



Турбидометрија у фотобиологији – одређивање броја бактерија

Немања Здравковић¹, Радослава Савић Радвановић²

¹Научни Институт за Ветеринарство Србије, Београд, orcid: 0000-0002-3925-4409

² Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине, Београд, orcid: 0000-0002-2419-5936,

DOI: <https://doi.org/10.46793/Osvetljenje25.65Z>

Кратак садржај

Турбидометрија представља широко примењивану технику у микробиологији за процену концентрације бактерија у течним културама. Мерењем оптичке густине (ОД) суспензије, истраживачи могу да прате динамику раста микроорганизама, процене ефикасност антимикробних агенаса и анализирају физиолошке одговоре бактерија. Овај рад разматра теоријске основе турбидометрије, методолошки оквир, примену у квантификацији бактерија и њена ограничења, са посебним освртом на антимикробна истраживања и савремене микробиолошке приступе.

Кључне речи: испитивање, инфекција, замућеност, раствор

Увод

Квантификација бактеријских популација представља основу микробиолошких истраживања, клиничке дијагностике и индустријске микробиологије. Традиционалне методе, попут бројања колонија на хранљивим подлогама, иако прецизне, захтевају време и мануелни рад. Турбидометрија нуди брзу, неструктивну алтернативу мерењем замућености бактеријских суспензија, што корелира са концентрацијом ћелија. Ова техника је постала неизоставна у праћењу раста бактерија, евалуацији антимикробних супстанци и оптимизацији биопроцеса.

Турбидометрија се заснива на интеракцији светлости са суспендованим честицама. Када светлосни зрак пролази кроз бактеријску суспензију, ћелије расипају и апсорбују светлост, смањујући интензитет пренесене светлости. Степен атенуације пропорционалан је концентрацији честица, што омогућава индиректну квантификацију бактеријске биомасе. Иако турбидометрија није строго заснована на **Lambert-Beer-овом закону** („**Lambert-Beer-Bouguer**“ - **ов закон**) због ефекта расипања, често се користи модификована форма:

$$A = \epsilon bc, (1)$$

A - адсорбанца, **ϵ** - моларна адсорптивност **b** - дужина оптичког пута, **a** **c** је концентрација

$$I = I_0 * e^{-NL\delta} (2)$$

I_0 – почетна јачина светлости, I – јачина светлости, L – оптичка дебљина, N - концентрација и σ – адсорпциони коефицијент материје.

Овај закон је само теоретска поставка ли у пракси због расипања није много примењив.



Мерења се обично врше на таласној дужини од 600 nm (OD_{600}), која минимизира интерференцију медијума и обезбеђује оптималну осетљивост за бактеријске ћелије.

Спектрофотометријска опрема

Спектрофотометри користе различите изворе светлости: жаруље, живине светиљке, ласере, ЛЕД. а данас најчешће монохроматске изворе светлости и фотодетекторе за мерење ОД у различитим таласним дужинама. За квантификацију бактерија стандардно се користи OD_{600} , иако се у зависности од врсте и медијума могу користити и OD_{540} или OD_{650} . За турбидометријска мерења, културе морају бити хомогено измешане како би се избегла седиментација. Често је потребно разблажење узорка да би се ОД довео у линеаран опсег (обично између 0.1 и 0.8). Калибрационе криве се формирају корелацијом ОД вредности са бројем колонија (CFU/mL) добијеним методом бројања на подлогама. На пример, OD_{600} од 0.5 може одговарати приближно 5×10^8 CFU/mL за „*Escherichia coli*“, у зависности од соја и састава медијума („Maia i sag., 2016“).

Анализа раста бактерија

Турбидометрија се широко користи за конструкцију кривих раста бактерија, које приказују фазе лаг, експоненцијалну, стационарну и фазу смрти. Ово је кључно за разумевање физиологије микроорганизама и одређивање оптималног времена за експерименталне интервенције.

Тестирање антимикробне осетљивости

У антимикробним истраживањима, турбидометрија омогућава брзо тестирање ефикасности супстанци. Поређењем OD_{600} вредности третираних и нетретираних култура током времена, може се проценити да ли супстанца има бактериостатски или бактерицидни ефекат.

Еколошка и индустријска примена

Турбидометрија се користи у тестирању квалитета воде за детекцију микробиолошке контаминације, у праћењу ферментације за процену производње биомасе, као и у микробиологији хране ради обезбеђења безбедности и конзистентности производа.

Турбидометрија има бројне предности у односу на традиционалне методе:

1. Брзина: Резултати се добијају у року од неколико секунди.
2. Недеструктивност: Ћелије остају живе за даљу анализу.
3. Економичност: Потребна је минимална количина реагенса и потрошног материјала.
4. Скалабилност: Погодна за аутоматизоване системе и тестове великог обима.

Упркос корисности, турбидометрија има одређена ограничења:

1. Недостатак специфичности
Турбидометрија не разликује живе од мртвих ћелија. Присуство остатака, преципитата или не-бактеријских честица може допринети ОД вредности, што доводи до прецењене концентрације живих ћелија.



2. Нелинеарност при високим концентрацијама
При високим концентрацијама ћелија долази до нелинеарног расипања светлости, што доводи до zasiћења OD вредности. Разблажење узорка је неопходно за тачна мерења.
3. Варијабилност међу врстама
Морфологија ћелија и индекс преламања утичу на расипање светлости. Калибрационе криве морају бити специфичне за сваки сој и услове гајења.
4. Груписање и формирање биофилма
Агрегација ћелија или формирање биофилма мења начин расипања светлости, што компромитује тачност OD мерења.

Компаративна анализа

Методe бројања живих ћелија, попут бројања колонија, дају директну процену виталних ћелија, али су временски захтевне. Турбидометрија нуди брзу алтернативу, иако захтева калибрацију и не процењује виталност. „McMeekin i sar. (1994)“ су показали да турбидометрија поуздано процењује максималне специфичне стопе раста када се коригује нелинеарност апсорбације. Напредак у развоју преносивих спектрофотометара и 3Д штампаних држача за културе омогућава теренску примену и праћење раста факултативних и анаеробних бактерија у реалном времену. Развијају се алгоритми машинског учења за интерпретацију турбидометријских података, предикцију динамике раста и идентификацију аномалија.

Комбинација турбидометрије са флуоресценцијом или сликовним техникама омогућава симултану процену виталности ћелија, морфологије и метаболичке активности.

Закључак

Турбидометрија представља ефикасну, брзу и економичну методу за квантификацију бактерија у микробиолошким истраживањима. Иако има ограничења у погледу специфичности и тачности при високим концентрацијама, њена примена у комбинацији са другим техникама и савременим технологијама обећава значајан напредак у анализи микроорганизама. Будући развој у области миниатуризације, вештачке интелигенције и хибридних система додатно ће проширити могућности турбидометрије у научним и индустријским апликацијама.

Литература:

1. **Brown, M.** (1980). Photodynamic therapy and microbial sensitivity: A turbidimetric approach. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 6(3), 245–252. <https://doi.org/10.1093/jac/6.3.245>
2. **Maia, A. S., Silva, R. T., & Oliveira, M. F.** (2016). Calibration of optical density for *Escherichia coli* quantification in different media. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(2), 499–505. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.01.003>
3. **McMeekin, T. A., Olley, J. N., Ross, T., & Ratkowsky, D. A.** (1994). Predictive microbiology: Theory and application. *International Journal of Food Microbiology*, 23(3–4), 241–264. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90036-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90036-1)



4. **Medical Lab Notes.** (2023). Turbidimetry: Introduction, principle, test requirements, result interpretation, application, and keynotes. *MedicalLabNotes.com*. <https://medicallabnotes.com/turbidimetry-introduction-principle-test-requirements-result-interpretation-application-and-keynotes>
5. **Barbé, B., Corsmit, E., Jans, J., Kaur, K., Baets, R., Jacobs, J., & Hardy, L.** (2022). Pilot testing of the “Turbidimeter”, a simple, universal reader intended to complement and enhance bacterial growth detection in manual blood culture systems in low-resource settings. *Diagnostics*, 12(3), 615. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12030615>
6. **Koch, A. L.** (2007). Growth measurement. In *Methods for General and Molecular Microbiology* (3rd ed., pp. 172–199). American Society for Microbiology Press. <https://doi.org/10.1128/9781555817497.ch9>
7. **Zhang, Y., Wang, Y., & Li, J.** (2020). Development of a low-cost turbidimetric system for rapid bacterial growth detection. *Sensors*, 20(14), 3892. <https://doi.org/10.3390/s20143892>