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 : ۲-۲۵۲۱-۱۰-A

افزایش دقت اندازه‌گیری غلظت بیومس باکتری ای‌کولای K-12 سویهٔ MG1655 با استفاده از چگالی اپتیکی

اعظم توسلی کوپائی، جعفر مصطفوی امجد، محمد دهقان نیری

دانشکده فیزیک، دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه، زنجان

tavassolip1990@gmail.com, mostafavi@iasbs.ac.ir, m.d.niry@iasbs.ac.ir

چکیده –اندازه‌گیری OD یا چگالی اپتیکی، هنگامی که تنها پراکندگی در میرایی نور نقش دارد، روشی پرکاربرد است که در رویکردهای میکروبیولوژیکی برای ارزیابی کمی رشد میکروارگانیزم‌ها به‌کار می‌رود. اما کاربرد روش‌های مبتنی بر اندازه‌گیری OD به انتخاب طول موج وابسته است. در این پژوهش، با استفاده ازروش اندازه‌گیری چگالی اپتیکی، منحنی رشد را برای نمونهٔ باکتری ای‌کولای K-12 سویهٔ MG1655 به دست آوردیم و نشان دادیم که چگالی اپتیکی تنها در بازهٔ طول موج مرئی، بیانگر غلظت بیومس باکتریایی است.

کلید واژه-ای‌کولای،چگالی اپتیکی، غلظت،قانون بیر-لامبرت، منحنی رشد.

Improving the accuracy of E. coli K-12 strain MG1655 biomassconcentration measurement using optical density

Azam Tavassoli Koupaei,Jafar Mostafavi Amjad, Mohammad Dehghan Niry

Department of Physics, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences (IASBS), Zanjan

tavassolip1990@gmail.com,mostafavi@iasbs.ac.ir,m.d.niry@iasbs.ac.ir

Abstract- Optical density is widely used as a proxy for measuring biomass concentration in microbiology approaches when light attenuation is dominated by scattering. However, the applicability of OD-based correlations is highly dependent on the wavelength. In this study, using the optical density measurement method, we obtained the growth curve for E.coli K-12 strain MG-1655 and displayed that OD indicates the concentration of bacterial biomass solely in the visible wavelength range.

Keywords: E.coli, Optical Density, Concentration, Beer-Lambert Law,Growth Curve.

این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترس باشد.

مقدمه

اندازه‌گیری چگالی اپتیکی یا OD، متداول‌ترین روشی است که در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی به‌کار می‌رود تا رشد میکروبی را به صورت کمی ارزیابی کند. کاربرد OD معمولاً بر اساس قانون بیر-لامبرت مورد بحث قرار می‌گیرد. هنگامی که نور از درون لایه‌ای از محلول با ضخامت l و غلظتی معادل c عبور می‌کند در اثر برهم‌کنش میان فوتون‌ها و ذرات جاذب، شدت باریکه از I_0 به I کاهش می‌یابد. مطابق قانون بیر-لامبرت:

0

که در این رابطه ϵ ضریب میرایی، c غلظت نمونه و l طول مسیر تابش از کُوِت حاوی نمونه است[۱]. جذب و پراکندگی نور، اساس استفاده از ODدر اندازه‌گیری غلظت بیومس و رنگدانه‌هاست. هنگامی که نور از یک محلول همگن عبور می کند، تنها جذب در میرایی شدت نور سهیم است. اما اگر سوسپانسیونی داشته باشیم که از دو یا چند فاز تشکیل شده باشد، پراکندگی که ناشی از تفاوت در ضرایب شکست است نیز در میرایی نور نقش خواهد داشت[۲]. انتخاب طول موج یک فاکتور اساسی در اندازه‌گیری OD است. رابطهٔ بین OD و غلظت بیومس در طول موج جذب رنگدانه‌های موجود در سلول زنده می‌تواند به‌طور قابل ملاحظه‌ای با تغییر شرایط کشت تغییرمی‌کند. بنابراین، لازم است طول موج از ناحیه‌ای از طیف انتخاب شود که از قلهٔ جذب (اگر وجود داشته باشد) دور باشد. زیرا در این ناحیه اثرات جذب نسبت به پراکندگی بسیار کم‌تر است و چون تغییرات پراکندگی متناسب باتغییرات جمعیت ذرات است، پس در طول موج‌هایی با این ویژگی می‌توان به مقدار چگالی ماده یا OD رسید[۳].

منحنی رشد

رشد جمعیت به وسیلهٔ آنالیز منحنی رشدکشت میکروبی مطالعه می‌شود. هنگامی که میکروارگانیسم‌ها در محیط مایع کشت داده می‌شوند معمولاًدر یک سیستم بسته رشد می‌کنند.به‌دلیل این که محیط کشت تازه‌ای در طول گرماگذاری (انکوباسیون) وارد سیستم نمی‌شود، غلظت مواد غذایی کاهش و غلظت مواد زائد افزایش می‌یابد. رشد میکروارگانیسم‌های تکثیر یافته با تقسیم دوتایی را می‌توان به صورت لگاریتم تعداد سلول‌های زنده با زمان گرماگذاری، در یک منحنی رسم کرد(شکل۱).

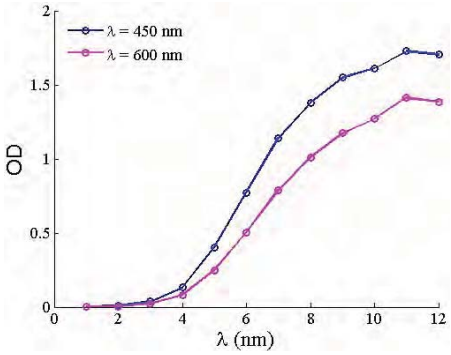
شکل۱: منحنی رشد میکروبی در یک سیستم بسته: چهار مرحلهٔ منحنی رشد به ترتیب از چپ به راست شامل فاز تأخیر، رشد نمایی، سکون، و مرگ است.

منحنی حاصل دارای چهار فاز جداگانه است: فاز تأخیر، فاز لگاریتمی یا نمایی، فاز سکون و فاز مرگ. هنگامی که میکروارگانیسم‌ها به یک محیط کشت تازه وارد می‌شوند، معمولاً افزایش فوری در تعداد سلول‌ها رخ نمی‌دهد. بنابراین این دوره، فاز تأخیر نامیده می‌شود. در جریان فازلگاریتمی یا نمایی، میکروارگانیسم‌ها بسته به توانایی ژنتیکی، طبیعت محیط کشت و دیگر شرایط، با بیشترین سرعت ممکن رشد کرده و تقسیم می‌شوند. نرخ رشد آن‌ها در طول رشد لگاریتمی ثابت است؛ به این معنی که میکروارگانیسم‌ها در فاصله‌های زمانی منظم تقسیم شده و تعدادشان دو برابر می‌شود. در این فاز، جمعیت بیشترین همسانی را از حیث ویژگی‌های شیمیایی و فیزیولوژیکی

داراست؛ بنابراین معمولاً از فاز نمایی در مطالعات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی استفاده می‌شود. در فاز سکون تعداد نهایی میکروارگانیسم‌های زنده، ثابت باقی می‌ماند. این می‌تواند نتیجهٔ تعادل بین تقسیم سلولی و مرگ سلولی باشد[۴].

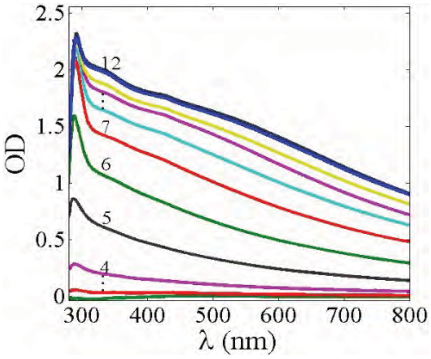
اندازه‌گیری ODو ترسیم منحنی رشد

نمودار OD برحسب زمان برای باکتری ای‌کولای K-12سویهٔ MG1655 که در یک محیط کشت مایعِ بسته در دمای $37\ ^{\circ}C$ کشت داده شده است با دستگاه طیف‌سنج Carry-5، در فاصله‌های زمانی یک ساعته برای ۱۲ ساعت کشت به صورت شکل ۲ در دو طول موج $\lambda = 450\ nm$ و $\lambda = 600\ nm$ به‌دست آمده است. اما این نمودار رفتار نمایی را در فاز رشد نمایی نشان نمی‌دهد (از ساعت پنجم تا هفتم، رشد خطی است و از ساعت هفتم تاقبل از اشباع، شیب به مرور کم می‌شود) و باید تصحیح شود.



شکل ۲ منحنی رشد باکتری ای‌کولای در طول موج‌های $\lambda = 450\ nm$ و $\lambda = 600\ nm$ برای۱۲ ساعت کشت.

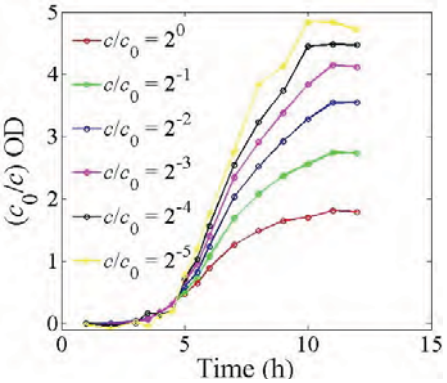
از آن‌جایی که باکتری ای‌کولای فاقد رنگدانه ودر نتیجه قلهٔ جذب مرتبط با آن است، طیف طول موج مرئی می‌تواند برای اندازه‌گیری OD انتخاب شود. شکل ۳ نمودار چگالی اپتیکی باکتری ای‌کولای را در ساعت‌های مختلف از شروع کشت برحسب طول موج نشان می‌دهد. در این نمودار، روند افزایشی OD با افزایش زمان کشت قابل مشاهده است. هم‌چنین برای هر منحنی (طیف جذب در هر ساعت)، با افزایش طول موج، OD کاهش می‌یابد.



شکل۳: نمودارOD برحسب طول موج در ساعت‌های اول تا دوازدهم از شروع کشت.

تصحیح اندازه‌گیری غلظت بیومس

شکل ۴ نمودار چگالی اپتیکی برحسب زمان را برای نمونهٔ باکتری ای‌کولای K-12 سویهٔ MG1655 نشان می‌دهد. با توجه به نمودار، غلظت بیومس، تنها برای نمونهٔ رقیق شده با OD متناسب است.

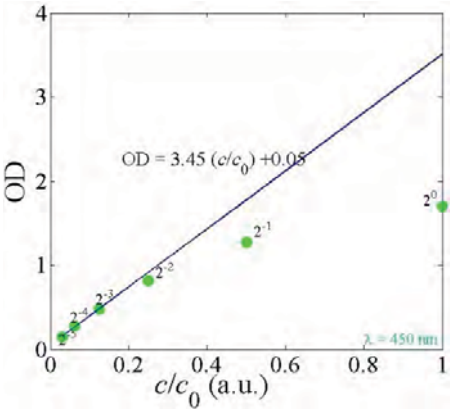


شکل ۴: نمودار OD (c_0/c) برحسب زمان برای غلظت اصلی بیومس باکتری و رقّت‌های سریالی تهیه شده از آندر فواصل زمانییک ساعته برای ۱۲ ساعت کشت(در فاصله زمانی ۳ الی ۶ ساعت،پله‌های زمانی، نیم‌ساعته انتخاب شده است).

اگر منحنی قرمز رنگ (نخستین منحنی از پایین) که نمایندهٔ غلظت اصلی است را در نظر بگیریم، این‌گونه به نظر می‌رسد که فاز سکون از ساعت هفتم آغاز می‌شود، در حالی‌که منحنی زردرنگ (بالاترین منحنی) نشان می‌دهد که زمان شروع فاز سکون در واقع از ساعت دهم است. اگر رابطهٔ OD و بیومس خطی باشد، با دو برابر کردن OD

برای نمونه‌ای که به میزان $\frac{1}{2}$ رقیق شده، انتظار می‌رود که منحنی مربوط به آن (منحنی سبز) بر منحنی مربوط به غلظت اصلی (منحنی قرمز) منطبق شود. به همین ترتیب انتظار داریم منحنی مربوط به رقّت‌های دیگر نیز بر منحنی قرمز منطبق شود. ولی این انتظار تنها برای ساعت‌های اولیهٔ شروع کشت برآورده می‌شود؛ از ساعت چهارم به بعد، با افزایش غلظت بیومس، پدیدهٔ چندپراکندگی رخ می‌دهد و رابطهٔ OD و غلظت دیگر خطی نخواهد بود.

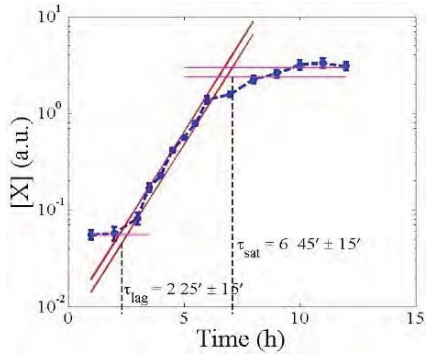
در شکل۵ در دوازدهمین ساعت پس از شروع کشت، نمودار OD برحسب نسبت‌های مختلف c/c_0 رسم شده است.



شکل۵: نمودار چگالی اپتیکی برحسب غلظت در ساعت دوازدهم از شروع کشت برای باکتری ای‌کولای در طول موج ثابت $\lambda = ۴۵۰\,nm$ خط راست، نشان‌دهندهٔ رابطهٔ خطی بین OD و غلظت و هر دایره نمایندهٔ یک نسبت غلظت است.

اگر در هر غلظتی، OD با غلظت بیومس متناسب می‌بود، باید همهٔ نقاط بر خطِ راست منطبق می‌شدند. اما تنها سه نقطهٔ ابتدای یکه بیانگر غلظت‌های کم از باکتری هستند، بر خط راست منطبق شده وسایر نقاط از آن انحراف پیدا کرده‌اند.

در شکل ۶ منحنی رشد طی ۱۲ ساعت کشت برای غلظت‌های کم در طول موج ثابت $\lambda = ۴۵۰\,nm$ رسم شده است. برطبق این نمودار، دو ساعت و بیست و پنج دقیقه پس از شروع کشت، فاز تأخیر به پایان رسیده و فاز رشد باکتری آغاز می‌شود. هم‌چنین شش ساعت و چهل و پنج دقیقه پس از شروع کشت، باکتری به انتهای فاز رشد رسیده و وارد فاز سکون خود می‌شود.



شکل ۶: منحنی رشد باکتری ای‌کولای در طول ۱۲ ساعت کشت برای غلظت‌های کم در طول موج ثابت $\lambda = ۴۵۰\,nm$ زمان شروع فازهای رشد و سکون در شکل با خط‌چین قائم مشخص شده است.

نتیجه‌گیری

انتخاب طول موج عامل مهمی برای اندازه‌گیری غلظت بیومس و رنگدانه‌هاست و با توجه به اینکه باکتری ای‌کولای دارای رنگدانه‌های قابل توجه و قله‌های جذب مرتبط نیست، می‌توان از هر طولی موجی در طیف مرئی، برای اندازه‌گیری غلظت یا OD استفاده کرد. هم‌چنین رابطهٔ OD و غلظت بیومس باکتریایی تنها در غلظت های کم از قانون بیر-لامبرت تبعیت می‌کند و خطی است.در واقع پدیدهٔ چندپراکندگی مانع از خطی بودن این رابطه در غلظت‌های بالاتر می‌شود.

مرجع‌ها

[۱] S. Svanberg, *Atomic and molecular spectroscopy: basic aspects and practical applications*. Springer Science & Business Media, 2012.

[۲] N. L. Swanson, B. D. Billard, and T. L. Gennaro, "Limits of optical transmission measurements with application to particle sizing techniques," *Applied optics,* vol. 38, no. 27, pp. 5887-5893, 1999.

[۳] M. W. Sganga and C. E. Bauer, "Regulatory factors controlling photosynthetic reaction center and light-harvesting gene expression in Rhodobacter capsulatus," *Cell,* vol. 68, no. 5, pp. 945-954, 1992.

[۴] J. J. Dobbins, "Prescott's microbiology," *Journal of Microbiology & Biology Education: JMBE,* vol. 11, no. 1, pp. 64-64, 2010.