فصلنامه انسان و محیط زیست، شماره ۴۸، بهار ۹۸

بررسی آلودگی های محیطی ایجاد شده با آفت کش های ارگانوفسفره توسط زیست حس گر طراحی شده با آنزیم استیل کولین استراز

علی شمس آذر[۱]*

Ali.Shamsazar@yahoo.com

فاطمه شمس آذر[۲]

اسداله اسدی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۷/۰۶ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۰۸**

چکیده

آفت‌کش‌ها مواد شیمیایی هستند که به منظور کنترل حشرات، قارچ ها، علف های هرز و سایر آفت ها استفاده می شوند. پسماند آفت-کش‌ها ممکن است ازطریق هوا، آب و خاک وارد زنجیره ی غذایی شده و باعث مشکلات بهداشتی برای اکوسیستم، پرندگان، حیوانات و انسان شود. روش‌های متداول شناسایی آفت کش شامل کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و کروماتوگرافی گازی (GC) می-باشند. ولی این روش‌ها وقت‌گیر و نیازمند به تکنسین برای کنترل مداوم است، بنابراین استفاده از زیست حس‌گرها می‌تواند در این زمینه مفید باشد.

زیست حس گرآنزیمی استیل کولین استراز برای شناسایی آفت‌کش‌های ارگانوفسفره (مورد مطالعه: پاراکسون) استفاده گردید. شناسایی کمی آفت‌کش‌ها بر پایه مهار آنزیم استیل کولین استراز و کاهش فعالیت آن در مواجهه با آفت‌کش مورد نظر می‌باشد. پارامترهایی مانند pH، غلظت آفت کش و پایداری زیست حس‌گر نیز مورد بررسی قرار گرفت.

زیست حس‌گر طراحی شده حساسیت بالایی را نسبت به پاراکسون از خود نشان داد. تحت شرایط بهینه مهار استیل کولین استراز توسط پاراکسون با افزایش غلظت این ترکیب در دامنه $۱۰^{-۴}$ تا $۱۰^{-۷}$ میلی مولار رابطه خطی داشت. همچنین زیست حس گر تهیه شده پایداری بسیار خوبی را از خود نشان داد.

زیست حس‌گر آنزیمی استیل کولین استراز می‌تواند با حد تشخیص 2.14×10^{-7} mM به عنوان شناساگری حساس در جهت شناسایی سریع سموم آفت‌کش در محیط های آلوده‌ی آبی و خاکی در بخش های صنعت و کشاورزی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: آفت کش، زیست حس گر، استیل کولین استراز، پاراکسون.

۱- کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه پیام نور، مرکز تهران شرق، تهران، ایران. *(مسوول مکاتبات)

۲- کارشناس ارشد شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل، اردبیل، ایران.

۳- دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

Human & Environment., No. 48, Spring 2019

Investigation of environmental contamination caused by organophosphate pesticides by acetylcholinesterase biosensor

Ali Shamsazar[1*] *(Corresponding Author)*
Vheidadri56@gmail.com
Fatemeh Shamsazar [2]
Asadollah Asadi [3]

Abstract

Pesticides are chemical substances that use to control insects, fungis, weeds and other pests. Residuals of pesticides maybe enter to food chain through air, water and soil and cause health problems for ecosystems, birds, animals and humans. Common methods to detect pesticides including, high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography (GC). But these methods are time consuming and require a technician to control, so use of biosensor can be useful in this field.
An acetylcholinesterase biosensor was used to detection of organophosphate pesticides (case study: Paraoxon). Qualitative identification of pesticides based on inhibition of the acetylcholinesterase enzyme and reduce activity of it in the face of pesticides. Also Other parameters were investigated such as pH, concentration of pesticides and sustainability of biosensor also.
The designed biosensor showed high sensitivity to paraoxon concentration. Under optimal condition, inhibition of acetylcholinesterase by paraoxon had a linear relation with increasing concentrations of the paraoxon in the range of 10^{-7} to 10^{-4} mM. Also prepared sensor showed good stability.
The designed acetylcholinesterase enzymatic biosensor with 2.14×10^{-7} mM identification limit can be use as a sensitive and accurate detector in order to rapid identification pesticides in contaminated environment such as soil and water, in industry and agriculture sectors.

Key Words: Pesticides, Biosensor, Acetylcholinesterase, Praoxon.

1- MSc in biochemistry, Department of Biochemistry, Payame Noor University, Tehran, Iran.**(Corresponding Author)*
2- MSc in chemistry, Department of Chemistry, Islamic Azad University, Ardabil Branch, Ardabil, Iran.
3- Associated Professor in biology, Department of Biology, Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

مقدمه

حضور پسماند های آفت‌کش‌ها در مواد غذایی، آب و خاک امروزه به یکی از بزرگ‌ترین نگرانی های بهداشتی محیط زیست تبدیل شده است. در واقع آفت کش ها در حال حاضر به دلیل استفاده زیاد در کشاورزی یکی از بزرگ ترین آلوده کننده محیطی حساب می‌شوند (۲،۱). کشاورزان در زمینه کشاورزی به منظور کنترل بیماری های شایع مرتبط با کشاورزی از آفت کش ها استفاده می‌کنند (۴،۳). آفت کش ها ممکن است سرطان زا باشند و یا بیماری های فلج اطفال، نازایی، اختلالات عصبی، مشکلات تنفسی و ایمنی بدن را به همراه داشته باشند. بالاترین میزان مجاز آفت کش در آب مورد استفاده انسان از ۰/۳ تا ۴۰۰ میکروگرم در لیتر می‌باشد (۵). در میان سموم آفت کش، ارگانوفسفره ها و کربامات ها به دلیل کارآیی بالا در عملکرد و ماندگاری کم، بیش تر استفاده می‌شوند (۶). روش‌ های رایج به کار رفته در تجزیه و تحلیل آفت کش ها شامل کروماتوگرافی (مایع با کارآیی بالا و گازی) با تکنیک های مکمل GC-MS یا ELISA می‌باشند (۸،۷). این روش‌های ذکر شده هر چند حساس و قابل اعتماد هستند و مزیت خاص خود را دارند، ولی با این حال نیازمند تجهیزات گران بها، زمان و زحمت زیاد بوده و به آسانی با تحلیل میدانی سازگاری نشان نمی دهند. زیست حس گر ها، جایگزین مقرون به صرفه ای برای روش های فوق هستند. زیست حس گر ها ردیاب هایی هستند که اجزای بیولوژیکی (زیست شناختی) یعنی آنزیم، سلول کامل، پادتن و غیره را با اجزاء الکتریکی به منظور ایجاد سیگنال های قابل اندازه گیری با یکدیگر به کار می‌گیرند (۹). با این وجود زیست حس‌گرها توان رقابت با تکنیک های کروماتوگرافی ذکر شده در بالا را ندارند و تکنیک های معرفی شده تحلیل های دقیق تری را ارایه می دهند. زیست حس گر ها برای آزمایش مقدماتی بسیار سودمند هستند و بهتر است این آزمایش قبل از به کارگیری تکنیک های گران قیمت کروماتوگرافی صورت گیرد. در طی سه دهه اخیر چند زیست حس گر آفت کش با استفاده از آنزیم ها، پادتن و سلول کامل تولید شده است. استیل کولین استراز به دست آمده از ارگانسیم‌های گوناگون در اکثر زیست حس گر آفت کش مورد استفاده قرار گرفته است.اشکال عمده سنسورهای استیل کولین استراز این است که محصول آنزیمی، تیوکولین اکسیده، به پتانسیل اعمالی بالایی نیاز دارد که در نتیجه پایداری سنسور را کاهش می دهد. به منظور حل این مشکل میانجی هایی مثل 8,8′,7,7′-تتراسیانوکونین دی متان (TCNQ) و مواد رسانایی مثل نانو لوله های کربنی به کار گرفته می شود (۱۱،۱۰) که در این مطالعه ما از نانو لوله کربنی به این منظور استفاده کردیم. روش تشخیص در این مطالعه شامل دو مرحله بود: که در گام اول ولتاموگرام چرخه ای در یک محلول به نسبت برابر از بافر و سوبسترا (استیل تیوکولین کلراید) به دست آمد. و در گام دوم پس از شستشوی الکترود، مهار کننده ی آنزیمی پاراکسون به بافر کار اضافه شد و مهار آنزیم به طریق ولتامتری شناسایی شد. در این روش آنزیم به عنوان عامل ضبط کننده برای آفت کش عمل می کند. و به دلیل مهار غیر قابل برگشت آنزیم توسط آفت کش، واکنش های پی در پی آنزیمی می تواند در یک محلول بافر تمیز انجام شود.

روش کار

مواد و دستگاه ها

آنزیم استیل کولین استراز (AchE 236 U/mg) و استیل تیوکولین کلراید (ATCl) از شرکت سیگما آلدریچ و نانولوله های کربنی چند دیواره نیز از شرکت NanoLab خریداری شدند. بووین آلبومین سرم (BSA) ازمرک آلمان و گلوترآلدهید به همراه پاراکسون از شرکت سیگما خریداری شدند. سایر مواد مورد استفاده نیز دارای خلوص تجزیه ای بودند. ساخت تمام محلول‌ها با آب مقطر دیونیزه انجام شد. در این پژوهش سه الکترود شامل: الکترود کار (کربن شیشه ای اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی و استیل کولین استراز)، الکترود مرجع (الکترود اشباع کالومل)، الکترود شمارش گر (الکترود پلاتین) با قطر ۴ میلی متر مورد استفاده قرار گرفت.

آزمایش‌های ولتامومتری چرخه‌ای توسط دستگاه پتانسیو گالوانومتر[1]هلندی پالم سنس[2]انجام شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره[3]و میکروسکوپ الکترونی گذاره[4]توسط میکروسکوپ‌های مدل DSM 960A و CEM 902A شرکت زئیس[5]گرفته شد.

آماده سازی الکترود کربن شیشه ای

الکترود کربن شیشه ای به وسیله ی کیت پولیش BSA و پودر Al_2O_3 پولیش داده شد تا به یک سطح صاف برسد (۱۲). سپس الکترود در محلول آب و اتانول و در حمام اولتراسونیک به مدت دو دقیقه قرار داده شد. در ادامه الکترود به سل الکتروشیمیایی حاوی محلول بافر (pH=5) منتقل شده و به آن پتانسیل ۱/۵۰ + ولت به مدت ۳۰۰ ثانیه اعمال گردید. الکترود در پتانسیل های ۰/۲ تا ۱/۲ و ۰/۲ تا ۱/۲۵ - تحت روبش قرار گرفت تا الکترود جریان زمینه ی ثابتی را نشان دهد سپس الکترود با آب مقطر شستشو داده شده برای اصلاح با نانو لوله ی کربنی آماده گردید (۱۳).

ساخت زیست حس گر

محلول کیتوسان ٪ ۰/۵ با حل کردن پودر کیتوسان در محلول آبی استیک اسید با pH=5 به دست آمد این محلول در زمان هایی که مورد نیاز نمی باشد در دمای ۴ درجه ی سانتیگراد نگهداری می شود (۱۴). ۵ میکرو لیتر از گلوترآلدهید ٪۲۵ با یک میلی لیتر محلول کیتوسان ٪۰/۵ مخلوط شده و این مخلوط به مدت ۳ دقیقه هم زده شده تا بین کیتوسان و گروه های CHO آزاد پیوند برقرار شود. ۰/۱ میلی گرم نانولوله کربنی چند دیواره به این مخلوط اضافه گردید و برای دست یابی به یک محلول یکنواخت به مدت ۱۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرارداده شد . ترکیب نسبی نانو لوله ی کربنی چند دیواره، کیتوسان و گلوترآلدهید در مخلوط به ترتیب برابر ٪۱۰ ، ٪۴۵ و ٪۴۵ (v/v) می باشد. برای آماده سازی حس گر، ۲ میکرولیتر از این مخلوط برروی الکترود قرارداده شده و برای تثبیت آن الکترود به مدت ۷ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت پس از این زمان سطح الکترود به منظور پاک شدن مقادیر اضافی گلوترآلدهید به وسیله ی آب مقطر دو بار تقطیر شستشو داده شد (۱۵). سپس ۴ میکرولیتر از محلول آنزیم استیل کولین استراز (۲۰۰ میلی واحد، حاوی ۵ میلی گرم در یک میلی لیتر از BSA) روی الکترود قرار گرفته و الکترود به منظور تثبیت آنزیم به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق گرفت (۱۶). در این مدت پیوندهای کووالانسی بین آنزیم و نانو لوله ی کربنی چند دیواره توسط گروه های آزاد CHO که گلوترآلدهید را به مولکول های کیتوسان متصل کرده اند برقرار می شود. پس از تبخیر آب، حس گر به منظور پاک شدن مقادیر اضافی آنزیم به وسیله ی محلول بافر فسفات ۰.۱ مولار (pH= ۷) شستشو داده شد. در این زمان حس گر آماده شد و می توانست مورد استفاده قرار گیرد. این حس گر در زمان هایی که مورد نیاز نمی باشد در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری می شود.

روش کار و محاسبات

حس گر آماده شده با روبش های ولتامتری چرخه ای بین صفر تا ۰/۸ ولت در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار تا دست یابی به منحنی پایدار فعال سازی گردید. سپس الکترود اصلاح شده به سل الکتروشیمیایی حاوی محلول بافرفسفات ۰/۱ مولار و استیل تیو کولین ATCl ۰/۱ میلی مولار منتقل شده و پاسخ الکتروشیمیایی با روش ولتامتری چرخه ای ثبت گردید ($i_p$control). به منظور تعیین بازداری آنزیم، الکترود اصلاح شده برای ۱۲ دقیقه در محلول های پاراکسون با غلظت های متفاوت غوطه ور شد. الکترود پس از هربار غوطه وری به سل الکتروشیمیایی حاول ۰/۱ میلی مولار سوبسترا منتقل و پس از انجام ولتامتری چرخه ای در هر غلظت، پاسخ الکترود ($i_p$exp) ثبت شد. در صد بازداری آنزیم از رابطه ی زیر محاسبه گردید:

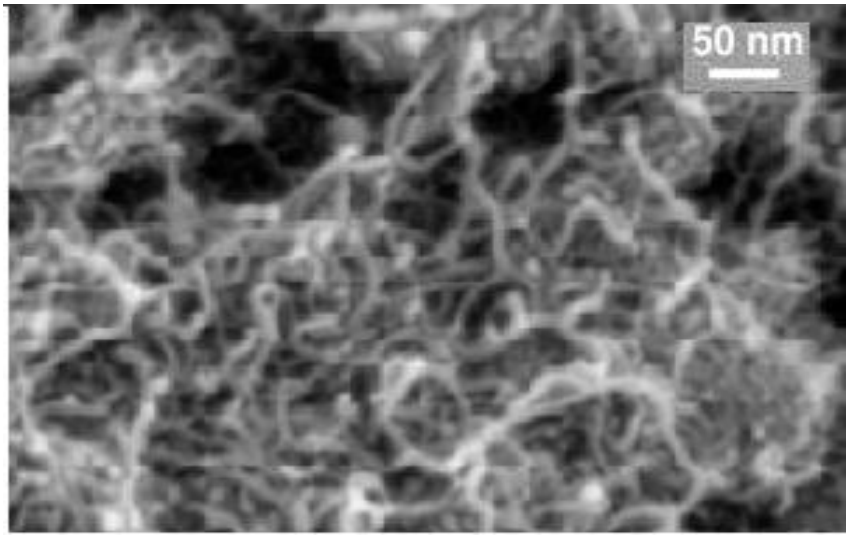
$$\text{indibition (\%)} = 100 * (i_p.\text{control} - i_p.\text{exp}) / i_p.\text{control}$$

1-Potentiostat/Galvanostat
2-Palm-Sens
3-SEM
4-TEM
5-Zeiss

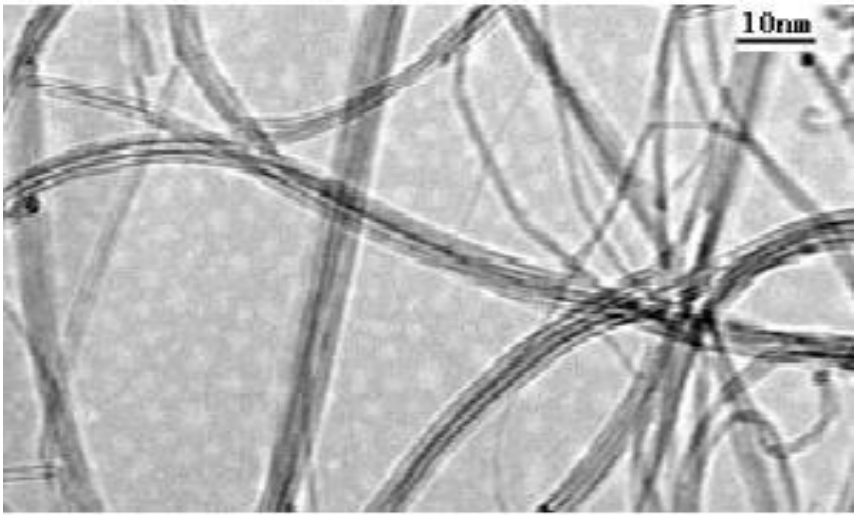
یافته ها

بررسی ویژگی‌های نانولوله‌های کربنی بـا میکروســکوپ الکترونی

شکل ۱، تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره و شـکل ۲ تصـویر میکروسکوپ الکترونی گذاره ی نانو لوله هـای کربنـی را نشـان می‌دهد. درجه وضوح بالای تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره بر آن تاکید دارد که مراحل خالص سازی به خوبی انجام شـده است. باتوجه به اطلاعات به دست آمده از تصاویر میکروسـکوپ الکترونی نگاره و گذاره نانو لوله هـای کربنـی دارای قطـری در محدوده ۱۰ تا ۵۰ نانومتر مـی باشـند و دارای خلـوص بـالای ٪۹۰ هستند.



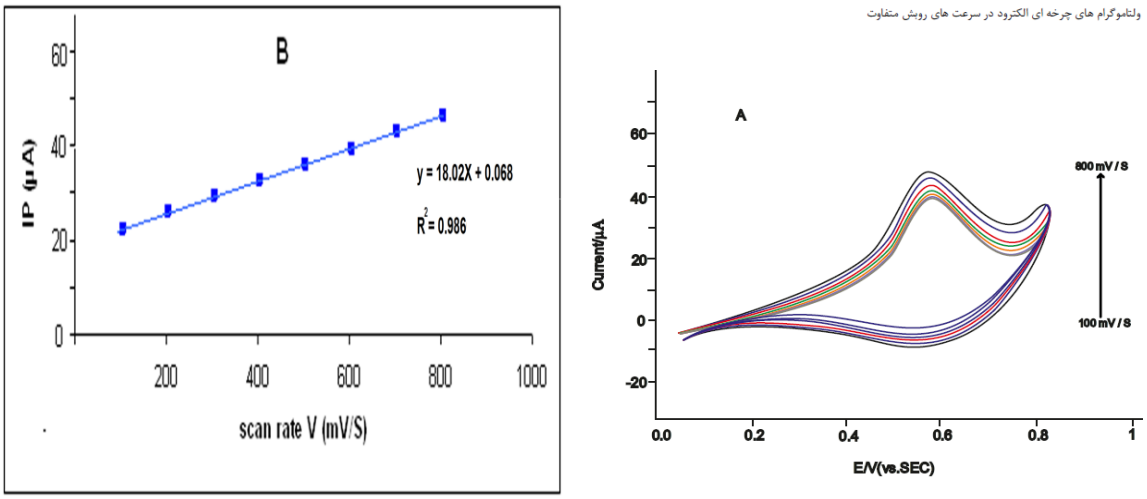
شکل ۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره نانولوله‌های کربنی



شکل ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره مربوط به نانولوله‌های کربنی

اثر سرعت‌های روبش متفاوت روی ولتاموگرام‌های چرخه ای الکترود شیشه ای کربن/ نانو لوله کربنی/ استیل کولین استراز

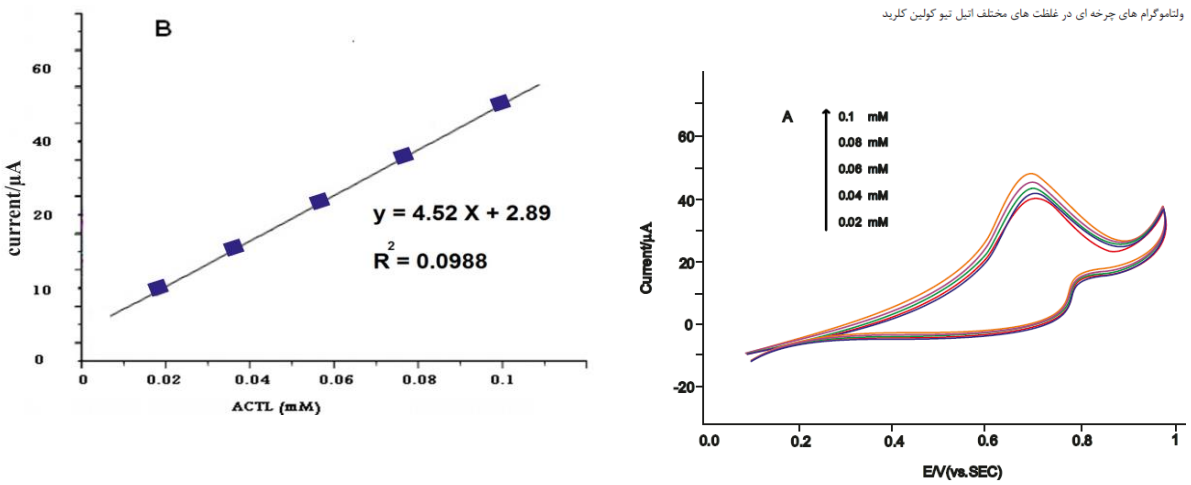
در مطالعه ی بعدی خصوصیات انتقال الکترون استیل کولین_ استراز روی الکترود شیشه ای کربن اصلاح شده با نانو لوله ی کربنی بررسی گردید و اثر سرعت‌های متفاوت روبشی روی ولتاموگرام‌های چرخه ای استیل کولین استراز مطالعه شد (شکل ۳- A) . همان طوری که در شکل ۳ (B) مشاهده می شود یک وابستگی خطی بین جریان آندی با سرعت روبش مشاهده می شود به طوری که جریان‌های قله ردوکس به طور خطی با سرعت روبش افزایش می‌یابد. که جریان قله اکسایشی (ip_a) متناسب با سرعت روبش می باشد. سرعت های روبش استفاده شده از کم ارتفاع ترین قله به پر ارتفاع ترین قله به ترتیب ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ ، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰، ۷۰۰ و ۸۰۰ میلی ولت بر ثانیه و ضریب همبستگی برابر ۰/۹۸۶ برای پیک آندی می باشد. این پدیده به این مطلب اشاره دارد که پروسه ردکس تحت کنترل جذب گونه ردوکس روی سطح الکترود می‌باشد و نشان دهنده ی تثبیت استیل کولین استراز به طور پایدار روی سطح الکترود می‌باشد.



شکل ۳ (A)- سرعت های روبش استفاده شده به ترتیب از کم ارتفاع ترین قله به پر ارتفاع ترین قله به ترتیب ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰، ۷۰۰ و ۸۰۰ میلی ولت بر ثانیه. (B)- وابستگی خطی جریان پیک آندی (خط آبی رنگ) با سرعت روبش را نشان می دهد.

اثر غلظت های مختلف استیل تیو کولین کلراید بر روی پیک آندی

همان گونه که مشاهده می شود ولتاموگرام چرخه ای برای انتقال مستقیم الکترون از تیوکولین درحضور مقادیر مختلف استیل تیو کولین کلراید محلول بصورت چشمگیر تغییر می کند و یک افزایش جریان پیک آندی مشاهده می شود و به طور کلی یک پاسخ جریان بزرگ در پتانسیل ۰/۷ ولت رخ می دهد (شکل ۴-A).



شکل ۴ (A)- ولتاموگرام های چرخه ای الکترود شیشه کربن / نانو لوله ی کربنی/ استیل کولین استراز در مقادیر مختلف استیل تیو کولین کلرید در سرعت روبش ۱۰۰ میلی ولت بر ثانیه در در بافر 0.1 مولار وpH برابر ۷ . (B)- منحنی کالیبراسیون خطی پاسخ ولتامتری الکترود به مقادیر مختلف استیل تیو کولین کلرید

تفاوت در منحنی های شکل ۴ نشان دهنده این است که فعالیت استیل کولین استراز جذب شده بر روی الکترود با افزایش مقادیر استیل تیو کولین کلرید قبل از رسیدن به حالت اشباع افزایش میابد و باعث یک افزایش چشمگیر در جریان پیک آندی می شود. که نشان دهنده اکسیداسیون آندیک تیوکولین در طی واکنش های زیر است:

$$\underset{Acetylthiocholine}{(CH_3)_3\overset{+}{N}CH_2CH_2SCOCH_3} \xrightarrow{AChE} \underset{thiocholine}{(CH_3)_3\overset{+}{N}CH_2CH_2SH} + CH_3COOH$$

$$2\underset{Thiocholine\,(oxidation\,state)}{(CH_3)_3\overset{+}{N}CH_2CH_2SH} \xrightarrow{electrode} SCH_2CH_2\overset{+}{N}(CH_3)_3 + 2H^+ + 2e^-$$

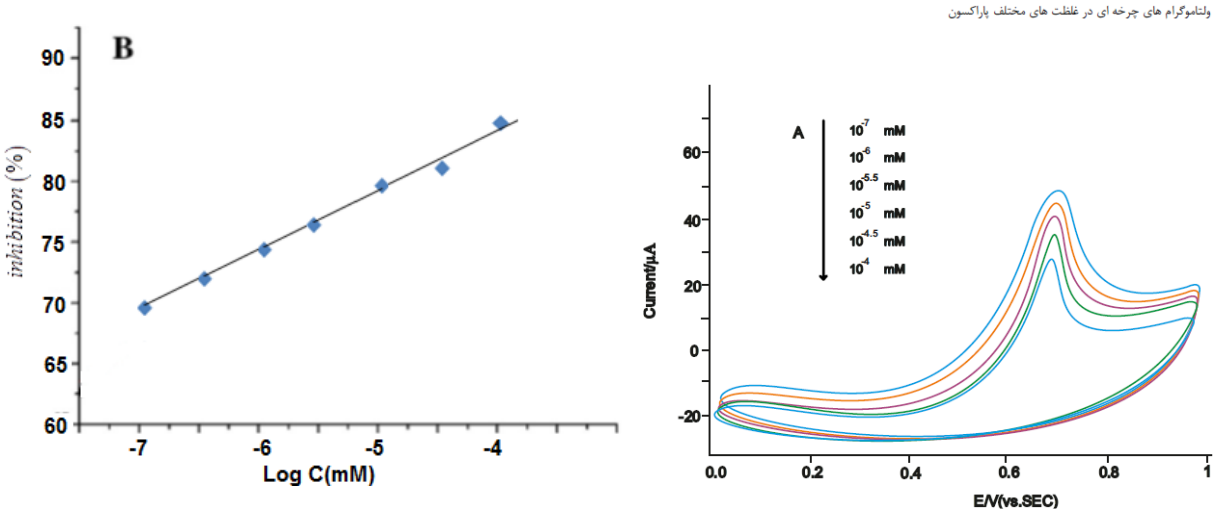
$$\underset{(reduction\,state)}{SCH_2CH_2\overset{+}{N}(CH_3)_3}$$

تاثیر پاراکسون بر الکترود شیشه کربن اصلاح شده با نانولوله کربنی و استیل کولین استراز و تعیین غلظت پاراکسون:

در این قسمت پیک های ولتامتری برای توصیف فعالیت استیل کولین استراز مورد استفاده قرار گرفت. در شکل ۵ رفتار الکترود شیشه ای کربن / نانو لوله ی کربنی / استیل کولین استراز، پس از اضافه کردن پاراکسون، نشان داده شد. پس از انکوباسیون بیوسنسور در محلول استاندارد پاراکسون در بافر فسفات ۰.۱ مولار (PH=7) به مدت ۱۲ دقیقه و سپس انتقال آن به یک سلول ولتامتری حاوی ۰.۱ میلی مولار استیل تیو کولین کلراید پیک ولتاموگرام نسبت به حالت عادی خالی از پاراکسون در غلظت ثابت استیل تیو کولین کلراید قله ی کوتاه تری را نشان داد که نشان دهنده مهار استیل کولین استراز توسط پاراکسون و کاهش فعالیت آنزیمی آن بود. در غلظت های مختلف پاراکسون به ترتیب برابر با 10^{-7} میلی مولار ، 10^{-6} میلی مولار، $10^{-5/5}$ میلی مولار، 10^{-5} میلی مولار ، $10^{-4/5}$ میلی مولار و 10^{-4} میلی مولار همانطور که در شکل ۵ مشخص است با افزایش غلظت پاراکسون پیک های جریان بیش تر کاهش میابند زیرا پاراکسون به عنوان یک آفت کش با سمیت حاد موجب مهار غیر قابل برگشت عمل استیل کولین استراز می شود در نتیجه فعالیت آنزیمی کاهش میابد. راندمان مهار آنزیم توسط پاراکسون از رابطه کلی زیر بدست میآید:

$$inhibition\,(\%) = \frac{i_{P,control} - i_{P,\exp}}{i_{P,control}} \times 100$$

که در آن $i_{P,control}$ جریان پیک در بیوسنسور الکترود شیشه کربن / نانو لوله ی کربنی/ استیل کولین استراز کربن در محلول حاوی سوبسترای استیل تیوکولین کلراید و $i_{P,exp}$ جریان پیک در بیوسنسور الکترود شیشه کربن / نانو لوله ی کربنی/ استیل کولین استراز به همراه پاراکسون می باشد. معادله ی قسمت خطی منحنی مهار آنزیم توسط پاراکسون در محدوده غلظت آن در 10^{-7} میلی مولار تا 10^{-4} میلی مولار برابر با I%=(6.683c+68.46)% میباشد. که ضریب همبستگی آن برابر ۰/۹۸۸۵ است. حد آشکارسازی 2.14×10^{-7} mM محاسبه شد. با توجه به تغییر قابل توجه در سیگنال ولتامتری، بیوسنسور الکترود شیشه کربن / نانو لوله ی کربنی/ استیل کولین استراز کربن روشی ساده، کم هزینه و مناسب برای تعیین میزان پاراکسون می باشد.



شکل ۵- ولتاموگرام‌های چرخه‌ای بدست آمده برای الکترود شیشه ای کربن / نانو لوله ی کربنی/ استیل کولین استراز در محلول بافر فسفات ۰.۱ مولار در pH= ۷ در غلظت‌های مختلف پاراکسون در سرعت روبش ۱۰۰ میلی ولت بر ثانیه

انتخاب پذیری و پایداری زیست حس گر طراحی شده

در این تحقیق بیوسنسور طراحی شده بر اساس الکترود شیشه ای کربن / نانو لوله ی کربنی/ استیل کولین استراز بعد از گذشت ۳۰ روز ٪۹۰ از فعالیت اولیه خود را حفظ کرد. این کاهش فعالیت بیوسنسور به دلیل انحلال آنزیم در طول زمان در بافر و جدا شدن از الکترود می باشد و همچنین در بررسی های بعدی مشخص شد که عوامل تداخل گر اثر چندانی بر روی فعالیت بیوسنسور طراحی شده نداشتند. تنها چالش موجود، اصلاح کردن تحت کنترل الکترود با نانولوله کربن بود.

نتیجه گیری

زیست حس گر های تهیه شده برای اندازه گیری آفت کش ها گزینه های مناسبی برای آشکار سازی سریع می باشند. باید ذکر کرد که زیست حس گر طراحی شده در این مطالعه توانایی خیلی خوبی برای تشخیص پاراکسون دارد و پیک ردوکس را کاهش می‌دهد. نتایج نشان داد که که با تثبیت آنزیم استیل کولین استراز برسطح الکترود اصلاح شده با نانو لوله کربنی می‌توان یک زیست حس گر جدید برای تعیین غلظت پاراکسون طراحی نمود که دارای حد تشخیص مناسبی برابر با 2.14×10^{-7} mM می باشد و در مجموع این الکترود اصلاح شده می تواند در بررسی های بیوالکتروشیمیایی مفید واقع شود. زیست حس گر آنزیمی استیل کولین استراز می تواند به عنوان شناساگری حساس در جهت شناسایی سریع سموم آفت کش در محیط های آلوده ی آبی و خاکی در بخش های صنعت و کشاورزی مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

1. Pohanka, M., 2016. Electrochemical Biosensors based on Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. A Review. Int. J. Electrochem. Sci, Vol. 11, pp.7440-7452.
2. Stojanović, Z., Đurović, A., Kravić, S., Grahovac, N., Suturović, Z., Bursić, V., Vuković, G. and Brezo, T., 2016. A simple and rapid electrochemical sensing method for metribuzin determination in tap and river water samples. Analytical Methods, Vol. 8(12), pp.2698-2705.
3. Liu, S., Yuan, L., Yue, X., Zheng, Z. and Tang, Z., 2008. Recent advances in nanosensors for organophosphate pesticide detection. Advanced Powder Technology, Vol.19(5), pp.419-441.
4. Leniart, A., Brycht, M., Burnat, B. and Skrzypek, S., 2016. Voltammetric determination of the herbicide propham on glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes. Sensors and Actuators B: Chemical, Vol.231, pp.54-63.
5. Sassolas, A., Prieto-Simón, B. and Marty, J.L., 2012. Biosensors for pesticide detection: new trends. American Journal of Analytical Chemistry, Vol. 3(3), p.210.
6. Kim, B.S., Kim, G.W., Heo, N.S., Kim, M.S., Yang, K.S., Lee, S.Y. and Park, T.J., 2015. Development of a portable biosensor system for pesticide detection on a metal chip surface integrated with wireless communication. Food Science and Biotechnology, Vol.24(2), pp.743-750.
7. Musilek, K., Dolezal, M., Gunn-Moore, F. and Kuca, K., 2011. Design, evaluation and structure—Activity relationship studies of the AChE reactivators against organophosphorus pesticides. Medicinal research reviews, Vol.31(4), pp.548-575.
8. Arduini, F., Guidone, S., Amine, A., Palleschi, G. and Moscone, D., 2013. Acetylcholinesterase biosensor based on self-assembled monolayer-modified gold-screen printed electrodes for organophosphorus insecticide detection. Sensors and Actuators B: Chemical, Vol.179, pp.201-208.
9. Shamsazar A., Asadi, A. and Shamsazar, F., 2015. Determination of Serum Glucose Samples Using Biosensor Based on Copper Oxide Nanoparticles.Journal of Ardabil University of Medical Sciences, Vol.15(3), pp.330-338.
10. Andreescu, S., Magearu, V., Lougarre, A., Fournier, D. and Marty, J.L., 2001. Immobilization of enzymes on screen-printed sensors via an histidine tail. Application to the detection of pesticides using modified cholinesterase. Analytical letters, Vol.34(4), pp.529-540.
11. Joshi, K.A., Tang, J., Haddon, R., Wang, J., Chen, W. and Mulchandani, A., 2005. A disposable biosensor for organophosphorus nerve agents based on carbon nanotubes modified thick film strip electrode. Electroanalysis, Vol.17(1), pp.54-58.
12. Kong, Y.T., Boopathi, M. and Shim, Y.B., 2003. Direct electrochemistry of

horseradish peroxidase bonded on a conducting polymer modified glassy carbon electrode. Biosensors and Bioelectronics, Vol.19(3), pp.227-232.

13. Dekanski, A., Stevanović, J., Stevanović, R., Nikolić, B.Ž. and Jovanović, V.M., 2001. Glassy carbon electrodes: I. Characterization and electrochemical activation. Carbon, Vol.39(8), pp.1195-1205.
14. Wang, J., Jiang, J.Z., Chen, W. and Bai, Z.W., 2016. Synthesis and characterization of chitosan alkyl urea. Carbohydrate polymers, Vol.145, pp.78-85.
15. dos Santos Silva, F.D.A., da Silva, M.G.A., Lima, P.R., Meneghetti, M.R., Kubota, L.T. and Goulart, M.O.F., 2013. A very low potential electrochemical detection of L-cysteine based on a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes/gold nanorods. Biosensors and Bioelectronics, Vol.50, pp.202-209.
16. Liu, Q., Fei, A., Huan, J., Mao, H. and Wang, K., 2015. Effective amperometric biosensor for carbaryl detection based on covalent immobilization acetylcholinesterase on multiwall carbon nanotubes /graphene oxide nanoribbons nanostructure. Journal of Electroanalytical Chemistry, Vol.740, pp.8-13.