



اندازه گیری نرخ توقف رشد باکتری E.Coli K-12 در حضور نانو ذرات با استفاده از 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 CO₂ 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 شد و 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 inhibition rate of growth of *E.coli*-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 this paper 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 sensor was fabricated using heat-pulling method by CO₂ laser and bacteria immobilized on the optical fiber surface. Then the sensor was surrounded with different concentration of SNP. Also, due to interaction of SNP and immobilized bacteria on the optical fiber surface, changed the effective refractive index around the fiber and this 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 $\mu\text{g ml}^{-1}$ were measured to be from $58.0 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ to $-35.0 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ and from $-1.3 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ to $-8.88 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ 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*, inhibition rate, Silver nanoparticles (SNPs)

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] فیبرهای نوری 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 فیبرهای نوری را گزینه مناسبی برای استفاده در 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 اندازه‌گیری می‌شود و با استفاده از روش زیستی شمارش تعداد کلونی‌ها نتایج آزمایشات صحت‌گذاری می‌گردد.

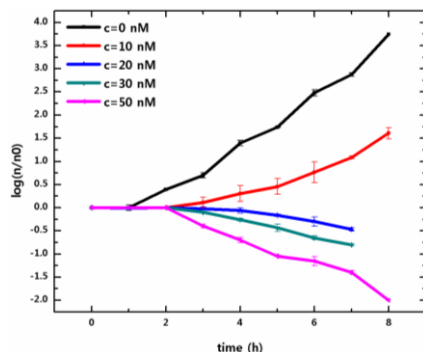
۲ اساس عملکرد حسگر زیستی

با باریک نمودن فیبرنوری با روش کششی-حرارتی، فیبر نوری باریک شده در ناحیه باریک مانند یک تداخل سنج ماخ-زندر عمل می‌نماید. 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 کلونی‌ها اثر غلظت‌های مختلف از نانوذرات نقره بر روی نرخ رشد اندازه‌گیری شد. نتایج بدست آمده از نمودار (۱) نشان می‌دهد که در غلظت $50 \mu\text{g/ml}$ تقریباً 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 غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره

چنانچه در شکل (۱) مشاهده می‌شود برای غلظت $C=0 \mu\text{g/ml}$ در محیط کشت گلوکز پس از ۱ ساعت با شیب ملایمی رشد شروع شده است. همچنین مشاهده می‌شود در غلظت $C=20 \mu\text{g/ml}$ و 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.

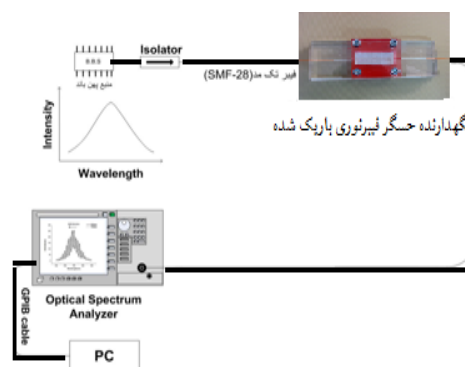
جدول (۱): ضرایب نرخ رشد باکتری در محیط کشت گلوکز برای غلظت‌های $50, 30, 20, 10, 0$ میلی‌گرم بر میلی لیتر از نانوذرات نقره با روش شمارش کلونی

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

$$C=50 \quad -35.0 \times 10^{-2}$$

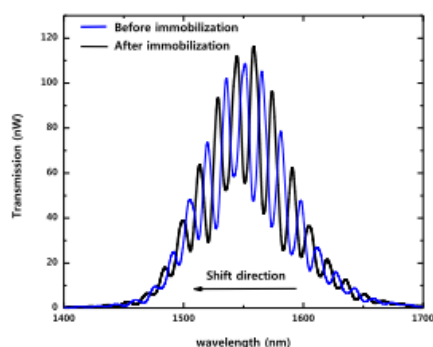
۲-۳ اندازه‌گیری تاثیر نانوذرات بر روی نرخ رشد باکتری با استفاده از حسگر فیبرنوری باریک شده

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 بار یونیزه‌شستشو 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 می‌شوئیم و باکتری را با استفاده از پلیمر پلی -ال-لازین 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 می‌شوئیم تا باکتری‌هایی که پیوند ضعیفی دارند از سطح فیبر جدا شوند. چیدمان آزمایش در شکل (۲) نشان داده شده است.



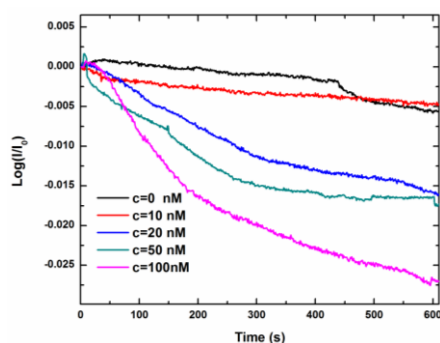
شکل (۲): شماتیک چیدمان تجربی آزمایش اندازه‌گیری تغییرات ضریب شکست

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 مشاهد می‌شود که با افزایش غلظت نانو ذرات نقره شدت خروجی از حسگر کاهش می‌یابد. 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 و تغییرات شدت در اثر تغییرات ضریب شکست اطراف حسگر فیبرنوری

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



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

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

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

۳-۳ فرآیند برهمکنش نانو ذرات نقره

مکانیزم برهمکنش نانوذرات با سلول های باکتری این گونه است که این ذرات پتانسیل غشایی پلازما را ناپایدار می کنند که منجر به کاهش سطح ATP درون سلول می شود و این عمل با هدف قرار دادن غشا سلول باکتری انجام می شود. همچنین با گروه های تیولی آنزیم های حیاتی واکنش داده و آنها را غیر فعال می کند و به همین علت DNA باکتری، توانایی تکثیر خود را از دست می دهد و باعث مرگ باکتری می شود. علاوه بر این نانوذرات موجب از هم گسیختن حفاظ موجود در غشا خارجی باکتری می شود که باعث آزاد شدن تصاعدی مولکول هایی نظیر لیپوپلی ساکارید و پورین ها از غشا سیتوپلاسمی می شود. [5]

۴ نتیجه گیری

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 می ریزد، این امر سبب می شود ضریب شکست موثر در اطراف فیبر باریک شده تغییر کند. این فرآیند موجب

تغییر دامنه و فاز میدان میراثونده می شود که با تغییرات شدت و جابجایی طول موجی در طیف حسگر فیبرنوری باریک شده می شود. 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 غلظت های ۰، ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میلیگرم بر میلی لیتر از نانو ذرات نقره در محدوده -8.88×10^{-3} تا 1.3×10^{-3}

بدست آمد که نشان دهنده کاهش رشد باکتری با افزایش غلظت نانوذرات می باشد. همچنین با استفاده از روش کشت زیستی برای شیب رشد باکتری غلظت های 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, Bhagavānādāsa, 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.