بیستمین کنفرانس اپتیک و فوتونیک ایران
و ششمین کنفرانس مهندسی و فناوری فوتونیک ایران
۸ تا ۱۰ بهمن ماه۱۳۹۲ - دانشگاه صنعتی شیراز

اندازه گیری نرخ توقف رشد باکتری E.Coli K-12 در حضور نانو ذرات با استفاده‌از حسگر باریک شده فیبرنوری

زهرا سعیدیان، محمد اسماعیل زیبایی، زهرا تقی پور و حمید لطیفی

تهران، اوین، پژوهشکده لیزر و پلاسما، دانشگاه شهید بهشتی

چکیده –در این مقاله خاصیت ضد باکتری نانوذرات نقره علیه باکتری گرم منفی *E.Coli*توسط حسگر فیبرنوری بررسی شده است. حسگر فیبرنوری باریک شده با استفاده از فیبرنوری تک مد به روش کشش-حرارت با استفاده از لیزر CO_2 ساخته شد. پس از تثبیت باکتری بر روی حسگر فیبرنوری باریک شده ، حسگر در غلظت‌های متفاوت از نانوذرات محلول در محیط کشت گلوکز غوطه‌ور شده و به مدت ۳ ساعت سیگنال خروجی از حسگر ثبت می‌شود.با اندازه‌گیری پیوسته شدت نور خروجی از فیبر نرخ توقف رشد آن اندازه‌گیری شدو سپس با استفاده از روش شمارش تعداد کلونی نتایج آزمایش صحه گذاری گردید.

کلید واژه- پلی ال لایزین،حسگر فیبرنوری باریک شده، میدان میرا شونده، نانوذرات نقره، نرخ توقف رشد،*E. coli*

Measuring the inhibination rate of growth of *E.colik-12* in the presence of silver nano particles by tapered optical fiber biosensor

Z.saeedian, M.I.Zibaii,Z.Taghipour, H.Latifi

Laser and Plasma Research Institute, Shahid Beheshti University

Abstract-In thispaper the antibacterial properties of silver nanoparticles (SNPs) against the *Escherichia coli* (*E.coli*) by culturing the organisms in liquid broth in the presence different concentration of SNP was studied by optical fiber sensor. The sensorwas fabricated using heat-pulling method by CO_2 laser and bacteria immobilized onthe optical fiber surface. Then the sensor was surrounded with different concentration of SNP.Also, due to interaction of SNP and immobilized bacteria onthe optical fiber surface, changedtheeffective refractive index around the fiberandthis affects the evanescent field leading to changes in optical throughput.The results show that *E.coli* growth was inhibited by different concentrations of SNP.The inhibition rate of the *E. coli* growth for SNP concentrations in the range of 0 to 50 $\mu g\ ml^{-1}$ were measured to be from$58.0\times10^{-2}h^{-1}$ to $-35.0\times10^{-2}\ h^{-1}$ and from $-1.3\times10^{-3}\ h^{-1}$ to $-8.88\times10^{-3}\ h^{-1}$for colony counting and optical fiber biosensor, respectively. This novel sensing method, promises new application such as rapid analysis of antibacterial effects of SNPs.

Keywords: Tapered optical fiber sensor, refractive index, *E. coli*, inhibitation rate, Silver nanoparticles (SNPs)

[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-11-05]

۱ مقدمه

حسگرهای زیستی در سال‌های اخیر بدلیل نیاز پیوسته به وجود یک وسیله که بتواند به سادگی و با سرعت زیاد به اندازه‌گیری نمونه‌های بیولوژیکی بپردازد پیشرفت‌های فراوانی داشته‌اند.[1] فیبرهای‌نوری قسمت عمده‌ای از تکنولوژی حسگرها را به خود اختصاص داده‌اند که استفاده از آنها بعنوان جزء حسگری در کاربردهای کلینیکی، داروسازی، صنعتی یا نظامی بسیار رایج و گسترده است. [2]انتقال خوب نور، طول برهمکنشی بالا، قیمت پایین و توانایی برانگیختن مولکول‌های هدف و گرفتن نورگسیلی از مولکول‌های هدف بهترین نکاتی هستند که فیبرهای‌نوری را گزینه مناسبی برای استفاده‌در حسگرهای زیستی می‌سازد[3].در این مقاله اثر ضد باکتری و متوقف کننده رشد نانوذرات نقره روی باکتری گرم منفی *E.Coli*با استفاده از حسگر فیبرنوری باریک شده اندازه گیری می شود و با استفاده از روش زیستی شمارش تعداد کلونی ها نتایج آزمایشات صحه گذاری می گردد.

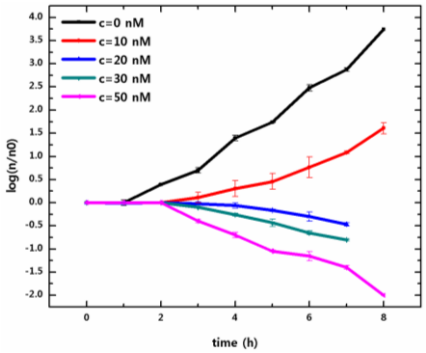
۲ اساس عملکرد حسگر زیستی

با باریک نمودن فیبرنوری با روش کششی-حرارتی ، فیبر نوری باریک شده در ناحیه باریک مانند یک تداخل سنج ماخ-زندر عمل می نماید. زمانی که یک نمونه خاص اطراف حسگر فیبرنوری باریک شده قرار می‌گیرد، در واقع نقش غلاف جدید فیبرنوری را به عهده می‌گیرد، با برهمکنش میان باکتری و نانوذرات نقره دیواره سلولی باکتری پاره شده و محتویات داخل آن بیرون می‌ریزد، این امر سبب می‌شود ضریب شکست موثر در اطراف فیبر باریک شده تغییر کند. این فرایند موجب تغییر دامنه و فاز میدان میراشونده می‌شود که با تغییرات شدت و جابجایی طول موجی در طیف حسگر فیبرنوری باریک شده می‌شود. با توجه به این که بین شدت نور خروجی از فیبر و دامنه میدان میراشونده ارتباط مستقیمی وجود دارد با اندازه‌گیری پیوسته شدت نور خروجی از فیبر می‌توان نرخ توقف رشد آن را اندازه‌گیری کرد. [4].

۳ نتایج تجربی

۳-۱ اندازه‌گیری تاثیر نانوذرات بر روی نرخ رشد باکتری با استفاده از روش زیستی

برای انجام آزمایش کنترل به منظور بررسی اثر نانوذرات بر روی رشد باکتری *E.Coli* ابتدا با استفاده از روش شمارش تعداد کلونی ها اثر غلظت‌های مختلف از نانوذرات نقره بر روی نرخ رشد اندازه‌گیری شد. نتایج بدست آمده از نمودار (۱) نشان می دهد که در غلظت ۵۰µg/ml تقریبا رشد باکتری در حال متوقف شدن می‌باشد. از نتایج آزمایش می‌توان نتیجه گرفت، تاثیر نانوذرات در محیط کشت گلوکز در توقف رشد آن بسیار محسوس و قابل مشاهده می‌باشد.



شکل(۱): توقف رشد باکتری در محیط کشت گلوکز برای غلظت های مختلف نانوذرات نقره

چنانچه در شکل (۱) مشاهده می‌شود برای غلظت µg/mlC=0 در محیط کشت گلوکز پس از ۱ ساعت با شیب ملایمی رشد شروع شده است. همچنین مشاهده می‌شود در غلظت µg/mlC=20و غلظت‌های بیشتر میزان تخریب باکتری بر رشد آن غلبه دارد. نرخ رشد باکتری در ۵ ساعت اولیه برای غلظت‌های مختلف نانوذرات در محیط کشت گلوکز در جدول (۱) آورده شده است.

جدول (۱): ضرایب نرخ رشد باکتری در محیط کشت گلوکز برای غلظت های ۰،۵۰،۳۰،۲۰،۱۰میلیگرم بر میلی لیتراز نانو ذرات نقره با روش شمارش کلونی

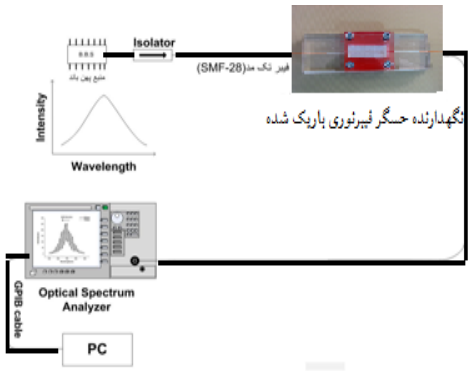
غلظت نانوذرات (µg/ml)	نرخ رشد باکتری (h^{-1})
C=0	58.0×10^{-2}
C=10	15.2×10^{-2}
C=20	-5.5×10^{-2}

[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-11-05]

C=50	-35.0×10^{-2}

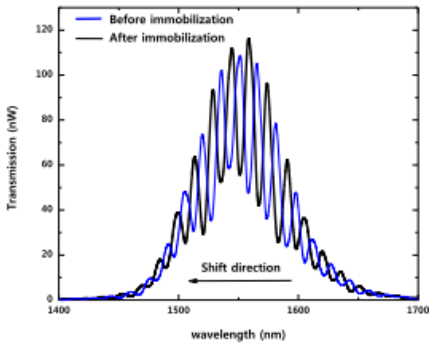
۳-۲ اندازه‌گیری تاثیر نانوذرات بر روی نرخ رشد باکتری با استفاده از حسگر فیبرنوری باریک شده

برای تثبیت باکتری روی حسگر فیبرنوری باریک شده از روش جذب سطحی و خصوصیت بار الکتریکی سطح فیبرنوری و باکتری *E.Coli* استفاده می‌شود. در ابتدا با انجام اسیدشویی حسگر فیبرنوری گروه‌های OH موجود در سطح آن(SiO_2) فعال می‌شود و سپس فیبر را دو بار با آب دو باریونیزهشستشو می‌دهیم. اجازه می‌دهیم فیبر به مدت ۳۰ دقیقه در معرض هوا باشد تا خشک شود. این مراحل باعث می‌شود تا فیبر کاملاً تمیز و ضد عفونی شود. در این مرحله از آزمایش ابتدا طیف زمینه که همان محیط کشت بعلاوه نانوذرات می‌باشد را به مدت ۲ ساعت ثبت می‌کنیم. هدف از این کار حذف تاثیر زمینه از نتایج اصلی آزمایش که برهمکنش باکتری با نانوذرات می‌باشد، است. پس از ثبت طیف زمینه حسگر را به آرامی چندین بار با محلول فسفات بافر سالین می‌شوییم و باکتری را با استفاده از پلیمر پلی –ال-لایزین روی فیبر تثبیت می‌کنیم. برای تثبیت باکتری به مدت ۴۵ دقیقه باکتری رقیق شده با رقت 10^{7} را در نگهدارنده مخصوص حسگر می‌ریزیم و بعد این مدت نگهدارنده فیبر را با محلول فسفات بافر سالین چندین بار می‌شوییم تا باکتری‌هایی که پیوند ضعیفی دارند از سطح فیبر جدا شوند. چیدمان آزمایش در شکل (۲) نشان داده شده است.



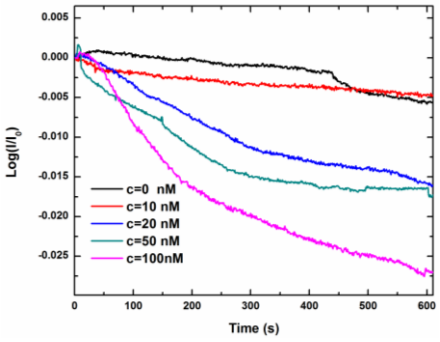
شکل(۲): شماتیک چیدمان تجربی آزمایش‌اندازه‌گیری تغییرات ضریب شکست

سپس برای اندازه‌گیری نرخ رشد باکتری محیط کشت گلوکز با نانوذرات نقره را به نگهدارنده فیبر اضافه می‌کنیم و به مدت ۳ ساعت تغییرات شدت و جابجایی طول موجی طیف مطابق شکل (۳) را ثبت می‌کنیم. با تحلیل داده‌های آزمایش توسط برنامه متلب مشاهده می شود که با افزایش غلظت نانو ذرات نقره شدت خروجی از حسگر کاهش می یابد. تغییرات شدت مشاهده شده در این نتایج ناشی از تغییر ضریب شکست موثر اطراف فیبر در اثر برهمکنش باکتری با نانوذرات می‌باشد. در اثر برهمکنش باکتری با نانوذرات دیواره سلولی باکتری سوراخ شده، ماده سیتوپلاسم داخل سلول به بیرون نشت می‌کند که باعث تغییر ضریب شکست موثر در اطراف حسگر فیبرنوری باریک شده و منجر به تغییرات شدت خروجی می‌شود.



شکل(۳): جابجایی طول موجی وتغییرات شدت در اثر تغییرات ضریب شکست اطراف حسگر فیبرنوری

تغییرات شدت در محیط کشت گلوکز را برای غلظت های مختلف نانوذرات بررسی کردیم و نتایج حاصل از تغییرات شدت برای طول موج‌های کمتر از ۱۵۵۰ نانومتر در شکل (۴) نشان داده شده است.



[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-11-05]

شکل(۴): بررسی تغییرات شدت برای طول موج های کمتر از ۱۵۵۰نانومتر

جدول(۲): ضرایب نرخ رشد باکتری در محیط کشت گلوکز برای غلظت های ۵۰،۲۰،۱۰،۰میکروگرم بر میلی لیتر از نانوذرات نقره در ۱ ساعت اولیهبا استفاده از بیوحسگر فیبرنوری

غلظت نانوذرات (μg/ml)	نرخ رشد باکتری (h^{-1})
C=0	-1.3×10^{-3}
C=10	-1.77×10^{-3}
C=20	-7.5×10^{-3}
C=50	-8.88×10^{-3}

۳-۳ فرآیند برهمکنش نانو ذرات نقره

مکانیزم برهمکنش نانوذرات با سلول‌های باکتری این گونه است که این ذرات پتانسیل غشایی پلاسما را ناپایدار می‌کنند که منجر به کاهش سطح ATP درون سلول می‌شود و این عمل با هدف قرار دادن غشا سلول باکتری انجام می‌شود. همچنین با گروه‌های تیولی آنزیم‌های حیاتی واکنش داده و آنها را غیر فعال می‌کند و به همین علت DNA باکتری، توانایی تکثیر خود را از دست می‌دهد و باعث مرگ باکتری می‌شود. علاوه بر این نانوذرات موجب از هم گسیختن حفاظ موجود در غشا خارجی باکتری می‌شود که باعث آزاد شدن تصاعدی مولکول‌هایی نظیر لیپوپلی ساکارید و پورین‌ها از غشا سیتوپلاسمی می‌شود.[5]

۴ نتیجه‌گیری

در این مقاله اثر ضد باکتری نانوذرات نقره علیه باکتری گرم منفی *E.Coli*با استفاده از حسگر فیبرنوری باریک شده اندازه گیری شد. باکتری ها توسط جذب سطحی با استفاده از پلی ال لایزین بر روی حسگر تثبیت شد و سپس در معرض غلظت های متفاوت نانو ذرات نقره قرار داده شد.با برهمکنش میان باکتری و نانوذرات نقره دیواره سلولی باکتری تخریب شده و محتویات داخل آن بیرون می‌ریزد، این امر سبب می‌شود ضریب شکست موثر در اطراف فیبر باریک شده تغییر کند. این فرآیند موجب تغییر دامنه و فاز میدان میراشونده می‌شود که با تغییرات شدت و جابجایی طول موجی در طیف حسگر فیبرنوری باریک شده می‌شود.نتایج حاصل از چندین بار آزمایش با استفاده از حسگر فیبرنوری باریک شده با تکرار پذیری خوب میزان برهمکنش باکتری با نانوذرات اندازه گیری شد. سپس نرخ توقف رشد باکتری با روش زیستی به صورت موازی مقایسه گردید. با استفاده از حسگر فیبر نوری شیب رشد باکتری برای غلظتهای ۰، ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میلیگرم بر میلی لیتر از نانو ذرات نقره درمحدوده -1.3×10^{-3} تا -8.88×10^{-3}

بدست آمد که نشاندهنده کاهش رشد باکتری با افزایش غلظت نانوذرات می باشد. همچنین با استفاده از روش کشت زیستی برای شیب رشد باکتری غلظتهای ۰، ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میلیگرم بر میلی لیتر از نانو ذرات نقره برابر است با

58.0×10^{-2} تا 35.0×10^{-2}-بدست آمد که نشان می دهد با افزایش غلظت نانوذرات نقره شیب رشد باکتری ها از مقدار مثبت شروع به کاهش به سمت مقادیر منفی را دارد. در هر دو روش مشاهده می شود که با افزایش غلظت نانو ذرات نرخ تخریب باکتری نیز افزایش می یابد.

۵ مراجع

[1].Gupta, Bhagavānadāsa, and Banshi Das Gupta. *Fiber Optic Sensors: Principles and Applications*. New India Publishing, 2006.

[2].Wolfbeis, Otto S., *Fiber-optic chemical sensors and biosensors*. Analytical Chemistry 80.12 (2008) 4269-4283.

[3]. Dutton, Harry JR. *Understanding optical communications*. Prentice Hall PTR, 1998.

[4].Zibaii, Mohammad Ismail, et al. Measuring bacterial growth by refractive index tapered fiber optic biosensor. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 101.3 (2010): 313-320.

[5].Dror-Ehre, A., et al. *Silver nanoparticle-E. coli colloidal interaction in water and effect on E. coli survival*. Journal of colloid and interface science, 339.2 (2009): 521-526.

[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-11-05]