

# Indice

<b>1</b>	<b>Colture batteriche: monitoraggio della crescita</b>	<b>5</b>
1.1	Crescita batterica . . . . .	5
1.2	Fasi della crescita batterica . . . . .	6
1.2.1	Fase di latenza . . . . .	6
1.2.2	Fase esponenziale (o logaritmica) . . . . .	7
1.2.3	Fase stazionaria (o di <i>plateau</i> ) . . . . .	7
1.2.4	Fase di morte . . . . .	8
1.3	Crescita batterica e cellule competenti . . . . .	9
1.3.1	Cellule competenti . . . . .	9
1.3.2	Protocollo per l'ottenimento di cellule competenti . . . . .	9
1.3.3	Condizioni ottimali di crescita batterica per l'ottenimento di cellule competenti efficienti . . . . .	11
<b>2</b>	<b>Set-up ottico per il monitoraggio della crescita batterica mediante misure <i>real-time</i> di trasmittanza</b>	<b>14</b>
2.1	Metodi tradizionali di rilevazione della crescita batterica . . . . .	14
2.2	Prototipo di un sensore ottico per la rilevazione <i>real-time</i> della crescita batterica . . . . .	17
<b>3</b>	<b>Risultati sperimentali</b>	<b>21</b>
3.1	Misure preliminari: <i>testing</i> dell'apparato sperimentale . . . . .	21
3.1.1	Primo test: variazioni discontinue della densità del campio- ne monitorato . . . . .	22

3.1.2	Secondo test: variazioni quasi-continue della densità del campione monitorato . . . . .	23
3.2	Monitoraggio <i>real-time</i> della variazione di torbidità di una coltura di <i>E. coli</i> in sospensione . . . . .	26

# Introduzione

I recenti sviluppi tecnologici nell'ambito delle scienze biologiche hanno permesso l'automazione di alcuni processi relativi alla preparazione e analisi di campioni cellulari. Spesso i metodi tradizionali di analisi necessitano infatti di controlli e campionamenti periodici che, se affidati ad un operatore, rallentano e riducono l'efficienza del processo stesso. In particolare, le tecnologie basate sulla manipolazione della luce permettono la realizzazione di sensori in grado di monitorare in maniera continua e automatica processi biologici variabili nel tempo, liberando l'operatore dalla necessità di campionare il materiale ad intervalli di tempo discreti.

Lo studio della crescita batterica ha permesso lo sviluppo di nuove tecniche applicate alla biologia molecolare e alla genetica, tecniche capaci di ricombinare e manipolare il DNA sfruttando le proprietà biosintetiche dei batteri. Tra queste la procedura di rendere le cellule batteriche competenti, ovvero rendere la membrana cellulare permeabile all'ingresso di molecole di DNA estraneo, di solito vettori (p.e. batteriofagi). La permeabilità della membrana è un processo transitorio (vedere cap. 2).

L'automatizzazione delle culture batteriche è oggetto di studio di grande interesse. Ad esempio, un articolo recente[1] descrive lo sviluppo di un metodo automatizzato per il monitoraggio del processo di crescita di *Escherichia coli*, creando procedure di controllo del pH, della densità ottica e delle concentrazioni di glucosio e acetato nelle colture, in appena 200 MicroL di volume.

Nel presente lavoro di tesi sono riportati i risultati relativi alla progettazione, realizzazione e *testing* di un sensore ottico in grado di monitorare la crescita di una coltura batterica (nel nostro caso *E. coli*) in maniera continua nel tempo. *E. coli* viene usualmente utilizzata nel campo della biologia molecolare per la realizzazione di cellule competenti.

Il protocollo tradizionale prevede un controllo dell'assorbanza ogni 20 minuti, utile per definire la concentrazione batterica. Tale verifica viene effettuata prelevando, in fase di crescita, un campione della coltura e analizzandolo mediante misura spettrofotometrica. Utilizzando questa procedura si corre il rischio che la densità ottica superi il valore atteso ottimale senza che l'operatore se ne accorga, un rischio al quale si può ovviare misurando in maniera continua l'intensità di luce trasmessa dalla sospensione cellulare illuminata da un fascio laser. Il segnale fornito dal sensore è correlato alla concentrazione della coltura che potrà "pilottare", una volta raggiunto il valore corrispondente alla densità ottica desiderata, un segnale acustico che possa avvertire l'operatore o un segnale di attuazione che possa portare la coltura, mediante un termostato, dalla temperatura di crescita a quella di quiescenza.

Il sensore sfrutta la legge di Lambert e Beer (cap 2) per controllare la crescita batterica in un mezzo di coltura liquido di 10ml. L'obiettivo del sensore è seguire la crescita di *E. coli* in maniera continuativa nel tempo. I sistemi ottici sono efficaci nel monitorare bioprocessi perchè non interferiscono con il metabolismo delle cellule, consentendo un monitoraggio in vivo non invasivo e che non altera il processo stesso, come spiegato nell'articolo di Marose *et al.*[2], dove sono consigliate diverse tecniche spettrofotometriche. La tecnica da noi utilizzata è quella della densità ottica (cap. 2).

L'efficienza di trasformazione si calcola in base al numero di cellule trasformate sul totale delle cellule, ed è fortemente influenzata da fattori ambientali. Utilizzando protocolli standard l'efficienza è pari a 1:1000 cellule trasformate, se il processo

viene automatizzato si ottiene un'efficienza superiore [3]. A parte l'efficienza, ci sono anche altri vantaggi nell'usare sistemi automatizzati. Ad esempio, come l'efficienza di trasformazione, anche la velocità di crescita batterica è dominata da differenti variabili ambientali quali il numero della generazione, la temperatura, la composizione dei nutrienti etc., pertanto risulta difficile riuscire a interrompere il processo nel momento esatto in cui la densità ottica raggiunge il valore utile. Spesso, infatti, il ritmo di crescita supera la fase logaritmica e la coltura non può essere più utilizzata. Inoltre, il prelievo di un campione della coltura ogni 20 minuti provoca una diminuzione del volume totale della stessa, causando un inutile dispendio di materiale. I vantaggi dell'utilizzo di un sensore automatico rispetto al metodo tradizionale si traducono non solo nell'eliminazione di materiale sprecato, ma anche nella possibilità di liberare l'utente dall'operazione di campionatura in sé.

# Bibliografia

- [1] Knepper, Andreas and Heiser, Michael and Glauche, Florian and Neubauer, Peter, *Robotic Platform for Parallelized Cultivation and Monitoring of Microbial Growth Parameters in Microwell Plates*, Journal of laboratory automation, **19** (6): 593–601 (2014).
  
- [2] Marose, Stefan and Lindemann, Carsten and Ulber, Roland and Schepfer, Thomas *Optical sensor systems for bioprocess monitoring*, Trends in Biotechnology, **17** (1): 30-34 (1999).
  
- [3] Hans, Sebastian and Gimpel, Matthias and Glauche, Florian and Neubauer, Peter and Cruz-Bournazou, Mariano *Automated Cell Treatment for Competence and Transformation of E. coli in a High-Throughput Quasi-Turbidostat Using Microtiter Plates*, Microorganisms, **6** (3): 60 (2018).

# Capitolo 1

## Colture batteriche: monitoraggio della crescita

### 1.1 Crescita batterica

La crescita batterica è l' aumento, in termini di popolazione, di una determinata specie batterica.

La scissione binaria è la causa di tale crescita, un processo nella quale la cellula si divide da una cellula madre in due cellule figlie, contenenti lo stesso materiale genetico. In *E.coli*, la scissione binaria inizia con l'allungamento delle cellule fino a circa il doppio della loro lunghezza, seguito dalla formazione di un setto (*setto trasverso*) che alla fine separa la cellula in due cellule figlie.

Il tempo di crescita richiesto per *E. coli* è di circa 20 minuti; pochi altri batteri possono crescere più velocemente, motivo per cui l'*E. coli* è ampiamente utilizzato nella sperimentazione e manipolazione del DNA.

La *velocità di crescita* è la variazione del numero di cellule o della massa per unità di tempo. L'intervallo di tempo durante il quale si formano due cellule a partire da un singolo individuo è chiamato *generazione*. Il tempo di generazione è quindi il tempo necessario a una cellula per duplicarsi. Questa modalità di

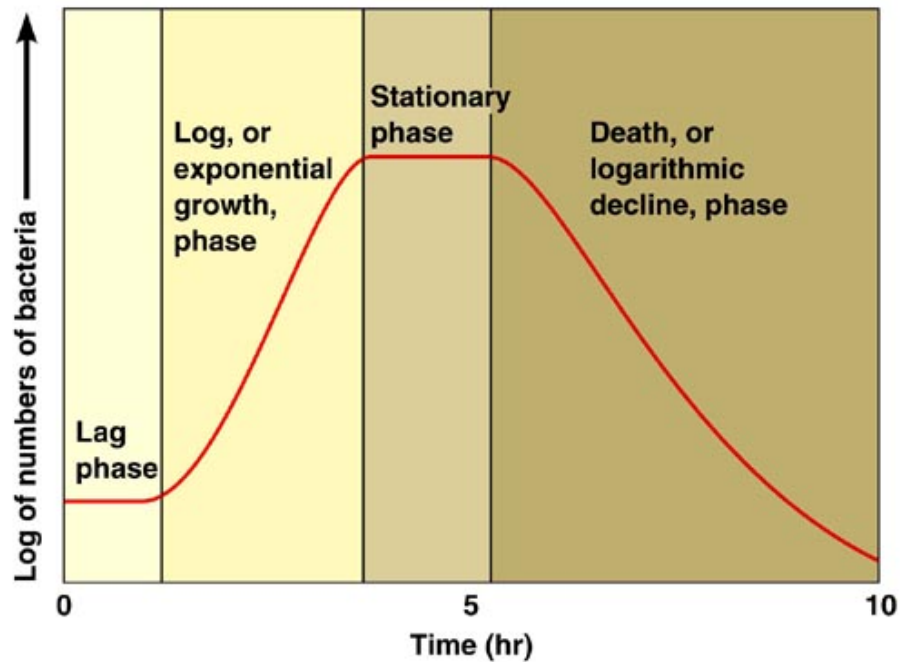


Figura 1.1: Curva di crescita di una coltura batterica in scala logaritmica e indicazione delle diverse fasi.

Fonte: <http://2012.igem.org/Team:Purdue/Characterization>

aumento della popolazione, in cui in un dato intervallo di tempo raddoppia il numero delle cellule, viene chiamata *crescita esponenziale*. Una curva di crescita può essere suddivisa in diverse fasi tra loro distinte, chiamate rispettivamente *fase di latenza*, *fase esponenziale*, *fase stazionaria* e *fase di morte* (si veda la Figura 1.1).

## 1.2 Fasi della crescita batterica

### 1.2.1 Fase di latenza

La *fase di latenza* (o fase *lag*) è la fase previa al inizio della crescita della popolazione batterica. Quando un microorganismo viene inoculato in un terreno di crescita ha bisogno di un tempo di quiescenza prima di iniziare la crescita esponenziale della popolazione. Questo periodo può essere più o meno breve a seconda delle condizioni. Se una coltura in fase esponenziale viene inoculata nello stesso



terreno mantenendo inalterate tutte le condizioni, non vi è fase di latenza e la crescita esponenziale continua alla stessa velocità. Al contrario, se l'inoculo viene prelevato da una coltura in fase stazionaria e inoculata nello stesso terreno, solitamente si osserva una fase di latenza anche se tutte le cellule dell'inoculo sono vitali. Ciò è dovuto al fatto che, solitamente, cellule vecchie non contengono una quantità ottimale di coenzimi o di altri costituenti cellulari essenziali per la crescita e necessitano, quindi, di un certo tempo per sintetizzarli nuovamente.

### 1.2.2 Fase esponenziale (o logaritmica)

La *fase esponenziale*, o *logaritmica*, è caratterizzata da una rapida riproduzione batterica. La maggior parte dei microrganismi unicellulari cresce in modo esponenziale, ma la velocità della crescita esponenziale può variare molto, infatti la velocità è influenzata sia dalle condizioni ambientali (temperatura e composizione del terreno) che dalle caratteristiche genetiche del microrganismo stesso. Il termine della fase esponenziale è determinato o dall'esaurimento di un nutriente essenziale del terreno colturale o dall'accumulo, fino a livelli inibitori, di prodotti di rifiuto escreti dall'organismo. In tali condizioni la popolazione raggiunge la *fase stazionaria*.

### 1.2.3 Fase stazionaria (o di *plateau*)

La fase esponenziale si conclude in seguito all'esaurimento di un nutriente essenziale del terreno colturale o all'accumulo, fino a livelli inibitori, di prodotti di rifiuto escreti dall'organismo. In queste condizioni la popolazione raggiunge la *fase stazionaria*. Durante la fase stazionaria non vi è un cambio nel numero di cellule.

### 1.2.4 Fase di morte

Durante la fase di morte, la conta totale (conta delle cellule presenti sia vive sia morte effettuata al microscopio) può rimanere costante, ma la conta vitale (conta delle cellule vive) diminuisce lentamente. In alcuni casi, la morte è accompagnata dalla *lisi cellulare*, che determina una diminuzione del numero di cellule contate direttamente al microscopio e della torbidità, in concomitanza con il decremento della conta vitale.

Le diverse fasi della curva di crescita di una popolazione batterica sono il risultato di eventi che interessano tutta la popolazione e non una singola cellula. I termini fase di latenza, esponenziale, stazionaria, e fase di morte non sono applicabili alle singole cellule ma soltanto a popolazioni di cellule. La curva può essere descritta da un modello matematico, il modello di Gompertz, formalizzato dalla seguente equazione differenziale:

$$\frac{dN}{dt} = -rN \ln\left(\frac{N}{K}\right) \quad (1.1)$$

dove  $N$  rappresenta la popolazione, mentre le costanti  $r$  e  $K$  rispettivamente il tasso di crescita ed la *carrying capacity*, ovvero il termine asintotico della popolazione (definito dalle risorse disponibili nell'ambiente). In un sistema che segue il modello di Gompertz si ha, per popolazioni poco numerose rispetto alle risorse presenti nell'ambiente, una crescita inizialmente esponenziale che in seguito si stabilizza, rallentando fino a diventare quasi lineare, una volta che la popolazione si avvicina asintoticamente ad un valore di equilibrio. Se invece la popolazione è superiore a quanta ne può sostenere l'ambiente, questa diminuisce fino a raggiungere uno stato di equilibrio.

fonte: <https://www.studocu.com/it/document/universita-politecnica-delle-marche/biotecnologia-dei-microorganismi/esercitazione/esercitazione-curva-di-crescita/1391271/view> <http://curba.racine.ra.it/local/biologia/ipertesto20ridotto/>

curvacrescita.htm [https://it.wikipedia.org/wiki/Legge<sub>di</sub>Gompertz](https://it.wikipedia.org/wiki/Legge_di_Gompertz)

## 1.3 Crescita batterica e cellule competenti

### 1.3.1 Cellule competenti

Nel nostro caso la trasformazione batterica definisce la competenza cellulare. Processo relazionato alla capacità di un microorganismo di acquistare DNA estraneo dall'ambiente circostante completando così la sua trasformazione genetica. In laboratorio una competenza indotta o artificiale comporta il trattamento delle cellule in coltura in modo tale da renderle transitoriamente permeabili al DNA, nel protocollo da noi utilizzato, il prelievo del batterio durante l'inizio della fase esponenziale è la chiave di un buon risultato di formazione delle cellule competenti, poichè la permeabilità è appunto transitoria.

Esistono due diversi metodi di trasformazione delle cellule; un metodo elettrico, il quale prevede il trattamento a freddo con glicerolo seguito dal processo di elettroporazione, e un metodo chimico, che consiste nel trattamento a freddo con  $\text{Ca}^{2+}$  seguito da uno shock termico. Durante la tesi abbiamo sperimentato il protocollo che prevede trattamento con  $\text{Ca}^{2+}$  descritto di seguito.

### 1.3.2 Protocollo per l'ottenimento di cellule competenti

- Si misura, in cuvette di plastica monouso, l'assorbanza (si rimanda al capitolo 2 per la sua definizione) a 600 nm di una pre-coltura cresciuta over-night (ON), utilizzando come "bianco" un campione di controllo costituito da terreno LB [Luria-Bertani broth, 1% peptone, 0.5% estratto lievito, 0.5% NaCl, 0.1% Glucosio].
- Si calcola il volume di coltura da inoculare in una beuta contenente 50 ml di terreno LB a partire dalla formula che descrive la crescita logaritmica.

Sapendo che il tempo di duplicazione ( $t_d$ ) è pari a 20 minuti, che l'assorbanza al momento della raccolta dovrà assumere valori compresi tra 0.2 e 0.3 e che le cellule verranno raccolte dopo 1.5 ore dall'inoculo ( $t=90$  minuti), si può risalire al valore iniziale dell'assorbanza  $A(t_0)$ :

$$A(t) = A(t_0)2^{t/t_d} \quad (1.2)$$

con  $A(t)$  assorbanza all'istante  $t$ ,  $t_0$  istante iniziale e  $t_d$  tempo di duplicazione. Questo valore andrà moltiplicato per il volume di terreno da inoculare.

- Ogni venti minuti viene misurata l'assorbanza a 600 nm.
- Raggiunto un valore dell'assorbanza pari a 0.2, si prelevano 8 ml di coltura e si trasferiscono in una provetta sterile da 10 ml.
- Si centrifugano i campioni a 3000 RPM in una centrifuga da banco per 20 minuti.
- Si scarta il surnatante versandolo in un recipiente avendo cura di eliminare il terreno senza perturbare il pellet.
- Si aggiungono sterilmente 4 ml di una soluzione di cloruro di calcio (50 mM  $\text{CaCl}_2$  in acqua) mantenuta in ghiaccio. Le cellule vanno risospese picchiettando con l'indice il fondo della provetta.
- Le provette vengono lasciate in ghiaccio per 20 minuti.
- Si esegue un'ulteriore centrifugazione a 4000 RPM per 5 minuti.
- Viene eliminato il surnatante.
- Vengono aggiunti sterilmente 600  $\mu\text{l}$  di soluzione di  $\text{CaCl}_2$  fredda.

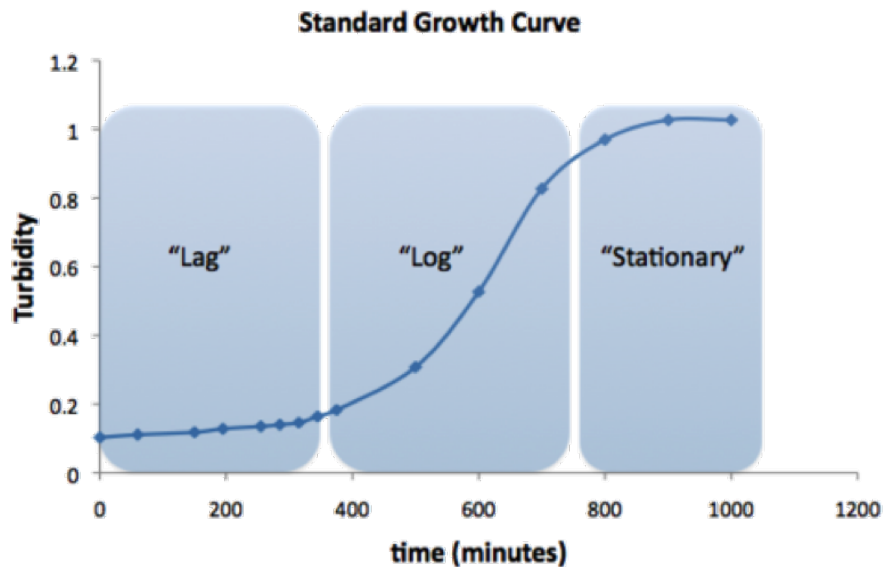


Figura 1.2: Variazione della torbidità nelle diverse fasi della crescita batterica.  
Fonte: <http://biobuilder.org/eau-that-smell>

- Le cellule vengono nuovamente risospese e viene controllata l'omogeneità della sospensione.
- Le sospensioni vengono infine conservate in frigo in un recipiente contenente ghiaccio fino al momento della trasformazione.

### 1.3.3 Condizioni ottimali di crescita batterica per l'ottenimento di cellule competenti efficienti

Per ottenere una buona efficienza di trasformazione è necessario utilizzare le cellule batteriche all'inizio della fase esponenziale. Per verificare che le cellule si trovino nella giusta fase di crescita, il protocollo prevede un'analisi manuale periodica per mezzo di uno spettrofotometro (strumento utilizzato per misurare l'assorbanza di un campione, si veda al capitolo 2). Esiste una relazione tra l'assorbanza e la concentrazione cellulare nel campione, come si vedrà in dettaglio nel capitolo successivo. Per ora basti tenere in considerazione che ogni fase di crescita corrisponde ad una determinata assorbanza (correlata, a sua volta, alla torbidità del mezzo).

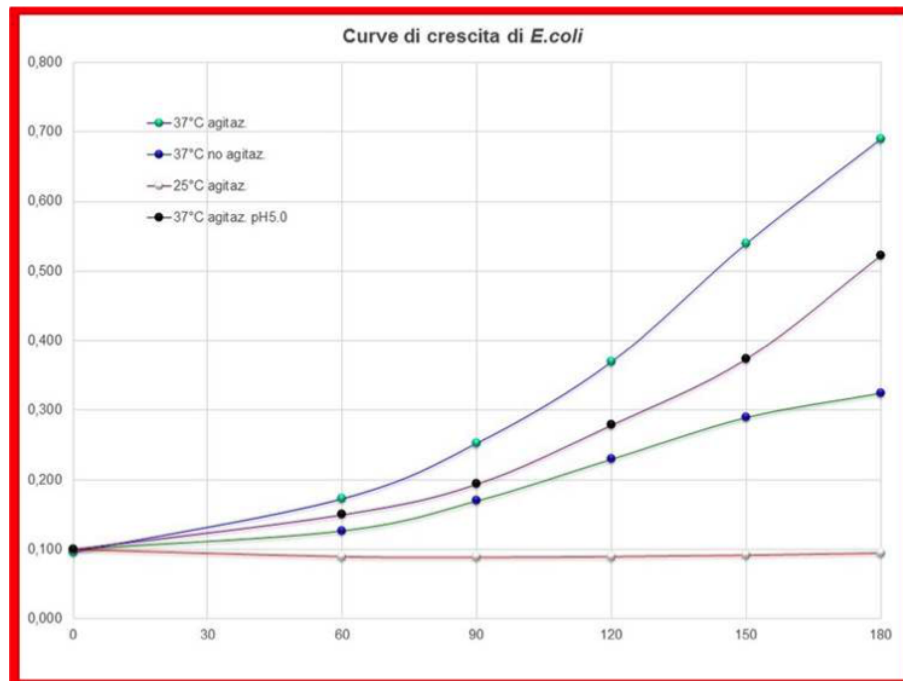


Figura 1.3: Curve di crescita per *E. coli* in termini di assorbanza per diverse condizioni di temperatura, agitazione e pH. Fonte: <http://biobuilder.org/about-the-foundation>

Per il batterio *E. coli*, le curve di crescita in termini di assorbanza e per diverse condizioni di temperatura, agitazione e pH sono riportate in Fig. 1.3. I batteri devono essere prelevati ad assorbanza 0.2, ossia all'inizio della fase esponenziale, per ottenere una buona resa di trasformazione.

# Bibliografia

- [1] Donlan R.M., Priede, J.A., Heyes C.D., et al., *Model System for Growing and Quantifying Streptococcus pneumoniae Biofilms In Situ and in Real Time*, Applied and Environmental Microbiology, **70** (8): 4980-4988 (2004).
  
- [2] Keirsse J., Lahaye E., Bouter A., Dupont V., Boussard-Plédel C., Bureau B., Adam, J.-L., Monbet, V., Sire, O., *Mapping bacterial surface population physiology in real-time: infrared spectroscopy of Proteus mirabilis swarm colonies*, Applied Spectroscopy, **60** (6): 584-591 (2006).

## Capitolo 2

# *Set-up* ottico per il monitoraggio della crescita batterica mediante misure *real-time* di trasmittanza

### 2.1 Metodi tradizionali di rilevazione della crescita batterica

La crescita di una popolazione batterica viene misurata monitorando nel tempo la variazione del numero di cellule o della densità cellulare. Esistono diversi metodi per contare il numero delle cellule o per stimare la densità cellulare; la scelta del protocollo da utilizzare dipende dal tipo di microrganismo e dal problema che si intende affrontare. Tra i metodi più usati:

- **Conta totale** (mediante microscopio). La camera conta cellule (camera di Petroff-Hausser) è costituita da un vetrino sul quale è incisa una griglia, formata da elementi quadrati di dimensioni note, che può contenere un determinato volume di campione. La conta dei batteri viene effettuata al microscopio ottico. Contando i batteri presenti all'interno delle celle e mol-



tiplicandolo per il volume totale contenuto nella camera, si può avere una stima del numero di batteri presenti nel campione.

- **Conta vitale** (mediante piastramenti). Il metodo usuale per ottenere una conta vitale consiste nel determinare il numero di cellule presenti in un campione capaci di formare colonie su un opportuno terreno agarizzato. Il presupposto di questo tipo di procedura è che ogni colonia sia originata da una singola cellula vitale.
- **Misurazione della densità cellulare mediante spettrofotometro**. La spettrofotometria costituisce un metodo indiretto per misurare la densità cellulare di una sospensione e consiste nell'effettuare misure di assorbanza (o *densità ottica*). In figura 2.1 è riportato lo schema di un tipico spettrofotometro.

L'assorbanza di una sospensione cellulare irraggiata mediante un'opportuna sorgente luminosa dipende dalla quantità di radiazione assorbita e diffusa, a sua volta proporzionale al numero di cellule presenti in sospensione. L'assorbanza è definita dalla seguente relazione:

$$A = \ln\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad (2.1)$$

con  $I_0$  e  $I$  intensità incidente e intensità trasmessa dal volume di cellule in sospensione, rispettivamente.

Il rapporto tra le intensità della luce trasmessa e incidente sul mezzo attraversato (trasmittanza) è espresso, per una data lunghezza d'onda  $\lambda$ , dalla seguente relazione (**legge di Lambert-Beer**):

$$\frac{I}{I_0} = e^{-\gamma L} \quad (2.2)$$

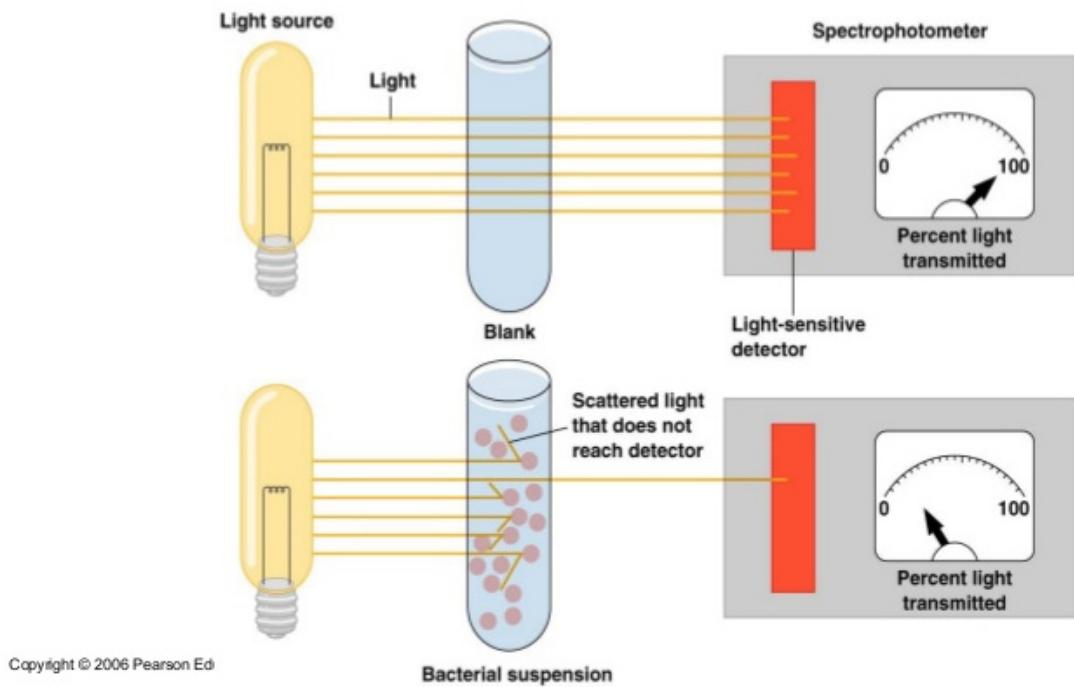


Figura 2.1: **Rappresentazione schematica di una misura spettrofotometrica.** La luce emessa da una lampada ad ampio spettro investe la sospensione batterica. Parte della radiazione verrà diffusa e assorbita dalla sospensione. Maggiore la torbidità della sospensione (correlata alla densità della sospensione e quindi al numero di cellule), minore sarà la luce trasmessa che raggiungerà il rivelatore di luce integrato nello spettrofotometro. La misura viene effettuata in comparazione con una sospensione di riferimento priva di cellule. Fonte: <http://www.slideshare.net/mahaar92/micro-growth-and-culturing-of-bacteria>

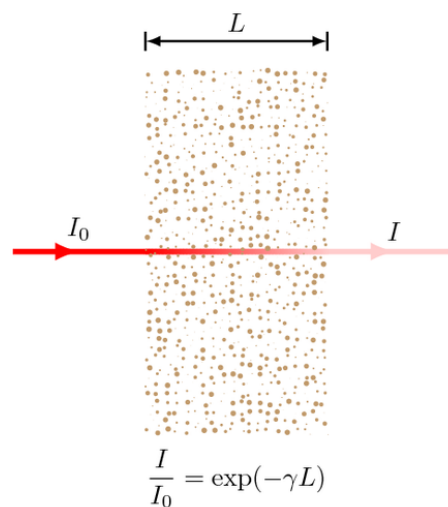


Figura 2.2: Rappresentazione grafica della legge di Lambert-Beer. Fonte: <http://www.texample.net/tikz/examples/lambert-beer-law/>

con  $\gamma$  coefficiente di attenuazione alla lunghezza d'onda  $\lambda$  e  $L$  spessore del mezzo attraversato. Confrontando la relazione 2.1 con la 2.2, ne deriva che:

$$A = \gamma L \quad (2.3)$$

## 2.2 Prototipo di un sensore ottico per la rilevazione *real-time* della crescita batterica

Il prototipo del nostro sensore permette un'acquisizione dell'intensità trasmessa da un campione, come ad esempio una sospensione batterica la cui densità (e quindi la cui assorbanza) varia in maniera continua nel tempo. In Figura 2.3 è rappresentato schematicamente l'apparato sperimentale utilizzato. Analizziamone in dettaglio le singole componenti.

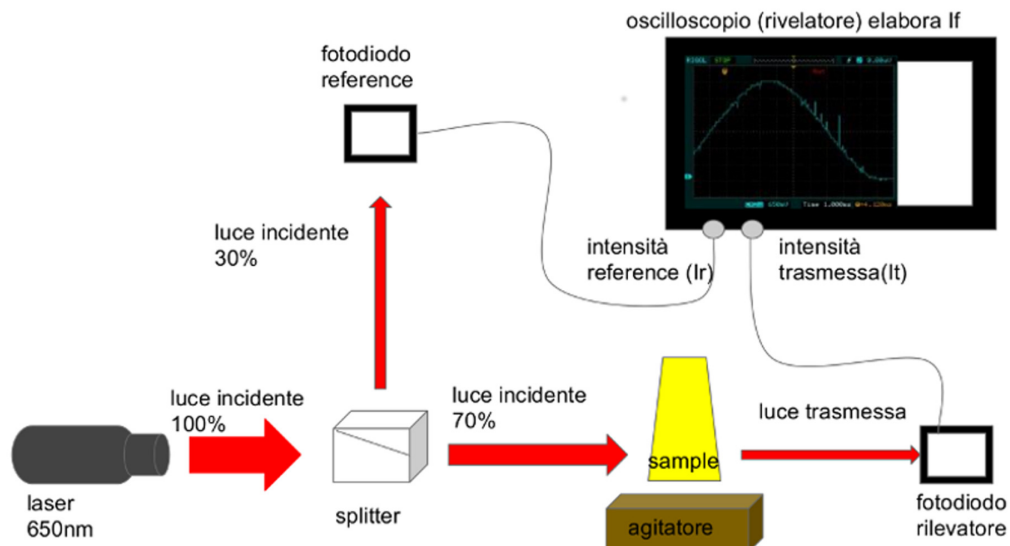


Figura 2.3: Set-up sperimentale del sistema ottico realizzato per il monitoraggio in continua di una crescita batterica.

- **Sorgente luminosa** (Fig.2.3).

Come sorgente luminosa è stato utilizzato un laser a diodo con emissione ad una lunghezza d'onda di 650 nm, alimentazione a 5 V e potenza emessa pari a 5 mW. Una sorgente laser permette di usufruire di radiazione *monocromatica* (emissione a singola lunghezza d'onda), *coerente* (tutti i fotoni emessi sono caratterizzati dalla stessa fase, energia, direzione di propagazione, polarizzazione) e ad elevata intensità.

- **Beam splitter.**

Un beam splitter (schematicamente rappresentato in Figura 2.5), è un componente ottico in grado di separare un fascio laser incidente in due parti, una trasmessa (2) e l'altra riflessa (3). Il beam splitter in nostra dotazione trasmette il 70% della radiazione incidente e ne riflette il 30%.

- **Fotodiodo.**

Il fotodiodo è un sensore basato sulla tecnologia dei semiconduttori in grado

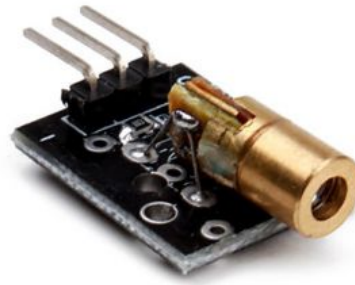


Figura 2.4: Tipico esempio di laser a diodo.

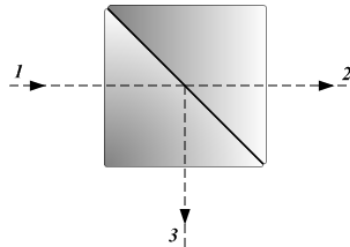


Figura 2.5: **Schema di un beam-splitter.** Il fascio incidente (1) viene separato in un fascio trasmesso (2) e in uno riflesso (3).

di convertire radiazione luminosa in un segnale elettrico proporzionale all'intensità incidente. Nel nostro set-up sono presenti due fotodiodi, uno per la misura dell'intensità luminosa trasmessa dal campione e uno di riferimento. Il fotodiodo di riferimento svolge due funzioni ben precise. In primo luogo, fornisce una misura diretta (anche se scalata di un fattore 0.3, date le caratteristiche del beam-splitter in dotazione) dell'intensità luminosa incidente. In secondo luogo, permette di svincolare la misura da eventuali instabilità in intensità della sorgente laser, dato che il nostro osservabile è costituito dal rapporto tra l'intensità trasmessa ( $I_T$ ) e quella rilevata dal fotodiodo di riferimento ( $I_R$ ) ed eventuali instabilità della sorgente influiranno allo stesso modo sia sul numeratore che sul denominatore di tale rapporto.

- **Agitatore termostabile.**

Esso consiste in un agitatore magnetico dotato di un termostato, necessario

in quanto la crescita ottimale dei batteri avviene in un range ben definito di temperatura ( nel nostro caso dai 35 ai 37 °C).

- **Beuta.**

La coltura batterica in sospensione è contenuta in una beuta da 50 ml, posizionata sull'agitatore.

- **Oscilloscopio.**

I segnali in uscita dai fotodiodi vengono inviati ad un oscilloscopio digitale, strumento in grado di visualizzarne l'evoluzione nel tempo e di operare su di essi analisi matematiche e statistiche. È possibile quindi visualizzare direttamente e in tempo reale le variazioni del rapporto  $I_T/I_R$ .

# Capitolo 3

## Risultati sperimentali

### 3.1 Misure preliminari: *testing* dell'apparato sperimentale

Per verificare il funzionamento del nostro sensore ci siamo serviti, come campione di *testing*, di un composto caratterizzato da un pronunciato picco di assorbimento nel rosso, il blu di metilene (composto organico di formula bruta  $C_{16}H_{18}ClN_3S$ ) in forma ossidata. In Figura 3.1 è rappresentato lo spettro d'assorbanza di una soluzione 4.5 M del composto, sia in forma ossidata che ridotta. Dal grafico si evince che lo spettro di assorbanza della forma ossidata del blu di metilene include anche la lunghezza d'onda alla quale viene solitamente monitorata la torbidità di una coltura batterica (600 nm), motivo per cui è stato selezionato per verificare l'efficienza del nostro apparato (si ricorda del resto che la nostra sorgente è caratterizzata da una lunghezza d'onda di emissione pari a 650 nm, in prossimità del picco di assorbanza del blu di metilene nella forma ossidata.)

A questo punto è utile chiarire che la densità ottica di una coltura batterica viene solitamente monitorata ad una lunghezza d'onda pari a 600 nm non perché a tale lunghezza d'onda corrisponda un picco nello spettro di assorbimento della

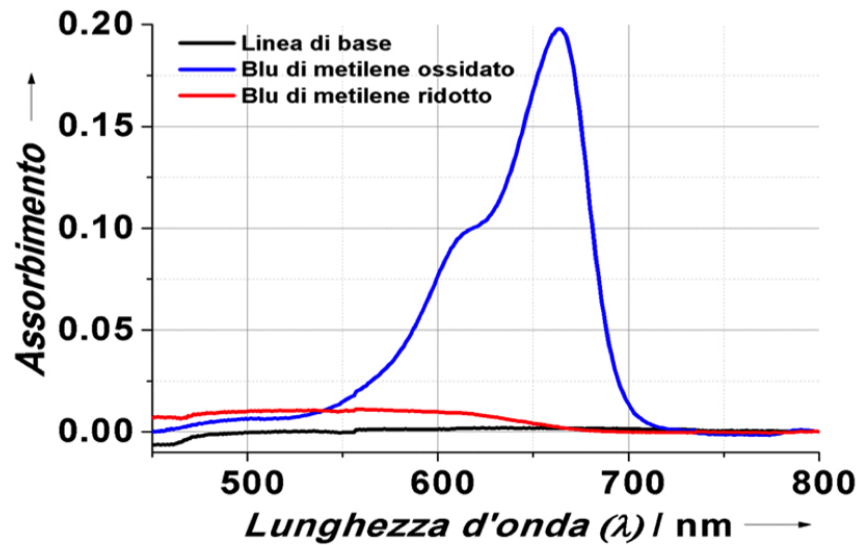


Figura 3.1: Spettri di assorbimento della forma ossidata (blu) e della forma ridotta (rosso) del blu di metilene.

coltura, ma perché la radiazione viene abbondantemente diffusa (sempre a detrimento della radiazione trasmessa) senza danneggiare le cellule (il che avverrebbe se si monitorasse l'assorbanza della coltura irraggiando con luce ultravioletta). Pur non avendo a disposizione una sorgente laser con emissione a 600 nm, lavorando a 650 nm il fotodanneggiamento è ulteriormente ridotto (all'aumentare della lunghezza d'onda diminuisce infatti l'energia associata ai fotoni) ed è inoltre possibile testare il sensore col blu di metilene ossidato (che ha una marcata assorbanza tra 580 e 680 nm).

### 3.1.1 Primo test: variazioni discontinue della densità del campione monitorato

Ad intervalli regolari di tempo sono state aggiunte singole gocce di una soluzione di blu di metilene ossidato ad elevata concentrazione in una beuta riempita con acqua distillata posizionata sull'agitatore termico e attraversata dal raggio laser, in accordo con lo schema riportato in Figura 2.3. La luce trasmessa viene rile-



vata dal fotodiodo posto a valle della beuta. Il segnale di uscita del fotodiodo, assieme al segnale del fotodiodo di riferimento, viene inviato all'oscilloscopio. In Figura 3.2 è riportato il rapporto tra il segnale del fotodiodo a valle della beuta e quello del fotodiodo di riferimento in funzione del tempo di acquisizione. Tale rapporto è pari, a meno di un fattore di proporzionalità dovuto alla "asimmetria" del beam-splitter, alla trasmittanza della soluzione contenuta nella beuta. Dopo i primi sessanta secondi di acquisizione, è stata aggiunta una singola goccia di blu di metilene ogni 40 secondi circa. Ad ogni aggiunta, nella curva di trasmittività in funzione del tempo si può osservare una decisa discontinuità fino al raggiungimento di un valore "di equilibrio" associato all'avenuta omogeneizzazione della soluzione in virtù dell'azione dell'agitatore. Complessivamente, lungo tutta la durata dell'acquisizione il segnale di trasmittanza tende a zero, ovvero la concentrazione di blu di metilene è tale da rendere la soluzione completamente torbida.

### **3.1.2 Secondo test: variazioni quasi-continue della densità del campione monitorato**

Aggiungendo le gocce di blu di metilene ad intervalli di tempo più brevi (1 s), si può determinare una variazione di densità ottica della soluzione quasi continua, almeno rispetto ai tempi di osservazione, simulando quindi in maniera più accurata le variazioni di torbidità di una coltura batterica in crescita. Il risultato è una curva di trasmittanza in funzione del tempo quale quella riportata in Figura 3.3. La soluzione diviene completamente torbida in tempi più brevi rispetto al caso precedente e il rapporto tra intensità trasmessa e intensità di riferimento è sufficientemente regolare da poter essere interpolato, almeno in prima approssimazione, con una curva esponenziale decadente.

A partire da questi primi test si può concludere che il nostro sensore è in grado di monitorare in tempo reale la trasmittanza di una soluzione la cui torbidità varia

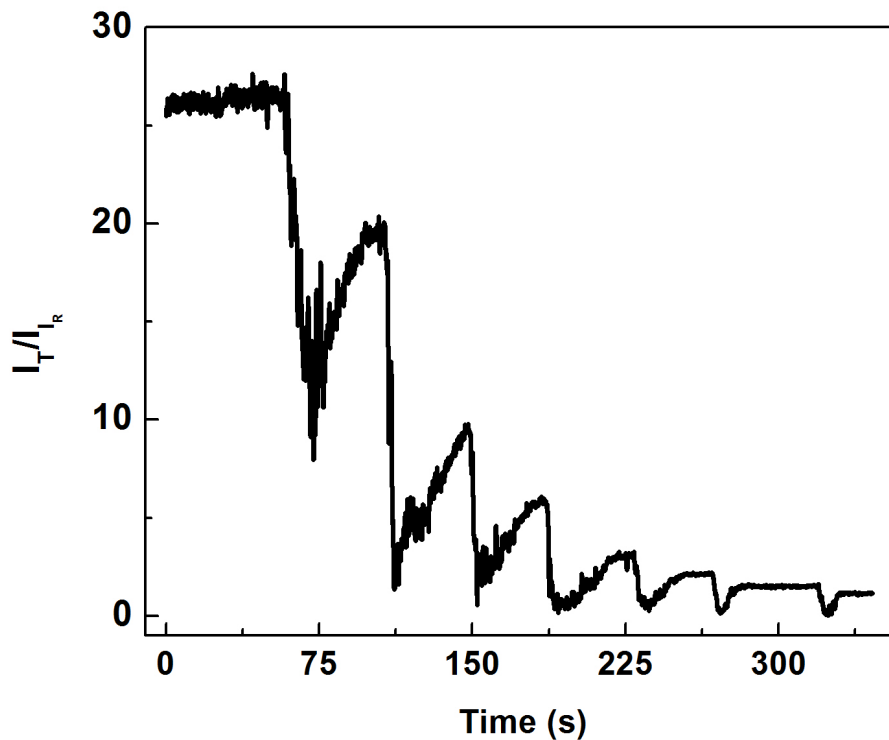


Figura 3.2: Rapporto tra il segnale del fotodiode a valle della beuta (associato all'intensità luminosa trasmessa dal campione,  $I_T$ ) e il segnale del fotodiode di riferimento ( $I_R$ , associato all'intensità incidente sulla beuta) in funzione del tempo di acquisizione. A partire da  $t=60$  s e ad intervalli di 40 secondi circa, la trasmissione presenta delle discontinuità associate all'aggiunta di una goccia di blu di metilene fino all'attenuazione totale del segnale trasmesso.

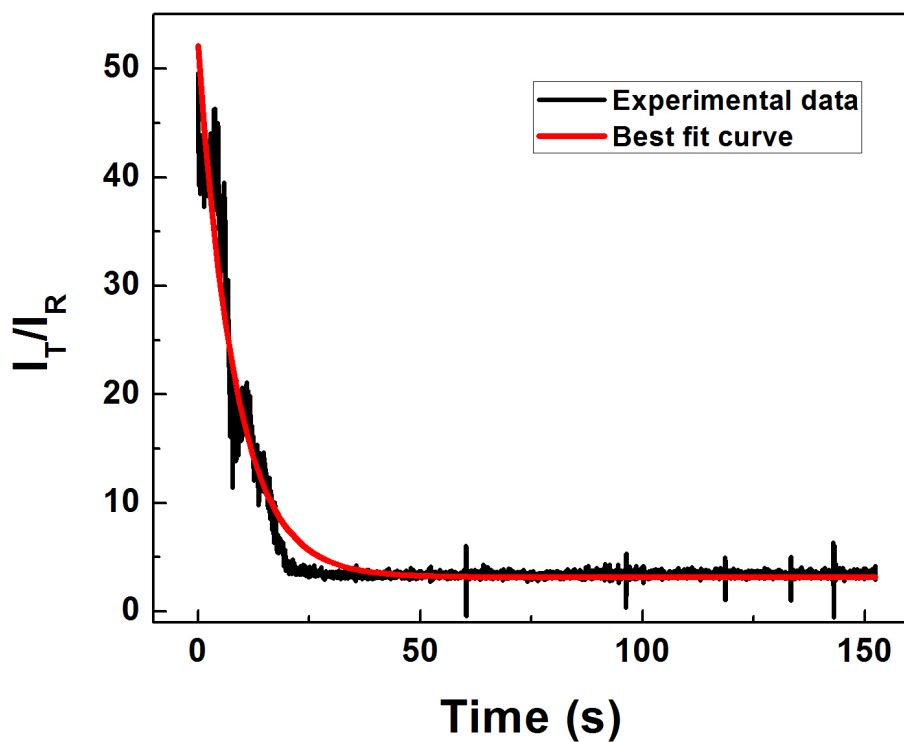


Figura 3.3: Rapporto tra segnale trasmesso e segnale di riferimento in funzione del tempo di acquisizione nel caso di incremento quasi continuo della torbidità del mezzo. In rosso si riporta una curva di interpolazione del tipo esponenziale decadente.

nel tempo, sia in maniera discontinua che continua, e su diverse scale temporali. La risoluzione temporale del sensore è dettata dalla risposta temporale dei fotodiodi e, da ultimo, dalla risoluzione temporale dell'oscilloscopio.

### 3.2 Monitoraggio *real-time* della variazione di torbidità di una coltura di *E. coli* in sospensione

Una volta testato il sensore con una soluzione di blu di metilene ossidato, si è passati all'analisi di una coltura di *E. coli* in sospensione in terreno LB contenuto in una beuta. Inizialmente si è scelto un tempo di monitoraggio di 5000 secondi (pari a 1.38 h). In Figura 3.4 si può osservare il risultato della misura, sempre espresso come rapporto tra intensità trasmessa e intensità di riferimento al variare del tempo di acquisizione. Prima dell'avvio dell'acquisizione e al termine della stessa si è misurata la densità ottica della sospensione mediante la tradizionale tecnica spettrofotometrica al fine di calibrare il nostro strumento. I valori ottenuti di densità ottica sono stati rispettivamente pari a 0.05 e 0.1. Ne deriva, quindi, che un tempo di crescita di 5000 secondi, nelle condizioni dettate dal nostro apparato sperimentale, non è sufficiente a raggiungere il valore di densità ottica generalmente associato alla fase stazionaria di crescita. Tuttavia, è sicuramente possibile monitorare la crescita della coltura più a lungo in quanto i tempi di acquisizione del nostro sensore sono limitati unicamente dalla memoria di archiviazione dell'oscilloscopio, che garantisce durate dell'ordine delle decine di ore.

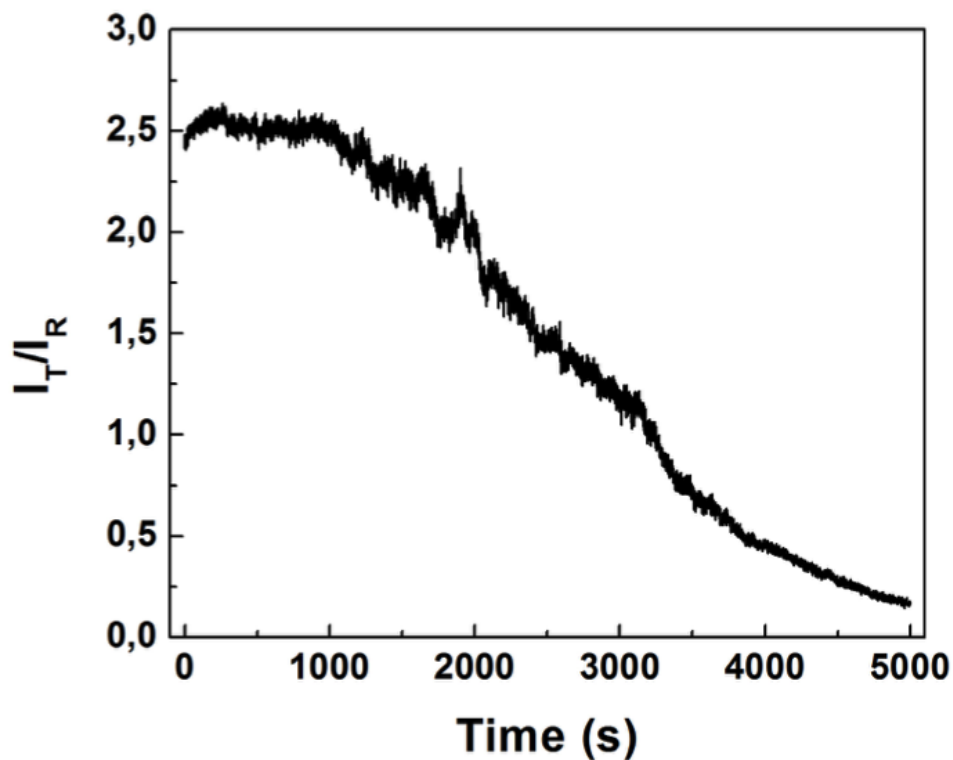


Figura 3.4: Rapporto tra intensità trasmessa e intensità di riferimento in funzione del tempo di acquisizione nel caso di una sospensione batterica di *E. coli*. All'aumentare del tempo, la torbidità della sospensione aumenta e il segnale di trasmissività diminuisce. Misurando la densità ottica della sospensione immediatamente prima e immediatamente dopo l'acquisizione per mezzo di una classica misura spettroscopica, si può opportunamente tarare, per confronto, il nostro sensore.

# Conclusioni e prospettive future

Nel presente lavoro di tesi si è progettato, realizzato e verificato un sensore ottico in grado di monitorare in tempo reale le variazioni di torbidità (correlata alla densità cellulare) di una coltura batterica. Il sensore si basa semplicemente sulla misura in continua dell'intensità di radiazione ottica trasmessa dal campione da monitorare. Il vantaggio rispetto alle tradizionali tecniche spettrofotometriche consiste nella possibilità di liberarsi della necessità di campionamenti discreti da parte di un operatore. Una stima temporale approssimativa del rate di crescita di una coltura batterica potrebbe infatti causare una sovrappopolazione della stessa e quindi la perdita dell'intera colonia. Pur avendo dimostrato la fattibilità di tale tecnica, al fine di ottenere un vero e proprio prototipo si fanno necessarie ulteriori implementazioni:

- Utilizzo di componentistica a basso costo;
- montaggio delle componenti ottiche ed elettroniche su una protoboard portatile per rendere il sensore facilmente trasportabile;
- realizzazione di un sistema di segnalazione: una volta raggiunto il valore desiderato di trasmittanza, un attuatore può simultaneamente pilotare un segnale acustico per avvertire l'operatore e forzare il termostato associato all'agitatore a riportarsi alla temperatura di quiescenza (4°C) per impedire l'ulteriore crescita della coltura batterica;

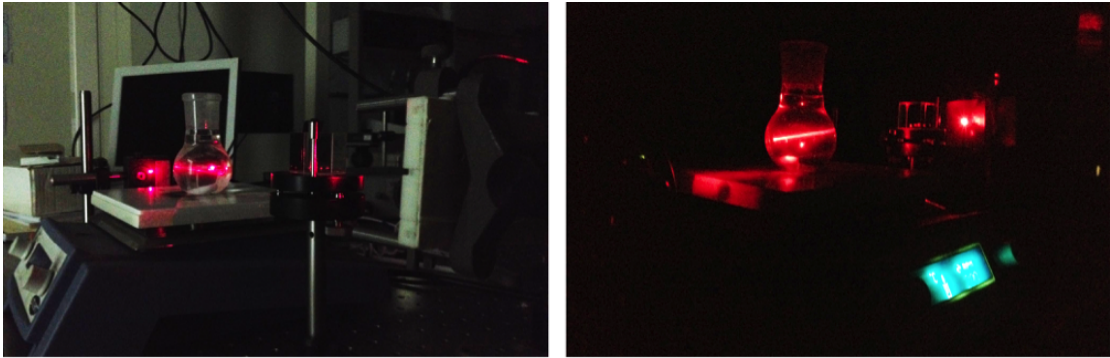


Figura 3.5: Dettagli del set-up sperimentale descritto nel presente lavoro di tesi.

- realizzazione di un software dedicato che possa permettere di impostare in remoto i principali parametri del sistema, quali temperatura, velocità di agitazione, acquisizione ed elaborazione dei segnali dei fotodiodi.