



بیست و ششمین کنفرانس اپتیک و
فوتونیک ایران و دوازدهمین کنفرانس
مهندسی و فناوری فوتونیک ایران،
دانشگاه خوارزمی،
تهران، ایران.
۱۶-۱۵ بهمن ۱۳۹۸



امکان بررسی نمونه‌های باکتری با بهره‌گیری از طیف‌سنجی فروشکست القایی لیزری

احمد ناصری^۱، جواد خلیل‌زاده^۱، عبدالله اسلامی‌مجد^۲، سید محمد رضا دربانی^۲، مرضیه همتی^۲، محمد رضا اکبری^۳ و 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 زیست‌شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع).

چکیده - در این مقاله با بهره‌گیری از طیف‌سنجی فروشکست القایی لیزری (LIBS) نمونه‌های باکتری بررسی شده است. باکتری‌های مطالعه شده شامل، نمونه‌های غیر بیماری‌زا از باکتری *Escherichia Coli* و *Bacillus Cereus* است. نمونه‌های باکتری در سه حالت قرصی شکل، پودری و لایه نازک بر روی زیرلایه شیشه آماده شده است. طیف نمونه باکتری با طیف زیرلایه شیشه‌ای مقایسه شده و عناصر کلسیم، منیزیم، فسفر، گوگرد، کلر، آهن، منگنز، مس، هیدروژن و پیوند مولکولی CN در طیف نمونه‌ها مشاهده شده است. نتایج حاصل از بررسی طیف‌های بدست آمده نشان می‌دهد، طیف‌سنجی فروشکست القایی لیزری قابلیت شناسایی و تفکیک نمونه‌های باکتری را دارد.

کلیدواژه - طیف‌سنجی فروشکست القایی لیزری، باکتری، غیر بیماری‌زا، پیوند مولکولی.

Possibility of Investigation bacterial samples using laser induced Breakdown spectroscopy

Ahmad Naseri¹, Javad Khalilzadeh¹, Abdollah Eslamimajd², Seyyed Mohammad Reza Darbani², Marziyeh Hemmati², Mohammad Reza Akbari³ and Shahin Faridfar³

¹Center of Science and Technology Laser Optics, University of Imam Hossein
²Institute of Optics and Laser Science and Technology, University of Maleke Ashtar²
³Center of Science and Technology Biology, University of Imam Hossein³

Abstract- In this paper, bacterial samples were investigated using Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS). The bacteria studied include non-pathogenic *Escherichia Coli* and *Bacillus Cereus*. Bacterial samples were prepared on three form: tablet, powder and thin film on glass substrate. Bacteria samples spectrum were compared with glass substrate spectrum and elements of calcium, magnesium, , phosphorus, sulfur, chlorine, iron, manganese, copper, hydrogen, and CN molecular bonding were observed in the spectra of samples. The results of the spectroscopy investigation show that laser Induced Breakdown Spectroscopy is capable of identification and discrimination bacterial samples.

Keywords: Laser Induced Breakdown Spectroscopy, Bacteria, non-pathogenic, Molecular bond.

آماده‌سازی نمونه‌های باکتری

دو نمونه باکتری غیربیماری‌زا به نام‌های *Escherichia Coli* (نمونه ۱) و *Bacillus Cereus* (نمونه ۲)، که در آزمایش‌ها بکار گرفته شدند، به روش زیر تهیه و آماده شد: ۱- ابتدا باکتری‌ها در سطح آگار^۴ رشد داده شده و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد در گرم‌خانه کشت داده شد. ۲- باکتری‌ها بعد از کشت از لحاظ خلوص میکروبی بررسی شدند تا آلوده به میکروبیهای دیگر نباشند. در صورت خلوص باکتری، دوباره در محیط براث^۵ کشت داده شده و بعد از ۲۴ ساعت توسط سانتریفوژ با شتاب ۵۰۰۰ g در مدت ۵ دقیقه جمع‌آوری شد. ۳- باکتری‌ها در آب مقطر حل شده و دوباره در سانتریفوژ قرار گرفتند. ۴- سپس باکتری‌های جمع‌آوری شده در فریزدرای^۶ و در دمای ۹۰- درجه سانتی‌گراد به پودر خشک اسفنجی شکل تبدیل شد. ۵- در نهایت توسط دستگاه قرص ساز و تحت فشار بالا تبدیل به قرص دایره‌ای شکل شد.

باکتری *E. Coli* با طی تمامی موارد فوق به شکل پودر و قرص در آزمایش‌ها بکار رفته است. اما باکتری *B. Cereus* به صورت لایه نازکی از مایع بر روی لایه شیشه پوشانده شد.

چیدمان آزمایش

طرح‌واره چیدمان آزمایش در شکل ۱ نشان داده شده است.

مقدمه

روش طیف‌سنجی فروشکست القایی لیزری^۱ که با نام‌های دیگری همچون طیف‌سنجی پلاسمای القایی لیزری^۲، طیف‌سنجی کندوسوز لیزری^۳ و ... نام‌گذاری شده‌است به طور گسترده‌ای برای کشف، شناسایی و تفکیک مواد مختلفی همچون هوا، مواد شیمیایی، منفجره و ... استفاده شده است [۱ و ۲]. اساس این روش مبتنی بر تحلیل طیف گسیلی از تابش پلاسمای تولید شده از پالس لیزری با چگالی توان بالا است. طیف LIBS نمونه، حاصل از بازترکیب الکترون‌ها و یون‌ها در مرحله سرد شدن پلازما است. فیزیک این روش در مرجع [۳] تبیین شده است. با توجه به اهمیت روزافزون مسائل مبتلابه بیولوژیک در سالهای اخیر، مسئله شناسایی و تفکیک نمونه‌های باکتری با سرعت و دقت بالا بسیار مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. پژوهش‌های مختلفی در زمینه‌ی کاربرد روش طیف‌سنجی فروشکست القایی لیزری برای مطالعه نمونه‌های باکتری انجام شده‌است. در مرجع [۴] مطالعه کاملی از کارهای صورت گرفته در این زمینه ارائه شده است. در این مقاله و برای اولین بار در کشور، نمونه‌های باکتری غیربیماری‌زای *Escherichia Coli* (E. Coli) و *Bacillus Cereus* (B. Cereus) با بهره‌گیری از طیف‌سنجی فروشکست القایی لیزری بررسی شده است. هدف ما در این بررسی مطالعه و مقایسه عناصر تشکیل دهنده این دو نمونه باکتری بوده است. شناسایی و تفکیک نمونه‌های باکتری با این روش در کارهای بعدی انجام خواهد شد.

Agar^۴

Broth^۵

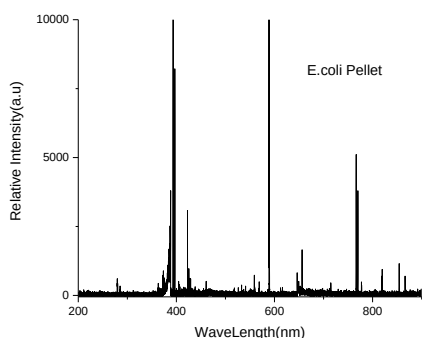
Freezdry^۶

Laser Induced Breakdown Spectroscopy^۱

Laser Induced Plasma Spectroscopy^۲

Laser Ablation Spectroscopy^۳

شکل ۲: طیف LIBS نمونه پودر E.coli



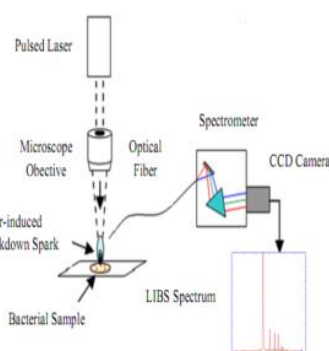
شکل ۳: طیف LIBS نمونه قرص E.coli

در جدول ۱، عناصر اصلی تشکیل دهنده باکتری E. Coli در مقایسه با طیف و اطلاعات گزارش شده این باکتری در مرجع [۷] آورده شده است. بر اساس اطلاعات استخراج شده از جدول مشخص می شود که در نمونه آزمایش شده، عناصر سدیم، پتاسیم، کلر، آلومینیوم در مقایسه با عناصر گزارش شده در مرجع [۷] مشاهده نشده است. علت این امر ناشی از روش آماده سازی متفاوت نمونه و همچنین این نکته است که نمونه باکتری E. Coli دارای گونه های متفاوتی است و نمونه استفاده شده در این آزمایش با نمونه مرجع [۷] متفاوت است.

در ادامه طیف LIBS دو نمونه باکتری بکار رفته در آزمایش از نظر عناصر تشکیل دهنده مقایسه شده است. در شکل ۴ طیف LIBS همزمان دو نمونه باکتری E. Coli و B. Cereus در بازه طول موجی ۲۰۰ تا ۹۰۰ نانومتر نشان داده شده است.

جدول ۱: مقایسه عناصر تشکیل دهنده E.coli پودری و قرصی شکل با مرجع [۵].

ردی ف	عنصر	طول موج nm [۷]	طیف حاصل از E.coli آزمایش	
			پودر	قرص
۱	کلسیم	۳۹۶/۸۴۷	۳۹۶/۸۱۶	ندارد
۲	منیزیم	۲۸۰/۲۷	ندارد	۲۸۰/۳۰۵
۳	سدیم	۵۶۳/۲۶۳	ندارد	ندارد
۴	پتاسیم	۳۴۴/۶۳۷	ندارد	ندارد
۶	فسفر	۴۱۵/۰۳۳ و ۸۵۶/۸۷۵	ندارد	۸۵۴/۲۱۱ و ۴۱۵/۱۶۹
۷	گوگرد	۳۹۳/۲۲۶	۳۹۳/۳۵۹	۳۹۳/۳۵۹

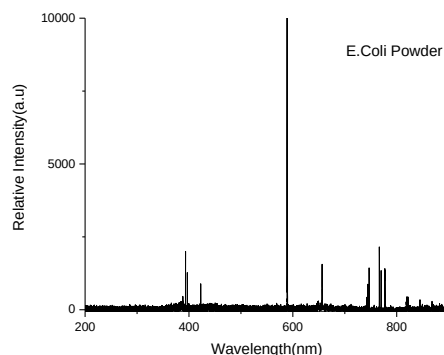


شکل ۱: طرحواره نوعی از چیدمان آزمایش [۵].

آزمایش ها با چیدمان طیف سنجی LIBSCAN100 انجام شده است. در این چیدمان که طرحواره آن در شکل ۱ نشان داده شده، از لیزر Nd:YAG متعلق به شرکت Quantel با طول موج ۱۰۶۴nm، انرژی ۱۰۰ میلی ژول، نرخ تکرار ۱۰ هرتز و پهنای زمانی ۷ns استفاده شده است. از یک طیف سنج ۸ کاناله که قابلیت پوشش طول موجی ۱۸۲ تا ۱۰۵۷ نانومتر را با دقت ۰/۰۴ نانومتر دارد، استفاده شده است. آشکارساز از نوع CCD با مدار تاخیر انداز با تاخیر زمانی ۱/۲۷ میکروثانیه و زمان نورگیری ۱/۱ میلی ثانیه بود. قبل از انجام آزمایش های اصلی سیستم مطابق با مرجع [۶] و براساس طیف های مس کالیبره شد.

نتایج

طیف نمونه ۱ در دو حالت پودری و قرص شده به ترتیب در شکل های ۲ و ۳ ارائه شده است. عناصر موجود در نمونه ۱ در حالت پودر و قرص با طیف حاصل از مرجع [۷] مقایسه و در جدول ۱ نشان داده شده است.

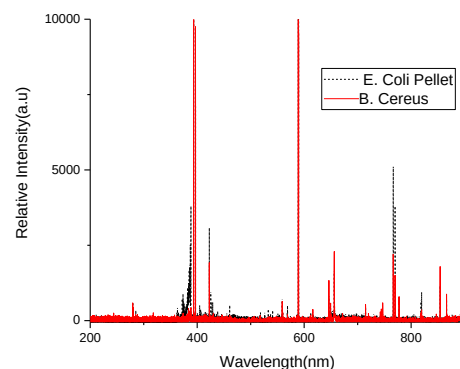


کالر با عناصر گزارش شده در مرجع [۷] یکسان است. همچنین با توجه به بررسی همزمان طیف نمونه های شماره ۱ و ۲ (شکل ۴) نشان داده شد که بعضی از عناصر، همانند منیزیم، هیدروژن به صورت مشترک و برخی از عناصر همانند فسفر، منگنز تنها در نمونه شماره ۱ وجود دارد. بنابراین بر اساس بررسی های صورت گرفته در این مقاله و همچنین بهره گیری از روش های شیمی سنجی و آماری، طیف سنجی فروشکست القایی لیزری امکان و قابلیت شناسایی و تفکیک نمونه های باکتری را خواهد داشت.

۸	کالر	۸۳۷/۵۹۶	ندارد	ندارد	ندارد
۹	آهن	۳۸۳/۹۲۶	ندارد	۳۸۳/۹۲۲	ندارد
۱۰	آلومینیوم	۶۶۲/۸۸۴	ندارد	ندارد	ندارد
۱۱	منگنز	۵۵۰/۵۸۷	ندارد	۵۵۰/۷۶۵	ندارد
۱۲	مس	۶۶۶/۰۷	ندارد	۶۶۶/۰۲۶	ندارد
		۵۷۰/۶،	۵۶۸/۸۴۹	۵۶۸/۸۴۹	
		۴۲۲/۷۹۳	۴۲۲/۶۹۸	۴۲۲/۶۹۸	
۱۳	کربن	۲۴۵/۸۸	۲۴۷/۸۵۶	۲۴۷/۸۵۶	ندارد
		۱۹۳/۰۲	[۵]	[۵]	
۱۴	هیدروژن	۶۵۶/۲۸	۶۵۶/۳۹۶	۶۵۶/۳۹۶	دارد
۱۵	پیوند مولکولی CN	۳۸۳	ندارد	۳۸۳/۸۱۶	ندارد
		۳۸۳/۴۰		۳۸۳/۲۳۱	
		۳۸۳/۷۵		ندارد	

مراجع

- [1] J. L. Gottfried, F. C. Delucla, JR., Chase A. Munson, A. W. Miziolek "Standoff Detection of Chemical and Biological Threats Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy", App1. Spec, Vol 62, No 4, pp. 353-363, 2008.
- [2] L. D. Ph. Adam, J. Amouroux, "Time-resolved laser-induced breakdown spectroscopy: application for fluorine, chlorine, sulfur, and carbon in air," Appl. Spec, Vol 52, pp 1321-1327, 1998.
- [3] L. J. Radziemski, "From LASER to LIBS, the path of technology development," Spectrochim. Acta Part B 57, pp 1109-1113, 2002.
- [4] 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.
- [5] Q. Mohaidat, "Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS): An innovative tool for studying bacteria" Thesis 2011.
- [6] www.NIST.com.
- [7] W. A. Farooq, M. Atif1, W. Tawfik, M. S. Alaslhi, Z. A. Alahmed, M. Sarfaraz, J. P. Singh, "Study of Bacterial Samples Using Laser Induced Breakdown Spectroscopy", Plasma Science and Technology, Vol.16, No.12, Dec. 2014.



شکل ۴: طیف LIBS همزمان نمونه قرصی شکل E.coli (رنگ مشکی - نقطه ای) و نمونه B.Cereus (رنگ قرمز - خط ممتد).

نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصل از طیف LIBS نمونه شماره ۱ در دو حالت پودر و قرص که در جدول ۱ جمع بندی شده است، عناصر تشکیل دهنده باکتری E. Coli استخراج شده است. این عناصر به جز در چند مورد سدیم، پتاسیم، آلومینیوم،