

بهره گیری از طیف سنجی فروشکست القایی لیزری برای بررسی فازهای مختلف رشد باکتری اشریشیا کلی

احمد ناصری^۱، جواد خلیلزاده^{۲*}، سیدمحمد رضا دربانی^۳، محمدرضا اکبری^۴، عبدالله اسلامی مجد^۵

۱- دانشجوی دکتری، ۲- دانشیار، ۳- استادیار دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران ۳ و ۵- استادیار دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران (دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۱۰، پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۰۱)

چکیده

به دلیل محدودیت روش های شناسایی مرسوم زیست شناسی، روش های مبتنی بر طیف سنجی فروشکست القایی لیزری در مشخصه یابی جنس، گونه و سویه باکتری های مختلف در فاز ایستای رشد استفاده شده است. در این مقاله، با هدف پایش تغییرات ساختار عنصری باکتری در فرآیند رشد، عناصر تشکیل دهنده دو فاز رشد نمایی و ایستای باکتری/اشریشیا کلی بر اساس این روش طیف سنجی بررسی و مقایسه شد. در این آزمایش از لیزر Nd:YAG با انرژی پالس ۱۰۰ mJ، طیف سنج و آشکارساز CCD استفاده شد. سویه صنعتی باکتری گرم منفی BL21 *Escherichia coli* انتخاب شد. باکتری در سه زمان مختلف در طی فرآیند رشد در محیط کشت، به ترتیب در چگالی اپتیکی ۰/۴ و ۰/۸ (فاز رشد نمایی) و چگالی اپتیکی ۱/۲ (فاز رشد ایستا) انتخاب و بعد از فریزدرای، تحت فشار به شکل قرص درآمد. با در نظر گرفتن ساختار شیمیایی باکتری اشریشیا کلی عناصر فسفر، کربن، کلسیم، سدیم، منیزیم، پتاسیم، اکسیژن، نیتروژن و هیدروژن در طیف نمونه ها مورد توجه قرار گرفت. یافته ها نشان داد، باکتری اشریشیا کلی در فرآیند رشد، الگوهای متفاوتی از ترکیب عنصری قابل تشخیص در ساختار خود دارد. پیش بینی می شود با توجه به تغییر ترکیب عناصر ساختاری باکتری در فازهای رشد، استفاده از این روش طیف سنجی نیز برای شناسایی باکتری، وابسته به فاز رشد خواهد بود. نتایج این مطالعه نشان داد، این روش، می تواند نقش مؤثری در تکامل روش های پلی فازی تعیین هویت باکتری ها، تعیین ترکیب محیط کشت و همچنین بهینه سازی و ارزیابی شرایط تولید محصول در این سویه صنعتی داشته باشد.

کلیدواژه ها: اشریشیا کلی، طیف سنجی فروشکست القایی لیزری، فاز رشد نمایی، فسفر، کربن، کلسیم، منیزیم

Using Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) to Investigate Different Growth Phases of *Escherichia coli* BL21

A. Naseri¹, J. Khalilzadeh^{2*}, S. M. R. Darbani³, M. R. Akbari⁴, A. Eslamimajd⁵

Associate Professor of Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran.

(Received: 01/11/2021; Accepted: 22/12/2021)

Abstract

Due to the limitations of conventional biological identification methods, spectroscopic methods, including laser induced breakdown spectroscopy, have been used to characterize the genus, species and strains of different bacteria in the static phase of growth. In this paper, in order to monitor the changes in the elemental structure of bacteria in the growth process, the constituent elements of the two phases of exponential and static growth of *Escherichia coli* were studied and compared based on this spectroscopic method. In this experiment, Nd: YAG laser with 100 mJ pulse energy, spectrometer and CCD detector were used. The industrial strain of gram-negative *Escherichia coli* BL21 bacteria was selected. Bacteria were selected at three different times (2.5, 4 and 6 hours after inoculation) during the growth process in broth, at optical density of 0.4 and 0.8 (exponential growth phase) and optical density of 1.2 (Static growth phase), respectively, and after dry freezing, under pressure has been pressed into tablets. Considering the chemical structure of *Escherichia coli*, the elements of phosphorus, carbon, calcium, sodium, magnesium, potassium, oxygen, nitrogen and hydrogen were considered in the sample. The results showed that *Escherichia coli* bacteria in the growth process have different patterns of recognizable elemental composition in its structure in the growth process. It is predicted that due to the change in the composition of structural elements of bacteria in growth phases, the use of this spectroscopic method to identify bacteria will be dependent on the growth phase. The results of this study showed that this method can play an effective role in the development of polyphasic methods to identify bacteria, determine the composition of the culture medium as well as optimizing and evaluating the production conditions in this industrial strain.

Keywords: Calcium, Carbon, *Escherichia Coli*, Exponential Growth Phase, Laser Induced Breakdown Spectroscopy, Magnesium, Phosphorus.

۱. مقدمه

غیره)، ویژگی‌های بیوشیمیایی (متابولیسم)، ساختار شیمیایی، ژنوم، تیپ و خصوصیات سرولوژیک انجام می‌شود. بررسی فنوتیپی و بیوشیمیایی به دلیل نیاز به کشت و آزمایش‌های متعدد، بسیار زمان‌بر است. روش سرولوژیک نیز وابستگی زیادی به نتایج فنوتیپی دارد و این روش هم به دلیل واکنش متقاطع و هم‌زمان سرم با چندین عامل، روش تشخیص قابل اعتمادی نیست. روش مطالعه ژنوم باکتری نیز متضمن محدودیت‌های آماده‌سازی نمونه بوده و این روش‌ها برای ارزیابی تغییرات ساختاری باکتری‌ها در واکنش به شرایط محیطی و فیزیولوژیک مناسب نیستند.

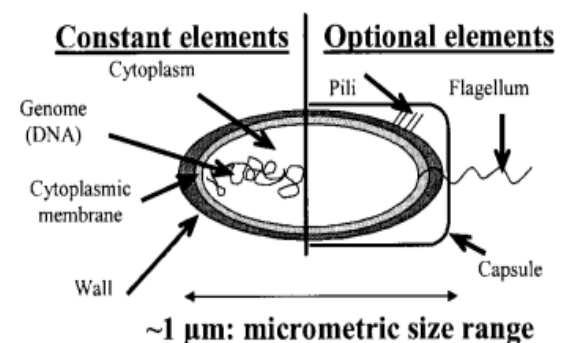
به دلیل تأثیر باکتری‌ها بر جنبه‌های مختلف زندگی انسان، رویکردهای مختلفی به منظور توسعه فناوری‌های جدید تعیین هویت، شناسایی، طبقه‌بندی و همچنین تحلیل پاسخ باکتری به شرایط محیطی در دست بررسی و پژوهش است. با توجه به محدودیت‌های روش‌های زیست‌شناسی، رویکردهای جدید برای مشخصه‌یابی، شناسایی و طبقه‌بندی باکتری‌ها به سمت بهره‌گیری از روش‌های فیزیکی مبتنی بر تجزیه و تحلیل طیف عنصری و مولکولی اجزای ساختاری آن‌ها در حال توسعه است. فناوری‌هایی که می‌توانند به‌عنوان یک ابزار دقیق و قدرتمند، جهت شناسایی و طبقه‌بندی باکتری‌ها به صورت سریع، دقیق، در لحظه، بدون تماس با نمونه، همراه با کمترین میزان آماده‌سازی و با کمترین میزان تخصص میکروبی‌شناسی استفاده شوند. این فناوری‌های تشخیصی جدید نه تنها در آزمایشگاه تشخیص طبی، بلکه در صنعت واکسن‌سازی، بیولوژیکی، غذایی، دفاعی، امنیتی و پدافندی در جنگ‌های زیستی نیز کاربرد خواهند داشت. یکی از این فناوری‌های تشخیصی جدید که در سال‌های اخیر بسیار مورد پژوهشگران قرار گرفته است، طیف‌سنجی فروشکست القایی لیزری است.

طیف‌سنجی فروشکست القایی لیزری بر اساس بررسی و مقایسه شدت نسبی عناصر معدنی همانند منیزیم، فسفر، کربن، کلسیم، سدیم، پتاسیم و عناصر آلی مانند کربن، اکسیژن، هیدروژن و نیتروژن در ساختمان باکتری‌ها به مشخصه‌یابی و شناسایی آن‌ها می‌پردازد. به‌طور ویژه، کلسیم و منیزیم نقش اساسی در تثبیت غشای بیرونی باکتری با اتصال مولکول‌های لیپولی ساکارید^۲ به یکدیگر بازی می‌کنند [۳].

مقالات منتشرشده در زمینه طیف‌سنجی فروشکست القایی لیزری نمونه‌های باکتری از سال ۲۰۰۳ با پژوهش Morel [۳] شروع و با پرداختن به ابعاد مختلف زیر تانکون ادامه پیدا کرده است: تأثیر گاز حامل محیطی [۵ و ۴]، محیط کشت^۳ باکتری [۳، ۶ و ۷]، تفکیک جنس^۴ و گونه^۵ باکتری‌ها [۸].

طیف‌سنجی فروشکست القایی لیزری^۱ به‌طور گسترده برای کشف، شناسایی و تفکیک مواد مختلفی همچون آلیاژها، مواد شیمیایی، مواد منفجره، سمی و ... استفاده شده است. اساس این روش مبتنی بر تحلیل طیف گسیلی از تابش پلاسمای تولیدشده از پالس لیزری با چگالی توان بالا است. در این روش (معمولاً دور ایستا)، باریکه‌ی لیزر پرتوان بر روی نمونه کانونی شده و چنانچه چگالی توان لیزر از مقدار آستانه شکست پیوندهای مولکولی سطح نمونه بیشتر باشد، پلاسمای القایی در آن نقطه ایجاد خواهد شد. طیف نمونه، حاصل باز ترکیب الکترون‌ها و یون‌ها در مرحله سرد شدن پلازما است. نور گسیل شده از این باز ترکیب که دربرگیرنده طیف عنصری نمونه نیز هست، توسط فیبر نوری جمع‌آوری و به طیف‌سنج فرستاده و توسط آشکارساز ثبت می‌شود. مبنای مشخصه‌یابی، شناسایی و تفکیک مواد در این روش طیف‌سنجی بر اساس اثرانگشتی بودن طیف عنصری هر ماده است. LIBS را می‌توان برای هر سه حالت ماده به صورت غیر تماسی به کار برد [۱ و ۲]. با توجه به اهمیت روزافزون مسائل مبتلابه بیولوژیک در سال‌های اخیر، مشخصه‌یابی، شناسایی و طبقه‌بندی نمونه‌های باکتری مورد توجه پژوهشگران در حوزه نظامی و صنعتی قرار گرفته است.

باکتری‌ها ریز جاندارهایی از مرتبه چند میکرون یا کوچک‌تر هستند که در همه‌جا یافت می‌شوند. هر باکتری همان‌گونه که در شکل (۱) نشان داده شده، شامل اجزای ساختاری ثابتی همانند دیواره، غشاء سیتوپلاسم، سیتوپلاسم، ژنوم و اجزای ساختاری اختیاری همانند تاژک پیلی و کپسول است [۳].



شکل ۱. نمایش اجزای ساختاری ثابت و اختیاری یک باکتری نوعی [۳].

در روش‌های مرسوم زیست‌شناسی، باکتری‌ها بر اساس خصوصیات فنوتیپی، سرولوژیکی و ژنوتیپی شناسایی و طبقه‌بندی می‌شوند. شناسایی باکتری خالص بر اساس مجموعه متعددی از ویژگی‌های ظاهری (شکل، اندازه، رنگ، نحوه حرکت و

^۲ Lipopolysaccharide

^۳ Culturing Environment

^۴ Genus

^۵ Species

^۱ Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS)

صنعت بیوتکنولوژی، تشخیص تغییر ساختار، خلوص و بهینه‌سازی فازهای رشد باکتری در طول زمان رشد بسیار مهم و حیاتی است.

۲. روش تحقیق

۲-۱. آماده‌سازی نمونه باکتری

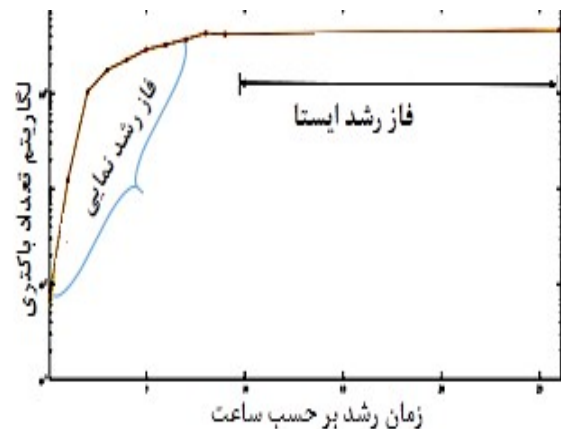
فازهای مختلف رشد نمونه باکتری گرم منفی و غیر بیماری‌زای نوترکیب (سویه صنعتی) *Escherichia BL21 coli* با دستورالعمل زیر تهیه و آماده شد. ابتدا باکتری در سطح آگار رشد داده شده و پس از حصول اطمینان از عدم آلودگی و ناخالصی، یک کلنی از آن به ۵ mL محیط کشت آبگوشت مایع^۱ منتقل و در گرم‌خانه با دمای ۳۵ C^۲ به مدت یک‌شب (کمتر از ۲۴ h) گرم‌خانه‌گذاری شد. سپس از سوسپانسیون باکتری، روی لام گسترش تهیه و به روش گرم رنگ‌آمیزی شد. پس از بررسی زیر میکروسکوپ نوری و تأیید مورفولوژی و خلوص باکتری، یک میلی‌لیتر از آن به ۵۰۰ mL محیط کشت آبگوشت مایع تحت شرایط سسترون منتقل و در گرمخانه شیکردار با دمای ۳۵ C^۲ و ۱۲۰ rpm گرمخانه‌گذاری و هوادهی شد. سپس از سوسپانسیون باکتری کشت داده‌شده در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری و تراکم میکروبی با روش اسپکتروفتومتری در ۶۰۰ nm اندازه‌گیری و نمودار رشد باکتری ترسیم شد.

در سه زمان از رشد (جذب ۰/۴ و ۰/۸ در فاز رشد نمایی و جذب ۱/۲ فاز رشد ایستا) با چگالی اپتیکی‌های ۰/۴^۳، ۰/۸^۴ و ۱/۲^۵ برای بررسی انتخاب شد. هر سه نمونه به لحاظ خلوص میکروبی با رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده میکروسکوپی بررسی شدند تا در حین فرآیند آماده‌سازی دچار آلودگی نشده باشند. پس از تأیید خلوص نمونه‌ها، سلول‌های باکتریایی توسط سانتریفوژ با شتاب ۵۰۰۰ به مدت ۱۰ min و دمای ۴ C^۲ جمع‌آوری و محلول رویی، دور ریخته شد. جهت شست‌وشو سلول‌های باکتریایی جمع‌آوری‌شده، باکتری‌های رسوب یافته در آب مقطر سوسپانسیون شده و در سانتریفوژ با شرایط بالا قرار گرفتند. سپس مایع رویی دور ریخته شد و باکتری‌های جمع‌آوری‌شده در فریزدرایر با دمای کارکردی کندانسور ۹۰ C^۲- و شرایط خلأ به میزان ۰/۵ mbar به پودر خشک اسفنجی شکل تبدیل شد.

در نهایت پودر اسفنجی مربوط به فازهای رشد مختلف پیش‌گفته، توسط دستگاه قرص‌ساز و تحت فشار هیدرولیکی به‌اندازه ۱۰ bar، قرصی با قطر ۷ mm و ضخامت ۱ mm از سلول‌های باکتریایی فریزدرای شده، تهیه شد (شکل ۳).

تفکیک سویه‌های^۱ باکتری از یکدیگر [۹ و ۱۰]، تأثیر غلظت^۲ نمونه باکتری [۱۱]، تأثیر شکل باکتری به‌صورت هواویز^۳ [۱۲]، قرص فشرده^۴ [۱۳]، تأثیر زیر لایه از جنس پالایه نیترو سلولوزی [۱۴]، نقش تداخل‌کننده‌ها^۵ [۱۵] و عوامل محیطی [۱۶] مورد بررسی قرار گرفته‌اند. این روش طیف‌سنجی به‌عنوان فناوری جدید در مطالعه میکروب‌های عفونی مرور شده است [۱۷].

در مجموعه مقالاتی که تاکنون منتشر شده، موضوعات تحقیقاتی بالا در فاز نهایی رشد (فاز ایستا) باکتری‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. شناسایی و تفکیک باکتری‌ها با استفاده از تحلیل آماری در فاز نهایی رشد بررسی شده است [۱۸]. فهرست کاملی از باکتری‌ها با روش LIBS مطالعه شده است [۱۹]. اگر باکتری مشخصی در یک محیط، کشت داده شود و این محیط حاوی مواد مغذی مناسب و گازهای مورد نیاز باشد، سرعت رشد و تکثیر باکتری در زمان‌های مختلف از الگوی منحنی شکل (۲) پیروی می‌کند. محور طولی این منحنی زمان و محور عرضی آن لگاریتم تعداد باکتری‌های زنده است. این منحنی نشان می‌دهد الگوی رشد باکتری در یک محیط کشت بسته، شامل دو مرحله اصلی فاز رشد نمایی و فاز رشد ایستا است.



شکل ۲. نمایش فاز رشد (تغییرات لگاریتم تعداد باکتری‌ها بر حسب زمان رشد) یک باکتری نوعی [۱۰].

در این مقاله، مقایسه عناصر تشکیل‌دهنده فازهای رشد نمایی و ایستای باکتری گرم منفی غیر بیماری‌زا و نوترکیب *Escherichia coli BL21* با بهره‌گیری از طیف‌سنجی فروشکست القایی لیزری برای اولین بار بررسی شده است. این پژوهش به دنبال ایجاد و بررسی کتابخانه تغییرات عنصری و یونی باکتری‌ها بود و به‌عنوان نمونه از ساده‌ترین باکتری، یعنی باکتری *اشریشیا کلی* مهندسی شده و غیربیماری‌زا استفاده نموده است. به‌دلیل کاربرد این سویه از باکتری *اشریشیا کلی* و باکتری‌های مشابه دیگر در

¹ Strain

² Concentration

³ Aerosol

⁴ Pressed pellet

⁵ Interferents

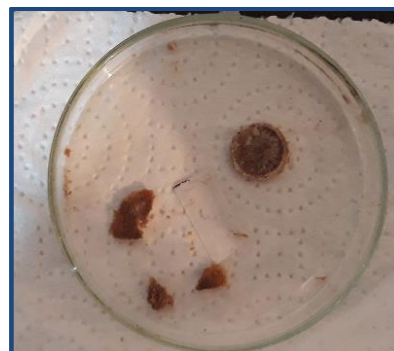
¹ Liquid Broth

² Optical Density (O.D)

و تحلیل اطلاعات طیف‌ها بر اساس پایگاه داده استاندارد طیف اتمی موسسه ملی فناوری و استاندارد (NIST) انجام شد.

۳. نتایج و بحث

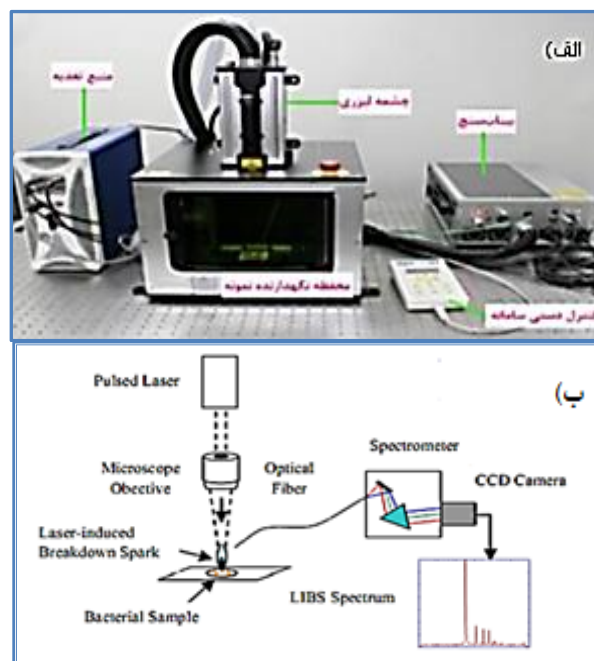
طیف باکتری *Escherichia coli* BL21 بر اساس فراوانی نسبی عناصر منتخب به ترتیب در سه فاز رشد با چگالی اپتیکی ۰/۴ (نمونه اول)، چگالی اپتیکی ۰/۸ (نمونه دوم) و چگالی اپتیکی ۱/۲ (نمونه سوم) و طیف زیر لایه شیشه‌ای که نمونه‌ها بر روی آن قرار گرفته بودند در شکل (۴) نشان داده شده است. طیف زیر لایه شیشه به این علت بررسی شده است که معلوم شود قله‌های شدت مشاهده شده ناشی از نمونه‌هاست و زیر لایه نقشی در آن نداشته است. طیف حاصل از باکتری *اشرشیاکلی* در هر مرحله از فاز رشد، حاصل میانگین‌گیری از ۲۰ پالس لیزر بوده است. در نهایت تمامی خطوط طیفی پر شدت طیف‌های حاصل مورد بررسی و مقایسه قرار گرفته است.



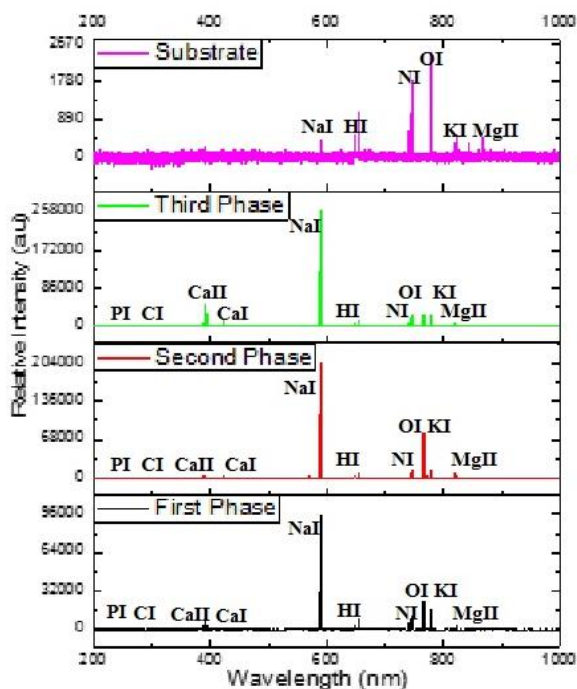
شکل ۳. تصویر قرص باکتری استفاده شده در آزمایش‌ها.

۲-۲. چیدمان آزمایش

طرح‌واره‌ی چیدمان آزمایش و تصویر طیف‌سنج LIBSCAN100 موجود در آزمایشگاه در شکل (۳) نشان داده شده است.



شکل ۴. (الف) تصویر سامانه طیف‌سنج LIBSCAN100 استفاده شده. (ب) طرح‌واره‌ی چیدمان آزمایش [۵].



شکل ۵. تصویر طیف باکتری *Escherichia coli* BL21 در سه فاز رشد مختلف. فاز رشد اول (چگالی اپتیکی ۰/۴)، فاز رشد دوم (چگالی اپتیکی ۰/۸)، فاز رشد سوم (چگالی اپتیکی ۱/۲) و طیف زیر لایه شیشه‌ای.

با توجه به تحلیل قله‌های موجود در طیف نمونه‌ها و با استناد به مرجع استاندارد داده‌های اتمی [۲۰]، عناصر فسفر، کربن، کلسیم، سدیم، پتاسیم، منیزیم، نیتروژن، هیدروژن، اکسیژن در طیف نمونه‌ها مشاهده شد. با توجه به احاطه نمونه‌ها توسط هوا در هنگام طیف‌سنجی، عناصری همچون نیتروژن در طول موج‌های ۷۴۶/۸۲۶ و ۷۴۴/۲۵۴، ۷۴۲/۴۲۶ و ۷۴۶/۸۲۶ نانومتر، هیدروژن در طول موج ۶۵۶/۳۹۶ نانومتر، اکسیژن در طول موج‌های ۷۷۷/۲۴۶، ۷۷۷/۴۸۰ و ۸۴۴/۷۲۰ نانومتر که جزو

آزمایش‌ها با چیدمان طیف‌سنج LIBSCAN100 متعلق به شرکت Applied Photonics انجام شد. در این چیدمان که طرح‌واره‌ی آن در شکل (۴) نشان داده شده، از لیزر پالسی Nd:YAG شرکت Quantel با طول موج ۱۰۶۴ nm استفاده شد. پالس‌های لیزر دارای انرژی ۱۰۰ mJ، نرخ تکرار ۱۰ Hz و پهنای زمانی ۷ ns بودند. از یک طیف‌سنج ۸ کانال با پوشش طول موجی ۱۸۰ تا ۱۰۱۷ nm و تفکیک‌پذیری متغیر ۰/۴ تا ۰/۱۵ nm استفاده شد. آشکارساز از نوع CCD با مدار تاخیرانداز ۱/۲۷ s و زمان نورگیری ۱/۱ ms بود. قبل از انجام آزمایش‌های اصلی سیستم مطابق با مرجع [۲۰] و بر اساس طیف‌های مس کالیبره شد. قرص باکتری در هنگام آزمایش بر روی یک زیر لایه‌ی شیشه‌ای قرار داده شد. رسم نمودارها با نرم‌افزار OriginPro2017

نسبی این عناصر در مقالات دیگر هم که سویه‌های دیگر باکتری اشریشیاکلی را در فاز رشد ایستا بررسی کرده‌اند نیز مشهود است. به‌گونه‌ای که در مرجع [۱۰] به‌منظور مشخصه‌یابی باکتری تنها به عنصر کلسیم، سدیم و منیزیم بسنده شده است. در مرجع [۹] و [۲۱] هم همان‌گونه از طیف باکتری اشریشیاکلی گزارش شده برمی‌آید، فراوانی این عناصر نسبت به عناصری همچون سدیم، کلسیم بسیار پایین است، اما شدت نسبی پایین این عناصر باعث نشده است که در مشخصه‌یابی باکتری کنار گذاشته شوند. در طیف زیر لایه شیشه‌ای هیچ‌گونه اثری از عناصر فوق دیده نشد.

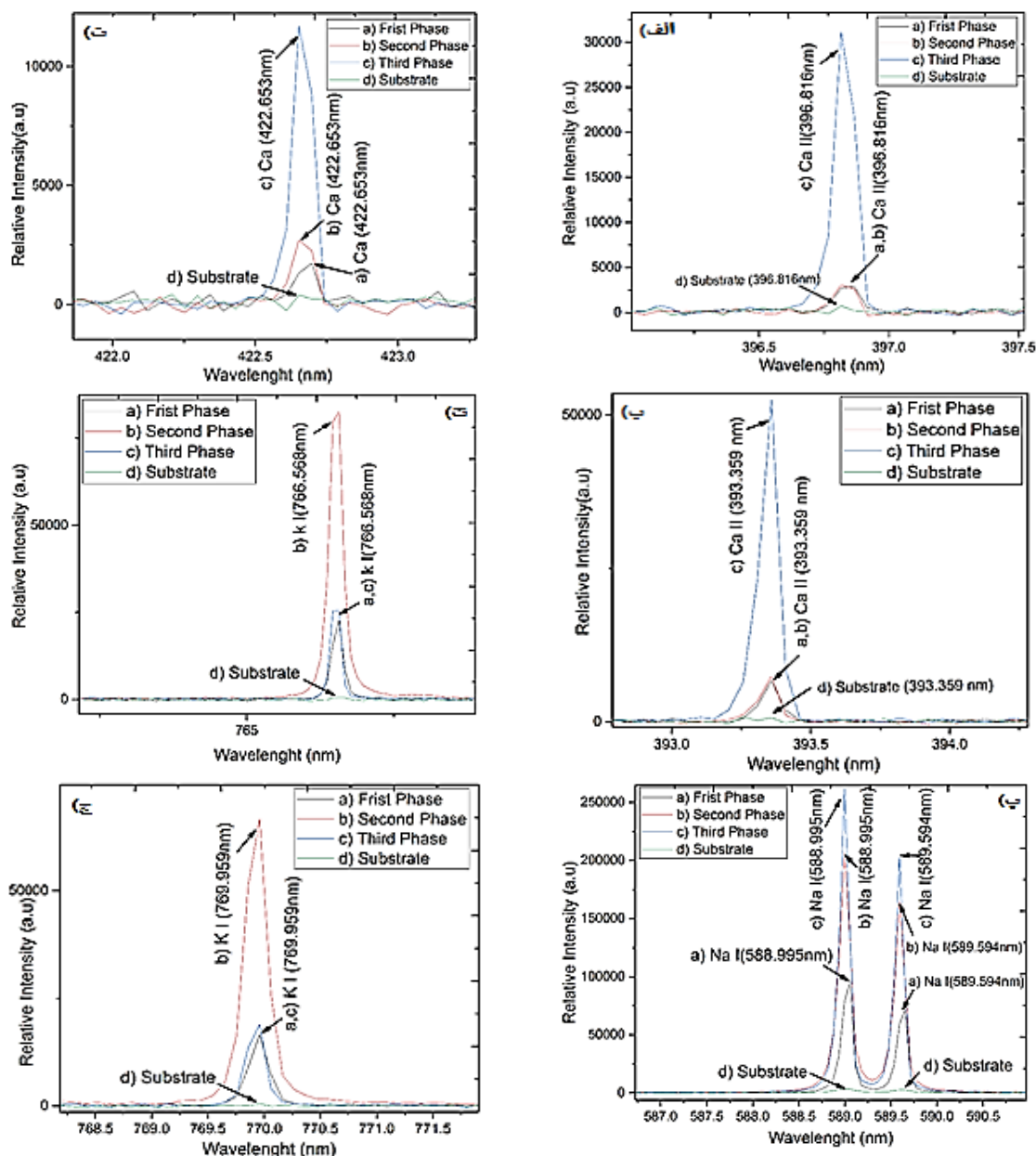
جدول ۱. عناصر مشاهده‌شده در طیف LIBS باکتری *Escherichia coli* BL21 در هر سه مرحله از فاز رشد با طول‌موج یکسان در مقایسه با عناصر گزارش شده در مقالات مشابه (I نشان‌دهنده عنصر خنثی و II نشان‌دهنده عنصر یک‌بار یونیزه است).

طول موج عناصر باکتری اشریشیاکلی در این مقاله (nm)	طول موج عناصر باکتری اشریشیاکلی در مراجع [۹، ۱۰ و ۲۱] (nm)	λ	λ _۰
۲۴۷/۸۹۴	۲۴۷/۸۶۵	CI	۱
۲۱۳/۶۳۲	۲۱۳/۶۱۸	PI	۲
۲۱۴/۷۷۴	۲۱۴/۹۱۴	PI	۳
۲۵۳/۲۵۶	۲۵۳/۳۹۸	PI	۴
۲۵۳/۳۱۶	۲۵۳/۶۵۰	PI	۵
۲۵۵/۴۱۴	۲۵۵/۳۲۶	PI	۶
مشاهده نشد.	۲۵۵/۴۹۱	PI	۷
مشاهده نشد.	۲۷۹/۰۷۹	Mg II	۸
مشاهده نشد.	۲۷۹/۵۵۳	Mg II	۹
مشاهده نشد.	۲۷۹/۸۰۶	Mg II	۱۰
مشاهده نشد.	۲۸۰/۲۷۱	Mg II	۱۱
مشاهده نشد.	۲۷۷/۹۸۳	Mg I	۱۲
۲۸۵/۲۱۴	۲۸۵/۲۱۳	Mg I	۱۳
۸۲۱/۱۲۵	گزارش نشده است.	Mg I	۱۴
مشاهده نشد.	۳۱۷/۹۳۳	Ca II	۱۵
۳۹۳/۳۵۹	۳۹۳/۳۶۶	Ca II	۱۶
۳۹۶/۸۱۶	۳۹۶/۸۴۷	Ca II	۱۷
۴۲۲/۶۵۳	۴۲۲/۶۷۳	Ca I	۱۸
۵۸۸/۹۹۵	۵۸۸/۹۹۵	Na I	۱۹
۵۸۹/۵۹۴	۵۸۹/۵۹۴	Na I	۲۰
۵۶۸/۲۶۵	گزارش نشده است.	Na I	۲۱
۷۶۶/۵۶۸	۷۶۶/۵۰۰	K I	۲۲
۷۶۹/۹۵۹	۷۶۹/۹۰۰	K I	۲۳

عناصر ساختاری باکتری هستند اما می‌توانند ناشی از هوای اطراف نمونه هم باشند، کنار گذاشته شدند. به همین دلیل این عناصر مشخصه باکتری، تنها در صورتی می‌توانند در تحلیل ساختار عنصری باکتری در فاز رشد مورد توجه قرار گیرند که به‌گونه‌ای اثر هوای اطراف نمونه با استفاده از عواملی همچون گازهای نادر در اطراف نمونه در حال توسعه طیف‌سنجی حذف شود [۷]. بنابراین با استناد به مراجع [۹، ۱۰ و ۲۱] که به مطالعه عناصر ساختاری باکتری اشریشیاکلی در فاز رشد ایستا پرداخته‌اند، عناصر فسفر، کربن، کلسیم، سدیم، پتاسیم و منیزیم به‌عنوان عناصر اصلی و مشخصه نمونه باکتری اشریشیاکلی مورد توجه قرار گرفته و شدت نسبی آن‌ها در فازهای مختلف رشد بررسی و مقایسه شد.

در جدول (۱) عناصری که به‌عنوان عناصر مشخصه باکتری اشریشیاکلی در مراجع مختلف، از جمله مراجع [۹، ۱۰ و ۲۱] مورد استناد قرار گرفته آورده شده است. بر این اساس در این مقاله طیف سویه صنعتی باکتری اشریشیاکلی مورد بررسی قرار گرفته و عناصر مختلفی همچون فسفر، کربن، کلسیم، سدیم، پتاسیم و منیزیم در طول موج‌های نشری مربوط به خود مشاهده شد.

همان‌گونه که جدول (۱) نشان می‌دهد، طیف باکتری بررسی شده در این مقاله تمامی عناصر گزارش شده در مقالات مشابه را دارد. تفاوت مشاهده‌شده ناشی از عواملی همچون، تفاوت در شرایط آزمایش طیف‌سنجی و تفاوت در سویه باکتری اشریشیاکلی بررسی شده در این مقاله است که با استناد به مرجع [۱۷] برای اولین بار مورد مطالعه قرار گرفته است. در شکل (۵)، قله‌های طیفی (خطوط نشری) مربوط به عناصر کلسیم در طول موج‌های ۳۹۳/۳۵۹، ۳۹۶/۸۱۶ و ۴۲۲/۶۵۳ نانومتر، سدیم در طول موج‌های ۵۸۸/۹۹۵، ۵۸۹/۵۹۴ و پتاسیم در طول موج‌های ۷۶۶/۵۶۸ و ۷۶۹/۹۵۹ نانومتر در طیف نمونه‌ها که دارای شدت نسبی بسیار بالایی هستند، در فازهای مختلف ارائه شده است. همان‌گونه که دیده می‌شود در تمامی فازهای رشد، عناصر اشاره شده وجود دارند و با پیشرفت فرآیند رشد باکتری بر میزان فراوانی آن‌ها نیز افزوده شده است؛ اما پتاسیم در هر دو طول موج نشری مخصوص خود در فاز رشد نمایی دوم دارای شدت نسبی بالاتری نسبت به فاز رشد نمایی اول و فاز سوم رشد ایستا است. عناصر فسفر، کربن و منیزیم هرچند با افزایش فاز رشد نمایی بر شدت نسبی آن‌ها افزوده شده است اما در هر سه مرحله فاز رشد دارای شدت نسبی بسیار پایینی و در نتیجه فراوانی بسیار کم در ساختار باکتری هستند. کم بودن شدت



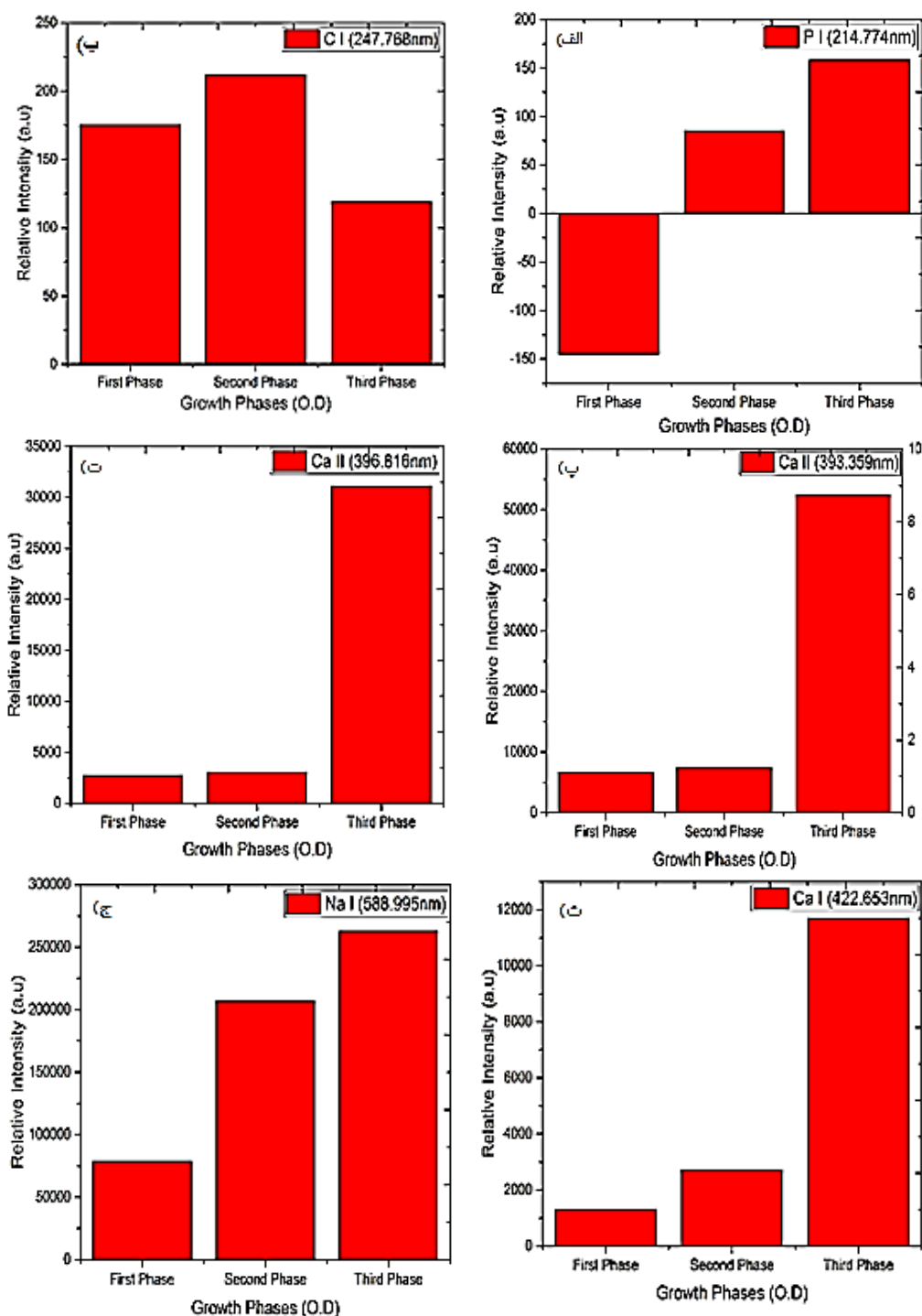
شکل ۶. مقایسه خطوط نشری عناصر تشکیل‌دهنده باکتری در سه فاز رشد و زیرلایه، الف) کلسیم در طول موج ۳۹۶/۸۱۶ nm، ب) کلسیم در طول موج ۳۹۳/۳۵۹ nm، پ) سدیم در طول موج ۵۸۸/۹۹۵ nm و ۵۸۹/۵۹۴ nm، ت) کلسیم در طول موج ۴۲۲/۶۵۳ nm، ث) پتاسیم در طول موج ۷۶۶/۵۶۸ nm، ج) پتاسیم در طول موج ۷۶۹/۹۵۹ nm.

مقایسه شدت نسبی عناصر فسفر، کربن، کلسیم، سدیم، پتاسیم و منیزیم در فازهای مختلف رشد در شکل (۷) نشان داده شده است. در شکل (۷-الف) با توجه به چگالی اپتیکی پایین در فاز رشد نمایی اول، عنصر فسفر در طول موج ۲۱۴/۷۷۴ نانومتر در این فاز مشاهده نشد؛ اما با گذشت زمان و رسیدن به فاز رشد نمایی با چگالی اپتیکی ۰/۸ و فاز رشد ایستا با چگالی اپتیکی ۱/۲ شدت نسبی آن در ساختار باکتری افزایش یافت. در شکل (۷-ب) فراوانی نسبی کربن در طول موج ۲۴۷/۷۶۸ نانومتر در فاز رشد نمایی با چگالی اپتیکی ۰/۴ و فاز رشد نمایی با چگالی اپتیکی ۰/۸ به تدریج افزایش یافته و در فاز رشد نمایی ۰/۸ به بیشترین مقدار خود رسید؛ اما در فاز رشد ایستا فراوانی آن در ساختار باکتری کاهش پیدا کرد. در شکل (۷-پ) تا شکل (۷-ث) فراوانی کلسیم در طول موج‌های ۳۹۳/۳۵۹، ۳۹۶/۸۱۶ و ۴۲۲/۶۵۳ نانومتر مقایسه شده است. همان‌گونه که نشان داده شده در هر سه طول موج مشخصه این عنصر با افزایش زمان رشد و افزایش چگالی اپتیکی باکتری بر شدت نسبی این عنصر افزوده شده است. در شکل (۷-ج) و شکل (۷-ح) نیز فراوانی سدیم در طول موج ۵۸۸/۹۹۵ و ۵۸۹/۵۹۴ نانومتر نشان داده شده است. فراوانی عنصر سدیم در ساختار باکتری هم در هر دو طول موج مشخصه با افزایش زمان رشد و افزایش چگالی اپتیکی افزوده شد. در شکل (۷-خ) فراوانی منیزیم در طول موج ۸۲۱/۱۲۵ نانومتر نشان

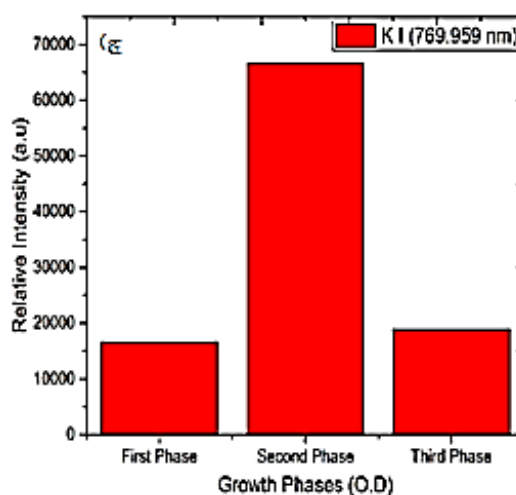
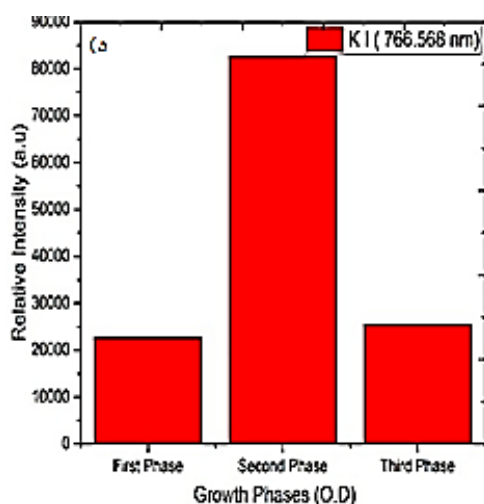
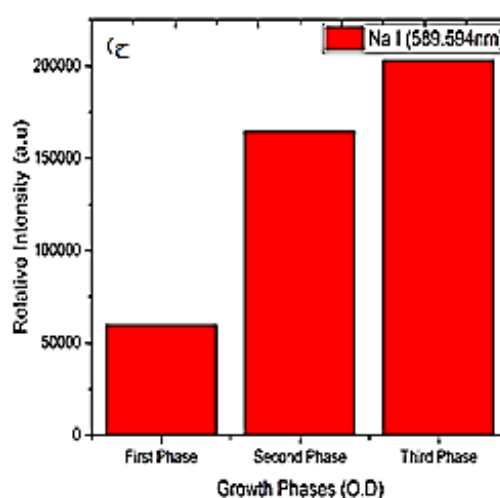
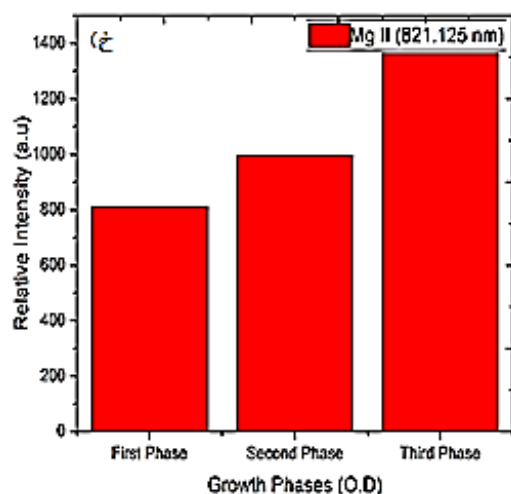
دهنده باکتری در سه فاز رشد و زیرلایه، الف) کلسیم در طول موج ۳۹۶/۸۱۶ nm، ب) کلسیم در طول موج ۳۹۳/۳۵۹ nm، پ) سدیم در طول موج ۵۸۸/۹۹۵ nm و ۵۸۹/۵۹۴ nm، ت) کلسیم در طول موج ۴۲۲/۶۵۳ nm، ث) پتاسیم در طول موج ۷۶۶/۵۶۸ nm، ج) پتاسیم در طول موج ۷۶۹/۹۵۹ nm.

داده شده است. شدت نسبی این عنصر هم در این طول موج مشخصه با افزایش چگالی اپتیکی و در نتیجه افزایش زمان رشد و رسیدن با فاز ایستا افزایش یافته است. در شکل (۷-چ) و شکل (۷-د) شدت نسبی عنصر پتاسیم در طول موج‌های ۷۶۹/۹۵۹ و

۷۶۶/۵۶۸ نانومتر نشان داده شده است. این عنصر در فاز رشد نمایی و با افزایش چگالی اپتیکی بر شدت نسبی آن در ساختار باکتری افزوده شده است اما در فاز رشد ایستا فراوانی آن در ساختار باکتری کاهش یافته است.



شکل ۷. مقایسه شدت نسبی خطوط نشری عناصر تشکیل‌دهنده باکتری در سه فاز رشد، الف) خط نشری فسفر در ۳۹۶/۸۱۶ nm، ب) خط نشری کربن ۲۴۷/۷۶۸ nm، پ) خط نشری کلسیم ۳۹۳/۳۵۹ nm، ت) خط نشری کلسیم ۳۹۶/۸۱۶ nm، ج) خط نشری کلسیم ۴۲۲/۶۵۳ nm، چ) خط نشری سدیم ۵۸۸/۹۹۵ nm، خ) خط نشری منیزیم ۸۲۱/۱۲۵ nm، د) خط نشری پتاسیم ۷۶۹/۹۵۹ nm.



ادامه شکل ۷. مقایسه شدت نسبی خطوط نشری عناصر تشکیل‌دهنده باکتری در سه فاز رشد، الف) خط نشری فسفر در ۲۱۴/۷۷۴ nm (ب) خط نشری کربن ۲۴۷/۷۶۸ nm، پ) خط نشری کلسیم ۳۹۳/۳۵۹ nm، ت) خط نشری کلسیم ۳۹۶/۸۱۶ nm، ث) خط نشری کلسیم ۴۲۲/۶۵۳ nm، ج) خط نشری سدیم ۵۸۸/۹۹۵ nm، ح) خط نشری سدیم ۵۸۹/۵۹۴ nm، خ) خط نشری منیزیم ۸۲۱/۱۲۵ nm، چ) خط نشری پتاسیم ۷۶۹/۹۵۹ nm، د) خط نشری پتاسیم ۷۶۹/۹۵۹ nm.

می‌افتد مطابقت دارد. در شکل (۷-ب) فراوانی نسبی کربن در نمونه سوم کاهش پیدا کرده است که نشان دهنده عدم توانایی باکتری در تولید ترکیبات آلی جدید است.

در شکل‌های (۷-پ)، (۷-ت)، و (۷-ث) در مورد فراوانی کلسیم و شکل‌های (۷-ج) و (۷-ح) فراوانی سدیم و همچنین شکل (۶-خ) فراوانی منیزیم، افزایش هر سه عنصر با افزایش زمان رشد و افزایش چگالی اپتیکی مشاهده شد. سدیم به صورت نمک کلراید در ترکیب اکثر محیط‌های کشت به صورت تجربی اضافه شده است و این نتایج با تجربیات قبلی مطابقت دارد. کلسیم و منیزیم نقش اساسی در تثبیت غشای بیرونی باکتری با اتصال مولکول‌های لیپوپولی ساکارید LPS^۱ به یکدیگر بازی می‌کنند و این نتایج نشان می‌دهد که این عناصر جزو عناصر ساختاری ثابت باکتری هستند...

مطالعه فازهای رشد در مشخصه‌یابی باکتری در طول زمان رشد و تعیین ناخالصی و آلودگی در زمان رشد دارای اهمیت است. ساختار باکتری *Escherichia coli* BL21 بر اساس عناصر تشکیل‌دهنده آن و بر اساس طیف‌سنجی LIBS به دست آمد. عناصر اصلی تشکیل‌دهنده این باکتری گرم منفی شامل کربن، فسفر، کلسیم، سدیم، پتاسیم و منیزیم است که در جدول (۱) نشان داده شد. با توجه به شکل (۶-الف) عنصر فسفر در نمونه اول (فاز رشد نمایی با چگالی اپتیکی ۰/۴) مشاهده نشده ولی با شدت نسبی بیشتر در نمونه دوم (فاز رشد نمایی با چگالی اپتیکی ۰/۸) و نمونه سوم (فاز رشد ایستا با چگالی اپتیکی ۱/۲) مشاهده شد. با توجه به اینکه فسفر به صورت بازهای آلی در انتقال انرژی در متابولیسم باکتری و همچنین ساختار اطلاعات ژنتیکی و بیان این اطلاعات نقش اساسی دارد بنابراین نتایج به دست آمده با افزایش رشد باکتری و تکثیر ژنوم آن که در فاز نمایی اتفاق

^۱ LiPopolySaccharide

به کمک روش‌های محاسباتی تجربی انجام می‌شود. نتایج این مطالعه می‌تواند به پیش‌بینی شرایط رشد در باکتری‌های مختلف بر اساس ساختار عنصری باکتری کمک شایانی نماید. این مطالعه بر روی یک‌سویه مهم تحقیقاتی و کاربردی در صنعت بیوتکنولوژی انجام شده است و نتایج در صنعت فرآورده‌های بیوتکنولوژی و دارویی می‌تواند باعث تغییر عمده در دیدگاه محققین و صنعتگران در شیوه‌های بهینه‌سازی تولید فرآورده باشد. با این روش سریع و دقیق وجود عناصر مختلف باکتری در زمان‌های رشد و چگونگی افزایش شدت نسبی عناصر مهم تشکیل‌دهنده باکتری در هر مرحله از سن باکتری قابل بررسی است.

۵. مراجع‌ها

- [1] Gottfried, J. L.; Deluca F. C.; Chase, A.; Munson, A.; Miziolek, W. "Standoff Detection of Chemical and Biological Threats Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy"; Appl. Spectrosc. 2008, 62, 353-363.
- [2] Dudrange, L.; Adam, L. D.; Amouroux, J. "Time-Resolved Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: Application for Fluorine, Chlorine, Sulfur, and Carbon in Air"; Appl. Spectrosc. 1998, 52, 1321-1327.
- [3] Morel, S.; Leone N.; Adam P.; Amouroux, J. "Detection of Bacteria by Time-Resolved Laser-Induced Breakdown Spectroscopy"; Appl. Opt. 2003, 42, 6184-6191.
- [4] Mohaidat, Q. I. "Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS): An Innovative Tool for Studying Bacteria" PhD. Diss. Detroit, Michigan, Wayne State Univ, 2011.
- [5] Farooq, W. A.; Atif, M.; Tawfik, W.; Alsalthi, M. S.; Alahmed, Z. A.; Sarfraz M. "Study of Bacterial Samples Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy"; Plasma Sci. Technol. 2014, 16, 1141-1146.
- [6] Kim, T.; Specht, Z. G.; Vary, P. S.; Lin, C. T. "Spectral Fingerprints of Bacterial Strains by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy"; J. Phys. Chem. B 2004, 17, 5477-5482.
- [7] Rehse, S. J.; Diedrich, J.; Palchadhuri, S. "Identification and Discrimination of Pseudomonas Aeruginosa Bacteria Grown in Blood and Bile by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy"; Spectrochim. Acta Part B 2007, 62, 1169-1176.
- [8] Mohaidat, Q. I.; Sheikh, K.; Palchadhuri, S. ; Rehse, S. J. "Pathogen Identification with Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: The Effect of Bacterial and Biofluid Specimen Contamination"; Appl. Opt. 2012, 51, 99-107.
- [9] Diedrich, J.; Rehse, S. J. ; Palchadhuri S. "Escherichia Coli Identification and Strain Discrimination Using Nanosecond Laser-Induced Breakdown Spectroscopy"; Appl. Phys. Lett. 2007, 90, 163901-3.
- [10] Sivakumar, V.; Sujatha, N. U.; Nilesh, J. V.; Srikanth, P.; Arumugam, I. "Bacterial Strain Discrimination Using a Low-Cost Laser-Induced Breakdown Spectroscopy Technique under Optimized Growth Conditions"; Proceedings SPIE Photonics Europe, Clinical Biophotonics 2020, 11362.
- [11] Rehse, S. J.; Mohaidat, Q. I.; Palchadhuri, S. "Towards the Clinical Application of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy for Rapid Pathogen Diagnosis: The Effect of Mixed Cultures and Sample Dilution on Bacterial Identification"; Appl. Phys. 2010, 49, 27-35.

اما پتاسیم در نمونه دوم دارای شدت نسبی بالاتر نسبت به نمونه اول و سوم است که نشان می‌دهد این عنصر در فاز رشد نمایی با چگالی اپتیکی $0/8$ دارای بیشترین تراکم در ساختار باکتری است و با کاهش سرعت رشد باکتری در فاز ایستایی، تراکم آن در باکتری کاهش یافته است؛ بنابراین پتاسیم در این مطالعه به‌عنوان شاخصی از رشد سریع باکتری بوده است. درحالی‌که پتاسیم به‌صورت نمک در ترکیب محیط کشت وجود نداشته است؛ بنابراین لازم است در مطالعات دیگری اثر افزودن نمک پتاسیم به ترکیب محیط کشت و تأثیر آن در مدت‌زمان فاز نمایی بررسی شود.

۴. نتیجه‌گیری

در این مقاله برای اولین بار، با بهره‌گیری از طیف‌سنجی فروشکست القایی لیزری عناصر تشکیل‌دهنده باکتری میزبان سویه صنعتی *Escherichia coli* BL21 در فازهای مختلف رشد که دارای چگالی اپتیکی متفاوت هستند، بررسی و مقایسه شد. فراوانی نسبی عناصر فسفر، کربن، کلسیم، منیزیم، پتاسیم در فازهای رشد مختلف بایکدیگر مقایسه شدند. با توجه به انجام آزمایش در هوا عناصر اکسیژن، نیتروژن، هیدروژن و پیوند مولکولی CN که می‌تواند ناشی از هوای اطراف نمونه باشد، در تحلیل‌ها کنار گذاشته شد. نتایج بیانگر تغییر در ترکیب عنصری باکتری، در فازهای مختلف رشد است که تاکنون محققان این متغیر مهم را که یک شاخص مهم از متابولیسم باکتری است در نظر نگرفته بودند. کلیه روش‌های شناسایی ریزجاندارها که بر پایه اجزای ساختاری آنها انجام می‌شود معمولاً در یک مرحله مشخص از رشد تنظیم می‌شوند و کتابخانه داده، در شرایط مشخص، برای دسته‌ای از ریزجاندارها تهیه می‌شود. به‌عنوان مثال می‌توان روش FAME را نام برد که برای باکتری‌های هوازی هتروتروف در محیط تریپتون آگار و بعد از ۱۸ ساعت رشد در سطح آگار، کلنی‌ها جمع‌آوری می‌شوند و بعد از تجزیه و تحلیل با روش گاز کروماتوگرافی نتایج تعیین هویت باکتری محاسبه می‌شود. نتایج این مقاله نشان می‌دهد ساختار عنصری و یونی باکتری بر اساس فاز رشد متفاوت است و این یافته‌ها در هیچ مطالعه‌ای گزارش نشده است. طبق این نتایج روش‌های تشخیصی باکتری‌ها بر اساس ساختار یونی نیز باید هم در یک فاز مشخص مقایسه شود. یکی دیگر از کاربردهای این مطالعه، این است که هرگونه آلودگی در فرآیندهای تولید صنعتی و در مقیاس بالا به باکتری‌های دیگر از طریق این سیستم قابل ردیابی خواهد بود. همان‌گونه که از نتایج طیف‌سنجی و مطالعه تمامی عناصر حاضر در طیف نمونه به‌دست آمد هیچگونه ناخالصی در فرآیند رشد باکتری اشریشیا کلی مشاهده نشد. در حال حاضر در روش‌های مرسوم زیست‌شناسی، بهینه‌سازی محیط کشت با آزمون و خطا و

- [17] Sing, V. K.; Sharma, J.; Phathak, A. K.; Ghany, C. T.; Gondal, M. A. "Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS): A Novel Technology for Identifying Microbes Causing Infectious Diseases"; *Biophysical Reviews* 2018, 10, 1221-1239.
- [18] Shakouri moghaddam, A.; Shorsheyeni, S. Z.; Shirvani mahdavi, H. R.; Khodabakhshi, Z. "Identification and Discrimination Bacterias of Gram Positive and Negative using Laser-Induced Break Down Spectroscopy (LIBS)"; 24th ICOP, 2018, 901-904 (In Persian).
- [19] Rehse, S. J. "A Review of the Use of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy for Bacterial Classification, Quantification, and Identification"; *Spectrochim Acta Part B* 2019, 154, 50-69.
- [20] www.NIST.gov.
- [21] Paulick, A. E. "Development of Laser Induced Breakdown Spectroscopy as Rapid Diagnostic Tool for Bacterial Infection" PhD. Diss., Windsor Univ 2018.
- [12] Dixon, P. B.; Hahn, D. W. "Feasibility of Detection and Identification of Individual Bioaerosols Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy"; *Analitical Chemistry* 2005, 77, 631-638.
- [13] Multari, R.; Cremers, D. A.; Dupre, J. M. Gustafson, J. E. "The Use of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy for Distinguishing Between Bacterial Pathogen Species and Strains"; *Appl. Spectrosc.* 2010, 64, 750-759.
- [14] Malenfant, D. J.; Gillies, D. J.; Rehse, S. J. "Bacterial Suspensions Deposited on Microbiological Filter Material for Rapid Laser-Induced Breakdown Spectroscopy Identification"; *Appl. Spectrosc.* 2016, 70, 485-493.
- [15] Gottfried, J. L.; De Lucia, Jr. F. C.; Munson, C. A.; Miziolek A. W. "Double-Pulse Standoff Laser-Induced Breakdown Spectroscopy for Versatile Hazardous Materials Detection"; *Spectrochim Acta Part B* 2007, 62, 1405-1411.
- [16] Mohaidat, Q.; Palchadhuri, S.; Rehse, S. J. "The Effect of Bacterial Environmental and Metabolic Stresses on a LIBS-Based Identification of Escherichia coli and Streptococcus Viridans"; *Appl. Spectrosc.* 2011, 65, 386-392.