

شناسایی و تفکیک باکترهای گرم مثبت و منفی با استفاده از طیف سنجی فروشکست القایی لیزری

اکرم شکوری مقدم^۱، سیده زهرا شورشی^۱، حمیدرضا شیروانی مهدوی^۲، زهرا خدابخش^۳

۱- دانشکده فیزیک شیمی دانشگاه الزهرا تهران

۲- دانشگاه آزاد واحد مرکز ۳- دانشگاه صنعتی شاهرود

چکیده - باکتری های *Bacillus subtilis* و *Escherichia coli* با استفاده از طیف سنجی فروشکست القایی لیزری (LIBS) آنالیز شدند. طیف حاصل شامل بیست و دو خط طیفی یونی و اتمی بود که اغلب عناصر غیر آلی مانند کلسیم، منیزیم و سدیم در طبقه بندی و شناسایی باکتری های گرم منفی و مثبت مورد استفاده قرار گرفتند. از یک تابع تشخیص برای تفکیک دو باکتری *Bacillus subtilis* و *Escherichia coli* استفاده شد. نتایج بررسی ها بیانگر تفکیک بسیار خوبی بین این دو باکتری بود. به طوری که توانایی LIBS را در شناسایی و طبقه بندی باکتری در کاربرد های پزشکی را نشان می دهد.

کلید واژه: تابع تشخیص، شناسایی باکتری، طیف سنجی فروشکست القایی

Identification and discrimination bacterias of Gram positive and negative using Laser-induced break down spectroscopy (LIBS)

Akram Shakouri moghaddam¹, seyedeh Zahra Shorsheyi¹, Hamid Reza Shirvani Mahdavi², Zahra Khodabakhshi³

1-College of Physical Chemistry, Alzahra University, Tehran

2- Azad University, Central Unit

3-Shahrood University of Technology

Abstract- *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* bacteria have been analyzed by Laser-induced breakdown spectroscopy. Twenty-two atomic and ionic emission lines in the LIBS spectrum, which was dominated by inorganic elements such as calcium, magnesium and sodium, were used to identify and classify the bacteria of Gram positive and negative. A discriminant function analysis was used to discriminate between *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. Our results show well discrimination. so, it shows the ability of LIBS in classification of bacteria and it feasibility in medical applications.

Keywords: Discriminant function analysis, Bacteria identification, Laser-induced break down spectroscopy

۱- مقدمه

باکتری‌ها میکروارگانیسم‌های بسیارکوچکی با ابعاد حدود (10^{-6} m) یا کوچکتر با اشکال مختلف می‌باشند^(۱). دیواره سلولی باکتری نقش مهمی در شناسایی و تفکیک بین آن‌ها ایفا می‌کند، معمولاً باکتری‌ها براساس دیواره خارجی به دونوع گرم مثبت و گرم منفی طبقه بندی می‌شوند. این طبقه بندی براساس یک نوع رنگ آمیزی گرمی است که در سال ۱۸۸۴ توسط هانس کریستین گرم توسعه داده شد.^(۲) باکتری‌ها دارای ترکیبات پیچیده مولکولی می‌باشند. در جدول ۱ ترکیبات مولکولی غشای خارجی باکتری‌ها نشان داده شده است.

جدول ۱: اجزا غشا خارجی باکتری‌ها

نوع	ساختار	نام اجزا
گرم منفی	شامل زنجیرهای glycosaminoglycan	peptidoglycan
	شامل lipopolysaccharide (LPS) polysaccharide, protein	phospholipids
گرم مثبت	شامل lipoteichoic acid, teichoic acid	peptidoglycan

وجود عناصر معدنی مانند Ca ، P ، Mg و Na در بدن باکتری‌ها و شاید به طور خاص در LPS، برآورد امکان بررسی و شناسایی باکتری‌ها به کمک روش‌های بیناب نگاری را محتمل می‌سازد. همچنین Ca^{2+} و Mg^{2+} به طور خاص نقش مهمی در تثبیت LPS‌های مجاور دارند^(۳).

طبق آمار، به دلیل وجود انواع باکتری‌ها در محیط و مواد غذایی سالانه تعداد زیادی از افراد دچار بیماری شده و حتی جانشان را از دست می‌دهند. اگر امکان شناسایی سریع ونوع این باکتری‌ها فراهم شود، می‌توان از بسیاری مرگ و میرهای ناشی از آن‌ها جلوگیری کرد. روش‌های فعلی شناسایی باکتری‌ها با وجودی که روش‌های دقیقی هستند، در مقایسه با مدت لازم برای درمان آن‌ها بسیار زمان‌برند، از طرفی با توجه به این که هر آزمون قابلیت شناسایی یک میکروارگانیسم خاص را دارد، عدم امکان شناسایی سریع باعث شیوع بسیاری از بیماری‌ها می‌شود^(۴).

بیناب نگاری فروشکست القایی (LIBS) یکی از ابزارهای قدرتمند برای تجزیه و تحلیل همه عناصر تشکیل دهنده مواد به طور همزمان می‌باشد. در این روش ثبت بیناب با سرعت

بالا و به صورت آنی انجام می‌شود. همچنین تجزیه و تحلیل بیناب‌های حاصل از آن به صورت در لحظه امکان پذیر است که خود موجب سرعت عمل بالای (LIBS) می‌شود. در کار حاضر از روش LIBS با کمک تحلیل تابع تشخیصی امکان جداسازی و تشخیص دو نوع باکتری به عنوان نماینده ای از گروه‌های گرم مثبت و گرم منفی بررسی شد.

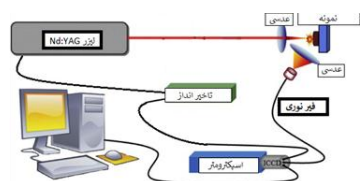
۲- مواد و روش

طرح وارده ای از چیدمان LIBS در شکل (۱) نشان داده شده است. این چیدمان شامل یک لیزر Q سوئیچ Nd:YAG است که از طول موج ۱۰۶۴ نانومتر، دیرپایی ۵ ns با نرخ تکرار ۱ هرتز استفاده شده است. انرژی لیزر ۱۶۳ mJ/pulse تنظیم شده، برای کانونی سازی نورلیزر بر روی نمونه از یک عدسی همگرا با فاصله کانونی ۲۰ cm استفاده شده، نمونه‌ها برای سهولت بر روی یک پایه میکرومتری که در سه راستای XYZ قابل تنظیم بود قرار گرفت. تابش حاصل از پلاسمای القایی لیزر توسط یک فیبر نوری که در فاصله یک سانتی متری از نمونه قرار دارد و به سر آن یک عدسی متصل است جمع آوری و به بیناب نگار S-150 با قدرت تفکیک ۰.۴ نانومتر در گستره ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر برای ثبت بیناب منتقل شد.

شکل ۱: چیدمان LIBS

۲-۲ نمونه‌ها

ابتدا مقدار سه لیتر از هرکدام از سویه‌های IBRC-



M10742Bacillussubtilis (گرم مثبت) و

IBR-M11100Escherichia coli (گرم منفی) تهیه شده از بانک میکروارگانیسم مرکز ملی ذخائر ژنتیکی وزیستی ایران درست شد. سپس محلول حاصل در دستگاه لیوفیلیزاسیون Christ مدل ALPHA2-4 LSC طی مراحلی در مدت زمان ۲۰ ساعت در دمای 50°C - لیوفلیز شد. در نهایت پودر لیوفلیز باکتری‌ها با استفاده از دستگاه قرص ساز تبدیل به قرص‌هایی با قطر ۱۳ mm وضخامت ۲ mm شدند.

۲- روش تحلیل تابع تشخیصی

تحلیل تابع تشخیص یک روش آماری است، که برای طبقه بندی مجموعه ای از مشاهدات به گروه های منحصر به فرد براساس مجموعه ای از متغیرهای مستقل استفاده می شود. که در این پژوهش از آن برای دسته بندی دونمونه باکتری استفاده شده است. این تکنیک مجموعه از توابع خطی ایجاد می کند که روابط بین گروه ها را با کمترین خطا در طبقه بندی بدست می دهد. این روابط را می توان با به حداکثر رساندن نسبت واریانس بین گروهی به واریانس درون گروهی بدست آورد. تابع تشخیصی به چندین شکل در معادلات نشان داده می شود که رایج ترین آن معادله زیرمی باشد:

$$DF=b_1x_1+b_2x_2+...+b_kx_k+b$$

که در آن DF ، تابع تشخیص و $b_1, b_2, \dots$ مقادیر ضریب تشخیص یا ضریب وزنی هر متغیر و x_k متغیرهای مستقل هستند. تعداد تابع تشخیص همیشه برابر تعداد طبقات متغیر منهای یک است. تحلیل تشخیصی شناسایی متغیرهای تفکیک کننده را در دومرحله انجام می دهد. در مرحله اول از آزمون F (وبرحسب لاندای ویلکس) برای آزمون معنا داری کل مدل استفاده می شود؛ در مرحله بعد اگر مقدار F در مرحله اول معناداری مدل تشخیصی را نشان دهد، در آن صورت هر متغیر مستقل ارزیابی می شود تا مشخص شود میانگین کدام یک از آن ها تفاوت معناداری باهم دیگر برحسب گروه دارد که در نهایت از آن ها برای طبقه بندی متغیر وابسته استفاده می شود. این تابع اطلاعات طیفی نمونه ها شامل شدت خطوط شاسایی شده در باکتری ها را به عنوان متغیر مستقل دریافت و بیشترین اختلافات را پیدا می کند. همه خطوط طیفی به یک اندازه درتابع تفکیک سهمیم نیستند و میزان اثر گذاری هر عنصررا ضرایب تابع تفکیک مشخص می کند^(۵).

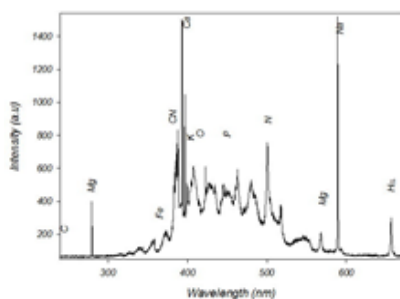
۳- نتایج و بحث

ابتدا با تابش لیزر درنقاط مختلف نمونه ها برای هر قرص ۲۰ طیف LIBS به دست آمد. به عنوان نمونه در شکل های ۳و۲ به ترتیب طیف های LIBS حاصل از نمونه های باکتری های گرم منفی و گرم مثبت مشاهده می شود. خط های طیفی مشاهده شده در بینابها متعلق به ۸ عنصر موجود در طیف باکتری ها شامل گونه های منیزیم، کلسیم، آهن، پتاسیم،

نیتروژن، اکسیژن و کربن که در جدول ۲ درج شده، می باشند. همانطور که انتظار می رود (جدول ۲) ساختار طیفی هر دو نمونه مشابه می باشد و تفاوت کیفی، بین بیناب دو باکتری مشاهده نمی شود. به منظور جداسازی نمونه هایی با ساختارهای مولکولی متفاوت انواع روش های آماری را می توان جهت تعیین اختلاف بین خطوط طیفی مشابه به کار برد. دراین کار از روش تابع تشخیص استفاده شد. شدت خطوط موجود در جدول ۲ به عنوان متغیرهای مستقل جهت تعیین تابع تشخیص به کمک نرم افزار SPSS.ver22 مورد استفاده قرار گرفت نتیجه تفکیک در جدول ۲ خلاصه شده است.

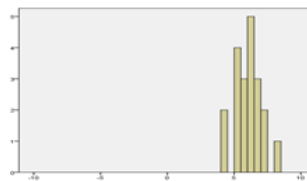
جدول ۲: خطوط مربوط به گونه های شناسایی شده

طول موج (nm)	نام عنصر	طول موج (nm)	نام عنصر
۴۰۴/۷۲	K II	۲۴۷/۴۵	C I
۴۰۷/۵۸	O II	۲۷۹/۵۵	Mg II
۴۲۲/۴۷	Ca I	۲۸۰/۲۰	
۴۳۴/۰۴	H I	۳۵۸/۱۱	Fe I
۶۵۶/۲۸		۳۸۳/۴۲	
۴۶۰/۲۰	P II	۳۸۶/۱۳	CN
۴۸۰/۴۲	K I	۳۸۷/۰۸	
۴۸۵/۶۰		۳۸۸/۲۹	
۵۱۷/۲۶	Mg I	۳۹۳/۳۶	
۵۱۸/۳۶		۳۹۶/۸۴	Ca II
۵۸۸/۹۹	Na I	۵۰۰/۵۱	N II



شکل ۲: بیناب LIBS باکتری E.coli

شکل ۴: نمودار ستونی تابع تشخیص
E.coli برای باکتری

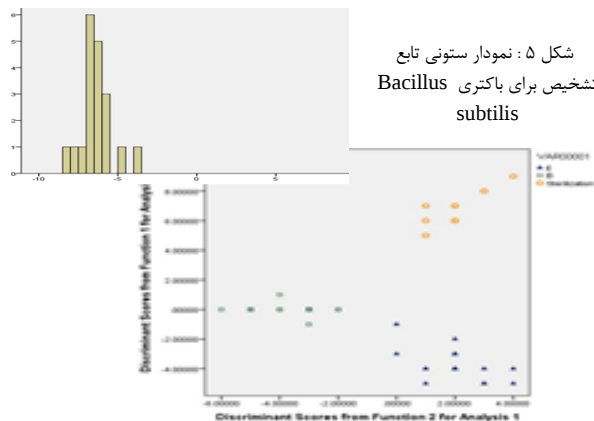


Canonical Discriminant Function1
(VAR1=B.Sub)

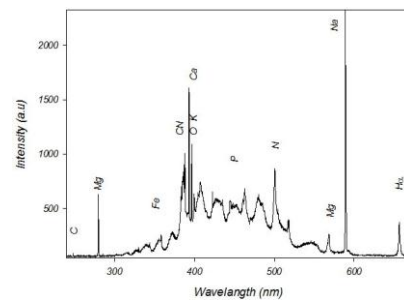
Mean=-6.30

Std.Dev =1.002

N=20



شکل ۵: نمودار ستونی تابع
Bacillus subtilis برای باکتری



شکل ۳: بیناب LIBS باکتری Bacillus subtilis

تمام متغیرهای مستقل بدست آمده از طیفها را که شامل شدت عناصر می باشد، به طور همزمان در نرم افزار SPSS.ver 22 مورد تحلیل قرار دادیم و نتیجه تفکیک حاصل در جدول ۳ آورده شده است.

Classification Results^a

g		Predicted Group Membership		Total
		E	B	
Original	Count	E	B	
		20	0	20
	B	0	20	20
	%	100.0	.0	100.0
	B	.0	100.0	100.0

a. 100.0% of original grouped cases correctly classified.

جدول ۳. نتیجه تفکیک دو باکتری با استفاده از SPSS

نتیجه گیری

در کار حاضر نشان داده شد که می توان به کمک بیناب نگاری LIBS و به کارگیری خطوط گسیلی مشخصه گروهی همه عناصر سازنده نمونه به کمک کاربرد روش تابع تشخیصی وجود باکتریهای گرم مثبت و منفی را از یکدیگر تشخیص داد.

مراجع

- [1] M. Madigan, J. Martinko and J. Parker, Brock Biology of Microorganisms, 9th Edition, (Prentice Hall College Div) 1996
- [2] J.F. Hair, W.C. Black, B.J. Babin, and R.E. Anderson, Multivariate Data Analysis, 7th Edition, (Prentice Hall) 2009
- [3] M. Asbell and R. Eagon, "Role of multivalent cations in the organization structure, and assembly of the cell wall of Pseudomonas aeruginosa," Journal of Bacteriology 92, 380-387 (1966)
- [4] S. Morel, M. Leone, P. Adam, and J. Amouroux, "Detection of bacteria by time-resolved laser-induced breakdown spectroscopy," Appl. Opt. 42, 6184-6191 (Oct.2003).

[۵] صفری، رضا و حبیب پورکریم، راهنمای جامع کاربرد SPSS در تحقیقات پیمایشی، مؤسسه راهبرد پیمایش، ۱۳۸۸.

همانطور که از جدول ۳ مشخص است به کمک تابع تشخیص دونوع باکتری گرم مثبت و گرم منفی با دقت ۱۰۰٪ از یکدیگر تفکیک شدند. شکل های ۴ و ۵ نمودارهای ستونی تابع تشخیص را برای دو باکتری نمایش می دهد. این شکل ها نیز بیانگر تفکیک کامل این دو باکتری از یکدیگر می باشند. برای آزمودن تابع تشخیص شدت خطوط طیف گسیلی یک ماده عاری از باکتری را بعنوان نمونه سوم وارد کردیم. شکل ۶ جداسازی این ماده را به خوبی نمایش می دهد. به این ترتیب می توان به کمک تحلیل طیفهای LIBS با روش آماری ساختارهای متفاوت مولکولی با عناصر سازنده مشابه را تشخیص داد.

Canonical Discriminant Function1 (VAR1=E.coli)

Mean=5.99

Std.Dev =0.998

N=20