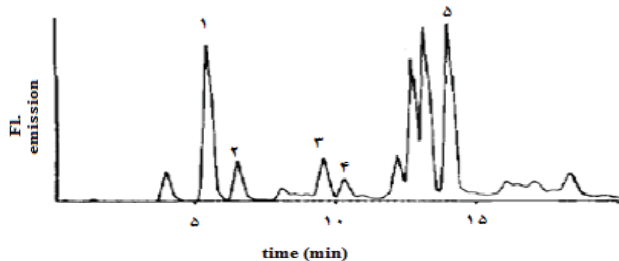


شکل ۵: (a) منحنی حاصل از اکسیداسیون الکتروشیمیایی گوانین در بافر، (b) منحنی حاصل از اکسیداسیون الکتروشیمیایی گوانین در حضور آنالیت

اندازه‌گیری نمونه‌ها با دستگاه HPLC

پس از آماده‌سازی نمونه به روش ذکر شده در بخش قبلی، به دستگاه HPLC در شرایط فاز معکوس تزریق شد. کروماتوگرام شکل ۶ مربوط به اندازه‌گیری ترکیبات PAH فوق در نمونه آب شهرچای (S₂) بعد از تغلیظ است که توسط آشکارساز فلورسانس شناسایی شدند. ترتیب خارج شدن آنالیت‌ها به صورت زیر است:

(۱) فلورن، (۲) فنانترن، (۳) آنتراسن، (۴) پیرن، (۵) بنزوآنتراسن.



شکل ۶: کروماتوگرام حاصل از نمونه حقیقی

تمامی نتایج حاصل از اندازه‌گیری این نمونه‌های آبی توسط زیست حسگر جهت مقایسه با نتایج بدست آمده از روش کروماتوگرافی مایع با آشکارساز فلورسانس در طول موج‌های مختلف در جدول ۱ و ۲ خلاصه شده است.

جدول ۱: مقایسه نتایج حاصل از اندازه‌گیری ترکیبات PAH در آب‌های نمونه برداری شده در فصل تابستان بوسیله دستگاه HPLC با نتایج حاصل از زیست حسگر

	BaA(μM)	PY(μM)	Phe(μM)	A (μM)	ds DNA R%
$\lambda_{ex/em}$	۲۳۸/۳۹۸	۲۳۸/۳۹۸	۲۵۲/۳۷۰	۲۵۲/۴۰۲	
S ₁	---	---	۰/۰۱۴	---	۹۱ ± ۹
S ₂	---	۰/۷۱۳	۰/۰۳۵	۰/۲۵۰	۲۳ ± ۵
S ₃	---	۰/۱۵۵	۰/۰۷۸	۰/۰۱۲	۶۸ ± ۸
S ₄	۰/۰۴۵	۰/۸۸۱	۰/۱۲۳	۰/۱۲۲	۱۸ ± ۵
S ₅	---	۰/۰۵۵	۰/۱۱۰	---	۸۷ ± ۹

جدول ۲: مقایسه نتایج حاصل از اندازه‌گیری ترکیبات PAH در آب‌های نمونه برداری شده در فصل پاییز بوسیله دستگاه HPLC با نتایج حاصل از زیست حسگر

	BaA(μM)	PY(μM)	Phe(μM)	A (μM)	ds DNA R%
$\lambda_{\text{ex/em}}$	۲۳۸/۳۹۸	۲۳۸/۳۹۸	۲۵۲/۳۷۰	۲۵۲/۴۰۲	
S ₁	---	---	۰/۰۱۱	---	۹۸ ± ۱۴
S ₂	---	۰/۴۰۳	۰/۰۱۵	۰/۱۵۰	۴۴ ± ۱۰
S ₃	---	۰/۰۹۵	۰/۰۶۸	۰/۰۰۵	۷۳ ± ۸
S ₄	۰/۰۳۱	۰/۱۰۱	۰/۰۳۲	۰/۰۲۲	۵۹ ± ۵
S ₅	---	۰/۰۱۲	۰/۰۹۰	---	۸۹ ± ۹

تابستان و پاییز نداشته در حالی که در نمونه‌های S₄ و S₂ در فصل تابستان نسبت به پاییز میزان ترکیبات پلی آروماتیک افزایش داشته است. دلیل این افزایش را می‌توان به منطقه جغرافیایی ویژه این محل‌های نمونه‌برداری، قرار گرفتن در حریم داخل شهری و افزایش تردد انسانی و ماشین‌ها در این مناطق مربوط دانست. از طرفی استفاده از آب این مناطق برای شستشو منسوجات و خودروها نیز می‌تواند باعث آلودگی این نمونه‌ها شود.

دلیل استفاده از DNA دو رشته‌ای تیموس گاوی در تحقیق حاضر، مطالعات پیشینه‌ای بود که توسط سایر پژوهشگران در زمینه استفاده از پروب DNA به عنوان قطعه بیولوژیکی زیست حسگر انجام شده بود (۱۷). بر اساس مطالعات انجام گرفته عواملی همچون خلوص DNA، طول رشته DNA و نسبت بازهای گوانین به سیتوزین در DNA مورد استفاده در کارایی زیست حسگر بسیار حائز اهمیت بوده و در بین چندین گونه و توالی‌های مختلف از DNAهای مورد بررسی، DNA دو رشته‌ای تیموس گاوی حاوی شرایط فوق بود. بنابراین در این تحقیق از DNA دو رشته‌ای تیموس گاوی به عنوان قطعه بیولوژیکی زیست حسگر استفاده شد.

مطالعات دیگری نیز در زمینه استفاده از زیست حسگرهای الکتروشیمیایی DNA در شناسایی گونه باکتری بیماری‌زا (*Mycobacterium tuberculosis*) توسط Liu و همکاران (۱۸) صورت گرفته است. در این تحقیق از یک

بحث

در تحقیق حاضر از یک زیست حسگر الکتروشیمیایی DNA بر پایه DNA دو رشته‌ای تیموس گاوی برای شناسایی آلاینده‌های PAH استفاده شد. اساس کار این زیست حسگر DNA، کاهش سیگنال الکتروشیمیایی گوانین در حضور غلظت‌های بسیار کم ترکیبات PAH است. علت احتمالی این کاهش سیگنال را می‌توان به تغییرات در سطوح قابل دسترس بخشی از بازهای گوانین در اثر اتصال (intercalative) این ترکیبات به سطح DNA دو رشته‌ای توضیح داد (۱۶).

نتایج حاصل از این تحقیق (جدول ۱ و ۲) بیانگر ارتباط کاملاً منطقی بین مجموع آلاینده‌های موجود در نمونه‌های حقیقی و نتیجه حاصل از زیست حسگر الکتروشیمیایی است. متناسب با افزایش میزان آلودگی در آب میزان R% کاهش یافته است. دلیل احتمالی متفاوت بودن نتایج حاصل از زیست حسگر PAH را می‌توان به متغیر بودن سایر ترکیبات PAH موجود که در این مطالعه اندازه‌گیری نشدند، مربوط دانست. در مقایسه نمونه‌ها می‌توان اختلاف مشهودی بین میزان آلودگی نمونه شهر چای پایین دست و تالاب حسنلو ۱ با سایر نمونه‌ها مشاهده کرد. یعنی این دو منطقه بیشترین میزان ترکیبات آروماتیک را داشته‌اند که نتایج حاصل از کروماتوگرافی مایع-مایع نیز این موضوع را تایید کرد. با مقایسه نتایج حاصل از دو فصل مختلف، مشاهده شد که در نمونه‌های S₁ و S₃ و S₅ مقادیر PAH‌های مجموع تغییر قابل ملاحظه‌ای در فصول

کروماتوگرافی هستند. نتایج حاصل از تحقیق حاضر در استفاده از زیست حسگر الکتروشیمیایی DNA دو رشته‌ای تیموس گاوی در ارزیابی آلودگی نمونه‌های حقیقی تهیه شده از آب‌های شهرستان ارومیه و مقایسه این نتایج با داده‌های حاصل از آنالیزهای HPLC، تاییدی بر کارایی این زیست حسگر الکتروشیمیایی DNA در شناسایی ترکیبات آلاینده است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی با عنوان ساخت حسگر الکتروشیمیایی DNA و ارزیابی کارایی آن در شناسایی آلاینده‌های آروماتیک چند حلقه‌ای در منابع آبی شهرستان ارومیه، مصوب دانشگاه ارومیه در سال ۹۱ با کد ۰۰۲/آ/۹۰ است که با حمایت دانشگاه ارومیه اجرا شده است. بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه و مسئولین محترم پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

زیست حسگر الکتروشیمیایی DNA بر پایه گرافن اکساید و نانوذرات طلا برای اندازه‌گیری گونه باکتری بیماری‌زا استفاده شده است که نتایج آن بیانگر کارایی بالای و تکرار پذیری خوب زیست حسگر الکتروشیمیایی DNA در اندازه‌گیری این گونه باکتری است. در تحقیق دیگری Del Carlo و همکاران (۱۹) از چهار قطعه DNA برای اندازه‌گیری موفق دو ترکیب Phe و BaA به عنوان مدلی از ترکیبات PAH در نمونه‌های آبی پس از فعالسازی با اشعه UV، استفاده کرده‌اند.

نتیجه‌گیری

زیست حسگرهای الکتروشیمیایی از جمله زیست حسگر بر پایه DNA تیموس گاوی توانایی شناسایی آلاینده‌های محیط از جمله هیدروکربن‌های پلی آروماتیک را دارند. علیرغم عدم توانایی این ساختارها در شناسایی انواع ترکیبات آلاینده به صورت منفرد در نمونه‌های واقعی و غلظت‌های دقیق، این سیستم‌های الکتروشیمیایی ابزاری توانمند در شناسایی ΣPAH مجموع آلودگی با سرعت و هزینه‌های پایین در مقایسه با سایر سیستم‌های اندازه‌گیری از جمله روش‌های

منابع

- 1- Yunesian M, Nasser S, Mahvi AH, Ahmadkhaniha R, Rastkari N, Nabizadeh R. Polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water of Tehran, Iran. *Journal of Environmental Health Sciences & Engineering*. 2013;11:25-31.
- 2- Ramalhosaa MJ, Paigaa P, Moraisa S, Sousac A, Goncalvesc MP, Delerue C, et al. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish: Optimisation and validation of microwave-assisted extraction. *Food Chemistry*. 2012;135(1):234-42.
- 3- Palchettia I, Mascini M. Nucleic acid biosensors for environmental pollution monitoring. *Analyst*. 2008;133(2):846-54.
- 4- Haritash AK, Kaushik CP. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*. 2009;169(1):1-15.
- 5- Kima KH, Jahanb SA, Kabirc E, Brownd RJC. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environment International*. 2013;60:71-80.
- 6- Anna M, Nowicka AM, Kowalczyk A, Stojek Z, Hepel M. Nanogravimetric and voltammetric DNA-hybridization biosensors for studies of DNA damage by common toxicants and pollutants. *Biophysical Chemistry*. 2010;146:42-53.
- 7- Cho JH, Lee Da Y, Lim WK, Shin HJ. A recombinant *Escherichia coli* biosensor for detecting polycyclic aromatic hydrocarbons in gas and aqueous phases. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 2014;44(8):849-60.
- 8- Viswanathan S, Radecka H, Radecki J. Electrochemical biosensor for pesticides based on acetylcholinesterase immobilized on polyaniline deposited on vertically assembled carbon nanotubes wrapped with ssDNA. *Biosensors and Bioelectronics*. 2009;24(9):2772-77.
- 9- Teles FR, Fonseca LP. Trends in DNA biosensors. *Talanta*. 2008;77(2):606-23.
10. Qu J, Wu L, Liu H, Li J, Lu H, Fu X, et al. A Novel electrochemical biosensor based on DNA for rapid and selective detection of cadmium. *International Journal of Electrochemistry Society*. 2015;10:4020-28.
- 11- Zheng Y, Yang C, Pu W, Zhang J. Carbon nanotube-based DNA biosensor for monitoring phenolic pollutants. *Microchimica Acta*. 2009;166(1):21-26.
- 12- Alonso-Lomillo M, Domínguez-Renedo O, Arcos-Martínez MJ. Screen-printed biosensors in microbiology; a review. *Talanta*. 2010;82(5):1629-36.
- 13- Sassolas A, Leca-Bouvier BD, Blum LJ. DNA

- biosensors and microarrays. *Chemical Reviews*. 2008;108(1):109-39.
- 14- Janoszka B. HPLC-fluorescence analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in pork meat and its gravy fried without additives and in the presence of onion and garlic. *Food Chemistry*. 2011;126(3):1344-53.
- 15- Wu L, Lu X, Jin J, Zhang H, Chen J. Electrochemical DNA biosensor for screening of chlorinated benzene pollutants. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011;26(10):4040-45.
- 16- Stobiecka M, Coopersmith K, Cutler S, Hepel M. Novel DNA-hybridization biosensors for studies of DNA under winding caused by herbicides and pesticides. *Electrochemical Society Transactions*. 2010;28(34):1-12.
- 17- Bagni G, Osella D, Sturchio E, Mascini M. Deoxyribonucleic acid (DNA) biosensors for environmental risk assessment and drug studies. *Analytica Chimica Acta*. 2006;573:81-89.
- 18- Liu C, Jiang D, Xiang G, Liu L, Liu F, Pu X. An electrochemical DNA biosensor for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*, based on signal amplification of graphene and a gold nanoparticle-polyaniline nanocomposite. *Analyst*. 2014;139(21):5460-65.
- 19- Del Carlo M, Di-Marcelo M, Peruhini M, Ponzilli V, Sergi M, Mascini M, et al. Electrochemical DNA biosensor for polycyclic aromatic hydrocarbons. *Microchimica Acta*. 2008;163:163-69.

Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water using an electrochemical DNA biosensor

R. Manaffar¹, B. Sehatnia^{*2}, R. Sabzi³, A. Ehsani⁴

¹ PhD, Assistant professor, Urmia Lake Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran

² PhD of Analytical Chemistry, Urmia Payame Noor University, Urmia, Iran

³ PhD, Associate Professor, Faculty of Chemistry, Urmia University, Urmia, Iran

⁴ PhD, Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Received: March 2015; Accepted: 30 May 2015 3

ABSTRACT

Background and Objectives: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are widespread environmental contaminants in aquatic environments. These contaminants are generated through oil spills, manufactory processes, and industrial wastes or naturally through the incomplete combustion of coal, oil, gas, and wood waste. Most of these compounds are noted as carcinogenic and mutagenic. Therefore, detection of these pollutants by a sensitive and inexpensive method is very important.

Materials and Methods: In this study, an electrochemical DNA biosensor was used to detect PAHs due to its sensitivity, ability, and high response rate. For this purpose, the bovine thymus double-stranded DNA was fixed on a screen-printed electrode. Then, the electrodes electrochemical behavior was investigated. This electrochemical DNA biosensor works upon the difference between the electrochemical response of guanine bases in DNA structure in the presence and absence of PAH compounds. To evaluate the biosensors performance, the response of biosensor to real samples was compared with conventional pollutant determination methods like liquid-liquid chromatography.

Results: Optimum conditions were examined for biosensor response including effect of activation potential and time on electrode pretreatment, applied potential for DNA immobilization, and detection potential. Under optimal conditions, the pretreatment of the electrode obtained in 1.6 V for 350s, then the DNA was immobilized on the electrode surface by applying a potential of -0.5 V to detect different PAHs in real samples in the range of micro molar.

Conclusion: Electrochemical DNA biosensors are capable of detecting the sum of PAHs in water samples with high accuracy, sensitivity, and low cost compared with chromatographic methods.

Key words: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), Electrochemical biosensor, liquid-liquid Chromatography, Screen-printed electrode.

***Corresponding Author:** *Bahar_sehat@yahoo.com*

Tel/Fax: +98 44 33440295 **Mob:** +98 914 974 5603