



بیست و هفتمین کنفرانس اپتیک و فوتونیک ایران و سیزدهمین کنفرانس مهندسی و فناوری فوتونیک ایران، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران.
۱۴-۱۶ بهمن ۱۳۹۹



کد مقاله : ۲-۲۰۷۸-۱۰-A

بررسی عناصر تشکیل دهنده باکتری اشرشیا کلی در فازهای مختلف رشد با بهره گیری از طیفنگاری فروشکست القایی لیزری

احمد ناصری^۱، جواد خلیل زاده^۱، سید محمدرضا دربانی^۲، عبدالله اسلامی مجد^۲، محمدرضا اکبری^۳، شاهین فریدفر^۳

۱. مرکز علم و فناوری لیزر اپتیک، دانشگاه جامع امام حسین(ع). ۲. پژوهشکده علوم و فناوری اپتیک و لیزر، دانشگاه صنعتی مالک اشتر.

۳. مرکز علم و فناوری زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع).

چکیده - در این مقاله با بهره گیری از طیفنگاری فروشکست القایی لیزری (LIBS) عناصر تشکیل دهنده باکتری اشرشیا کلی در فازهای مختلف رشد بررسی و مقایسه شده است. نمونه بررسی شده، نمونه غیر بیماری زا از باکتری اشرشیا کلی است که در سه مرحله زمانی از فاز رشد با چگالی اپتیکی ۰/۴، ۰/۸ و ۱/۲ کشت داده شده است. نمونه های باکتری بدست آمده در هر مرحله از فاز رشد، پس از خشک شدن به شکل قرص تبدیل شده است. طیف باکتری در هر سه مرحله با چیدمان استاندارد و رومیزی LIBSCAN100 بدست آمده است. بر اساس نتایج حاصل از آزمایش هادر شرایط یکسان، عناصر کلسیم، سدیم، پتاسیم، و پیوند مولکولی CN در طیف نمونه ها مشاهده شده و شدت نسبی آن ها با یکدیگر مقایسه شده است. نتایج حاصل از طیف ها، نشان می دهد طیفنگاری LIBS قابلیت و توانایی شناسایی و تفکیک فازهای مختلف رشد باکتری از یکدیگر را دارد.

کلید واژه- طیفنگاری فروشکست القایی لیزری، باکتری، فاز رشد، آماده سازی نمونه، اشرشیا کلی.

Investigation of the constituent elements of Escherichia coli bacterial in different growth phases using laser induced breakdown spectroscopy

Ahmad Naseri¹, Javad Khalilzadeh¹, Seyyed Mohammad Reza Darbani², Abdollah Eslamimajd², Shahin Faridfar³, Mohammad Reza Akbari³

Center of Science and Technology Laser Optics, University of Emam Hossein¹, Institute of Optics and Laser Science and Technology, University of Maleke Ashtar², Center of Science and Technology Biology, University of Emam Hossein³

Abstract- In this paper, constituent elements of Escherichia Coli bacterial were investigated and compared using Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS). The studied samples are non-pathogenic specimens of Escherichia Coli that have been cultured in three time phases of growth phase with optical density 0.4, 0.8 and 1.2. Bacterial samples were prepared at each stage of the growth phase, after freeze-drying are transformed into tablets. Bacterial spectra are obtained in all three stages of growth phase with standard layout and desktop LIBSCAN100. Based on the results of spectroscopy under the same experimental conditions, and compared with glass substrate spectrum, elements of calcium, sodium, potassium and CN molecular bonds were observed in the spectra of samples and their relative intensities were compared with each other. The results of the spectroscopy investigation show that laser Induced Breakdown Spectroscopy is capable of identification and discrimination of different phases of bacterial growth from each other.

Keywords: Laser Induced Breakdown Spectroscopy, Bacteria, Growth Phases, Sample preparation, Escherichia Coli

شروع فرآیند کشت با جذب نوری ۰/۴، نمونه دوم پس از ۴ ساعت از شروع فرآیند کشت با جذب نوری ۰/۸ و نمونه سوم پس از ۶ ساعت از شروع کشت با جذب نوری ۱/۲ آماده شد. ۳- هر سه نمونه به لحاظ خلوص میکروبی بررسی شدند تا در حین فرایند آماده سازی دچار آلودگی نشده باشند. پس از تایید خلوص نمونه‌ها، سلول‌های باکتریایی توسط سانتریفوژ با شتاب ۵۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جمع‌آوری و محلول رویی دور ریخته شد. ۴- باکتری‌های جمع‌آوری شده در فریزدرایر با دمای ۹۰- درجه سانتی‌گراد و شرایط خلا به میزان ۵/۰ میلی بار به پودر خشک اسفنجی شکل تبدیل شد. ۶- در نهایت توسط دستگاه قرص ساز و تحت فشار هیدرولیکی به اندازه ۱۰ بار، قرص با قطر ۷ میلی‌متر و ضخامت ۱ میلی‌متر از سلول‌های باکتریایی فریزدرای شده تهیه گشت.

چیدمان آزمایش

چیدمان آزمایش و طیف‌نگار LIBSCAN100 موجود در آزمایشگاه در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱: سامانه طیف‌نگاری LIBSCAN100.

آزمایش‌ها با چیدمان طیف‌نگاری LIBSCAN100 متعلق به شرکت Photonics Applied انجام شدند. در این چیدمان که طرح‌واره‌ی آن در شکل ۱ نشان داده شده، از لیزر Nd:YAG متعلق به شرکت Quantel با طول موج ۱۰۶۴nm، انرژی ۱۰۰ میلی‌ژول، نرخ تکرار ۱۰-۱۰هرتز و پهنای زمانی 7 ± 2 ns استفاده شد. از یک طیف‌سنج ۸ کاناله که قابلیت پوشش طول‌موجی ۱۸۰ تا

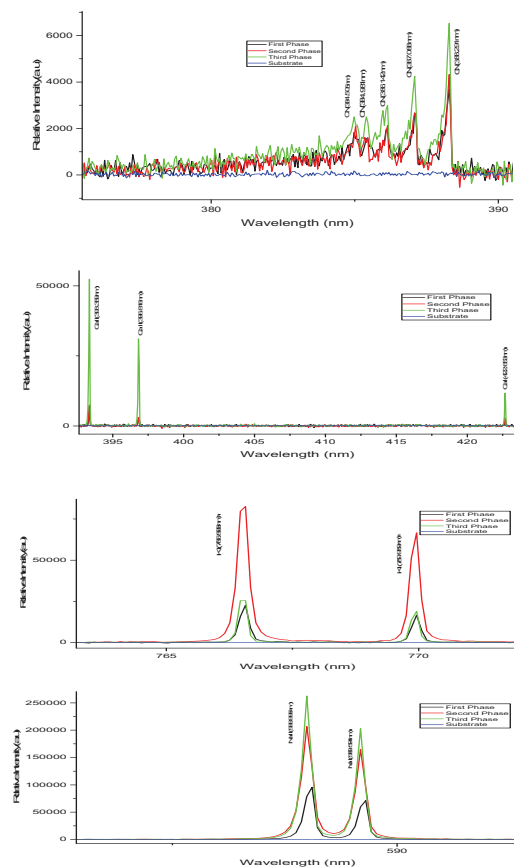
مقدمه

طیف‌نگاری فروشکست القایی لیزری، یک روش طیف‌نگاری گسیل اتمی است که به صورت گسترده‌ای برای مشخصه‌یابی و تحلیل عنصری گونه‌های ناشناخته بکار رفته است [۱]. اساس این روش مبتنی بر تحلیل طیف گسیلی از تابش پلاسمای تولید شده از پالس لیزری با چگالی توان بالا است. این روش طیف‌نگاری را می‌توان به عنوان یک ابزار سریع، ارزان، با حساسیت و دقت بالا برای شناسایی میکروساختارهای بیولوژیک نیز بکار برد. در چندین پژوهش به منظور مشخصه‌یابی سریع نمونه‌های باکتری از ویژگی اثر انگشتی طیف عنصری مبتنی بر LIBS استفاده شده است [۲]. در مقاله قبلی ما، عناصر دو نمونه مختلف از باکتری‌ها در فاز نهایی رشد بررسی و مطالعه شده است [۳]. در این مقاله و برای اولین بار در کشور، عناصر تشکیل‌دهنده نمونه باکتری غیربیماری‌زای Escherichia Coli در سه مرحله مختلف از فاز رشد با بهره‌گیری از طیف‌نگاری فروشکست القایی لیزری بررسی شده است.

آماده‌سازی نمونه‌های باکتری

نمونه باکتری غیربیماری‌زای Escherichia Coli که در آزمایش‌ها بکار رفته، به روش زیر تهیه و آماده شده است: ۱- ابتدا باکتری در سطح آگار رشد داده شده و یک کلنی از آن به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB منتقل و در گرمخانه با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه روز گذاشته شد. پس از بررسی زیر میکروسکوپ نوری و تایید مورفولوژی و خلوص باکتری، یک میلی‌لیتر از آن در گرمخانه با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری و هوادهی شد. ۲- از سوسپانسیون باکتری کشت داده شده در سه مرحله از فاز رشد با جذب نوری ۰/۴، ۰/۸ و ۱/۲ نمونه‌گیری صورت گرفت. نمونه اول پس از ۲/۵ ساعت از

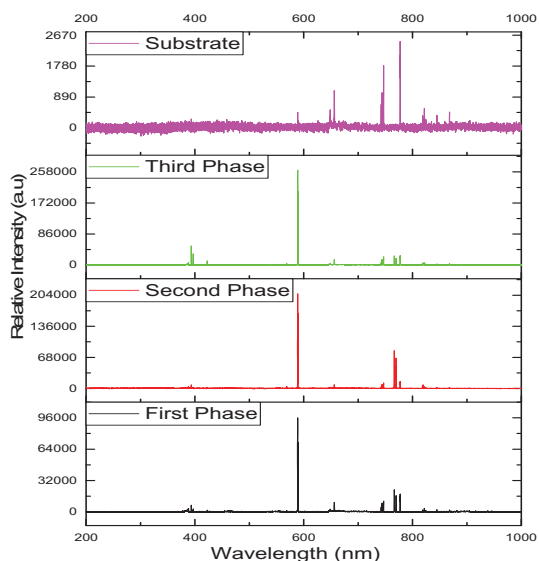
در شکل ۳، قله‌های طیفی مربوط به عناصر کلسیم، سدیم، پتاسیم و پیوند مولوکلی CN در طیف نمونه‌ها در فازهای مختلف ارائه شده است. همانگونه که دیده می‌شود در تمامی فازهای رشد، عناصر اشاره شده وجود دارند و همانگونه که انتظار می‌رود با پیشرفت فرآیند رشد باکتری بر میزان فراوانی عناصر نیز افزوده می‌شود. در طیف زیر لایه شیشه‌ای هیچگونه اثری از عناصر فوق دیده نمی‌شود. در شکل ۴ قله‌هایی از طیف نمونه‌ها در فازهای مختلف نشان داده شده که همزمان، در طیف زیرلایه شیشه‌ای نیز مشاهده شده است. این قله‌ها مربوط به عناصر هیدروژن، نیتروژن، اکسیژن و مس است. عناصری همچون فسفر، آلومینیوم، منگنز، منیزیم، آهن، گوگرد و کربن بر خلاف مرجع [۶] در هیچکدام از مراحل رشد مشاهده نشد.



۱۰۱۷ نانومتر را با تفکیک‌پذیری متغیر ۰/۰۴ تا ۰/۱۵ نانومتر دارد، استفاده شد. آشکارساز از نوع CCD با مدار تاخیرانداز با تاخیر زمانی ۱/۲۷ میکروثانیه و زمان نورگیری ۱/۱ میلی ثانیه استفاده شد. قبل از انجام آزمایش‌های اصلی سیستم مطابق با مرجع [۴] و براساس طیف‌های مس کالیبره شد. قرص باکتری در هنگام طیف‌گیری بر روی یک زیرلایه‌ی شیشه‌ای قرار داده شد.

نتایج

طیف باکتری اشرشیا کلی به ترتیب در سه فاز رشد با چگالی اپتیکی ۰/۴ (نمونه اول)، ۰/۸ (نمونه دوم) و ۱/۲ (نمونه سوم)، و طیف زیرلایه شیشه‌ای که نمونه‌ها بر روی آن قرار گرفته بودند در شکل ۲ نشان داده شده است. طیف زیرلایه شیشه به علت این بدست آمده که معلوم شود سیگنال‌های مشاهده شده ناشی از نمونه‌هاست نه زیرلایه. بر اساس اطلاعات استخراج شده از طیف نمونه در فازهای مختلف و بر اساس اطلاعات مرجع [۴،۵،۶] قله‌های موجود در طیف مورد بررسی قرار گرفته است.



شکل ۲: طیف باکتری اشرشیا کلی در سه فاز رشد و طیف زیرلایه شیشه‌ای.

۸	KI	۷۶۹/۸۹۶	۷۶۹/۹۵۹	۷۶۹/۹۵۹	۷۶۹/۹۵۹	ندارد
۹	CN	-	۳۸۴/۵۰۵	۳۸۴/۵۰۵	۳۸۴/۵۰۵	ندارد
		-	۳۸۴/۹۸۱	۳۸۴/۹۸۱	۳۸۴/۹۸۱	ندارد
		-	۳۸۶/۱۴۲	۳۸۶/۱۴۲	۳۸۶/۱۴۲	ندارد
		-	۳۸۷/۰۸۸	۳۸۷/۰۸۸	۳۸۷/۰۸۸	ندارد
		-	۳۸۸/۲۹۱	۳۸۸/۲۹۱	۳۸۸/۲۹۱	ندارد

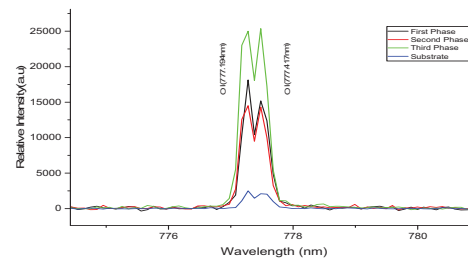
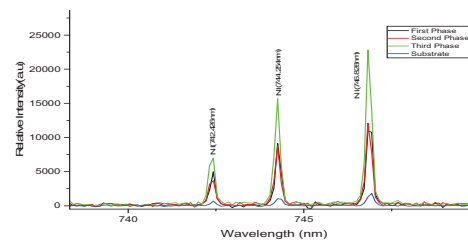
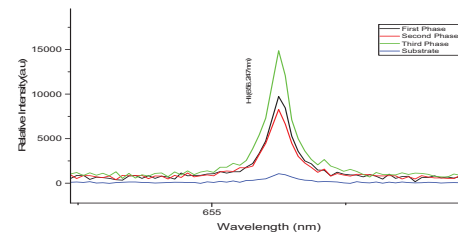
نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصل از طیف LIBS نمونه‌های ا تا ۳، به جز در چند مورد کلر، فسفر، منگنز، گوگرد، عناصر موجود با عناصر گزارش شده در مرجع [۵] یکسان است. همچنین با توجه به بررسی هم‌زمان طیف نمونه‌ها و طیف زیرلایه (شکل ۳ و ۴) نشان داده شد که بعضی از عناصر، همانند سدیم، کلسیم، پتاسیم و پیوند مولکولی CN به صورت مشترک اما با شدت نسبی متفاوت در هر سه نمونه وجود دارند. بنابراین بر اساس بررسی‌های صورت گرفته در این مقاله و بهره‌گیری از روش‌های شیمی‌سنجی و آماری برای تحلیل طیف‌ها، امکان و قابلیت شناسایی و تفکیک فازهای مختلف رشد نمونه باکتری از یکدیگر وجود خواهد داشت.

مراجع

- [1] F.J. Fortes, J. Moros, P. Lucena, L. Cabalín, J. J. Laserna, "Laser-Induced Breakdown Spectroscopy", *Anal. Chem.* **85**(2), 640-669 (2013).
- [2] S. J. Rehse, "A review of the use of laser-induced breakdown spectroscopy for bacterial classification, quantification, and identification", *Spectrochim. Acta Part B* **57**, 2019.
- [3] A. Naseri, J. Khalilzadeh, A. Eslamimajd, S. M. R. Darbani, M. Hemmati, M. R. Akbari and S. Faridfar, "Possibility of Investigation bacterial samples using laser induced Breakdown spectroscopy", 26th ICOP and 12th ICPEd, 2019.
- [4] www.NIST.com.
- [5] Q. Mohaidat, "Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS): An innovative tool for studying bacteria" Thesis 2011.
- [6] V. Simakumar, N. U. Sujatha, J. V. Nilesh, P. Srikanth, I. Arumugam, "Bacterial strain discrimination using a low-cost laser-induced breakdown spectroscopy technique under

شکل ۳: نمایش روند تغییرات شدت عناصر پیوند مولکولی CN، کلسیم، سدیم و پتاسیم در طیف LIBS باکتری در فازهای مختلف رشد.



شکل ۴: نمایش روند تغییرات شدت عناصر هیدروژن، نیتروژن و اکسیژن در طیف LIBS باکتری در فازهای مختلف رشد.

در جدول ۱، عناصر اصلی تشکیل‌دهنده باکتری E. coli در فازهای مختلف رشد، در مقایسه با طیف و اطلاعات گزارش شده این باکتری در مرجع [۶] نشان داده شده است. علت اختلاف در عناصر موجود در نمونه آزمایش شده در این مقاله و نمونه‌ی مرجع [۶] ناشی از روش تفاوت در نژاد باکتری و تفاوت در آماده‌سازی نمونه‌هاست.

جدول ۱: مقایسه عناصر تشکیل دهنده E. coli در فازهای مختلف رشد.

ردیف	عنصر	طول موج nm [۶]	طول موج طیف فاز اول رشد (nm)	طول موج طیف فاز دوم رشد (nm)	طول موج طیف فاز سوم رشد (nm)	زیر لایه شیشه
۱	Ca II	۳۹۲/۳۹۶	۳۹۲/۳۵۹	۳۹۲/۳۵۹	۳۹۲/۳۵۹	ندارد
۲	Ca II	۳۹۶/۸۴۶	۳۹۶/۸۱۶	۳۹۶/۸۱۶	۳۹۶/۸۱۶	ندارد
۳	Ca I	۴۲۲/۶۷۲	۴۲۲/۶۵۳	۴۲۲/۶۵۳	۴۲۲/۶۵۳	ندارد
۴	Na I	۵۸۸/۹۹۷	۵۸۸/۹۹۵	۵۸۸/۹۹۵	۵۸۸/۹۹۵	ندارد
۶	Na I	۵۸۹/۵۹۲	۵۸۹/۵۹۴	۵۸۹/۵۹۴	۵۸۹/۵۹۴	ندارد
۷	K I	۷۶۶/۴۸۹	۷۶۶/۵۶۸	۷۶۶/۵۶۸	۷۶۶/۵۶۸	ندارد

