مجله پژوهش های معاصر در علوم و تحقیقات
سال هشتم، شماره۸۳، خرداد ۱۴۰۵
ISSN: ۲۶۷۶-۵۷۶٤
www.jocrisar.ir

# استفاده از بیوسنسورها برای پایش سریع آلودگی میکروبی در محصولات شیلاتی

**زهرا باورمنش**[۱]

[۱] گروه صنایع غذایی، دانشگاه تهران، ایران

**چکیده**

آلودگی میکروبی در محصولات شیلاتی یکی از مهم‌ترین چالش‌های ایمنی غذایی در زنجیره تأمین آبزیان به‌شمار می‌رود و می‌تواند منجر به فساد سریع محصول، کاهش کیفیت و بروز بیماری‌های منتقله از غذا شود. روش‌های متداول تشخیص مانند کشت میکروبی و آزمون‌های مولکولی اگرچه از دقت بالایی برخوردارند، اما اغلب زمان‌بر بوده و نیازمند تجهیزات آزمایشگاهی پیشرفته هستند؛ بنابراین توسعه فناوری‌های تشخیص سریع و در محل برای کنترل کیفیت محصولات شیلاتی اهمیت زیادی دارد. در این پژوهش یک بستر بیوسنسور الکتروشیمیایی مبتنی بر میکروآرایه‌های الکترودی اصلاح‌شده با نانوذرات طلا–گرافن و آنتی‌بادی‌های اختصاصی طراحی و ارزیابی شد. عملکرد حسگر با استفاده از تکنیک امپدانس‌سنجی الکتروشیمیایی (EIS) و اندازه‌گیری جریان اکسایش–کاهش مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سامانه طراحی‌شده قادر است حضور باکتری‌های شاخص آلودگی شامل *اشرشیا کلی*، *ویبریو پاراهمولیتیکوس* و *سالمونلا* را در نمونه‌های آب و بافت ماهی با حد تشخیص کمتر از $۱۰^{۴}$ CFU/mL در زمانی کمتر از ۱۰ دقیقه شناسایی کند. ارزیابی صحت عملکرد حسگر از طریق مقایسه با روش‌های استاندارد کشت میکروبی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) انجام شد که دقت کلی تشخیص ۹۶ درصد و میزان خطای مثبت یا منفی کمتر از ۲ درصد را نشان داد. همچنین طراحی چندگانه حسگر امکان تشخیص همزمان چند پاتوژن را فراهم کرد و قابلیت اتصال به یک ماژول پردازش داده قابل‌حمل با ارتباط بلوتوثی جهت انتقال داده‌ها به سامانه‌های مدیریت کیفیت نیز بررسی شد. نتایج نشان می‌دهد که استفاده از بیوسنسورهای الکتروشیمیایی مبتنی بر نانومواد می‌تواند به‌عنوان ابزاری کارآمد برای پایش سریع آلودگی میکروبی در صنعت شیلات مورد استفاده قرار گیرد و با فراهم کردن امکان تشخیص سریع در محل، به بهبود ایمنی غذایی و تصمیم‌گیری سریع در مراحل برداشت، نگهداری و توزیع محصولات آبزی کمک کند.

**واژه‌های کلیدی:** بیوسنسور، پایش میکروبی، محصولات شیلاتی، الکتروشیمیایی، تشخیص سریع، نانوذرات طلا–گرافن، تشخیص چندگانه

**مقدمه**

محصولات شیلاتی به دلیل ارزش تغذیه‌ای بالا، دارا بودن پروتئین‌های با کیفیت، اسیدهای چرب امگا-۳، ویتامین‌ها و مواد معدنی، بخش مهمی از رژیم غذایی انسان را تشکیل می‌دهند. با این حال، این محصولات به علت فعالیت آبی بالا، pH نسبتاً خنثی و ترکیبات مغذی فراوان، محیط مناسبی برای رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌ها فراهم می‌کنند و به همین دلیل در برابر آلودگی‌های میکروبی بسیار حساس هستند. رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در ماهی و سایر آبزیان می‌تواند علاوه بر کاهش کیفیت و ماندگاری محصول، منجر به بروز بیماری‌های منتقله از غذا در مصرف‌کنندگان شود. باکتری‌هایی نظیر اشرشیا کلی، سالمونلا، لیستریا مونوسیتوژنز و گونه‌های ویبریو از جمله مهم‌ترین عوامل میکروبی مرتبط با فساد و آلودگی محصولات شیلاتی به شمار می‌روند که حضور آن‌ها در زنجیره تولید و توزیع می‌تواند تهدیدی جدی برای سلامت عمومی باشد (حسینی و همکاران، ۱۳۹۸؛ کومار و همکاران، ۲۰۲۰).

در سال‌های اخیر با افزایش مصرف جهانی محصولات آبزی و گسترش تجارت بین‌المللی این محصولات، توجه به ایمنی میکروبی و توسعه روش‌های کارآمد برای پایش سریع آلودگی در این حوزه اهمیت بیشتری یافته است. روش‌های متداول تشخیص آلودگی میکروبی در صنایع غذایی عمدتاً مبتنی بر کشت میکروبی، آزمون‌های بیوشیمیایی و روش‌های مولکولی نظیر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) هستند. اگرچه این روش‌ها از نظر دقت و حساسیت قابل قبول‌اند، اما معمولاً زمان‌بر بوده و به تجهیزات تخصصی آزمایشگاهی و نیروی انسانی ماهر نیاز دارند. برای مثال، روش‌های مبتنی بر کشت میکروبی ممکن است بین ۲۴ تا ۷۲ ساعت زمان برای شناسایی قطعی یک پاتوژن نیاز داشته باشند (لاو و همکاران، ۲۰۱۵). این محدودیت زمانی در صنایع شیلاتی که محصولات آن فسادپذیری بالایی دارند می‌تواند منجر به تأخیر در تصمیم‌گیری‌های مدیریتی و افزایش خطر ورود محصولات آلوده به بازار شود. از سوی دیگر، برخی روش‌های مولکولی نیز اگرچه سرعت بیشتری دارند، اما هزینه بالا، نیاز به آماده‌سازی پیچیده نمونه و تجهیزات پیشرفته، کاربرد آن‌ها را در پایش‌های میدانی محدود می‌کند (ولوسامی و همکاران، ۲۰۱۸).

در پاسخ به این چالش‌ها، در سال‌های اخیر فناوری بیوسنسورها به عنوان یکی از رویکردهای نوین و امیدبخش برای تشخیص سریع عوامل میکروبی در مواد غذایی مورد توجه قرار گرفته است. بیوسنسورها ابزارهای تحلیلی هستند که از ترکیب یک عنصر زیستی شناسایی‌کننده مانند آنتی‌بادی، آنزیم یا DNA با یک مبدل فیزیکی یا شیمیایی تشکیل شده‌اند و قادرند حضور یک ترکیب زیستی خاص را به یک سیگنال قابل اندازه‌گیری تبدیل کنند. این سامانه‌ها به دلیل سرعت بالا، حساسیت مناسب، امکان کوچک‌سازی، قابلیت استفاده در محل و نیاز کمتر به آماده‌سازی نمونه، پتانسیل قابل توجهی برای کاربرد در صنایع غذایی و به‌ویژه پایش ایمنی محصولات شیلاتی دارند (ترنر، ۲۰۱۶؛ بهالا و همکاران، ۲۰۲۰). در میان انواع مختلف بیوسنسورها، بیوسنسورهای الکتروشیمیایی به دلیل حساسیت بالا، هزینه نسبتاً پایین، قابلیت یکپارچه‌سازی با سیستم‌های الکترونیکی و امکان توسعه سامانه‌های قابل‌حمل، کاربرد گسترده‌ای در تشخیص پاتوژن‌های غذایی پیدا کرده‌اند (جوستینو و همکاران، ۲۰۱۷).

یکی از پیشرفت‌های مهم در بهبود عملکرد بیوسنسورها، استفاده از نانومواد در طراحی سطح حسگر است. نانوذرات طلا، نانولوله‌های کربنی و ساختارهای گرافنی به دلیل سطح ویژه بالا، رسانایی الکتریکی مناسب و قابلیت اصلاح سطحی، می‌توانند به طور قابل توجهی حساسیت و پایداری حسگرهای زیستی را افزایش دهند. ترکیب نانوذرات طلا با ساختارهای گرافنی به ویژه در بیوسنسورهای الکتروشیمیایی، بستر مناسبی برای تثبیت مولکول‌های زیستی و انتقال سریع الکترون فراهم می‌کند و موجب افزایش دقت تشخیص پاتوژن‌ها می‌شود (پومرا، ۲۰۱۸؛ آردوئینی و همکاران، ۲۰۲۰). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که

استفاده از این نانومواد می‌تواند حد تشخیص بیوسنسورها را تا مقادیر بسیار پایین کاهش داده و امکان شناسایی سریع باکتری‌های بیماری‌زا در نمونه‌های غذایی را فراهم سازد (ژو و همکاران، ۲۰۲۱).

با وجود پیشرفت‌های قابل توجه در حوزه بیوسنسورهای زیستی، هنوز چالش‌هایی در زمینه کاربرد عملی این فناوری در پایش ایمنی محصولات شیلاتی وجود دارد. بسیاری از حسگرهای توسعه‌یافته در مقیاس آزمایشگاهی بررسی شده‌اند و قابلیت استفاده همزمان برای تشخیص چندین پاتوژن یا عملکرد مناسب در نمونه‌های واقعی غذایی کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است. همچنین ادغام این حسگرها با سامانه‌های قابل‌حمل و سیستم‌های مدیریت داده برای استفاده در زنجیره تأمین مواد غذایی هنوز به طور کامل توسعه نیافته است. این شکاف دانشی نشان می‌دهد که نیاز به پژوهش‌هایی وجود دارد که ضمن بهره‌گیری از نانومواد پیشرفته، امکان تشخیص سریع، چندگانه و قابل‌حمل پاتوژن‌های مهم در محصولات شیلاتی را فراهم کنند.

بر این اساس، هدف پژوهش حاضر طراحی و ارزیابی یک بیوسنسور الکتروشیمیایی مبتنی بر میکروآرایه‌های الکترودی اصلاح‌شده با نانوذرات طلا–گرافن برای پایش سریع آلودگی میکروبی در محصولات شیلاتی است. در این مطالعه تلاش شده است با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی، امکان شناسایی همزمان چند باکتری شاخص آلودگی در نمونه‌های آب و بافت ماهی فراهم شود و عملکرد حسگر از نظر حساسیت، حد تشخیص، زمان پاسخ و دقت تشخیص با روش‌های استاندارد آزمایشگاهی مقایسه گردد. انتظار می‌رود نتایج این پژوهش بتواند گامی در جهت توسعه سامانه‌های پایش سریع و قابل‌حمل برای افزایش ایمنی میکروبی محصولات شیلاتی و بهبود مدیریت کیفیت در زنجیره تأمین این محصولات باشد.

## مبانی نظری

بیوسنسورها به‌عنوان یکی از مهم‌ترین فناوری‌های نوین در حوزه تشخیص زیستی و ایمنی مواد غذایی شناخته می‌شوند و در دهه‌های اخیر توجه پژوهشگران حوزه‌های زیست‌فناوری، مهندسی پزشکی و علوم غذایی را به خود جلب کرده‌اند. به‌طور کلی، بیوسنسور یک ابزار تحلیلی است که از ترکیب یک جزء زیستی شناسایی‌کننده با یک مبدل فیزیکی یا شیمیایی تشکیل شده و قادر است حضور یا غلظت یک ماده زیستی خاص را به یک سیگنال قابل اندازه‌گیری تبدیل کند. جزء زیستی در این سامانه می‌تواند شامل آنتی‌بادی، آنزیم، اسید نوکلئیک، سلول کامل یا گیرنده‌های زیستی باشد که با هدف شناسایی یک آنالیت مشخص طراحی می‌شود، در حالی که مبدل یا ترانسدیوسر سیگنال حاصل از واکنش زیستی را به یک سیگنال الکتریکی، نوری یا مکانیکی تبدیل می‌کند (ترنر، ۲۰۱۶). اهمیت بیوسنسورها در صنایع غذایی به دلیل توانایی آن‌ها در ارائه نتایج سریع، حساسیت بالا، نیاز کم به آماده‌سازی نمونه و قابلیت استفاده در محل افزایش یافته است (بهالا و همکاران، ۲۰۲۰).

از دیدگاه ساختاری، یک بیوسنسور معمولاً از سه بخش اصلی تشکیل می‌شود: عنصر شناسایی زیستی، مبدل سیگنال و سیستم پردازش داده. عنصر شناسایی زیستی مسئول تعامل اختصاصی با هدف مورد نظر است و این تعامل می‌تواند از طریق واکنش‌های ایمنی‌شناسی، فعالیت آنزیمی یا هیبریداسیون اسیدهای نوکلئیک صورت گیرد. پس از وقوع این تعامل، مبدل سیگنال تغییرات فیزیکی یا شیمیایی ایجاد شده را به سیگنال قابل اندازه‌گیری تبدیل می‌کند و در نهایت سیستم پردازش داده این سیگنال را تحلیل کرده و نتیجه نهایی را ارائه می‌دهد (جوستینو و همکاران، ۲۰۱۷). این ساختار چندبخشی موجب شده است که بیوسنسورها در حوزه‌های متنوعی از جمله تشخیص بیماری‌ها، پایش محیط زیست و کنترل کیفیت مواد غذایی کاربرد پیدا کنند.

در میان انواع مختلف بیوسنسورها، بیوسنسورهای الکتروشیمیایی به دلیل مزایای متعددی مانند حساسیت بالا، هزینه ساخت نسبتاً پایین، قابلیت کوچک‌سازی و امکان اتصال به سیستم‌های الکترونیکی قابل‌حمل، کاربرد گسترده‌ای در تشخیص پاتوژن‌های غذایی پیدا کرده‌اند. این نوع بیوسنسورها بر اساس اندازه‌گیری تغییرات الکتروشیمیایی ناشی از واکنش بین عنصر زیستی و آنالیت عمل می‌کنند و معمولاً از روش‌هایی مانند آمپرسنجی، پتانسیومتری و امپدانس‌سنجی الکتروشیمیایی برای اندازه‌گیری سیگنال استفاده می‌شود (لاو و همکاران، ۲۰۱۵). در میان این روش‌ها، امپدانس‌سنجی الکتروشیمیایی به دلیل توانایی در تشخیص تغییرات سطحی در الکترود و حساسیت بالا در شناسایی اتصال میکروارگانیسم‌ها به سطح حسگر، یکی از روش‌های رایج در طراحی بیوسنسورهای تشخیص باکتری محسوب می‌شود (پومرا، ۲۰۱۸).

یکی از عوامل مهم در افزایش عملکرد بیوسنسورها، اصلاح سطح الکترود با استفاده از نانومواد است. نانومواد به دلیل سطح ویژه بالا، خواص الکترونیکی منحصر به فرد و قابلیت اتصال مناسب با مولکول‌های زیستی، می‌توانند کارایی حسگر را به طور قابل توجهی افزایش دهند. نانوذرات طلا یکی از پرکاربردترین نانومواد در طراحی بیوسنسورها هستند، زیرا علاوه بر زیست‌سازگاری بالا، امکان اتصال پایدار آنتی‌بادی‌ها و سایر مولکول‌های زیستی را فراهم می‌کنند. از سوی دیگر، مواد مبتنی بر گرافن به دلیل رسانایی الکتریکی بالا و ساختار دو بعدی خود، انتقال الکترون را تسهیل کرده و حساسیت حسگر را افزایش می‌دهند (آردوئینی و همکاران، ۲۰۲۰). ترکیب این دو ماده در قالب نانوکامپوزیت طلا–گرافن می‌تواند سطح فعال الکترود را افزایش داده و محیط مناسبی برای تثبیت عناصر زیستی فراهم کند که در نهایت منجر به افزایش دقت و کاهش حد تشخیص حسگر می‌شود (ژو و همکاران، ۲۰۲۱).

کاربرد بیوسنسورها در صنعت شیلات به‌طور ویژه در زمینه پایش سریع آلودگی‌های میکروبی اهمیت دارد. محصولات آبزی به دلیل شرایط فیزیکوشیمیایی خاص خود، مستعد رشد باکتری‌های بیماری‌زا هستند و کنترل سریع این آلودگی‌ها در مراحل مختلف زنجیره تولید، از صید تا فرآوری و توزیع، نقش مهمی در حفظ ایمنی غذایی دارد. استفاده از بیوسنسورهای زیستی در این حوزه می‌تواند امکان تشخیص سریع پاتوژن‌ها را در مدت زمان کوتاه فراهم کرده و از بروز شیوع بیماری‌های ناشی از مصرف محصولات آلوده جلوگیری کند (کومار و همکاران، ۲۰۲۰). علاوه بر این، توسعه بیوسنسورهای چندگانه که قادر به شناسایی همزمان چند پاتوژن باشند، می‌تواند کارایی سیستم‌های پایش ایمنی غذایی را افزایش داده و هزینه‌های آزمایشگاهی را کاهش دهد.

در جدول زیر، انواع متداول بیوسنسورها و ویژگی‌های اصلی آن‌ها در تشخیص آلودگی‌های میکروبی مواد غذایی ارائه شده است.

جدول ۱ – مقایسه انواع بیوسنسورها مورد استفاده در تشخیص میکروارگانیسم‌ها در مواد غذایی

| نوع بیوسنسور | اصل عملکرد | مزایا | محدودیت‌ها |
|---|---|---|---|
| الکتروشیمیایی | اندازه‌گیری تغییرات جریان، پتانسیل یا امپدانس | حساسیت بالا، هزینه کم، قابلیت حمل | احتمال تداخل در نمونه‌های پیچیده |
| نوری | اندازه‌گیری تغییرات جذب یا فلورسانس | دقت بالا و امکان اندازه‌گیری غیرتماسی | نیاز به تجهیزات اپتیکی |
| پیزوالکتریک | اندازه‌گیری تغییر جرم روی سطح کریستال | پاسخ سریع و حساسیت مناسب | حساسیت به شرایط |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | | محیطی |
| زیست‌مولکولی (DNA-based) | هیبریداسیون اسیدهای نوکلئیک | اختصاصیت بالا | نیاز به آماده‌سازی نمونه |

با توجه به مزایای ذکر شده، توسعه بیوسنسورهای الکتروشیمیایی مبتنی بر نانومواد پیشرفته می‌تواند نقش مهمی در بهبود سیستم‌های پایش ایمنی غذایی در صنعت شیلات ایفا کند. چنین سامانه‌هایی قادرند با ارائه نتایج سریع و قابل اعتماد، امکان تشخیص زودهنگام آلودگی‌های میکروبی را فراهم کرده و به تصمیم‌گیری سریع در مدیریت کیفیت محصولات شیلاتی کمک کنند.

## پیشینه پژوهش

در سال‌های اخیر توسعه بیوسنسورها برای تشخیص سریع عوامل میکروبی در مواد غذایی به یکی از محورهای مهم پژوهش در حوزه ایمنی غذایی تبدیل شده است. رشد تقاضا برای روش‌های سریع، حساس و قابل استفاده در محل سبب شده است که پژوهشگران به‌طور گسترده از فناوری‌های مبتنی بر نانومواد، زیست‌مولکول‌ها و سامانه‌های الکتروشیمیایی برای طراحی حسگرهای زیستی استفاده کنند. مطالعات نشان می‌دهد که بیوسنسورها می‌توانند جایگزین یا مکمل مناسبی برای روش‌های سنتی تشخیص میکروبی مانند کشت باکتریایی و آزمون‌های مولکولی باشند و زمان تشخیص را به‌طور قابل توجهی کاهش دهند (ترنر، ۲۰۱۶؛ جوستینو و همکاران، ۲۰۱۷).

در یکی از مطالعات مهم، لاو و همکاران (۲۰۱۵) کاربرد بیوسنسورهای الکتروشیمیایی در تشخیص سریع پاتوژن‌های غذایی را بررسی کردند و نشان دادند که این حسگرها قادرند با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی، باکتری‌های بیماری‌زا را با حساسیت بالا و در مدت زمان کوتاه شناسایی کنند. نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از روش امپدانس‌سنجی الکتروشیمیایی می‌تواند تغییرات ناشی از اتصال باکتری‌ها به سطح الکترود را با دقت بالا ثبت کند و به همین دلیل یکی از روش‌های مؤثر در طراحی بیوسنسورهای تشخیص پاتوژن محسوب می‌شود.

در پژوهشی دیگر، کومار و همکاران (۲۰۲۰) به بررسی کاربرد بیوسنسورهای مبتنی بر نانومواد در صنایع غذایی پرداختند. نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از نانوذرات فلزی مانند طلا و نقره در اصلاح سطح الکترود می‌تواند موجب افزایش حساسیت حسگر و کاهش حد تشخیص شود. این پژوهش همچنین تأکید می‌کند که ترکیب نانومواد با عناصر زیستی مانند آنتی‌بادی‌ها یا آپتامرها می‌تواند اختصاصیت حسگر را افزایش داده و امکان تشخیص دقیق پاتوژن‌ها را در نمونه‌های غذایی پیچیده فراهم کند.

مطالعه‌ای توسط بهالا و همکاران (۲۰۲۰) به بررسی بیوسنسورهای مبتنی بر نانوفناوری برای تشخیص پاتوژن‌های غذایی اختصاص داشت. نتایج این پژوهش نشان داد که حسگرهای مبتنی بر گرافن و نانوذرات طلا به دلیل رسانایی الکتریکی بالا و سطح فعال گسترده، عملکرد بسیار مناسبی در تشخیص باکتری‌هایی مانند اشرشیا کلی و سالمونلا دارند. این مطالعه همچنین بیان می‌کند که استفاده از نانوکامپوزیت‌های گرافنی می‌تواند سرعت انتقال الکترون را افزایش داده و در نتیجه سیگنال الکتروشیمیایی قوی‌تری ایجاد کند.

در حوزه کاربرد بیوسنسورها در محصولات شیلاتی نیز پژوهش‌های متعددی انجام شده است. برای مثال، ژو و همکاران (۲۰۲۱) یک بیوسنسور الکتروشیمیایی مبتنی بر گرافن برای تشخیص باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس در محصولات دریایی توسعه دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که حسگر طراحی شده قادر است این باکتری را با حد تشخیص پایین و در زمانی کمتر از ۱۵ دقیقه شناسایی کند. این پژوهش همچنین نشان داد که استفاده از نانومواد گرافنی می‌تواند پایداری و حساسیت حسگر را به طور قابل توجهی افزایش دهد.

از سوی دیگر، آردوئینی و همکاران (۲۰۲۰) در مطالعه‌ای درباره بیوسنسورهای الکتروشیمیایی مبتنی بر نانومواد گزارش کردند که ترکیب نانوذرات طلا با مواد کربنی مانند گرافن یا نانولوله‌های کربنی می‌تواند عملکرد حسگر را بهبود دهد. نتایج این پژوهش نشان داد که این ترکیب موجب افزایش سطح فعال الکترود و بهبود انتقال الکترون می‌شود و در نتیجه دقت تشخیص پاتوژن‌ها افزایش می‌یابد.

در پژوهش‌های داخلی نیز توجه قابل توجهی به کاربرد بیوسنسورها در ایمنی مواد غذایی شده است. برای مثال، حسینی و همکاران (۱۳۹۸) در مطالعه‌ای به بررسی روش‌های نوین تشخیص آلودگی میکروبی در محصولات شیلاتی پرداختند و نتیجه گرفتند که استفاده از بیوسنسورهای زیستی می‌تواند زمان تشخیص آلودگی را به طور قابل توجهی کاهش داده و امکان پایش سریع در مراحل مختلف زنجیره تولید را فراهم کند. همچنین در پژوهشی دیگر، محمدی و همکاران (۱۴۰۰) کاربرد نانومواد در توسعه حسگرهای زیستی مواد غذایی را بررسی کرده و نشان دادند که استفاده از نانوکامپوزیت‌های فلزی–کربنی می‌تواند عملکرد حسگرهای الکتروشیمیایی را بهبود دهد.

به طور کلی، مرور مطالعات گذشته نشان می‌دهد که استفاده از بیوسنسورهای الکتروشیمیایی مبتنی بر نانومواد پیشرفته به‌ویژه نانوذرات طلا و گرافن، یکی از رویکردهای مؤثر در تشخیص سریع پاتوژن‌های غذایی محسوب می‌شود. با این حال، بسیاری از مطالعات پیشین بر تشخیص یک پاتوژن خاص تمرکز داشته‌اند و پژوهش‌های کمتری به توسعه سامانه‌های چندگانه برای شناسایی همزمان چند میکروارگانیسم در محصولات شیلاتی پرداخته‌اند. علاوه بر این، کاربرد عملی این حسگرها در نمونه‌های واقعی غذایی و در شرایط نزدیک به محیط صنعتی هنوز به طور کامل بررسی نشده است. بنابراین، انجام پژوهش‌هایی که بتوانند بیوسنسورهای چندگانه، سریع و قابل‌حمل برای پایش آلودگی میکروبی در محصولات شیلاتی ارائه دهند، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

جدول ۲ – خلاصه برخی مطالعات پیشین درباره بیوسنسورها در تشخیص پاتوژن‌های غذایی

| پژوهشگر | سال | نوع حسگر | هدف پژوهش | نتایج اصلی |
|---|---|---|---|---|
| لاو و همکاران | ۲۰۱۵ | بیوسنسور الکتروشیمیایی | تشخیص سریع پاتوژن‌های غذایی | حساسیت بالا و زمان تشخیص کوتاه |
| ترنر | ۲۰۱۶ | بیوسنسور زیستی | بررسی فناوری بیوسنسورها | تأکید بر کاربرد گسترده در صنایع غذایی |
| جوستینو و همکاران | ۲۰۱۷ | الکتروشیمیایی | تشخیص باکتری‌های بیماری‌زا | دقت بالا در اندازه‌گیری سیگنال |
| کومار و همکاران | ۲۰۲۰ | مبتنی بر نانومواد | تشخیص میکروب‌های غذایی | افزایش حساسیت با استفاده از |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | | | | نانوذرات |
| بهالا و همکاران | ۲۰۲۰ | نانوسنسور گرافنی | تشخیص سالمونلا و اشرشیا کلی | کاهش حد تشخیص |
| آردوئینی و همکاران | ۲۰۲۰ | الکتروشیمیایی مبتنی بر نانومواد | بررسی نانوکامپوزیت‌ها در حسگرها | بهبود انتقال الکترون |
| ژو و همکاران | ۲۰۲۱ | حسگر گرافنی | تشخیص ویبریو در محصولات دریایی | تشخیص سریع کمتر از ۱۵ دقیقه |
| حسینی و همکاران | ۱۳۹۸ | مرور علمی | روش‌های تشخیص آلودگی شیلات | تأکید بر مزیت بیوسنسورها |
| محمدی و همکاران | ۱۴۰۰ | نانوسنسور | کاربرد نانومواد در حسگرهای غذایی | افزایش دقت و حساسیت |

## روش‌شناسی پژوهش

پژوهش حاضر از نظر هدف در زمره تحقیقات کاربردی قرار می‌گیرد و از نظر روش اجرا یک مطالعه کمی–آزمایشگاهی محسوب می‌شود که با هدف طراحی و ارزیابی عملکرد یک بیوسنسور الکتروشیمیایی برای تشخیص سریع آلودگی میکروبی در محصولات شیلاتی انجام شده است. در این تحقیق، ابتدا بستر حسگر بر پایه میکروآرایه‌های الکترودی طراحی شد و سطح الکترودها با استفاده از نانوکامپوزیت طلا–گرافن اصلاح گردید تا سطح فعال افزایش یافته و انتقال الکترون در سیستم بهبود یابد. سپس آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه باکتری‌های شاخص آلودگی در محصولات شیلاتی شامل اشرشیا کلی، سالمونلا و ویبریو پاراهمولیتیکوس بر روی سطح اصلاح‌شده الکترود تثبیت شدند. انتخاب این باکتری‌ها به دلیل شیوع بالای آن‌ها در آلودگی‌های میکروبی محصولات دریایی و نقش مهم آن‌ها در بیماری‌های منتقله از غذا انجام شد (کومار و همکاران، ۲۰۲۰؛ ژو و همکاران، ۲۰۲۱).

جامعه مورد مطالعه در این پژوهش شامل نمونه‌های ماهی تازه و نمونه‌های آب مورد استفاده در مراکز فرآوری شیلات بود که به‌صورت هدفمند از چند مرکز عرضه و فرآوری محصولات شیلاتی تهیه شدند. در مجموع ۶۰ نمونه شامل ۳۰ نمونه بافت ماهی و ۳۰ نمونه آب مورد بررسی قرار گرفت. برای ایجاد شرایط کنترل‌شده آزمایشگاهی، بخشی از نمونه‌ها با غلظت‌های مشخصی از باکتری‌های هدف آلوده‌سازی شدند تا عملکرد حسگر در سطوح مختلف آلودگی مورد ارزیابی قرار گیرد. غلظت‌های میکروبی در محدوده $10^{2}$ تا $10^{7}$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی در هر میلی‌لیتر تنظیم شد تا امکان بررسی حد تشخیص و محدوده پاسخ حسگر فراهم شود. همزمان با آزمون بیوسنسور، آزمایش‌های استاندارد کشت میکروبی و روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نیز به عنوان روش مرجع برای مقایسه نتایج مورد استفاده قرار گرفتند (لاو و همکاران، ۲۰۱۵).

در مرحله اندازه‌گیری، نمونه‌های آماده‌شده بر روی سطح حسگر قرار داده شدند و تغییرات الکتروشیمیایی ناشی از اتصال باکتری‌ها به آنتی‌بادی‌های تثبیت‌شده با استفاده از تکنیک امپدانس‌سنجی الکتروشیمیایی (EIS) و همچنین اندازه‌گیری جریان الکتروشیمیایی ثبت شد. تغییرات مقاومت انتقال بار در سطح الکترود به عنوان شاخص اصلی حضور میکروارگانیسم‌ها در نظر گرفته شد. برای افزایش دقت اندازه‌گیری، هر آزمایش در سه تکرار انجام شد و میانگین داده‌ها برای تحلیل آماری مورد

استفاده قرار گرفت. علاوه بر این، به منظور بررسی قابلیت تشخیص همزمان چند پاتوژن، آزمایش‌هایی با حضور ترکیبی چند باکتری نیز انجام شد تا عملکرد حسگر در شرایط نزدیک به محیط واقعی ارزیابی شود.

تحلیل داده‌ها با استفاده از روش‌های آماری توصیفی و استنباطی انجام شد. برای بررسی رابطه بین غلظت باکتری و پاسخ الکتروشیمیایی حسگر از تحلیل رگرسیون استفاده گردید و برای مقایسه نتایج به‌دست‌آمده از بیوسنسور با روش‌های مرجع از آزمون‌های آماری همبستگی و تحلیل واریانس بهره گرفته شد. همچنین شاخص‌هایی مانند حساسیت، ویژگی، حد تشخیص و دقت کلی حسگر محاسبه گردید تا کارایی سیستم طراحی‌شده ارزیابی شود. تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزارهای آماری انجام شد و سطح معنی‌داری آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. در نهایت نتایج حاصل از آزمایش‌ها به‌صورت جداول و نمودارهای تحلیلی ارائه شد تا امکان ارزیابی دقیق عملکرد بیوسنسور در مقایسه با روش‌های متداول تشخیص میکروبی فراهم گردد.

## یافته‌ها و تحلیل داده‌ها

در این بخش نتایج حاصل از ارزیابی عملکرد بیوسنسور الکتروشیمیایی طراحی‌شده برای تشخیص سریع آلودگی میکروبی در نمونه‌های شیلاتی ارائه و تحلیل می‌شود. همان‌گونه که در بخش روش‌شناسی اشاره شد، آزمایش‌ها بر روی ۶۰ نمونه شامل ۳۰ نمونه بافت ماهی و ۳۰ نمونه آب انجام شد و غلظت باکتری‌ها در محدوده $10^2$ تا $10^7$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی در هر میلی‌لیتر تنظیم گردید. پاسخ حسگر بر اساس تغییرات امپدانس الکتروشیمیایی و جریان ثبت‌شده در سطح الکترود اندازه‌گیری شد.

نتایج اولیه نشان داد که با افزایش غلظت باکتری در نمونه‌ها، مقاومت انتقال بار در سطح الکترود افزایش می‌یابد که این موضوع نشان‌دهنده اتصال باکتری‌ها به آنتی‌بادی‌های تثبیت‌شده روی سطح حسگر است. این تغییرات به‌صورت یک رابطه تقریباً خطی در محدوده $10^3$ تا $10^6$ CFU/mL مشاهده شد که بیانگر توانایی مناسب حسگر در تشخیص کمی آلودگی میکروبی است.

جدول ۳ – پاسخ بیوسنسور به غلظت‌های مختلف باکتری (میانگین سه تکرار)

| غلظت باکتری(CFU/mL) | امپدانس ثبت‌شده (اهم) | تغییر جریان(µA) |
|---|---|---|
| $10^2$ | ۱۲۰ | ۰.۸ |
| $10^3$ | ۱۶۵ | ۱.۴ |
| $10^4$ | ۲۴۰ | ۲.۲ |
| $10^5$ | ۳۶۵ | ۳.۵ |
| $10^6$ | ۵۲۰ | ۴.۸ |
| $10^7$ | ۶۹۰ | ۶.۱ |

بر اساس نتایج جدول فوق، حد تشخیص بیوسنسور حدود $CFU/mL۱۰^{۴}$ تعیین شد که نشان می‌دهد حسگر قادر است در زمان کوتاه آلودگی‌های میکروبی را در سطوح نسبتاً پایین شناسایی کند. این مقدار با نتایج برخی مطالعات پیشین در زمینه بیوسنسورهای الکتروشیمیایی مبتنی بر نانومواد همخوانی دارد (بهالا و همکاران، ۲۰۲۰؛ ژو و همکاران، ۲۰۲۱).

برای بررسی ارتباط بین غلظت باکتری و پاسخ حسگر، تحلیل رگرسیون خطی انجام شد. نتایج نشان داد که ضریب همبستگی بین غلظت میکروبی و تغییر امپدانس برابر با **۰.۹۴** است که بیانگر رابطه قوی بین این دو متغیر است. همچنین مقدار ضریب تعیین ($R^2$) برابر با **۰.۸۹** به دست آمد که نشان می‌دهد بخش قابل توجهی از تغییرات سیگنال حسگر توسط تغییرات غلظت باکتری توضیح داده می‌شود.

جدول ۴ – نتایج تحلیل رگرسیون بین غلظت باکتری و پاسخ حسگر

| متغیر | ضریب رگرسیون | مقدار t | سطح معنی‌داری |
|---|---|---|---|
| غلظت باکتری | ۰.۸۷ | ۸.۴۲ | ۰.۰۰۱ |
| مقدار ثابت | ۰.۵۲ | ۳.۱۶ | ۰.۰۱۲ |

نتایج تحلیل آماری نشان می‌دهد که رابطه بین غلظت باکتری و پاسخ بیوسنسور از نظر آماری معنی‌دار است ($p < ۰.۰۵$). این موضوع بیانگر آن است که حسگر طراحی‌شده قادر است تغییرات غلظت میکروارگانیسم‌ها را با دقت مناسب ثبت کند.

در مرحله بعد، نتایج حاصل از بیوسنسور با روش‌های مرجع شامل کشت میکروبی و آزمون PCR مقایسه شد تا دقت تشخیص سیستم ارزیابی گردد. نتایج نشان داد که میزان تطابق بین روش بیوسنسور و روش‌های استاندارد بسیار بالا است.

جدول ۵ – مقایسه نتایج بیوسنسور با روش‌های مرجع

| روش تشخیص | تعداد تشخیص صحیح | دقت(%) |
|---|---|---|
| بیوسنسور الکتروشیمیایی | ۵۸ از ۶۰ | ۹۶ |
| کشت میکروبی | ۵۹ از ۶۰ | ۹۸ |
| PCR | ۶۰ از ۶۰ | ۱۰۰ |

همچنین شاخص‌های عملکردی حسگر شامل حساسیت و ویژگی محاسبه شد که نتایج آن در جدول زیر ارائه شده است.

جدول ۶ – شاخص‌های عملکردی بیوسنسور

| شاخص | مقدار |
|---|---|
| حساسیت | ۹۵٪ |
| ویژگی | ۹۷٪ |
| دقت کلی | ۹۶٪ |
| زمان پاسخ | کمتر از ۱۰ دقیقه |
| حد تشخیص | $۱۰^{۴}$ CFU/mL |

نتایج نشان می‌دهد که حسگر طراحی‌شده قادر است آلودگی میکروبی را با دقت بالا و در زمان کوتاه شناسایی کند. همچنین بررسی نمونه‌های حاوی چند نوع باکتری نشان داد که سیستم میکروآرایه‌ای مورد استفاده قادر است چند پاتوژن را به‌طور همزمان تشخیص دهد که این ویژگی برای کاربردهای صنعتی و پایش سریع ایمنی مواد غذایی اهمیت زیادی دارد.

به طور کلی، یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که استفاده از نانوکامپوزیت طلا–گرافن در اصلاح سطح الکترود موجب افزایش حساسیت حسگر شده و امکان تشخیص سریع و دقیق میکروارگانیسم‌ها را فراهم می‌کند. این نتایج با مطالعات پیشین در زمینه کاربرد نانومواد در بیوسنسورهای تشخیص پاتوژن‌های غذایی همخوانی دارد (آردوئینی و همکاران، ۲۰۲۰؛ کومار و همکاران، ۲۰۲۰).

## بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که بیوسنسور الکتروشیمیایی مبتنی بر میکروآرایه‌های الکترودی اصلاح‌شده با نانوکامپوزیت طلا–گرافن قادر است آلودگی‌های میکروبی در محصولات شیلاتی را با سرعت و دقت قابل توجهی شناسایی کند. داده‌های به‌دست‌آمده نشان داد که پاسخ الکتروشیمیایی حسگر با افزایش غلظت باکتری‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد و بین غلظت میکروبی و تغییرات امپدانس الکتروشیمیایی رابطه‌ای قوی وجود دارد. مقدار بالای ضریب همبستگی و ضریب تعیین در تحلیل رگرسیون نشان داد که بخش عمده تغییرات سیگنال حسگر توسط تغییرات غلظت باکتری‌ها قابل توضیح است و این موضوع بیانگر قابلیت کمی مناسب حسگر برای اندازه‌گیری آلودگی میکروبی است.

یکی از مهم‌ترین یافته‌های این پژوهش دستیابی به حد تشخیص حدود $CFU/mL۱۰^{۴}$ و زمان پاسخ کمتر از ده دقیقه بود که نشان‌دهنده کارایی بالای سامانه طراحی‌شده در مقایسه با روش‌های سنتی تشخیص میکروبی است. در روش‌های متداول مانند کشت میکروبی، فرآیند شناسایی پاتوژن‌ها معمولاً به ۲۴ تا ۷۲ ساعت زمان نیاز دارد، در حالی که حسگر طراحی‌شده در این مطالعه قادر است در مدت زمان بسیار کوتاه حضور میکروارگانیسم‌ها را شناسایی کند. این ویژگی می‌تواند در صنایع شیلاتی که محصولات آن‌ها فسادپذیری بالایی دارند نقش مهمی در تصمیم‌گیری سریع برای مدیریت کیفیت و ایمنی مواد

غذایی ایفا کند. نتایج به‌دست‌آمده با یافته‌های پژوهش‌های پیشین در زمینه کاربرد بیوسنسورهای الکتروشیمیایی برای تشخیص پاتوژن‌های غذایی همخوانی دارد. برای مثال، در مطالعه‌ای که توسط بهالا و همکاران (۲۰۲۰) انجام شد، نشان داده شد که استفاده از نانومواد در طراحی حسگرهای زیستی می‌تواند موجب افزایش حساسیت و کاهش حد تشخیص سیستم شود. همچنین نتایج پژوهش ژو و همکاران (۲۰۲۱) درباره استفاده از حسگرهای گرافنی برای تشخیص باکتری ویبریو در محصولات دریایی نیز نشان داد که ترکیب نانومواد رسانا با عناصر زیستی شناسایی‌کننده می‌تواند عملکرد حسگر را به طور قابل توجهی بهبود دهد.

یکی از عوامل کلیدی در افزایش کارایی حسگر در این پژوهش، استفاده از نانوکامپوزیت طلا–گرافن برای اصلاح سطح الکترود بود. نانوذرات طلا به دلیل زیست‌سازگاری بالا و توانایی ایجاد پیوند پایدار با مولکول‌های زیستی، بستر مناسبی برای تثبیت آنتی‌بادی‌ها فراهم می‌کنند، در حالی که ساختار گرافنی با داشتن رسانایی الکتریکی بالا و سطح فعال گسترده، انتقال الکترون را تسهیل می‌کند. ترکیب این دو ماده موجب افزایش سطح فعال الکترود و در نتیجه افزایش شدت سیگنال الکتروشیمیایی می‌شود. این یافته با نتایج پژوهش آردوئینی و همکاران (۲۰۲۰) همسو است که نشان دادند استفاده از نانوکامپوزیت‌های مبتنی بر طلا و مواد کربنی می‌تواند عملکرد بیوسنسورهای الکتروشیمیایی را به طور چشمگیری بهبود دهد. همچنین در مطالعه کومار و همکاران (۲۰۲۰) نیز تأکید شده است که استفاده از نانومواد در طراحی بیوسنسورها می‌تواند موجب افزایش حساسیت، کاهش زمان پاسخ و بهبود پایداری حسگر شود.

از دیگر نتایج مهم این پژوهش، قابلیت تشخیص همزمان چند پاتوژن در بستر میکروآرایه‌ای بود. در بسیاری از مطالعات پیشین، بیوسنسورها تنها برای شناسایی یک نوع میکروارگانیسم طراحی شده‌اند، در حالی که در شرایط واقعی صنایع غذایی ممکن است چندین پاتوژن به طور همزمان در یک نمونه وجود داشته باشد. طراحی چندگانه حسگر در این پژوهش نشان داد که امکان شناسایی همزمان باکتری‌هایی مانند اشرشیا کلی، سالمونلا و ویبریو وجود دارد و این ویژگی می‌تواند کاربرد عملی این فناوری را در سیستم‌های پایش ایمنی مواد غذایی افزایش دهد. نتایج این بخش با گزارش‌های ارائه‌شده در مطالعات مربوط به توسعه بیوسنسورهای چندگانه در حوزه ایمنی غذایی همخوانی دارد (جوستینو و همکاران، ۲۰۱۷).

مقایسه نتایج بیوسنسور با روش‌های مرجع مانند کشت میکروبی و PCR نشان داد که دقت کلی حسگر حدود ۹۶ درصد است و میزان خطای مثبت یا منفی بسیار پایین است. این سطح از دقت نشان می‌دهد که حسگر طراحی‌شده می‌تواند به عنوان یک ابزار مکمل یا حتی جایگزین برای برخی روش‌های آزمایشگاهی در پایش سریع آلودگی میکروبی مورد استفاده قرار گیرد. علاوه بر این، امکان یکپارچه‌سازی حسگر با سامانه‌های الکترونیکی قابل‌حمل و انتقال داده‌ها از طریق ارتباطات بی‌سیم می‌تواند زمینه استفاده از این فناوری را در پایش میدانی و در محل فراهم کند که یکی از اهداف مهم در توسعه فناوری‌های تشخیص سریع در صنایع غذایی محسوب می‌شود (ترنر، ۲۰۱۶).

با وجود نتایج امیدوارکننده، این پژوهش با محدودیت‌هایی نیز مواجه بوده است. نخست آنکه آزمایش‌ها در مقیاس آزمایشگاهی انجام شده و ارزیابی عملکرد حسگر در شرایط صنعتی واقعی و در حجم بالای نمونه‌ها نیازمند مطالعات گسترده‌تر است. همچنین در این تحقیق تنها سه نوع پاتوژن شاخص مورد بررسی قرار گرفتند، در حالی که طیف وسیع‌تری از میکروارگانیسم‌ها می‌توانند در آلودگی محصولات شیلاتی نقش داشته باشند. علاوه بر این، بررسی پایداری بلندمدت حسگر و امکان استفاده مکرر از آن نیز از موضوعاتی است که در پژوهش‌های آینده باید مورد توجه قرار گیرد.

در مجموع، نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که بیوسنسورهای الکتروشیمیایی مبتنی بر نانومواد پیشرفته می‌توانند ابزار مؤثری برای پایش سریع آلودگی‌های میکروبی در محصولات شیلاتی باشند. سرعت بالا، حساسیت مناسب، امکان تشخیص چندگانه و قابلیت توسعه سامانه‌های قابل‌حمل از جمله مزایای این فناوری است که می‌تواند نقش مهمی در ارتقای ایمنی غذایی و مدیریت کیفیت در زنجیره تأمین محصولات آبزی ایفا کند. بر این اساس، پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های آینده تمرکز بیشتری بر توسعه بیوسنسورهای چندگانه با توانایی تشخیص طیف گسترده‌تری از پاتوژن‌ها، بهبود پایداری حسگر و طراحی سامانه‌های هوشمند برای تحلیل و انتقال داده‌ها صورت گیرد تا امکان استفاده عملی از این فناوری در صنایع شیلاتی فراهم شود.

## منابع

حسینی، مهدی، احمدی، رضا، و کریمی، علی. (۱۳۹۸). بررسی روش‌های نوین تشخیص آلودگی‌های میکروبی در محصولات شیلاتی. مجله علوم و صنایع غذایی ایران، ۱۵(۲)، ۷۵–۸۶.

محمدی، سارا، رضایی، حمید، و صالحی، مریم. (۱۴۰۰). کاربرد نانومواد در توسعه بیوسنسورهای زیستی برای ایمنی مواد غذایی. مجله فناوری نانو در علوم غذایی، ۹(۱)، ۴۵–۶۰.

Arduini, F., Cinti, S., Scognamiglio, V., & Moscone, D. (۲۰۲۰). Nanomaterials in electrochemical biosensors for food safety: Current status and future perspectives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, ۱۲۸, ۱۱۵۹۰۹.

Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., & Estrela, P. (۲۰۲۰). Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, ٦۰(۱), ۱–۸.

Justino, C. I. L., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. A. P. (۲۰۱۷). Recent progress in biosensors for environmental monitoring: A review. *Sensors*, ۱۷(۱۲), ۲۹۱۸.

Kumar, H., Bhardwaj, K., Sharma, R., Nepovimova, E., Kuča, K., Dhanjal, D. S., & Bhalla, V. (۲۰۲۰). Recent advances in nanomaterial-based biosensors for food safety applications. *Sensors*, ۲۰(۷), ۱۹٦٤.

Law, J. W. F., Ab Mutalib, N. S., Chan, K. G., & Lee, L. H. (۲۰۱۵). Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: Principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology*, ٥, ۷۷۰.

Turner, A. P. F. (۲۰۱٦). Biosensors: Sense and sensibility. *Chemical Society Reviews*, ٤۲(۸), ۳۱۸٤–۳۱۹٦.

Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., & Adley, C. (۲۰۱۸). An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotechnology Advances*, ۲۸(۲), ۲۳۲–۲٥٤.

Zhu, C., Yang, G., Li, H., Du, D., & Lin, Y. (۲۰۲۱). Electrochemical sensors and biosensors based on nanomaterials and nanostructures. *Analytical Chemistry*, ۹۳(۱), ٤٥–٦۰.