



Detection of *Escherichia coli* in pharmaceutical and water samples using a biosensor based on carbon nanotubes containing gold nanoparticles

Fatemeh Behoftadeh¹, Mohammad Faezi Ghasemi², Ali Mojtahedi³, Khosro Issazadeh⁴, Mostafa Golshekan⁵

¹PhD Student, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.

²Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.

³Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

⁴Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.

⁵Assistant Professor, Department of Paramedical Sciences, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.

Abstract

Background & Objectives: *Escherichia coli* is an important indicator in the quality control of pharmaceutical and real samples. This study compares the detection of this bacterium by regular method and a biosensor based on Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNTs) on glassy carbon electrodes (GCE) in pharmaceutical and water as real sample.

Materials & Methods: In this experimental study, the conventional culture method (pour plate) and modified biosensor based on Multi-Walled Carbon Nanotubes on glassy carbon electrode with the arrangement of GC/MWCNTs/AuNPs/Ab/BSA were used for the detection of *E. coli*. Dilutions of *E. coli* between (1×10^1 – 1×10^8 CFU/ml) were used in pharmaceutical and water samples, prepared in 0.1 M PBS (pH 7.4), mixed with 0.5mM acetaminophen. The efficiency of the designed biosensor was investigated using SEM, Cyclic Voltammetry, and Square-Wave Voltammetry electrochemical techniques, as well as interfering bacteria.

Results: The results of *E. coli* detection using the conventional culture and designed biosensor were not statistically significant. The designed biosensor had a high sensitivity with accuracy in 3 minutes and LOD 3.02 CFU/ml for *Escherichia coli*.

Conclusion: Considering the time-consuming and influenced by environmental factors in the microbial monitoring of pharmaceuticals for *E. coli* detection in conventional methods and the risk of losing pharmaceutical products, the biosensor has good efficiency in detection with low cost and no need for enrichment in a small volume of samples.

Keywords: Biosensor, *Escherichia coli*, Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNTs), Au nanoparticles (AuNPs)

Received: 18 May 2023

Revised: 6 September 2023

Accepted: 27 October 2023

Correspondence to: Mohammad Faezi Ghasemi

Tel: +98 9113314187

E-mail: faezi_m@yahoo.com

Journal of Microbial World 2023, 16 (3): 178 - 194

DOI:10.30495/jmw.2023.1990858.2069



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



شناسایی اشریشیاکلی در نمونه‌های دارویی و آب با استفاده از روش حسگر زیستی بر پایه نانولوله‌های کربنی حاوی نانوذرات طلا

فاطمه به‌افتاده^۱، محمد فائزی قاسمی^{۲*}، علی مجتهدی^۳، خسرو عیسی زاده^۴، مصطفی گلشکن^۵

^۱ دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم پایه، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران. ^۲ دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران. ^۳ استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ^۴ استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران. ^۵ استادیار، گروه شیمی آلی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: اشریشیاکلی یکی از شاخص‌های مهم در کنترل کیفیت نمونه‌های دارویی و واقعی است. هدف از این تحقیق بررسی مقایسه‌ای تشخیص این باکتری با روش‌های متداول و استفاده از یک حسگر زیستی بر پایه نانولوله‌های کربنی چندلایه بر روی الکتروود شیشه‌ای کربن در نمونه‌های دارویی و واقعی مانند آب می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی، از روش متداول کشت (پورپلیت) و حسگر زیستی ساخته‌شده بر پایه نانولوله‌های کربنی چندلایه بر روی الکتروود شیشه‌ای کربن با آرایش GC/MWCNTs/AuNPs/Ab/BSA برای تشخیص اشریشیاکلی استفاده شد. رقت‌های 10^1 تا 10^8 CFU/ml از باکتری اشریشیاکلی در نمونه‌های دارویی و آب در بافر فسفات ۰/۱ M حاوی استامینوفن ۰/۵ mM استفاده گردید. ویژگی‌های حسگر زیستی به وسیله میکروسکوپ الکترونی، روش‌های الکتروشیمیایی ولتامتری چرخه‌ای و ولتامتری موجی مربعی بررسی و از باکتری‌های مداخله‌گر در بررسی عملکرد اختصاصی آن استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج تشخیص اشریشیاکلی توسط حسگر زیستی در نمونه‌های مختلف دارویی و آب از نظر آماری در مقایسه با روش متداول کشت اختلاف معنی‌داری نشان نداد. اما حسگر زیستی طراحی‌شده برای باکتری اشریشیاکلی دارای حساسیت بالا و حداقل حد تشخیص ۳/۰۲ CFU/ml باکتری اشریشیاکلی در زمان ۳ دقیقه بود.

نتیجه‌گیری: معمولاً شاخص‌های میکروبی مانند اشریشیاکلی را با روش‌های متداول تشخیص می‌دهند. پایش میکروبی در ترکیبات دارویی با روش‌های متداول زمان‌بر بوده و خطر از دست رفتن محصولات دارویی را نیز به همراه دارد. اما حسگر زیستی در تشخیص این باکتری با صرف هزینه کم و بدون نیاز به غنی‌سازی در حجم کم نمونه‌ها، کارایی مناسبی دارد.

واژگان کلیدی: حسگر زیستی، اشریشیاکلی، نانولوله‌های کربنی چندلایه، نانوذرات طلا.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۸/۵

ویرایش مقاله: ۱۴۰۲/۶/۱۵

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۲/۲۸

مقدمه

عصبی است (۲۰۱) همچنین به‌عنوان یکی از شاخص‌های مهم آلودگی در صنایع دارویی و غذایی و حتی نمونه‌های واقعی بوده که در روده انسان و حیوانات ساکن است (۳-۵). در روش متداول برای تشخیص باکتری‌های کلی فرم مانند اشریشیاکلی، مراحل متعددی از قبیل غنی‌سازی، غربال‌گری‌های بیوشیمیایی،

باکتری اشریشیاکلی باکتری گرم منفی بی‌هوازی اختیاری، شیمیو ارگانوتروف عامل عفونت روده‌ای، ادراری و ریوی و سیستم

(* آدرس برای مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.
پست الکترونیک: faezi_m@yahoo.com
تلفن: ۰۹۱۱۳۳۱۴۱۸۷



طراحی کردند که دارای حد تشخیص 0.8 cfu/ml بود (۱۷). باکتری/شریسیاکلی یکی از مهم‌ترین عوامل باکتریایی که باعث اسهال و شکم‌روش است و تشخیص سریع و دقیق این باکتری‌ها کمک شایانی به بررسی و کنترل عفونت خواهد کرد (۱۸).

در صنعت داروسازی براساس آخرین فارماکوپه آمریکا (USP44) و بریتانیا (BP2022) روش‌های کشت برای شناسایی و تشخیص این باکتری در مواد دارویی ذکر شده است (۱۹). هدف از انجام این تحقیق تسریع در تشخیص و بررسی شاخص میکروبی/شریسیاکلی در محصولات دارویی و جلوگیری به هنگام از نشر آن و کم نمودن ضایعات در صنعت دارویی کشور و در نمونه واقعی مانند ادرار با استفاده از طراحی حسگر زیستی براساس ایمونوسنسور نانولوله‌های کربنی چندلایه شده آراسته با نانوذرات طلا است. تشخیص این باکتری از اهداف جزئی‌تر طراحی روش‌های آزمون نوین با کارایی بالا برای نیل به نتایج با دقت و صحت بالا در تشخیص باکتری/شریسیاکلی در اشکال مختلف دارویی ماده سیتی کولین، نمونه آب اعم از آب قابل تزریق، آب خالص، آب شرب و همچنین نمونه ادرار در بحث آزمون‌های بیماران در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی است. تاکنون از حسگر زیستی با آرایش GC/MWCNTs/Au NPs/Ab/BSA در بافر فسفات 0.1 M حاوی 0.5 mM استامینوفن به‌عنوان یک مولکول شاهد در عملکرد حس گریزیستی استفاده نشده است. همچنین از روش‌های تشخیص سریع با حسگر زیستی در زمینه مواد و محصولات دارویی نیز استفاده نشده است و روش‌های رایج بسیار زمان‌بر و نیازمند فرآیندهای ختنی‌سازی بوده است که می‌تواند موجب از دست رفتن محصول و خسارات فاحشی در فرآیند تولید شود. همچنین آزمون تشخیصی/شریسیاکلی در آب و ادرار به‌واسطه این نوع حسگر تاکنون انجام نشده است.

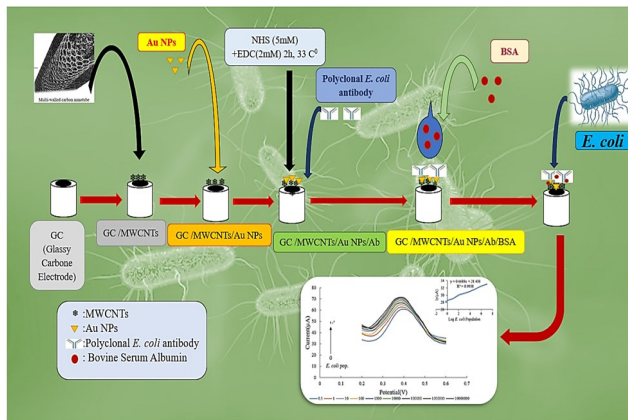
مواد و روش‌ها

(الف) مواد و شرایط کشت: محیط‌های کشت و مواد مصرفی در این تحقیق از شرکت مرک

غنی‌سازی‌های اختصاصی و گاهی آزمون‌های سرولوژیک لازم است که تا ۷۲ ساعت زمان می‌برد. روش‌های آزمون براساس استانداردهای دارویی اروپا و آمریکا مبتنی بر روش کشت بوده و دارای خطای تبیین شده و محدودیت‌هایی از قبیل زمان حصول نتیجه و عدم تکرارپذیری و بازیافت میکروارگانسیم‌ها بوده لذا روش‌های سریع آزمون بخصوص مواردی که مبتنی بر کشت نیستند راندمان بالاتری نسبت به روش‌های متداول دارند (۶). حسگر زیستی یک ابزار تشخیصی است که می‌تواند با شناسایی مواد شیمیایی یا زیستی در ترکیب با یک ترکیب زیستی با یک شناساگر فیزیکوشیمیایی عمل نماید. حساسیت و اختصاصی بودن حسگر زیستی به آن این امکان را می‌دهد تا در دامنه وسیعی از تشخیص نمونه‌ها استفاده شود (۴). اخیراً ترکیبات نانو پتانسیل تشخیص حسگرها را در سطح وسیع با حجم کم نمونه فراهم آورده است (۷-۱۰).

نانولوله‌های کربنی دارای چگالی و هدایت عالی و همچنین میزان بالای سطح هستند که در طراحی حسگرها استفاده می‌شوند (۱۱). از گرافن و ترکیب گرافن تک لایه بر روی ماده اولیه SiO_2/Si برای تشخیص/شریسیاکلی $\text{O}157:\text{H}7$ با دقت $10-100 \text{ cell/ml}$ در سال ۲۰۱۷ بهره گرفته شد (۱۲). از DNA در نانولوله‌های کربنی برای آرایش حسگر زیستی در تشخیص این باکتری در نمونه واقعی نیز استفاده شد (۱۳). در سال ۲۰۱۹ یک حسگر زیستی با بهره از نانوذرات طلا و تصاویر تلفن همراه هوشمند برای تشخیص/شریسیاکلی $\text{O}157:\text{H}$ با حد تشخیص 50 cfu/ml طراحی گردید (۱۴). مرات و همکاران از حسگر زیستی نانوذرات اکسید روی بر نانولوله‌های کربنی چندلایه بر پایه بتاگالاکتوزیداز با حد تشخیص/شریسیاکلی 10 cfu/ml در مدت زمان ۱۰ دقیقه استفاده کردند (۱۵). حسگر زیستی با استفاده از نانوذرات طلا آرایش یافته بر روی الکترودهای چاپ‌شده با صفحه کربن (SPE) در محلول فروسیانید پتاسیوم طراحی شد که دارای حد تشخیص 15 cfu/ml بود (۱۶). در سال ۲۰۲۳ تحسین و همکارانش یک حسگر زیستی با استفاده از نانولوله‌های کربنی چندلایه برای تشخیص/شریسیاکلی K-12 با روش بیوامپدانس

سترون (N-hydroxy succinimide) 2mM/EDC 5mM NHS / carbodiimide [3-dimethylaminopropyl]-1-ethyl-3-(hydrochloride) به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۳ درجه سلسیوس به حالت غوطه‌ور قرار گرفت. پس از آن الکتروده به آرامی با بافر فسفات ۰/۱M با pH ۷/۴ سترون شسته و در محلول آنتی‌بادی اشریشیاکلی با غلظت ۱۰ ml / ۵ μl به حالت غوطه‌ور در دمای ۳۳ درجه به مدت ۱ ساعت قرار داده شد. در طی مراحل ظرف حاوی سر الکتروده به‌طور متناوب هم زده شد تا واکنش‌پذیری تسریع گردد. پس از این مرحله نیز سر الکتروده با بافر ۰/۱M PBS شسته شد و در دمای ۳۳ درجه به مدت ۳۰ دقیقه خشک گردید. میزان ۵ میکرولیتر از محلول BSA ۰/۵ %w/v به سر الکتروده آرایش یافته چکانده شد و در دمای ۳۳ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. الکتروده مذکور آماده برای آزمایش در دمای ۲ تا ۸ درجه نگهداری شد. مراحل کار و اصلاح الکتروده در شمای ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱: مراحل اصلاح سر الکتروده با استفاده از نانولوله‌های کربنی چندلایه. اندازه‌گیری بخش الکتروشیمیایی آزمایش توسط سه الکتروده کار، الکتروده شمارش‌گر و الکتروده مرجع که در ظرف حاوی رقت‌های متعدد از اشریشیاکلی ($1 \times 10^1 - 1 \times 10^8$ CFU/ml) که به بافر فسفات ۰/۱ M حاوی ۰/۵ mM استامینوفن استریل حاوی رقت مشخص از هر نمونه انجام شد. به‌واسطه روش ولتامتری موج مربعی (SWV: Square-Wave Voltametric) در دامنه پتانسیل ۰ تا ۱/۳ ولت در نرخ اسکن حدود 100 mVs^{-1} اسکن انجام شد.

Merck KGaA (Darmstadt Germany) و آنتی‌بادی ضد اشریشیاکلی بیوتینه (ab68451) از شرکت Abcam بوستون آمریکا تهیه شد. از نانوذرات طلا ۰/۵ M تهیه شده در H_2SO_4 برای طراحی حسگر زیستی استفاده شد. نانولوله‌های کربنی چندلایه نیز از شرکت نوترینو تهران تهیه گردید. سویه‌های باکتریایی اشریشیاکلی PTCC 1330، سالمونلا انتریکا زیرگونه انتریکا سروتایپ تایفی موریوم PTCC 1709، سودو موناس آئروجینوزا PTCC 1074، باسیلوس اسپیزیزنی PTCC 1023 و استافیلوکوکوس اورئوس PTCC 1112 از مرکز کلکسیون میکروارگانیزم‌های صنعتی ایران تامین گردید. کشت اولیه ویال لیوفیلیزه اشریشیاکلی بر روی پتری دیش حاوی محیط تریپتون سوی آگار (TSA) فعال گردید و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. پس از آن کشت در محیط آبگوشت تریپتون سوی‌براث انجام و شمارش تعداد سلول‌های باکتری با تهیه رقت‌های باکتری اشریشیاکلی ($1 \times 10^1 - 1 \times 10^8$ CFU/ml) در بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH ۷/۴ انجام شد.

ب) آماده‌سازی حسگر برپایه نانولوله کربنی: سطح الکتروده کربن شیشه‌ای با قطر ۲ mm به دقت با نانوذرات ۰/۳ و ۰/۵ میکرومتر پودر آلومینا بر روی پارچه مخصوص، پوشش داده شد. برای حذف نانوذرات جذب‌شده به‌صورت فیزیکی بر روی سطح، سر الکتروده در لوله‌آزمایش حاوی استون در معرض امواج فراصوت قرار گرفت. پس از این مرحله سر الکتروده سه بار با آب خالص شستشو داده شد (۲۰). برای بررسی و بهینه‌سازی الکتروده با نانولوله‌های کربنی چندلایه ۵ μl از سوسپانسیون همگن MWCNTs در استون با غلظت ۵ μg/ ۵ml بر سطح کربنی آن با دقت چکانده شد و برای تشکیل یک‌لایه کاملاً یکنواخت در معرض هوا خشک شد. نانوذرات طلا به روش کلرآپرومتریکی در پتانسیل ۰/۲- ولت به مدت ۲۵۰ ثانیه در محلول هواگیری شده ۰/۵ مولار H_2SO_4 حاوی ۳/۰ mM HAuCl_4 بر روی آن قرار گرفت. سپس سر الکتروده با آب خالص شسته و در دمای ۳۳ درجه سلسیوس خشک شد (۲۰). پس‌از این مرحله سر الکتروده در درون محلول

داده‌ها بر اساس مقایسه میانگین و انحراف معیار سه تکرار مستقل با کمک آزمون آماری t-test با کمک نرم افزار SPSS/PC نسخه ۲۶ انجام شد.

یافته‌ها

نتایج نشان داد حضور مولکول استامینوفن در تشخیص باکتری اشریشیاکلی در دو روش تأثیر منفی نداشت. در حضور جمعیت‌های مختلف از باکتری اشریشیاکلی میزان اختلاف جریان توسط این مولکول دچار تغییراتی می‌شود که کمک شایانی در تخمین جمعیت باکتریایی دارد. نتایج حاصل از نمونه شربت سیتی کولین البرزدارو در جدول ۱ نشان داده شده است که در مقایسه با نمونه خارجی دارای بیشترین تفاوت در غلظت 10^6 CFU/ml به میزان $0/13$ بود که در محدوده مجاز و بالای عدد $0/05$ بوده و از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد. نتایج بررسی محصولات تزریقی سه شرکت داروسازی مینو در تهران و البرز دارو و کاسپین تأمین رشت نیز دارای نتایج مشابه در هر دو روش بودند (جدول ۲).

نتایج بررسی در ماده اولیه سیتی کولین مونوسدیم ساخت شرکت Bajaj Healthcare از کشور هند نیز مشابه و نزدیک به هم بود (جدول ۳). در نمونه‌های آب بیشترین اختلاف در نتایج شمارش روش حسگر زیستی با روش متداول آب قابل تزریق در غلظت 10^0 CFU/ml به میزان $0/666$ بوده و برای آب شرب در جمعیت باکتریایی 10^3 CFU/ml به میزان $0/395$ که از نظر آماری اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد (جدول ۴، ۵ و ۶). در رقت 1×10^7 CFU/ml در تفاوت به میزان $0/451$ دیده شد. نتایج حاصل در آب قابل تزریق و ماده اولیه سیتی کولین به میزان ۱ بود و کمترین مقدار تفاوت را برای آب خالص در پایین‌ترین غلظت نشان داد که حدود $0/079$ بوده و هیچ کدام شاخص و کمتر از $0/05$ نبودند و این به معنی عدم وجود تفاوت بین داده‌های حاصل از حسگر زیستی با روش متداول است.

برای آزمون ماده اولیه داروی سیتی کولین مونوسدیم، غلظت 125 mg/ml از این ماده در بافر فسفات $1/0$ M حاوی $5/0$ mM استامینوفن استریل به‌عنوان محلول اصلی تهیه گردید. غلظت نمونه خوراکی (100 mg/ml) از محصولات شرکت البرز دارو و نمونه آمپول از محصولات شرکت البرز دارو، مینو و کاسپین تأمین با رقت $1:10$ بود. رقت‌های متعدد اشریشیاکلی ($1 \times 10^1 - 1 \times 10^4$ CFU/ml) استفاده شد. اسکن توسط روش SWV انجام و روش متداول شمارش پورپلیت از هر نمونه در هر رقت به صورت مجزا در دو پلیت انجام شد. آب خالص، آب تزریق و آب شرب تحت عنوان نمونه‌های واقعی مورد بررسی قرار گرفتند. ۲ میلی‌لیتر از هریک از نمونه‌ها به 98 میلی‌لیتر از بافر فسفات $0/1$ M حاوی $0/5$ mM استامینوفن اضافه و سپس از غلظت‌های متعدد اشریشیاکلی ($1 \times 10^1 - 1 \times 10^4$ CFU/ml) به این محلول تلقیح گردید.

ج) بررسی اختصاصی بودن، تکرارپذیری و پایداری حسگر زیستی: از سویه‌های سالمونلا انتریکا زیرگونه انتریکا سروتایپ تایفی موریوم PTCC 1709، سودو موناس آئروجینوزا PTCC 1074، باسیلوس اسپیزینی PTCC 1023 و استافیلوکوکوس اورئوس PTCC 1112 برای تشخیص عمل کردن اختصاصی الکتروود طراحی شده استفاده شد. بدین ترتیب که هر سویه با رقت 1×10^0 CFU/ml آماده شد و سپس با روش SWV در حضور باکتری مرجع اشریشیاکلی اسکن شد. جهت تکرارپذیری و تجدید پذیری از ۴ سری نتایج از غلظت 10^7 CFU/ml باکتری در حضور نمونه آمپول سیتی کولین در محدوده اسکن $E_1=0$ تا $E_2=1.3$ با سرعت روبش 100 mV.s⁻¹ با تکنیک ولتامتری مربعی استفاده گردید. به منظور پایداری الکتروود طراحی شده در زمان‌های صفر، ۷ روز، ۱۴ روز، ۲۱ روز و ۲۸ روز برای اندازه‌گیری میزان باکتری در رقت 100 CFU/ml در سرعت اسکن 100 mV.s⁻¹ باکتری از تکنیک ولتامتری موجی مربعی و محدوده اسکن $E_1=0$ تا $E_2=0.8$ استفاده گردید.

د) تجزیه و تحلیل آماری: در این مطالعه تجزیه و تحلیل همه

دنیای میکروب‌ها، سال شانزدهم شماره سوم پاییز ۱۴۰۲. شناسایی اشریشیاکلی در نمونه‌های دارویی و آب با استفاده از روش حسگر زیستی. فاطمه به‌افتاده و همکاران.

جدول ۱: نتایج شمارش جمعیت میکروبی اشریشیاکلی در شربت سیتی کولین البرز دارو در سه گروه مجزا توسط حسگر و روش متداول.

لگاریتم غلظت باکتری تلقیح شده	غلظت اشریشیاکلی (CFU/ml) در نمونه	نتایج مربوط به نمونه‌های شربت سیتی کولین شرکت البرز دارو								
		نتایج تشخیصی از حسگر زیستی			نتایج تست‌های متداول با استامینوفن			نتایج تست‌های متداول بدون استامینوفن		
		سری ۱	سری ۲	سری ۳	سری ۱	سری ۲	سری ۳	سری ۱	سری ۲	سری ۳
۰	۰	۰	۰	۰/۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۰	۰/۵	۰	۰/۵	۰/۸	۲	۰/۵	۰/۵	۱	۰/۵	۰/۵
۱	۱	۳/۹	۵	۳/۹	۳/۵	۵	۳	۴/۵	۶	۲
۲	۱۰	۲۶/۵	۲۰	۳۶/۱	۲۶	۱۸	۱۱/۵	۲۳/۵	۵/۱۸	۵/۱۰
۳	۱۰۰	۲۰۹/۲	۱۷۰	۱۵۸/۸	۲۱۰	۱۶۶	۱۶۰	۲۰۰	۱۶۵	۱۵۴
۴	۱۰۰۰	۱۵۹۵	۱۵۴۱	۱۳۸۹/۸	۱۶۰۰	۱۵۲۰	۱۳۴۵	۱۵۷۰	۱۵۱۰	۱۳۵۰
۵	۱۰۰۰۰	۱۶۵۷۶/۷	۱۶۱۲۶	۱۵۴۷۳/۷	۱۶۶۵۰	۱۶۰۰۰	۱۵۰۰۰	۱۶۶۰۰	۱۵۵۰۰	۱۴۵۰۰
۶	۱۰۰۰۰۰	۱۶۵۸۸۱	۱۷۸۳۱۸	۱۴۵۰۳۸/۵	۱۶۵۵۰۰	۱۶۸۰۰۰	۱۴۳۵۰۰	۱۶۴۲۰۰	۱۶۸۰۰۰	۱۴۳۰۰۰
۷	۱۰۰۰۰۰۰	۱۷۲۹۹۶۸/۸	۱۶۶۵۶۷۷	۱۶۱۴۸۵۶/۶	۱۶۷۰۰۰۰	۱۶۵۰۰۰۰	۱۶۱۰۰۰۰	۱۶۵۰۰۰۰	۱۵۸۰۰۰۰	۱۵۱۰۰۰۰
۸	۱۰۰۰۰۰۰۰	۱۶۱۵۹۶۸۹/۶	۱۷۰۷۴۸۳۳	۱۵۳۹۹۲۶۵/۳	۱۶۳۰۰۰۰۰	۱۷۰۰۰۰۰۰	۱۵۴۵۰۰۰۰	۱۶۲۰۰۰۰۰	۱۶۵۰۰۰۰۰	۱۵۳۰۰۰۰۰

جدول ۲: نتایج شمارش جمعیت میکروبی اشریشیاکلی در نمونه‌های آمپول تزریقی سیتی کولین در سه گروه مجزا توسط حسگر و روش متداول.

لگاریتم غلظت باکتری تلقیح شده	غلظت اشریشیاکلی (CFU/ml) در نمونه	نتایج مربوط به نمونه‌های آمپول تزریقی سیتی کولین								
		نتایج تشخیصی از حسگر زیستی			نتایج تست‌های متداول با استامینوفن			نتایج تست‌های متداول بدون استامینوفن		
		سری ۱	سری ۲	سری ۳	سری ۱	سری ۲	سری ۳	سری ۱	سری ۲	سری ۳
۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۰	۰/۵	۰/۲	۰/۷	۰	۰	۱	۰	۰	۰/۵	۰
۱	۱	۱/۴	۴/۶	۱/۲	۱/۵	۵	۱/۵	۲	۴	۱
۲	۱۰	۱۶/۹	۲۳/۱	۱۲/۹	۱۳/۵	۲۲	۱۳/۵	۱۱/۵	۲۰	۹/۵
۳	۱۰۰	۱۴۳/۳	۱۳۳/۷	۱۴۸/۳	۱۴۵	۱۳۲	۱۴۵	۱۳۵	۱۲۵	۱۳۰
۴	۱۰۰۰	۱۰۹۲/۱	۱۱۳۰/۴	۱۰۱۹/۵	۱۰۸۰	۱۰۹۵	۱۰۲۵	۱۰۸۰	۱۱۰۰	۱۰۱۰
۵	۱۰۰۰۰	۱۳۹۵۵/۲	۱۲۵۸۵/۸	۱۲۱۵۹/۹	۱۳۵۰۰	۱۲۲۰۰	۱۲۰۰۰	۱۳۲۰۰	۱۲۱۰۰	۱۱۹۰۰
۶	۱۰۰۰۰۰	۱۷۸۳۱۸/۴	۱۶۹۳۴۳/۳	۱۵۲۷۲۵/۵	۱۷۲۰۰۰	۱۶۰۰۰۰	۱۵۲۰۰۰	۱۷۱۰۰۰	۱۶۵۰۰۰	۱۵۲۰۰۰
۷	۱۰۰۰۰۰۰	۱۷۲۹۹۶۸/۸	۱۶۴۲۸۹۵/۹	۱۷۰۰۴۳/۵	۱۷۱۸۰۰۰	۱۶۴۵۰۰۰	۱۶۸۰۰۰۰	۱۷۲۰۰۰۰	۱۶۴۰۰۰۰	۱۵۶۰۰۰۰
۸	۱۰۰۰۰۰۰۰	۱۶۷۸۳۴۱۶/۹	۱۵۶۶۶۶۴۷/۷	۱۶۷۸۳۴۱۶/۹	۱۶۹۵۰۰۰۰	۱۵۳۸۵۰۰۰	۱۶۸۶۰۰۰۰	۱۷۰۰۰۰۰۰	۱۵۳۰۰۰۰۰	۱۶۸۵۰۰۰۰

دنیای میکروب‌ها، سال شانزدهم شماره سوم پاییز ۱۴۰۲. شناسایی اشریشیاکلی در نمونه‌های دارویی و آب با استفاده از روش حسگر زیستی. فاطمه به‌افتاده و همکاران.

جدول ۳: نتایج شمارش جمعیت میکروبی اشریشیاکلی در ماده اولیه سیتی کولین مونوسدیم در سه گروه مجزا توسط حسگر و روش متداول.

نتایج مربوط به نمونه‌های ماده اولیه سیتی کولین مونوسدیم

لگاریتم غلظت باکتری تلقیح شده	غلظت اشریشیاکلی (CFU/ml) در نمونه	نتایج تشخیصی از حسگر زیستی			نتایج تست های متداول با استامینوفن			نتایج تست های متداول بدون استامینوفن		
		سری ۱	سری ۲	سری ۳	سری ۱	سری ۲	سری ۳	سری ۱	سری ۲	سری ۳
۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۰	۰/۵	۰/۳	۰/۲	۰/۵	۰/۵	۰	۰/۵	۰	۰/۵	۰/۵
۱	۱	۶/۹	۵/۴	۲/۷	۷	۶	۳	۷	۵/۴	۳
۲	۱۰	۱۰/۸	۲۸/۴	۲۵/۶	۱۱	۲۶	۲۵	۱۲	۲۲	۲۴
۳	۱۰۰	۱۴۳/۳	۱۹۵/۳	۱۲۹/۲	۱۴۰	۱۸۵	۱۰۵	۱۳۷	۱۷۸	۱۰۰
۴	۱۰۰۰	۱۴۳۸/۴	۱۹۶۰/۹	۱۱۳۰/۴	۱۴۱۰	۱۹۵۰	۱۰۹۰	۱۲۳۰	۱۹۰۰	۱۰۸۰
۵	۱۰۰۰۰	۱۴۴۴/۱	۱۷۷۵۸/۳	۲۱۸۳۳/۱	۱۴۳۰۰	۱۷۰۵۰	۲۱۳۰۰	۱۴۶۰۰	۱۶۹۰۰	۲۱۰۰۰
۶	۱۰۰۰۰۰	۱۴۲۵۶۳/۱	۱۳۰۸۰۵/۷	۲۱۱۸۱۵/۱	۱۴۱۵۰۰	۱۲۶۵۰۰	۲۱۰۰۰۰	۱۴۱۰۰۰	۱۲۷۰۰۰	۲۰۱۰۰۰
۷	۱۰۰۰۰۰۰	۱۴۵۶۳۸۹/۴	۱۴۲۱۷۱۰	۲۱۲۶۹۲۰/۲	۱۴۰۵۰۰۰	۱۴۱۲۰۰۰	۲۰۵۰۰۰۰	۱۴۰۰۰۰۰	۱۴۱۰۰۰۰	۲۰۰۰۰۰۰
۸	۱۰۰۰۰۰۰۰	۱۴۶۲۴۱۸۸/۳	۱۷۶۷۲۹۳۲/۲	۲۲۱۰۵۳۶۰/۸	۱۵۴۰۰۰۰۰	۱۷۵۰۰۰۰۰	۲۱۵۰۰۰۰۰	۱۵۲۰۰۰۰۰	۱۶۶۰۰۰۰۰	۲۱۰۰۰۰۰۰

جدول ۴: نتایج شمارش جمعیت میکروبی اشریشیاکلی در آب شرب در سه گروه مجزا توسط حسگر و روش متداول.

نتایج مربوط به نمونه‌های آب شرب

لگاریتم غلظت باکتری تلقیح شده	غلظت اشریشیاکلی (CFU/ml) در نمونه	نتایج تشخیصی از حسگر زیستی			نتایج تست های متداول با استامینوفن			نتایج تست های متداول بدون استامینوفن		
		سری ۱	سری ۲	سری ۳	سری ۱	سری ۲	سری ۳	سری ۱	سری ۲	سری ۳
۰	۰	۰	۰	۰/۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۰	۰/۵	۰/۳	۰/۲	۰/۴	۰/۵	۰	۰/۵	۰/۵	۰	۰/۵
۱	۱	۳/۶	۴/۶	۵/۱	۳/۵	۶	۷	۴	۴	۷
۲	۱۰	۳۰/۴	۱۸/۲	۳۶/۱	۲۸/۵	۲۳	۳۴	۳۰	۲۴	۳۳
۳	۱۰۰	۳۳۸/۸	۲۳۲	۳۳۸/۸	۳۳۰	۲۲۴	۲۶۰	۳۲۵	۲۰۸	۲۵۰
۴	۱۰۰۰	۲۴۵۲/۷	۲۶۷۳/۲	۲۹۱۳/۵	۲۳۵۰	۲۵۹۰	۲۷۰۰	۲۲۰۰	۲۴۲۰	۲۶۵۰
۵	۱۰۰۰۰	۲۵۹۳۴/۴	۲۲۹۹۰/۲	۳۳۰۰۲	۲۵۶۰۰	۲۳۲۰۰	۳۳۰۰۰	۲۵۰۰۰	۲۲۶۰۰	۳۲۰۰۰
۶	۱۰۰۰۰۰	۲۳۴۸۶۲/۳	۲۱۹۲۳/۶	۲۶۰۴۱۷/۳	۲۲۵۰۰۰	۲۱۸۰۰۰	۲۴۴۰۰۰	۲۲۲۰۰۰	۲۱۸۰۰۰	۲۴۵۰۰۰
۷	۱۰۰۰۰۰۰	۲۳۵۸۳۴۶/۷	۲۲۰۱۴۲۲/۲	۳۱۰۶۱۶۷/۶	۲۳۶۰۰۰۰	۲۱۳۲۰۰۰	۳۱۰۰۰۰۰	۲۴۵۰۰۰۰	۲۱۲۰۰۰۰	۳۰۱۰۰۰۰
۸	۱۰۰۰۰۰۰۰	۲۰۹۲۰۶۰۱/۳	۲۱۳۵۷۲۵۶/۱	۲۱۷۲۸۰۸۹	۲۱۰۰۰۰۰	۲۱۲۰۰۰۰۰	۲۱۶۵۰۰۰۰	۱۹۹۰۰۰۰۰	۲۱۰۰۰۰۰۰	۲۱۶۰۰۰۰۰

دنیای میکروپها، سال شانزدهم شماره سوم پاییز ۱۴۰۲. شناسایی اشریشیاکلی در نمونه‌های دارویی و آب با استفاده از روش حسگر زیستی. فاطمه به‌افتاده و همکاران.

جدول ۵: نتایج شمارش جمعیت میکروبی اشریشیاکلی در نمونه‌های آب خالص در سه گروه مجزا توسط حسگر و روش متداول.

لگاریتم غلظت باکتری تلقیح شده	غلظت اشریشیاکلی (CFU/ml) در نمونه	نتایج مربوط به نمونه‌های آب خالص										
		نتایج تشخیصی از حسگر زیستی			نتایج تست‌های متداول با استامینوفن			نتایج تست‌های متداول بدون استامینوفن				
		سری ۱	سری ۲	سری ۳	سری ۱	سری ۲	سری ۳	سری ۱	سری ۲	سری ۳		
۰	۰	۰/۱	۰	۰/۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۰	۰/۵	۰/۵	۰/۳	۱	۰/۵	۰/۵	۱	۰	۱	۱	۱	۱
۱	۱	۹/۱	۱/۵	۳	۲	۵	۳/۵	۲	۵/۵	۲۹	۳/۵	۳/۵
۲	۱۰	۱۱/۲	۲۵/۶	۴/۳۰	۱۱	۵/۲۶	۳۱	۱۰	۲۵	۲۹	۲۹	۲۹
۳	۱۰۰	۲۰۲/۱	۱۳۸/۴	۱۹۵/۳	۱۹۸	۱۲۳	۱۸۵	۱۹۵	۱۲۰	۱۸۰	۱۸۰	۱۸۰
۴	۱۰۰۰	۲۴۹۵/۳	۲۳۶۹/۷	۱۵۴۱	۲۴۰۰	۲۲۵۰	۱۵۹۰	۲۴۰۰	۲۲۰۰	۱۴۴۰	۱۴۴۰	۱۴۴۰
۵	۱۰۰۰۰	۱۷۱۵۷/۳	۲۱۸۸۳/۱	۱۵۴۷۳/۷	۱۶۵۰۰	۲۱۵۰۰	۱۵۳۰۰	۱۵۶۰۰	۲۱۰۰۰	۱۵۲۰۰	۱۵۲۰۰	۱۵۲۰۰
۶	۱۰۰۰۰۰	۲۰۴۶۶۶/۷	۲۱۹۲۳۴/۶	۱۴۷۵۵۶/۸	۲۰۰۰۰۰	۲۱۴۰۰۰	۱۴۶۵۰۰	۱۹۸۰۰۰	۲۲۰۰۰۰	۱۴۷۵۰۰	۱۴۷۵۰۰	۱۴۷۵۰۰
۷	۱۰۰۰۰۰۰	۲۲۰۱۴۲۲/۲	۲۱۱۹۶۱۰/۱	۱۲۶۹۰۲۱/۳	۲۲۰۰۰۰۰	۲۱۲۰۰۰۰	۱۲۴۴۰۰۰	۲۱۶۰۰۰۰	۲۱۳۰۰۰۰	۱۲۵۰۰۰۰	۱۲۵۰۰۰۰	۱۲۵۰۰۰۰
۸	۱۰۰۰۰۰۰۰	۱۸۹۳۲۷۱۵/۹	۲۲۸۷۹۶۷۰/۲	۱۴۶۲۴۱۸۸/۳	۱۸۸۰۰۰۰۰	۲۳۰۰۰۰۰۰	۱۴۳۲۰۰۰۰	۱۷۸۰۰۰۰۰	۲۲۵۰۰۰۰۰	۱۳۵۰۰۰۰۰	۱۳۵۰۰۰۰۰	۱۳۵۰۰۰۰۰

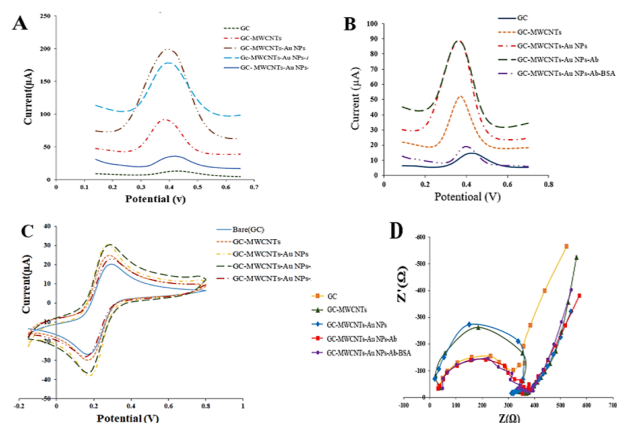
جدول ۶: نتایج شمارش جمعیت میکروبی اشریشیاکلی در نمونه‌های آب قابل تزریق در سه گروه مجزا توسط حسگر و روش متداول.

لگاریتم غلظت باکتری تلقیح شده	غلظت اشریشیاکلی (CFU/ml) در نمونه	نتایج مربوط به نمونه‌های آب قابل تزریق										
		نتایج تشخیصی از حسگر زیستی			نتایج تست‌های متداول با استامینوفن			نتایج تست‌های متداول بدون استامینوفن				
		سری ۱	سری ۲	سری ۳	سری ۱	سری ۲	سری ۳	سری ۱	سری ۲	سری ۳		
۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۰	۰/۵	۰/۲	۰/۱	۰/۷	۰/۵	۰	۰/۵	۰	۰	۱	۱	۱
۱	۱	۳/۵	۹/۱	۸/۲	۳	۹	۹	۳	۸	۴/۵	۴/۵	۴/۵
۲	۱۰	۲۳/۱	۳۳/۷	۲۹/۴	۲۲/۵	۳۵	۲۹/۵	۲۳	۳۳	۲۵	۲۵	۲۵
۳	۱۰۰	۲۳۲	۲۹۵/۲	۲۵۷/۲	۲۲۸	۲۸۸	۲۴۵	۲۲۶	۲۹۰	۲۴۰	۲۴۰	۲۴۰
۴	۱۰۰۰	۱۵۹۵	۲۵۸۲/۷	۱۱۳۰/۴	۱۵۸۰	۲۵۲۰	۱۱۰۰	۱۶۵۰	۲۴۱۰	۱۰۵۰	۱۰۵۰	۱۰۵۰
۵	۱۰۰۰۰	۲۰۳۸۰/۳	۲۵۰۵۶/۷	۲۶۸۴۲/۸	۱۹۶۰۰	۲۵۰۰۰	۲۶۲۰۰	۱۹۵۰۰	۲۴۴۰۰	۲۶۰۰۰	۲۶۰۰۰	۲۶۰۰۰
۶	۱۰۰۰۰۰	۲۲۶۹۱۴	۳۳۱۳۸۶/۶	۲۷۸۹۸۰/۷	۲۲۰۰۰۰	۲۸۰۰۰۰	۲۷۰۰۰۰	۲۲۰۰۰۰	۲۷۵۰۰۰	۲۵۸۰۰۰	۲۵۸۰۰۰	۲۵۸۰۰۰
۷	۱۰۰۰۰۰۰	۲۴۴۰۹۵۵/۲	۲۴۴۰۹۵۵/۲	۲۳۱۸۰۹۶/۹	۲۴۰۰۰۰۰	۲۴۰۰۰۰۰	۲۳۵۰۰۰۰	۲۴۲۰۰۰۰	۲۴۵۰۰۰۰	۲۲۹۰۰۰۰	۲۲۹۰۰۰۰	۲۲۹۰۰۰۰
۸	۱۰۰۰۰۰۰۰	۲۵۳۶۹۱۶۷/۷	۲۷۱۷۷۵۶۳/۹	۲۵۳۶۹۱۶۷/۷	۲۵۱۰۰۰۰۰	۲۶۶۰۰۰۰۰	۲۵۱۰۰۰۰۰	۲۴۴۰۰۰۰۰	۲۵۸۰۰۰۰۰	۲۴۲۰۰۰۰۰	۲۴۲۰۰۰۰۰	۲۴۲۰۰۰۰۰

ولتامتری موجی مربعی و ولتامتری پالس تفاضلی (DPV: Differential pulse voltammetry) و امپدانس در همه مراحل قابل رویت است (شکل ۲). همچنین میزان سطح موثر الکتروود نیز براساس آرایش طراحی شده 5mM K₃Fe (CN)₆ در محلول 0.1M KCl با روش ولتامتری چرخه‌ای در محدوده اسکن E₁=-0.2 تا E₂=0.8 با سرعت اسکن‌های مختلف (۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵، ۱۵۰، ۱۷۵ و ۲۰۰ mv.S⁻¹) با دستگاه پتانسیوستات گالوانوستات متحنی گرفته و با فرمول زیر محاسبه شد که از ۰/۰۳۱۴cm² به ۰/۰۵۳۹cm² افزایش یافت.

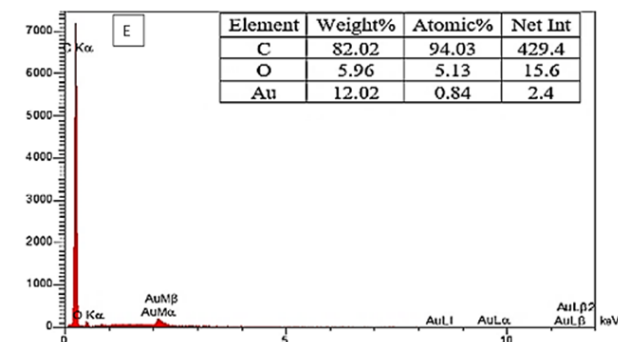
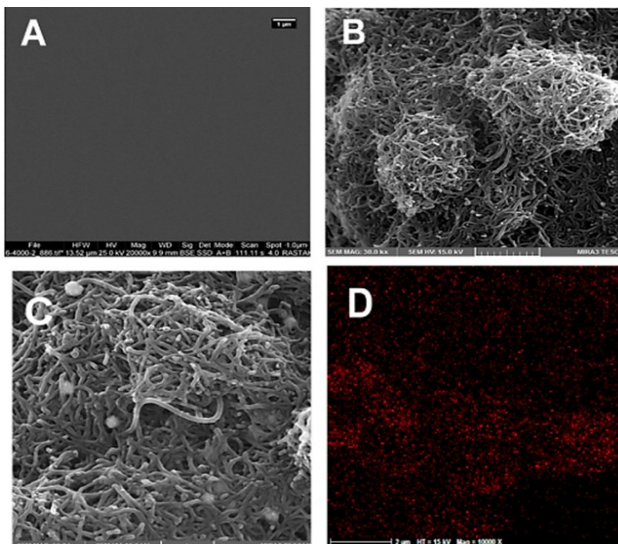
$$A^{1/2} C v^{1/2} \frac{3}{2} i_p = 2.69 \times 10^5 n$$

در این فرمول i_p میزان جریان ماکزیمم برحسب آمپر و n تعداد الکترون‌های جابه‌جا شده در پروسه احیا که معمولاً برابر با عدد ۱ است و A میزان سطح الکتروود برحسب cm² که عدد مورد محاسبه است. D میزان ضریب انتشار برحسب cm²/s میزان C و غلظت K₃Fe (CN)₆ بر حسب mol/cm³ (۶/۷×۱۰^{-۶}) و v (۵×۱۰^{-۶}) میزان سرعت اسکن V/s است (۲۱).



شکل ۲: نتایج ولتامتری موجی مربعی برای هر مرحله از اصلاح حسگر زیستی (A). نتایج ولتامتری پالس تفاضلی در هر مرحله از اصلاح (B). ولتامتری چرخه‌ای برای هر مرحله از اصلاح الکتروود (C). طیف‌های امپدانس از اصلاح سطح حسگر زیستی (D)

ساختار و خصوصیات شکلی از الکتروود برهنه کربن شیشه‌ای در مقایسه با الکتروود تغییر یافته به‌واسطه میکروسکوپ SEM بررسی و درصد میزان عناصر موجود در GCE/MWCNTs/Au NPs در شکل ۱ آمده است.



شکل ۱: سطح کربن شیشه‌ای برهنه (A)، سطح کربن شیشه‌ای با نانولوله‌های کربنی چندلایه (B)، سطح کربن شیشه‌ای با نانولوله‌های کربنی و نانوذرات طلا (C)، نقشه کلی از نانوذرات طلا بر روی سطح نانولوله‌های کربنی چندلایه روی الکتروود کربن شیشه‌ای (D) از تصویر EDX از GCE/MWCNTs/Au NPs €

در حسگر زیستی سطح الکتروود کربن شیشه‌ای دارای پیک‌های اکسیداسیون و احیا بود که پس از قرارگیری نانولوله‌های کربنی چندلایه دچار تغییرات و با اضافه شدن نانوذرات طلا این میزان افزایش داشت، اما اضافه شدن آنتی‌بادی و سرم آلبومین تا حدی روند کاهشی را نشان داد. در شکل A تا D نتایج اسکن با سه روش ولتامتری چرخه‌ای (CV: Cyclic voltammetry)،

$$DI = (A-C)/(B-C) \times 100\%$$

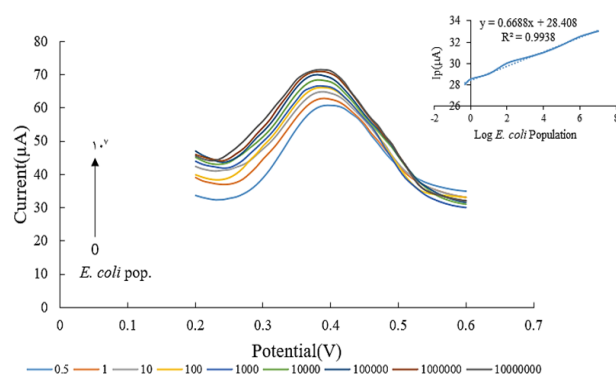
در این فرمول DI درجه تداخل بوده و A نیز میزان اختلاف دماغه بیشینه جریان (ΔI) باکتری مداخله‌گر و B میزان بیشینه دماغه جریان باکتری اشریشیاکلی و C نیز مربوط به بیشینه جریان در بافر بدون باکتری (Blank) می‌باشد. DI نشانگر میزان تداخل باکتری‌های مداخله‌گر و اختصاصی بودن الکتروود برای تشخیص باکتری اشریشیاکلی می‌باشد. این میزان برای چهار باکتری مداخله‌گر به ترتیب باسیلوس اسپیزینزی % ۴۹/۶۸- و برای سالمونلا % ۳۴/۶۶- و برای سودوموناس آئروژینوزا % ۴۸/۶۹- و در مورد استافیلوکوکوس اورئوس % ۳۸/۶۷- بود این در حالی است که میزان DI برای اشریشیاکلی % ۹۸/۷۹ مشاهده شد. این نتایج حاکی از میزان اختصاصی بودن الکتروود طراحی شده است. حد تشخیص (LOD) این الکتروود برای اشریشیاکلی ۳/۰۲ به دست آمد.

بحث

اولین و اساسی‌ترین مرحله در کنترل باکتری‌ها تشخیص مؤثر و سریع آن‌ها در نمونه بدون نیاز به فرآیند آماده‌سازی است. بعضی از مراحل آماده‌سازی شامل عصاره‌گیری، جداسازی، غنی‌سازی و شمارش است. حسگرهای زیستی به دلیل انعطاف‌پذیری زیاد در طراحی، سبکی ساختار، ارزان بودن بسیار مورد استفاده و مقبول هستند (۲۲). مطابق قوانین عملیات بهینه تولید (GMP) محصولات دارویی و همچنین استانداردهای سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) لازم است شرایط کلیه خطوط تولید دارویی اعم از آب، مواد مصرفی و فضاهای تولیدی و کارکنان به‌طور کامل مورد بررسی و معتبرسازی قرار گیرند. به این ترتیب آزمایشگاه میکروبیولوژی هر شرکت دارویی موظف است کلیه آزمون‌های مربوط به این موارد را در دستور کار خود قرار دهد (۲۳). تاییدات در قوانین GMP در این امر بخصوص در فرموله کردن و تولید محصولات خوراکی و شرایط آن‌ها برای آلودگی با باکتری‌های موجود در هوا و آب و همچنین دامنه قابل‌قبول آلودگی (کمتر از ۱۰۰ CFU/ml) ناشی از شمارش میکروارگانیسم‌ها در

رسم منحنی کالیبراسیون از سر الکتروود اصلاح‌شده دارای کارایی مناسب در سنجش میزان باکتری اشریشیاکلی در محلول بافر فسفات ۰/۱M با pH ۷/۴ حاوی ۰/۵mM استامینوفن حاوی غلظت‌های ۰ تا ۱۰^۷ CFU/ml از باکتری اشریشیاکلی در ولتاژ ۱۰۰mV.s-1 در محدوده اسکن $E_1=0$ تا $E_2=0.8$ انجام و طول بیشینه میزان دماغه جریان در آن‌ها اندازه گرفته شد. رسم نمودار براساس لگاریتم غلظت نسبی باکتری نسبت به طول بیشینه میزان دماغه جریان و اندازه‌گیری شیب خط و همچنین ضریب رگرسیون انجام شد که در شکل ۳ قابل مشاهده است. براساس نتیجه موجود معادله خط کالیبراسیون براساس معادله زیر است:

$$I_p(\mu A) = 0.6688 \log E. coli \text{ population (CFU/ml)} + 28.408 \quad (R^2=0.9938)$$



شکل ۳: SWV الکتروود اصلاح‌شده با ترکیب نانولوله کربنی چندلایه در غلظت‌های مختلف اشریشیاکلی (۱۰^۷-۰ CFU/ml)

نتایج اسکن الکتروود طراحی شده در سرعت ۱۰۰mV. s-1 در محدوده $E_2=0.8$ تا $E_1=0$ از روش ولتامتری موجی مربعی در بافر فسفات ۰/۱M حاوی ۰/۵mM استامینوفن از رقت‌های ۱۰^۰ CFU/ml باکتری‌های مداخله‌گر شامل سویه‌های سالمونلا انتریکا، سودوموناس آئروژینوزا، باسیلوس اسپیزینزی و استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با گراف اولیه فاقد باکتری و در حضور باکتری اشریشیاکلی انجام و مورد مقایسه قرار گرفت و از معادله زیر درصد تداخل تعیین گردید.

واکنش اتصال ایمنولوژیکی بین یک آنتی‌ژن و یک آنتی‌بادی است. اختصاصی بودن و حساسیت روش الیزا بسیار بالاست و می‌تواند میزان/شریشیاکلی در آب و غذا در رنج وسیعی تشخیص داد. اما کمبودهای این روش را نمی‌توان نادیده گرفت به‌طور مثال کیت‌های آماده شده الیزا را نمی‌توان به مدت طولانی نگهداری کرد. این روش کارایی بالایی در سنجش میزان پروتین دارد و بعضی نمونه‌ها با وزن مولکولی کوچک فعالیت ایمنولوژیکی ندارند نیاز به جفت شدن با پروتین‌های بزرگ مولکول برای تشخیص دارند (۲۵).

همچنین رویکردهای نشانه‌گذاری ایمنولوژیک برای تعیین/شریشیاکلی با استفاده از فلوروسین، آنزیم یا نانو ذرات اتصال یافته به آنتی‌بادی‌ها برای اتصال به آنتی‌ژن‌های هدف خاص روی سطح باکتری و تشخیص آن به‌واسطه میکروسکوپ فلوروسنت، دوربین تلفن همراه و یا خوانش صفحات است. از اهداف نشاندارکردن ایمنولوژیک در اتصال به/شریشیاکلی در سطح حسگرهای زیستی اندازه‌گیری تغییرات به‌وسیله امیدانسی و یا رزونانس‌های سطحی پلاسمون است (۲۷) در این تحقیق به دلیل هزینه بالا، حساسیت بالای معرف‌ها و تجهیزات پیچیده و ناتوانی در تشخیص باکتری زنده برای استفاده عملیاتی مورد توجه قرار نگرفت. استفاده از فن‌آوری پخش نفوذ سطحی رامان (Surface-enhanced Raman spectroscopy) بسیار سریع اما حساس به آنتی‌بیوتیک بود و در کمتر از ۲ ساعت شناسایی باکتری را انجام می‌داد و دارای راندمان پایین و هزینه بالا و نیازمند وسایل جنبی و ریسک آلودگی بالا به دلیل باز بودن نمونه است (۲۷). استفاده از آنتی‌بادی کمک شایانی به اختصاصی بودن حسگرهای زیستی می‌کند، آنتی‌بادی منو کلونال در مقایسه با آنتی‌بادی پلی کلونال می‌تواند آنتی‌ژن اپی‌توب‌های خاصی را شناسایی کند (۲۸). به‌دلیل خصوصیات و الزامات آزمون‌ها در فارماکوپه آمریکا و اروپا مونوکلونال آنتی‌بادی برای کار دارای محدودیت‌های تشخیص بوده و از نوع پلی کلونال در تحقیق استفاده گردید. ضمناً ساختار برهمکنش این آنتی‌بادی به‌کل سلول/شریشیاکلی است و قابلیت اتصال به سلول‌های مرده یا توالی نوکلئوتیدی نامرتبط

آن‌ها و دارا بودن پتانسیل بالای آلودگی شدت و اهمیت بیشتری پیدا می‌کند (۲۴). در حال حاضر سه روش اصلی تشخیص باکتری/شریشیاکلی وجود دارد: روش متداول شمارش در محیط‌های کشت، روش‌های تشخیص مولکولی، روش‌های تشخیصی ایمنولوژیکی. روش کشت یک روش بر پایه شکل شناسی کلنی و تغییر رنگ و واکنش‌های بیوشیمیایی در محیط خاص بعد از جداسازی و کشت باکتری است که به روش شمارش در پلیت و بیشترین احتمال شمارش (MPN) تقسیم می‌شود. روش شمارش دارای دامنه ۱۵ تا ۱۵۰ CFU/ml است در حالیکه برای شمارش کلی فرم‌ها در نمونه‌ها با تعداد کم مناسب است. روش کشت به‌شدت محدود به گذشت زمان طولانی برای تشخیص است (۷۲ تا ۱۲۰ ساعت).

در مقایسه با روش کشت، روش واکنش زنجیره پلی‌مراز به‌طور وسیع برای تشخیص/شریشیاکلی استفاده شده است (۲۵). اگرچه PCR زمان تشخیص را بسیار تقلیل می‌دهد اما مراحل مختلف آن از دناتوراسیون تا طویل سازی نیاز به تجهیزات آزمایشگاهی خاص دارد و همچنین آنزیم‌های PCR به ممانعت حاصل از ترکیبات پیچیده حساس هستند (۲۶). اگرچه تعیین ترادف DNA اطلاعات قابل‌توجهی را برای شناسایی باکتری‌های بیماری‌زا فراهم می‌کند اما روش پرهزینه با چالش‌های بسیار و نیازمند کارشناسان مجرب است. در مقایسه با تعیین ترادف DNA روش PCR کمی در زمان واقعی حساسیت و اختصاصیت بیشتری (کمتر از ۱۰ CFU/ml) دارد و در حدود چند ساعت قابل انجام است. به‌هرحال در کنار این نکات آنزیم DNA پلی‌مراز به بسترهای آلوده‌کننده و ممانعت‌کننده در نمونه‌های اولیه حساس است. نکته مورد اهمیت این است که این روش‌های مولکولی قابلیت تشخیص باکتری زنده از غیرزنده و یا ترادف DNA که هیچ اثر سوئی در بیماری انسان ندارند را دارا نمی‌باشند، به این دلیل این روش‌ها به‌عنوان یک ریسک در جهت سنجش آلودگی/شریشیاکلی بوده و به‌نوعی جزو هزینه‌های غیرضروری شمرده می‌شوند (۲۷).

روش ارزیابی ایمنولوژیکی با اتصال آنزیم (ELISA) یک روش برای تشخیص/شریشیاکلی است که بر پایه توانمندی

به‌عنوان روش اصلی سنجش میزان باکتری/شریشتی‌کلی استفاده شد علت این امر سرعت، دقت و حساسیت بالای این روش در مقایسه با روش‌های ولتامتری چرخه‌ای، ولتامتری پالس تفاضلی، ولتامتری پالس طبیعی و غیره بوده و دارای پیک تیزتری در سنجش است (۳۱). در مطالعه Vu و همکاران در سال ۲۰۲۱ یک حسگر زیستی الکتروشیمیایی فاقد نشانگر با استفاده از نانوذرات طلا برای تشخیص سریع میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا طراحی شد و در تشخیص/شریشتی‌کلی از روش ولتامتری چرخه‌ای و اسپکتروفوتومتری امپدانس الکتروشیمیایی در محلول Potassium $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (Potassium ferricyanide (III)/Potassium hexacyanoferrate (II)) با غلظت ۵ mM و ۰/۱ M KCl استفاده شده بود که دارای حد تشخیص حدود ۱۵ CFU/ml در مدت زمان ۳۰ دقیقه بود و در مقایسه با حسگر طراحی شده در این تحقیق دارای قدرت تشخیص پایین‌تری بوده است (۱۶).

در مقایسه با دیگر حسگرهای طراحی شده زیستی، این نمونه دارای دامنه تشخیص باکتری وسیع‌تری (۰ تا 10^6 CFU/ml) می‌باشد. برای نمونه Cao و همکاران در سال ۲۰۲۲ حسگر زیستی برای تشخیص/شریشتی‌کلی به روش مستقیم با استفاده الکتروود کربن شیشه‌ای طراحی نمودند که دامنه تشخیصی بسته‌تر (10^4 تا 10^6 CFU/ml) داشتند (۳۲). از آنجاکه در اغلب محصولات دارویی خوراکی از مواد نگهدارنده اعم از متیل پارابن و پروپیل پارابن استفاده می‌شود و در انجام آزمایش شمارش میکروبی و بررسی حضور/شریشتی‌کلی به روش مرسوم فارماکوپه‌های معتبر نیاز به فرآیند خنثی‌سازی اثر ممانعت‌کننده این مواد قبل از انجام آزمایش است که این خود مستلزم صرف هزینه‌های بیشتر و اعتبارسنجی روش خنثی‌سازی مورد استفاده دارد (۱۹). در مقایسه با این امر استفاده از این حسگر زیستی بدون نیاز به این مرحله توانسته است کمک قابل توجهی به کم نمودن هزینه‌ها و کم نمودن زمان تشخیص داشته باشد. همچنین، مورد تأیید بودن نتایج در مقایسه برندهای محصولات دارویی تولیدی اعم از آمپول‌های

نداشته و این امر کمک شایانی در سنجش صحیح میزان حضور یا عدم حضور/شریشتی‌کلی در نمونه دارد که دقیقاً از نکات مهم و ارزشمند در تشخیص است و از مردود نمودن نمونه به‌طور کاذب جلوگیری می‌نماید. با توجه به استفاده از روش آمپرومتریک و بهره‌گیری از فرآیند اکسیداسیون و احیا در تشخیص باکتری/شریشتی‌کلی لازم بود که از یک مولکول شاهد در ترکیب بافر فسفات با pH ۷/۴ استفاده گردد (۲۹).

در مطالعه پورمدی و همکاران در سال ۲۰۱۹ روش آپتامری با استفاده از الکتروود کربن شیشه‌ای و اکسید گرافن احیاشده و نانو ذرات طلا ساخته شد که در آن از نمک -3/-4 $[Fe(CN)_6]$ (Iron (III) ferrocyanide) استفاده شد که خود به‌دلیل ترکیب سیانید دارای سمیت برای باکتری‌ها بوده و باعث حصول نتایج نادرست یا محدودیت در بازه تشخیص در نمونه‌ها خواهد بود (۳۰). در مقایسه با دیگر مطالعات انجام‌شده حضور مولکول استامینوفن در طراحی شرایط تشخیص حسگر زیستی است که خود شاخص بسیار مناسبی برای اندازه‌گیری تغییر میزان ارتفاع بیشینه جریان در ولتاژ ۰/۴ ولت بود و این امر دارای نوآوری در طراحی حسگرهای زیستی است. استفاده از مولکول شاهد استامینوفن برای اولین بار در طراحی روش‌های تشخیصی کمک شایانی به تشخیص و تعیین میزان آلودگی باکتری/شریشتی‌کلی در نمونه‌ها داشت نمود. در تحلیل مقایسه‌ای داده‌های حاصل از حسگر زیستی با آزمون‌های مرسوم آزمایشگاهی در حضور استامینوفن و همچنین عدم حضور آن شمارش تعداد کلنی‌های باکتری در بافر فسفات در مقایسه با بافر فسفات حاوی مولکول استامینوفن تغییر چشمگیری نداشت و حضور استامینوفن مزاحمتی برای رشد یا عدم رشد باکتری در نمونه مورد بررسی نداشت. همچنین رقت‌سازی و اندازه‌گیری تغییرات جریان در بافر فسفات با pH مناسب باعث حداقل نمودن آسیب به میکروارگانیزم‌ها به‌ویژه در رقت‌های پایین بود که این امر نقطه مثبتی در حصول نتایج با درستی بالا و منطبق بر نتایج روش‌های مرسوم موجود است. در مقایسه با مطالعات قبل هریک از روش‌های سنجش آمپرومتریک برای بررسی در تحقیق فوق از روش SWV

سیستم (LMIA) loop-mediated isothermal amplification طراحی شد که دارای حد تشخیص ۱ CFU/ml بود. از فواید این حسگر اختصاصی بودن، هزینه کم، پذیری و تکرارپذیری بالا بود و همچنین قابلیت تشخیص اشریشیاکلی سروتیپ ۷ O157:H را در نمونه‌های غذایی داشت (۳۸). Simoska و همکاران در سال ۲۰۱۹ نیز یک حسگر ایمونولوژیکی الکتروشیمیایی ساختند که از احیای نمک‌های فروسیانید پتاسیوم با ظرفیت ۳ و ۴ با روش امپدانس (EIS) در تشخیص باکتری اشریشیاکلی استفاده کرد. حسگر طراحی شده آن‌ها هیچ‌گونه واکنش خاصی به باکتری‌های استافیلوکوکوس آلبوس، استافیلوکوکوس اورئوس، لاکتوباسیلوس کازئی و شیگلا فلکسنری نداشت. حد تشخیص آن نیز حدود ۱۰۰ CFU/ml در دامنه $10^2 \times 3$ تا $10^8 \times 3$ CFU/ml بوده است (۳۹).

از جنبه‌های دیگر نوآوری در این تحقیق طراحی منحصربه‌فرد آرایش GCE/MWCNTs/Au NPs/PAb *E. coli*/BSA است که برای اولین بار به تشخیص و بررسی میزان باکتری اشریشیاکلی در نمونه‌های دارویی اعم از مواد اولیه، شربت، آمپول سیتی‌کولین و نمونه‌های واقعی آب اعم از آب خالص، آب قابل تزریق و آب شرب کمک قابل توجهی می‌نماید. از نکات قابل ذکر حجم پایین نمونه و زمان کمتر و عدم نیاز به پروسه کشت، هزینه آزمون کمتر و تعداد نمونه کمتر که به‌عنوان معضلی در بحث نمونه‌های گران‌قیمت و یا با حجم تولید کم مطرح است می‌باشد (۱۹).

در مباحث پایش در صنعت دارو می‌توان با بررسی آلودگی مواد اولیه و آب قبل از فرآیند ساخت محصول و همچنین آلودگی محصول قبل از فرآیند پرکردن به‌واسطه انجام آزمایش‌های سریع تشخیصی و اطلاع از میزان بار میکروبی نمونه از انتشار بسیاری از آلودگی‌ها و هدر رفت هزینه‌های بیشتر جلوگیری نمود. طراحی حسگرهای زیستی از این دست در زمینه آزمایش‌های پایش میکروبی آب و شاخص بودن باکتری اشریشیاکلی در این مورد و همچنین بررسی پروسه تمیزکاری تانک‌های تهیه در صنعت دارو می‌تواند کمک قابل توجهی در کم نمودن نشر آلودگی‌ها و رفع آن باشد.

شرکت‌های البرزدارو، کاسپین تامین و مینو و شربت‌های برند خارجی و البرز دارو است. این مسئله بیان‌گر این است که تفاوت فرموله شدن در محصولات تأثیر سوئی بر نتایج آزمایش با روش استفاده از حسگر زیستی نداشته و این روش قابلیت انجام برای کلیه محصولات دارویی سیتی کولین را دارا است.

از دیگر معضلات تشخیص در روش‌های مرسوم عدم امکان شناسایی کلیه باکتری‌ها اعم از قابل کشت و غیرقابل کشت در نمونه می‌باشد (۳۳ و ۳۶) که این خطا به‌واسطه استفاده از حسگر زیستی رفع شده است. همچنین مشکلاتی از قبیل تنظیم pH، شرایط، دمای کشت و کیفیت محیط کشت مصرفی از نظر قابلیت عوامل قابل توجهی در انجام آزمایش‌ها سترون بودن، شمارش و بررسی میکروارگانیسم بیماری‌زای اشریشیاکلی به روش متداول است (۱۹) لذا استفاده از حسگر زیستی طراحی شده با آرایش GC/MWCNTs/Au NPs/PAb/BSA محدودیت‌های فوق‌الذکر را نداشته و توانایی بالایی در تشخیص این باکتری داشته است. به‌علاوه، در روش تشخیصی طراحی شده فعلی نیاز به غنی‌سازی قبل از تشخیص وجود ندارد در حالی که در بسیاری از حسگرهای زیستی مانند نمونه طراحی شده توسط El.Moghazy و همکاران در سال ۲۰۲۲ از ترکیبات نانولوله کربنی در طراحی استفاده شد که در تشخیص اشریشیاکلی نیاز به حداقل یک ساعت غنی‌سازی قبلی داشت (۳۴) و همچنین در روش متداول نیز نیاز به غنی‌سازی در محیط مک‌کانکی براث می‌باشد (۱۹).

اغلب حسگرهای زیستی طراحی شده برای اشریشیاکلی در تشخیص در نمونه‌های غذایی و آب (۳۵ و ۲۹) و یا نمونه‌های واقعی مانند ادرار یا سرم بیماران (۳۶) طراحی شده‌اند. از مطالعات پیشین دیگر در این زمینه می‌توان به حسگر طراحی شده توسط Wang و همکاران اشاره نمود که یک حسگر بیوشیمیایی بر پایه آبتامر بوده و امکان تشخیص سریع باکتری اشریشیاکلی با دامنه حدود $10^2 \times 5$ تا $10^7 \times 5$ CFU/ml در عصاره لیکوریس (شیرین‌بیان) با حد تشخیص حدود CFU/ml ۸۰ را داشته است (۳۷). همچنین حسگر زیستی دیگری با استفاده از نانولوله‌های کربنی و یک سیستم بر پایه ریزتراشه با

تعارض منافع با توجه به زمان‌بر بودن آزمایش‌های کنترل میکروبی این اقلام (در حدود ۵ تا ۷ روز) امکان آزمون‌های میکروبی آنلاین برای این موارد با روش‌های مرسوم وجود نداشته و روش‌های نوین و سریع حسگر زیستی طراحی شده مکمل در حل این مشکل بسیار مناسب هستند. با استفاده از این حسگر زیستی می‌توان در کمتر از ۳ دقیقه بررسی ماده مورد نظر را انجام و برای تایید اولیه آن برای فرآیند ساخت بهره برد.

نتیجه‌گیری

از حسگر طراحی شده می‌توان در آزمون‌های مربوط به پایش‌های محیطی از قبیل پایش هوا و سطوح اتاق‌ها، بررسی آلودگی در صنایع غذایی و آزمایش‌ها تشخیصی بیمارستانی بعد از انجام مراحل معتبر سازی استفاده کرد. به‌طور معمول کارایی حسگر زیستی با اسکن متعدد در رقت‌های متعدد باکتری اشریشیاکلی کم می‌شود لذا پیشنهاد می‌گردد برای آزمایش از حسگرهای تازه ساخته شده در بررسی آزمون استفاده گردد تا نتایج با خطای پایین‌تری به دست آید. همچنین از آنجاکه این حسگر زیستی برای نمونه دارویی مورد آزمایش قرار گرفت، از این حسگر می‌توان در بررسی اشریشیاکلی در سایر محصولات دارویی با در نظر گرفتن فرآیند معتبر سازی استفاده کرد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان این مقاله پژوهشی تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

امکانات پژوهشی این تحقیق توسط مجموعه شرکت داروسازی البرز دارو واقع در شهر قزوین فراهم آمد بدینوسیله از این مجموعه تقدیر می‌شود.

References

1. Mokhtari S, Tahamtan Y, Kargar M, Tadayon K, Moazamian E. Molecular typing *E. coli* O157: H7 isolates using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR technique and the relationship genetic and antibiotic resistance patterns. *Journal of Microbial World*. 2023;15(4):282-93.
2. Robotjazi SM, Hasanpour Matikolaee SM, Babaeipour VB, Rouhani Nejad H. Purification of recombinant human growth hormone produced in soluble form in *Escherichia coli* in lab-scale. *Journal of Microbial World*. 2020;12(4):343-54.
3. Ahmed A, Rushworth JV, Hirst NA, Millner PA. Biosensors for whole-cell bacterial detection. *Clinical microbiology reviews*. 2014;27(3):631-46.
4. Ivnicki D, Abdel-Hamid I, Atanasov P, Wilkins E. Biosensors for detection of pathogenic bacteria. *Biosensors and Bioelectronics*. 1999;14(7):599-624.
5. Bandari S, Arbab Soleimani N, Tajbakhsh E. The effect of probiotic lactobacilli on the attachment power and biofilm formation of *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections. *Journal of Microbial World*. 2018;11(3):278-87.
6. Sandle T. Approaching the Selection of Rapid Microbiological Methods. *Journal of Validation Technology*. 2014;20(2):1-10.
7. Thostenson ET, Ren Z, Chou T-W. Advances in the science and technology of carbon nanotubes and their composites: a review. *Composites science and technology*. 2001;61(13):1899-912.
8. Wang J. Nanomaterial-based electrochemical biosensors. *Analyst*. 2005;130(4):421-6.
9. Wei B, Vajtai R, Ajayan P. Reliability and current carrying capacity of carbon nanotubes. *Applied physics letters*. 2001;79(8):1172-4.
10. Xia Y, Yang P, Sun Y, Wu Y, Mayers B, Gates B, et al. One-dimensional nanostructures: synthesis, characterization, and applications. *Advanced materials*. 2003;15(5):353-89.
11. Liu C, Yu Z, Neff D, Zhamu A, Jang BZ. Graphene-based supercapacitor with an ultrahigh energy density. *Nano letters*. 2010;10(12):4863-8.
12. Pandey A, Gurbuz Y, Ozguz V, Niazi JH, Qureshi A. Graphene-interfaced electrical biosensor for label-free and sensitive detection of foodborne pathogenic *E. coli* O157: H7. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017;91:225-31.
13. Ozkan-Ariksoysal D, Kayran YU, Yilmaz FF, Ciucu AA, David IG, David V, et al. DNA-wrapped multi-walled carbon nanotube modified electrochemical biosensor for the detection of *Escherichia coli* from real samples. *Talanta*. 2017;166:27-35.
14. Zheng L, Cai G, Wang S, Liao M, Li Y, Lin J. A microfluidic colorimetric biosensor for rapid detection of *Escherichia coli* O157: H7 using gold nanoparticle aggregation and smart phone imaging. *Biosensors and Bioelectronics*. 2019;124:143-9.

15. Meraat R, Issazadeh K, Abdolhazadeh Ziabari A, Faezi Ghasemi M. Rapid Detection of *Escherichia coli* by β -Galactosidase Biosensor Based on ZnO NPs and MWCNTs: A Comparative Study. *Current Microbiology*. 2020;77(10):2633-41.
16. Vu QK, Tran QH, Vu NP, Anh T-L, Le Dang TT, Matteo T, et al. A label-free electrochemical biosensor based on screen-printed electrodes modified with gold nanoparticles for quick detection of bacterial pathogens. *Materials Today Communications*. 2021;26:101726.
17. Ertaş T, Dinç B, Üstünsoy R, Eraslan H, Ergenç AF, Bektaş M. Novel electrochemical biosensor for *Escherichia coli* using gold-coated tungsten wires and antibody functionalized short multiwalled carbon nanotubes. *Instrumentation Science & Technology*. 2023:1-16.
18. Ghalandari Shamami M, Mirzaee M, Najar-peerayeh S. Frequency of papaA, papC genes and antimicrobial resistance pattern in uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Microbial World*. 2016;9(1):44-52.
19. United States Pharmacopoeia 44th ed. National Formulary 39 ed. (USP 44/NF 39) (2021). In: United States Pharmacopoeia and National Formulary (USP 44-NF 39); United States Pharmacopoeial Convention: Rockville, MD, USA, 6410, 6457, 6463, 7819
20. Assari P, Rafati AA, Feizollahi A, Asadpour Joghani R. An electrochemical immunosensor for the prostate specific antigen based on the use of reduced graphene oxide decorated with gold nanoparticles. *Microchimica Acta*. 2019;186(7):1-9.
21. Iwunze MO. Electrooxidation of Ferrocene in Nano-emulsion. *J Chem*. 2020;14:37-48.
22. Bhardwaj J, Devarakonda S, Kumar S, Jang J. Development of a paper-based electrochemical immunosensor using an antibody-single walled carbon nanotubes bio-conjugate modified electrode for label-free detection of foodborne pathogens. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2017;253:115-23.
23. Gad SC. *Pharmaceutical manufacturing handbook: production and processes*: John Wiley & Sons; 2008.
24. Pal S, Basak S, Roy S, Roy D, Palchoudhuri S, Dastidar SG. Experimental evaluation of practical viability of Good Manufacturing Practice (GMP) in preparation of oral liquid formulations in small scale pharmaceutical industries. *European Journal of Pharmacy and Medical Research*. 2016;3(4):403-7.
25. Zhao Y-W, Wang H-X, Jia G-C, Li Z. Application of aptamer-based biosensor for rapid detection of pathogenic *Escherichia coli*. *Sensors*. 2018;18(8):2518.
26. Ivanov AV, Safenkova IV, Drenova NV, Zherdev AV, Dzantiev BB. Comparison of Biosensing Methods Based on Different Isothermal Amplification Strategies: A Case Study with *Erwinia amylovora*. *Biosensors*. 2022;12(12):1174.
27. Wu W, Nguyen BTT, Liu PY, Cai G, Feng S, Shi Y, et al. Single *Escherichia coli* bacteria detection using a chemiluminescence digital microwell array chip. *Biosensors and Bioelectronics*. 2022;215:114594.

28. Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR journal*. 2005;46(3):258-68.
29. Razmi N, Hasanzadeh M, Willander M, Nur O. Recent progress on the electrochemical biosensing of *Escherichia coli* O157: H7: Material and methods overview. *Biosensors*. 2020;10(5):54.
30. Pourmadadi M, Shayeh JS, Omid M, Yazdian F, Alebouyeh M, Tayebi L. A glassy carbon electrode modified with reduced graphene oxide and gold nanoparticles for electrochemical aptasensing of lipopolysaccharides from *Escherichia coli* bacteria. *Microchimica Acta*. 2019;186(12):1-8.
31. Liu J, Xu Y, Liu S, Yu S, Yu Z, Low SS. Application and progress of chemometrics in voltammetric biosensing. *Biosensors*. 2022;12(7):494.
32. Cao Z, Li C, Yang X, Wang S, Zhang X, Zhao C, et al. Rapid Quantitative Detection of Live *Escherichia coli* Based on Chronoamperometry. *Biosensors*. 2022;12(10):845.
33. Salmani H, Azarnezhad A, Fayazi MR, Hosseini A. Pathotypic and phylogenetic study of diarrheagenic *Escherichia coli* and uropathogenic *E. coli* using multiplex polymerase chain reaction. *Jundishapur journal of microbiology*. 2016;9(2).
34. El-Moghazy AY, Wisuthiphaet N, Yang X, Sun G, Nitin N. Electrochemical biosensor based on genetically engineered bacteriophage T7 for rapid detection of *Escherichia coli* on fresh produce. *Food Control*. 2022;135:108811.
35. Pebdeni AB, Roshani A, Mirsadoughi E, Behzadifar S, Hosseini M. Recent advances in optical biosensors for specific detection of *E. coli* bacteria in food and water. *Food Control*. 2022:108822.
36. Pourmadadi M, Shayeh JS, Omid M, Yazdian F, Alebouyeh M, Tayebi L. A glassy carbon electrode modified with reduced graphene oxide and gold nanoparticles for electrochemical aptasensing of lipopolysaccharides from *Escherichia coli* bacteria. *Microchimica Acta*. 2019;186:1-8.
37. Wang H, Zhao Y, Bie S, Suo T, Jia G, Liu B, et al. Development of an electrochemical biosensor for rapid and effective detection of pathogenic *Escherichia coli* in licorice extract. *Applied Sciences*. 2019;9(2):295.
38. Li T, Zhu F, Guo W, Gu H, Zhao J, Yan M, et al. Selective capture and rapid identification of *E. coli* O157: H7 by carbon nanotube multilayer biosensors and microfluidic chip-based LAMP. *RSC advances*. 2017;7(48):30446-52.
39. Simoska O, Stevenson KJ. Electrochemical sensors for rapid diagnosis of pathogens in real time. *Analyst*. 2019;144(22):6461-78.