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

اکرم شکوری مقدم[۱] ، سیده زهرا شورشینی[۱]، حمیدرضا شیروانی مهدوی [۲]،زهرا خدابخشی[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 درطبقه 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 درکاربرد 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 moghaddam[1], seyedeh Zahra Shorsheyni[1], Hamid Reza Shirvani Mahdavi[2], Zahra Khodabakhshi[3]

1-College of Physical Chemistry, Alzahra University, Tehran

2- Azad University, Central Unit 3-Shahroud 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

[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-06-18]

این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد

۱- مقدمه

باکتری‌ها میکروارگانیسم های بسیارکوچکی با ابعاد حدود (10^{-6}m) یا کوچکتر با اشکال مختلف می‌باشند[1]. دیواره سلولی باکتری نقش مهمی در شناسایی وتفکیک بین آن ها ایفا می کند، معمولا باکتری ها براساس دیواره خارجی به دونوع گرم مثبت و گرم منفی طبقه بندی می شوند. این طبقه بندی براساس یک نوع رنگ آمیزی گرمی است که در سال ۱۸۸۴ توسط هانس کریستین گرم توسعه داده شد.[2] باکتری‌ها دارای ترکیبات پیچیده مولکولی می‌باشند. درجدول۱ ترکیبات مولکولی غشای خارجی باکتری ها نشان داده شده است.

جدول ۱: اجزا غشا خارجی باکتری ها

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

وجود عناصر معدنی مانندMg ،P ، Caو Na در بدن باکتری‌ها و شاید به طور خاص درLPS ، برآورد امکان بررسی و شناسایی باکتری ها به کمک روش های بیناب نگاری را محتمل می سازد. همچنین Ca^{2+}و Mg^{2+} به طور خاص نقش مهمی در تثبیت LPSهای مجاور دارند(3).

طبق آمار، به دلیل وجود انواع باکتری ها در محیط و مواد غذایی سالانه تعداد زیادی از افراد دچاره بیماری شده وحتی جانشان را از دست می دهند. اگر امکان شناسایی سریع ونوع این باکتری ها فراهم شود، می توان از بسیاری مرگ و میر های ناشی از آن‌ها جلوگیری کرد. روش های فعلی شناسایی باکتری ها با وجودی که روش‌های دقیقی هستند، درمقایسه با مدت لازم برای درمان آن‌ها بسیار زمان برند، از طرفی با توجه به این که هر آزمون قابلیت شناسایی یک میکروارگانیسم خاص را دارد، عدم امکان شناسایی سریع باعث شیوع بسیاری از بیماری ها می شود[4].

بیناب نگاری فروشکست القایی (LIBS) یکی از ابزار های قدرتمند برای تجزیه و تحلیل همه عناصر تشکیل دهنده مواد به طور همزمان می باشد. دراین روش ثبت بیناب با سرعت بالا وبه صورت آنی انجام می‌شود. همچنین تجزیه و تحلیل بیناب‌های حاصل از آن به صورت درلحظه امکان پذیر است که خود موجب سرعت عمل بالای (LIBS) می شود. در کار حاضر از روش LIBS با کمک تحلیل تابع تشخیصی امکان جداسازی و تشخیص دو نوع باکتری به عنوان نماینده ای از گروه های گرم مثبت و گرم منفی بررسی شد.

۲- مواد و روش

طرح واره ای از چیدمان LIBS در شکل (۱) نشان داده شده است. این چیدمان شامل یک لیزر Qسوئیچ Nd:YAG است که از طول موج ۱۰۶۴ نانومتر ،دیرپایی ۵ns با نرخ تکرار ۱ هرتز استفاده شده است. انرژی لیزر ۱۶۳mJ/pulse تنظیم شده، برای کانونی سازی نورلیزر برروی نمونه از یک عدسی همگرا با فاصله کانونی ۲۰cm استفاده شده، نمونه ها برای سهولت برروی 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 وبه سر آن یک عدسی متصل است جمع آوری وبه بیناب نگار S-150 با قدرت تفکیک ۰.۴ نانومتر در گستره ۲۰۰تا۸۰۰ نانومتر برای ثبت بیناب منتقل شد.

شکل ۱: چیدمان LIBS

۲-۲ نمونه ها

ابتدا مقدار سه لیتر از هرکدام از سویه‌های IBRC-M10742Bacillussubtilis(گرم‌مثبت)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-50^0C لیوفلیز شد. در نهایت پودر لیوفلیز باکتری‌ها بااستفاده از دستگاه قرص ساز تبدیل به قرص‌هایی با قطر۱۳mm وضخامت ۲mm شدند.

این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد

[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-06-18]

۲- ۲روش 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 متغیر های 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:

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

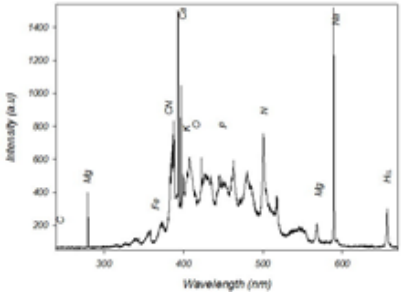
که در آن DF، تابع تشخیص و $b_1,b_2,...$ مقادیر ضریب تشخیص یا ضریب وزنی هر متغیر و x_k متغیرهای مستقل هستند. تعداد تابع تشخیص همیشه برابر تعداد طبقات متغیر منهای یک است. تحلیل تشخیصی شناسایی متغیر های تفکیک کننده را در دومرحله انجام می‌دهد. در مرحله اول از آزمون F (وبرحسب لاندای ویلکس) برای آزمون معنا داری کل مدل استفاده می‌شود؛ 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 آن‌ها 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 سهیم نیستند ومیزان اثر گذاری هر عنصررا ضرایب تابع تفکیک مشخص می کند[۵].

۳- نتایج و بحث

ابتدا با تابش لیزر درنقاط مختلف نمونه‌ها برای هر قرص ۲۰ طیف LIBS به دست آمد.به عنوان نمونه در شکل‌های ۲و۳ به ترتیب طیف‌های LIBS حاصل از نمونه‌های باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت مشاهده می‌شود. خط‌های طیفی مشاهده شده در بیناب‌ها متعلق به ۸ عنصر موجود در طیف باکتری‌ها شامل گونه‌های منیزیم، کلسیم، آهن، پتاسیم، نیتروژن، اکسیژن و کربن که در جدول ۲ درج شده، می‌باشند. همانطور که انتظار می رود (جدول ۲) ساختار طیفی هر دو نمونه مشابه می‌باشد و تفاوت کیفی، بین بیناب دو باکتری مشاهده نمی‌شود. به منظور جداسازی نمونه‌هایی 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 ۲به عنوان متغیرهای مستقل جهت تعیین تابع تشخیص به کمک نرم افزار SPSS.ver22 مورد استفاده قرار گرفت نتیجه تفکیک در جدول ۲خلاصه شده است.

جدول۲ : خطوط مربوط به گونه های شناسایی شده

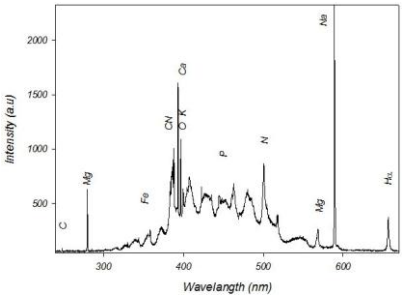
طول موج(nm)	نام عنصر	طول موج(nm)	نام عنصر
۴۰۴/۷۲	K II	۲۴۷/۴۵	C I
۴۰۷/۵۸	O II	۲۷۹/۵۵	Mg II
۴۲۲/۴۷	Ca I	۲۸۰/۲۰	
۴۳۴/۰۴	H I	۳۵۸/۱۱	Fe I
۶۵۶/۲۸		۳۸۳/۴۲	
۴۶۰/۲۰	P II	۳۸۶/۱۳	CN
۴۸۰/۴۲	K I	۳۸۷/۰۸	
۴۸۵/۶۰		۳۸۸/۲۹	
۵۱۷/۲۶	Mg I	۳۹۳/۳۶	
۵۱۸/۳۶		۳۹۶/۸۴	Ca II
۵۸۸/۹۹	Na I	۵۰۰/۵۱	N II



شکل ۲ : بیناب LIBS باکتری E.coli

این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد

[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-06-18]



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 ونتیجه تفکیک حاصل درجدول ۳ آورده شده است.

Classification Results[a]

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

همانطور که از جدول ۳مشخص است به کمک تابع تشخیص دونوع باکتری گرم مثبت و گرم منفی بادقت ۱۰۰٪ از یکدیگر تفکیک شدند. شکل‌های ۴و۵ نمودارهای ستونی تابع تشخیص را برای دو باکتری نمایش می دهد. این شکل‌ها نیز بیانگر تفکیک کامل این دو باکتری از یگدیگر می‌باشند. 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 می‌دهد. به این ترتیب می‌توان به کمک تحلیل طیف‌های LIBS با روش آماری ساختارهای متفاوت مولکولی با عناصر سازنده مشابه را تشخیص داد .

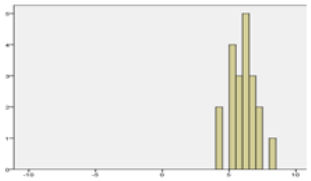
Canonical Discriminant Function1 (VAR1=E.coli)

Mean=5.99

Std.Dev =0.998

N=20

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



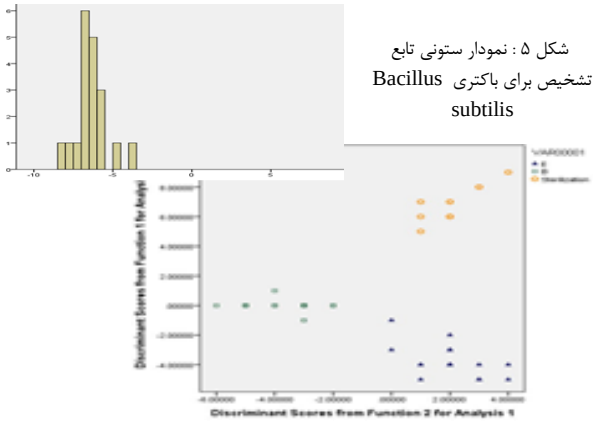
Canonical Discriminant Function1 (VAR1=B.Sub)

Mean=-6.30

Std.Dev =1.002

N=20

شکل ۵ : نمودار ستونی تابع تشخیص برای باکتری Bacillus subtilis



شکل۶ : نمودار دوبعدی تابع تشخیص برای تفکیک ماده استرلیزه

نتیجه‌گیری

در کار حاضر نشان داده شد که می توان به کمک بیناب نگاری LIBS و به کارگیری خطوط گسیلی مشخصه‌ی گروهی همه عناصر سازنده نمونه به کمک کاربرد روش تابع تشخیصی وجود باکتری‌های گرم مثبت ومنفی 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.

این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد

[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-06-18]