نهمین کنگره ملی مهندسی شیمی ایران

دانشگاه علم و صنعت ایران
۳-۵ آذر ماه ۱۳۸۳

اندازه گیری غلظت سلولی و تعیین کیفیت آن به صورت On-lineتوسط حسگرهای خازنی

محمدحسین صراف زاده[×] ، جان-مری ناوارو

UMR IR2B, CC23, UM2, 34095 Montpellier, France

mhsarraf@univ-montp2.fr

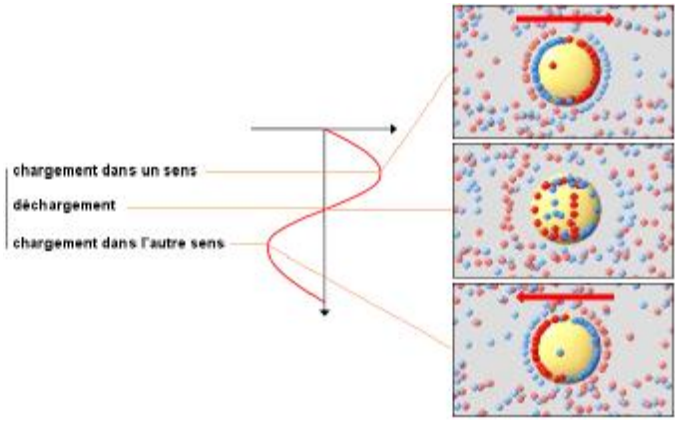
چکیده

در یک فرایند کشت میکربی تعیین غلظت بیومس از اهمیت بسیاری برخوردار است، چرا که این پارامتر در طراحی ،کنترل، بهینه سازی و افزایش مقیاس یک فرایند تخمیر مورد نیاز است، اندازه گیری بیومس بر مبنای خواص دی الکتریک سلولی سالیان درازی است که مورد توجه محققین بوده است و لیکن استفاده عملی از آن تنها در سالیان اخیر و پس از غلبه بر مشکلات تکنیکی آن محقق شده است، در این روش با در نظر گرفتن سلول به عنوان یک خازن، کاپاسیتانس حاصل از القای یک میدان الکتریکی در محیط کشت با غلظت سلولی متناسب می گردد، این تناسب تنها میان سلولهای زنده برقرار می شود و به همین دلیل این روش قادر به تفکیک فازهای فیزیولوژیک در یک کشت سلولی می باشد، در این مقاله استفاده از این تکنیک در کشت یک باکتری اسپرولانت مورد مطالعه قرار گرفته است، در طول کشت نیمه پیوسته باسیلوس تورینجنسیس در یک فرمانتور ۲۰ لیتری، بیومس با روشهای دیگری چون دانسیته نوری، وزن خشک وشمارش سلولی نیز اندازه گیری شد، ارتباط میان این اندازه گیریها و کاپاسیتانس امکان تفکیک سه فاز مشخص : رشد، انتقالی و اسپرولاسیون را به صورت در جا فراهم نمود، کاهش کاپاسیتانس در فاز اسپرولاسیون نیز نشان داد که درصد توسعه اسپرولاسیون را می توان به راحتی بر مبنای این کاهش تخمین زد،

کلمات کلیدی: بیومس، پلاریزاسیون، کاپاسیتانس، اسپرولاسیون، باسیلوس

مقدمه

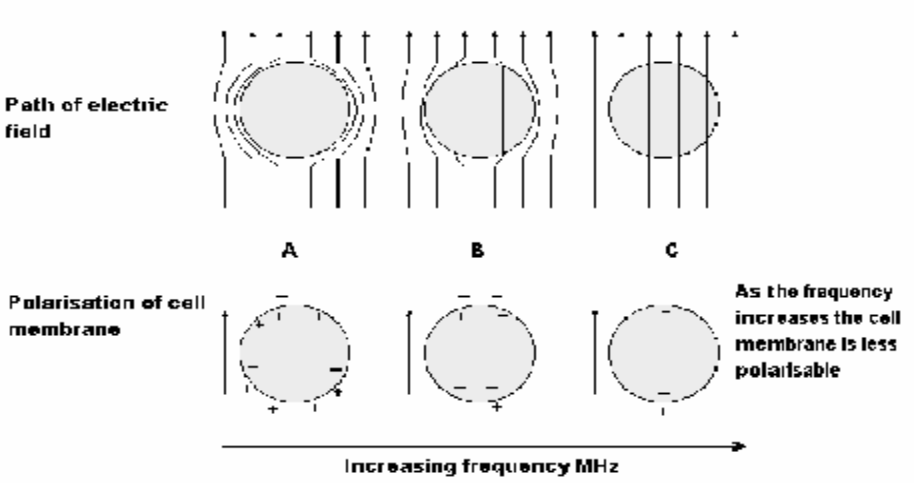
حال اگر یک میدان الکتریکی آلترناتیو القا شود، سلولها شارژ، دشارژ و سپس دوباره شارژ در جهت مخالف می شوند (شکل ۲).



شکل ۲. پلاریزاسیون سلولی تحت القای میدان الکتریکی آلترناتیو

اما جابجایی یونها درون سلول و دو قطبی شدن آن به یک حداقل زمانی نیاز دارد و لذا فرکانس میدان تعیین کننده میزان پلاریزاسیون و در نتیجه میزان کاپاسیتانس میباشد (شکل ۳). بطوریکه اگر فرکانس از حدی بیشتر شود، سلولها فرصت کافی جهت پلاریزاسیون پیدا نمی کنند و مشارکت آنها در کاپاسیتانس حاصل از محیط کشت به صفر کاهش می یابد. فرکانس استفاده شده در این تحقیق در بخش مواد و روشها ذکر خواهد شد.

باکتری های اسپورزا دسته ای مهم از میکروارگانیسم های صنعتی را تشکیل می دهند که در تولید آنتی بیوتیک ها، آنزیم ها، حلال های آلی و حشره زداها کاربرد دارند [۱ و ۶]. در این مقاله استفاده از تکنولوژی کاپاسیتانس در کشت یک نمونه از این باکتری ها بررسی می شود.



شکل ۳. تاثیر فرکانس در میزان پلاریزاسیون سلولی

مواد و روشها

ترکیب محیط های کشت و خوراک استفاده شده در طول کشت نیمه پیوسته در جدول ۱ داده شده اند.

در صورت لزوم pH محیط کشت با سود ۳ مولار در ۶،۸ تنظیم گردید.

جدول ۱

Components (g/l)	Preculture	Culture	Feeding
Glucose	10	5	240
Hydrolyzed casein	-	4.5	155
Yeast extract	2	0.5	25
Ammonium sulphate	1.47	6	-
K_2HPO_4	1.5	1.4	-
KH_2PO_4	1.5	1.4	-
$MgSO_4$, 7 H_2O	0.5	0.61	-
$CaCl_2$	0.06	0.332	-
$MnSO_4$, H_2O	0.05	0.006	-

از سوش باسیلوس تورینجنسیس H14 (Ecautec) استفاده شد که در لوله آزمایش تکثیر یافت.

۵۰۰ میلی لیتر از محیط پیش کشت در یک ارلن ۵ لیتری بر روی یک میز چرخان در ۳۰ درجه سانتیگراد و به مدت ۹ ساعت کشت داده شد.

این ارلن جهت تلقیح ۹ لیتر محیط کشت موجود در یک فرمانتور ۲۰ لیتری استریل بکار رفت. تخمیر در ۳۰ درجه سانتیگراد و بصورت بچ آغاز شد. سطح اکسیژن محلول در بیش از ۲۰ درصد اشباع کنترل گردید. پ-هاش در ۶،۸ و فقط در طول فاز رشد با افزودن سود کنترل گردید. از ضد کف سیلیکونی جهت کنترل کف استفاده شد. کشت نیمه پیوسته در چهارمین ساعت کشت آغاز و تا بیست و چهارمین ساعت آن با دبی ثابت ۱۵۰ میلی لیتر بر ساعت ادامه یافت. در اواسط کشت نیمه پیوسته محلول غلیظی از نمک های مشخصی به فرمانتور افزوده شد.

فرمانتور مجهز به یک سنسور نوری و یک سنسور کاپاسیتیو جهت اندازه گیری در جای غلظت بیومس بود. پاسخ سنسور نوری خطی نمی باشد و لذا با استفاده از معادله تجربی زیر، بدست آمده از رقت های مختلف محیط کشت، تصحیح گردید:

$$OD_L = OD_m + 0.0288\left(e^{3.244 OD_m} - 1\right)$$

که در آن:

OD_L : Linearized optical density

OD_m : Measured optical density.

اما سنسور کاپاسیتیو غلظت بیومس را از طریق اندازه گیری تفاوت کاپاسیتانس در دو فرکانس ۲ و ۱۰ مگاهرتز تعیین می نمود. شکل ۴ دستگاه مورد استفاده را نشان می دهد.

جهت مقایسه، بیومس به صورت آف-لاین و توسط روشهای سنتی نیز اندازه گیری شد. وزن خشک با فیلتراسیون محیط کشت روی میکروفیلترهای ۰،۲ میکرن و سپس خشک کردن آن بدست آمد. دانسیته نوری نیز با رقیق کردن نمونه ها و اندازه گیری در ۵۴۰ نانومتر در یک اسپکتروفتومتر تکرار شد.

شکل ۴. دستگاه مورد استفاده در اندازه گیری کاپاسیتانس .FOGALE nanotech

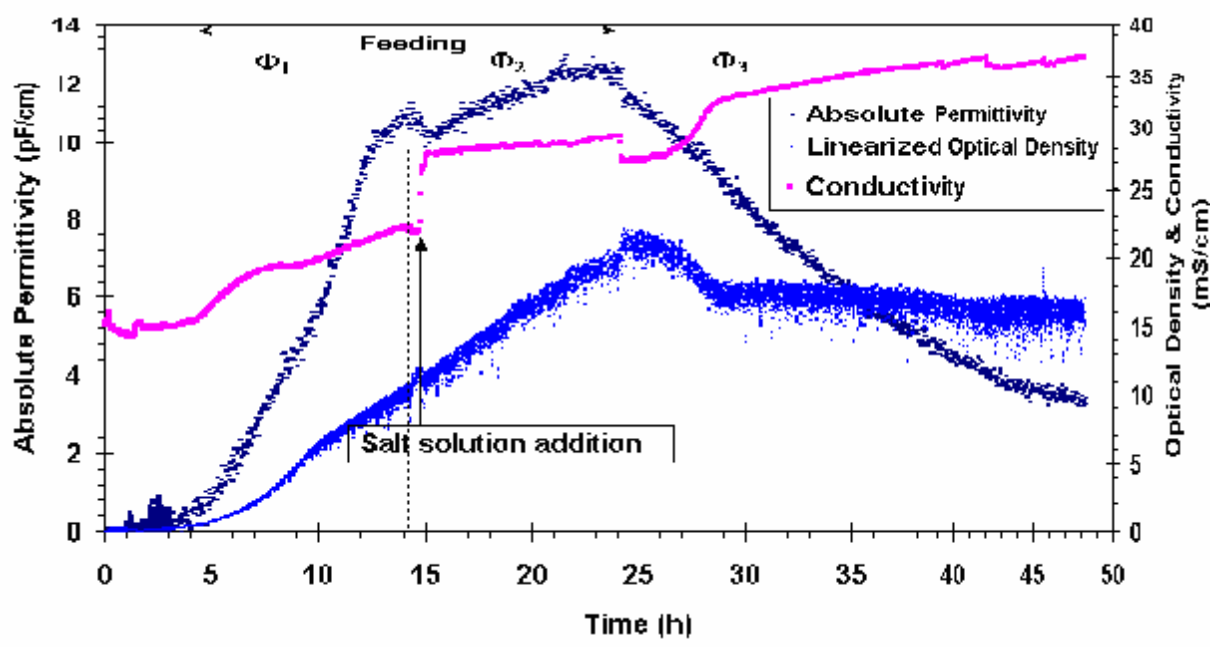
اسپرولاسیون با استفاده از یک میکروسکپ مجهز به تمایز فاز بررسی گردید. هموسیتومتر توما جهت شمارش کل سلولها، سلولهای اسپر شده و اسپرهای آزاد مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج و بحث

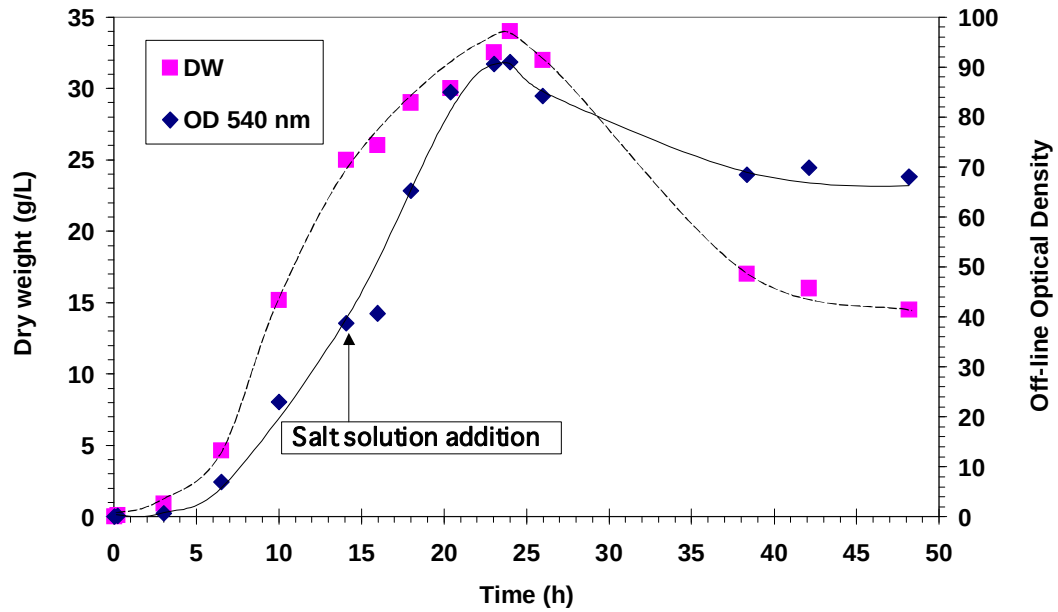
نتایج حاصل از یک کشت نیمه پیوسته باسیلوس تورینجنسیس در شکل های ۵ تا ۷ نمایش شده اند. اندازه گیری های آن-لاین دانسیته نوری و پرمیتیویته (کاپاسیتانس) و همچنین آف-لاین وزن خشک، شمارش سلولی و دانسیته نوری در ۵۴۰ نانومتر بیانگر نحوه رشد در ترم های مختلف هستند. اسپرولاسیون به صورت درصد سلول هایی که در حال اسپر شدن هستند خواه سلول مادر آنها لیز شده و یا نشده باشد به تعداد کل سلول های شمارش شده بیان شده است. درصد اسپرهایی نیز که به طور کامل از سلول مادر لیز شده خود آزاد شده اند، جداگانه آورده شده است.

بطوریکه در شکل ۵ دیده می شود، پرمیتیویته همچون سایر اندازه گیریها تا چهاردهمین ساعت افزایش می یابد ولی پس از آن دچار کاهشی شده که در سایر اندازه گیریها مشاهده نمی شود. یک محلول نمکی به عنوان تقویت کننده رشد در این ساعت به محیط کشت اضافه شد، چرا که این کاهش می تواند نمایشگر ورود به فاز اسپرولاسیون باشد. در واقع اسپرولاسیون شامل چندین مرحله توسعه مورفولوژیک می باشد که یکی پس از دیگری مانند یک ساعت از پیش برنامه ریزی شده انجام می گیرند [۷ و ۱۱]. در سومین مرحله از اسپرولاسیون ممبران سلولی به طور موقت شکافته می شود تا تشکیل پری اسپر دهد. این نخستین مرحله برگشت ناپذیر در اسپرولاسیون می باشد که تشخیص به موقع آن در کنترل فرمانتاسیون بسیار حائز اهمیت است. خصوصا آنکه این مرحله به صورت میکروسکپی قابل مشاهده نیست و تنها از مرحله چهارم به بعد

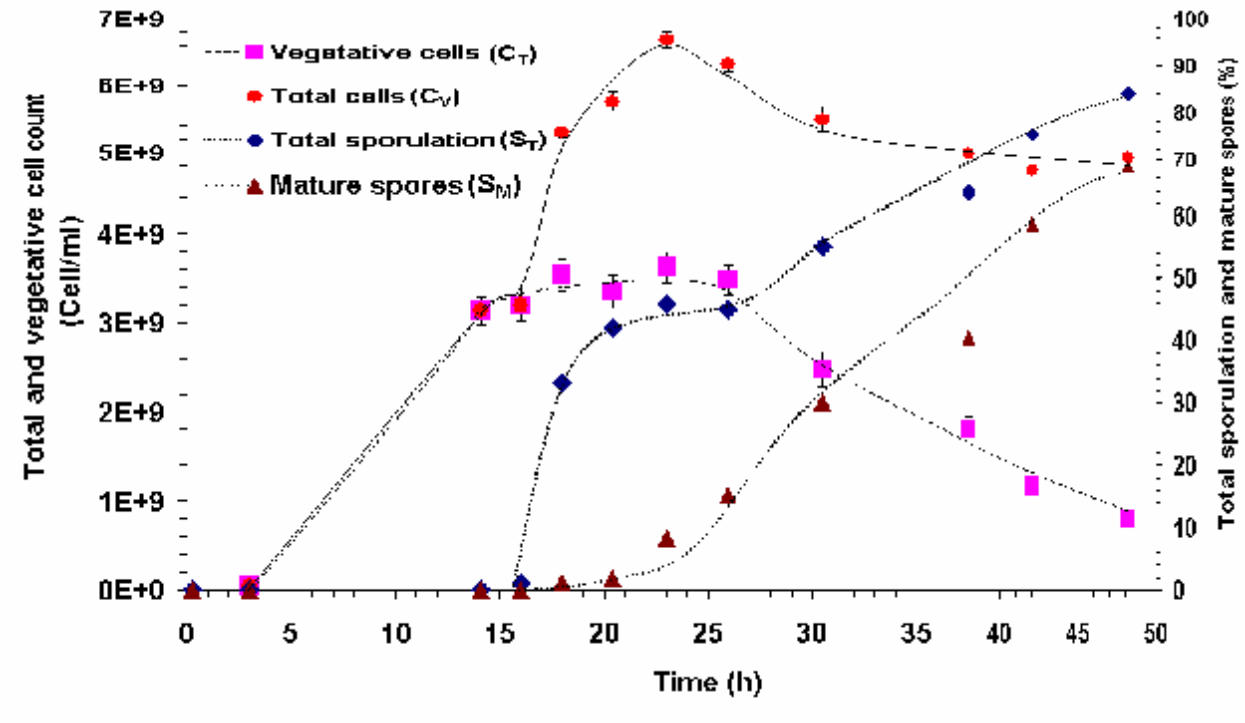
اسپرولاسیون، سلول در حال اسپرولاسیون قابل رؤیت است که حدود ۴ ساعت با شروع اسپرولاسیون فاصله دارد [۹]. در اینجا نیز این کاهش پرمیتیویته با اولین موج مشاهده میکروسکپی اسپرولاسیون در هجدهمین ساعت همخوانی دارد (شکل ۷). پرمیتیویته مجددا شروع به افزایش میکند تا ۲۴مین ساعت که پایان کشت نیمه پیوسته است. پس از آن بیومس مطابق کلیه اندازه گیریها تا پایان فرمانتاسیون شروع به کاهش می کند ولی این بار نیز کاهش آن بر مبنای پرمیتیویته بسیار قابل توجه تر است.



شکل ۵. پیگیری آن-لاین بیومس بر مبنای تغییرات پرمیتیویته، کنداکتیویته و دانسیته نوری در کشت ناپیوسته باسیلوس تورینجنسیس



شکل ۶. پیگیری آف-لاین بیومس بر مبنای وزن خشک و دانسیته نوری در کشت ناپیوسته باسیلوس تورینجنسیس



شکل ۷. پیگیری آف-لاین بیومس و اسپرولاسیون بر مبنای شمارش های سلولی

لذا سه فاز مشخص بر طبق منحنی تغییرات پرمیتیویته قابل رؤیت است: یک فاز رشد سریع تا ۱۴ ساعت، سپس فاز رشد آهسته بین ۱۴ تا ۲۴ ساعت و در نهایت فاز اسپرولاسیون (شکل ۵). نکته جالب توجه دیگر در خصوص پرمیتیویته پایدارتر بودن سیگنال آن در مقایسه با دانسیته نوری است، بطوریکه علیرغم هوادهی و همزدگی شدید و همچنین تغییرات زیاد کنداکتیویته، نوسان سیگنال آن در حد ۰،۵ پیکوفاراد باقی مانده است.

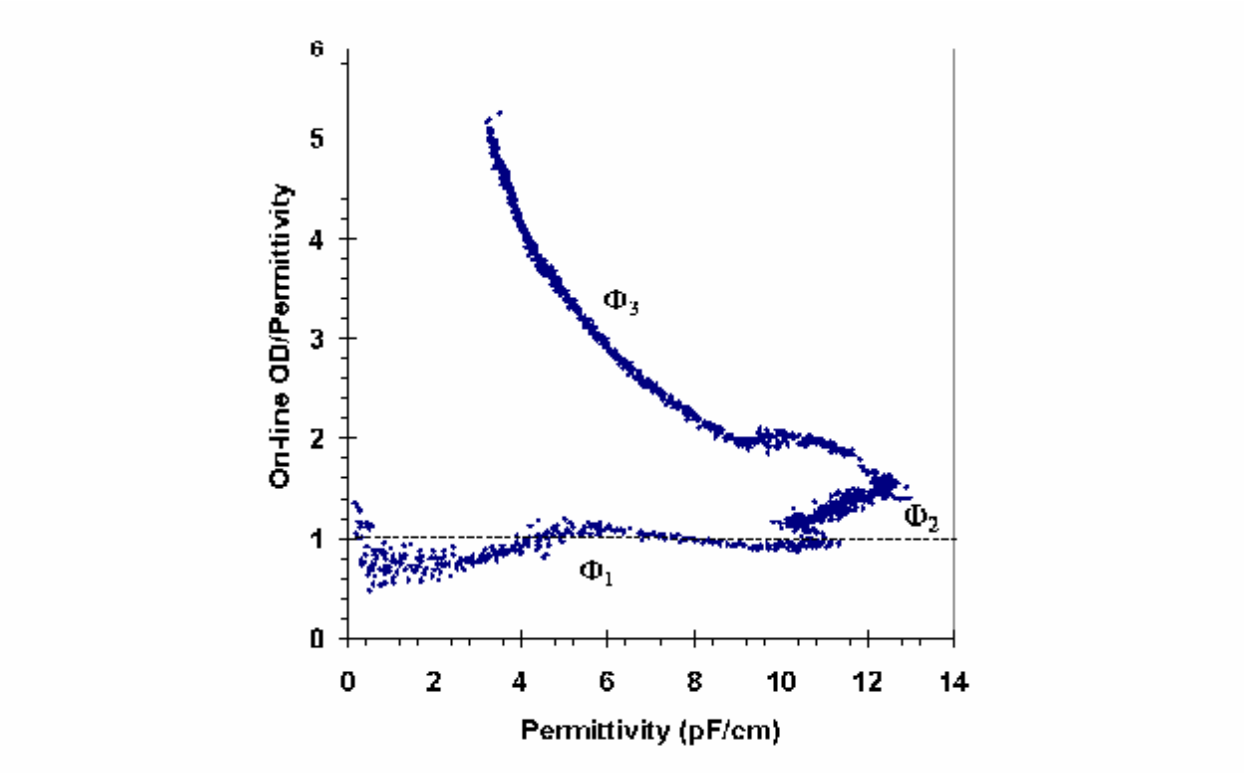
کاهش پرمیتیویته در فاز اسپرولاسیون کاملا با کاهش سلول های وژتاتیو و افزایش اسپرولاسیون هماهنگی دارد (شکل های ۵و۷) و به همین دلیل می تواند در تخمین آن-لاین درصد اسپرولاسیون بکار گرفته شود. اما از این مهمتر اینکه در صورت بکارگیری همزمان دو حسگر پرمیتیویته و دانسیته نوری می توان تغییر فاز فیزیولوژیک محیط کشت را بصورت آن-لاین تشخیص داد. برای بیان بهتر موضوع نسبت دانسیته نوری به پرمیتیویته بر حسب پرمیتیویته و با استفاده از همان داده های شکل ۵ مجددا در شکل ۸ رسم شده است. بطوریکه دیده می شود هنگامیکه این نسبت حدود ۱ می باشد کشت در فاز رشد خود قرار دارد. نسبت بین ۱ و۲ بیانگر یک فاز انتقالی است و در نهایت مقادیر بزرگتر از ۲ نشاندهنده فاز اسپرولاسیون خواهد بود.

نتیجه گیری

۱. در میان تکنیک های اندازه گیری بیومس تکنیک کاپاسیتانس تنها تکنیکی است که قادر به تعیین میزان حیات پذیری جمعیت سلولی بصورت آن-لاین می باشد و قادر است دو ترم زیر را از هم تفکیک نماید:

$$\text{Biomass} \neq \text{Necromass}$$

۲. این تکنیک به اندازه گیری ساده بیومس ختم نمی شود بلکه اطلاعات ذیقیمت کمی و کیفی از محیط کشت در اختیار می گذارد.



شکل ۸. تشخیص آن-لاین تغییر فاز فیزیولوژیک بر مبنای نسبت دانسیته نوری به پرمیتیویته

۳. کاربرد این تکنیک در باکتری های اسپرزا می تواند نقطه واقعی شروع اسپرولاسیون را که از مباحث پر چالش بین محققین می باشد تعیین نماید و تغییر فازهای فیزیولوژیکی را به صورت آن-لاین نشان دهد.

منابع و مراجع

1. Buchanan RG, Gibbon NE , Endospore forming rodes and cocci. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th edn. Baltimore: Williams & Wilkins Co., pp. 529-545, 1974.
2. Davey CL, Davey HM, Kell DB, Todd RW , Introduction to the dielectric estimation of cellular biomass in real time, with special emphasis on measurements at high volume fractions. *Analytica Chimica Acta.* 279: 155-16.
3. Gencer MA, Mutharasan R , Determination of biomass concentration by capacitance measurement. *Biotech. Bioeng.* 21: 1097-1103, 1979.
4. Gheorghiu E, Asami K , Monitoring cell cycle by impedance spectroscopy: experimental and theoretical aspects. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 45: 139-143, 1998.
5. Kell DB, Samworth CM, Todd RW, Bungard SJ, Morris JG, Real-time estimation of microbial biomass during fermentation, using a dielectric probe. *Studia Biophysica.* 119: 153-156, 1987.
6. Liu W, Bajpai R, Bihari V , High-density cultivation of sporeformers. In: Bajpai RK, Prokop A, eds. *Annals of the New York Academy of Sciences,* Vol. 721. The New York Academy of Sciences, pp. 310–325, 1994.
7. Losick R, Youngman P, Piggot PJ , Genetics of endospore formation in *Bacillus subtilis. Ann. Rev. Genet.* 20: 625-669, 1986.
8. Schwann H.P. , Electrical properties of tissue and cell suspensions. *Adv. Biol. Med. Phys.*, 5: 147-209, 1957.
9. Setlow P , Mechanisms which contribute to the long term survival of spores of *Bacillus* species. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 49S-69S, 1994.
10. Siano SA , Biomass measurement by inductive permittivity. *Biotech. Bioeng.* 55: 289-304, 1997.
11. Stragier P, Losick R , Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis. Ann. Rev. Genet.* 30: 297-341, 1996.
12. Yardley J.E., Kell D.B., Barrett J., Davey C.L. , On-line, real-time measurements of cellular biomass using dielectric spectroscopy. *Biotechnol. Gen. Eng. Rev.*, 17: 3-35, 2000.