

استفاده از بیوسنسور کاندای کتیوی متر برای شناسایی میکوباکتریوم توبرکولوسیس

احمد رضا پور میر^۱، حسین باقری^۲، طاهره صفری^۳

^۱دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، گروه بیوفیزیک، زاهدان، ایران

^۲دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، گروه زبان انگلیسی، زاهدان، ایران

^۳دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، گروه فیزیولوژی، زاهدان، ایران

چکیده

با پیشرفت تکنولوژی زیست حسگری، اخیراً استفاده از تکنولوژی کندانکتیویمتری بمنظور شناسایی تعداد کم با سیل میکوباکتریوم توبرکولوسیس مطرح گردیده که بر اساس آن از دو میدان AC و DC استفاده می‌گردد. در این مطالعه کاندوکتانس و پتانسیل زتا در غلظت‌های مختلف با سیل بر مبنای $\frac{CFU}{ml}$ در میدان DC اندازه‌گیری شده و ملاحظه گردید که هر دو مورد با افزایش غلظت باکتری بصورت خطی افزایش یافتند. در غلظت‌های مختلف باکتری از 10^1 تا $10^8 \frac{CFU}{ml}$ تغییر کاندوکتانس از $3\mu S$ تا $26\mu S$ افزایش یافت. همچنین میزان تغییر پتانسیل زتا در این بازه غلظت از $4mV$ - در غلظت $10^1 \frac{CFU}{ml}$ به $12mV$ - در غلظت $10^8 \frac{CFU}{ml}$ افزایش یافت. ارتباط بین اندازه کلونی‌ها با کاندوکتانس و پتانسیل زتا نیز محاسبه شد. بنابراین با توجه به نتایج این مطالعه و انطباق الگوی افزایش در هر دو مورد تغییر کاندوکتانس و پتانسیل زتا، روشی برای استفاده از این الگو برای اندازه‌گیری تعداد باکتری مطرح گردید. تکمیل بررسی حاضر می‌تواند امکان ساخت بیوسنسوری را فراهم نماید که با استفاده از آن بتوان تعداد باکتری را با بکارگیری یک سیستم تشخیصی پرتابل، بصورتی سریع و با دقت بالا شناسایی کرد و با بهره‌گیری از آن در مناطق کمتر توسعه یافته و فاقد امکانات آزمایشگاهی کافی، در جهت کنترل گسترش بیشتر بیماری سل نقش آفرینی نمود.

کلمات کلیدی: بیوسنسور، میکوباکتریوم توبرکولوسیس، کندانکتیویمتری، پتانسیل زتا، سیستم تشخیصی پرتابل

۱- مقدمه

۱-۱- شناسایی میکوباکتریوم توبرکولوسیس

میکوباکتریوم توبرکولوسیس باکتری است که باعث ایجاد نوعی بیماری سل می شود. سل نام گروهی از بیماریها است که بوسیله انواع میکوباکتریوم ها همچون میکوباکتریوم توبرکولوسیس و میکوباکتریوم بوویس ایجاد می شود. میکوباکتریوم توبرکولوسیس می تواند باعث عفونت شش ها (ریوی) و کلیه ها، گروه های لنفاوی، استخوان ها و مفاصل (ریوی-فوقانی) گردد. (۱)

مباحث مربوط به تشخیص کلینیکی سالم بودن آب و مواد غذایی و محیط زیست بطور گسترده ای به حساسیت بالا در زمینه شناسایی میکوباکتریوم توبرکولوسیس وابسته اند. بنابراین برای حفظ سلامت جهانی شناسایی، تشخیص و کنترل کردن میکوباکتریوم توبرکولوسیس بسیار حیاتی است. امروزه هنوز در بسیاری مناطق از روش های سنتی بویژه روش های کشت پایه استفاده می شود. معمولاً این روش ها شامل کشت سلولی، شمارش سلولی و تقویت سلولی هستند اما زمان مورد نیاز برای این روش ها معمولاً زیاد است، بویژه برای باکتری دارای رشد آهسته ای مانند میکوباکتریوم توبرکولوسیس. روش کشت سلولی می تواند غلظت های کم میکوباکتریایی را نیز شناسایی کند اما بسیار کند است. روش میکروسکوپی اسمر AFB سریع و ارزان است اما قادر به شناسایی در غلظت های کم نیست. بمنظور توسعه روش های حساس، سری، دقیق، فوری و بسادگی قابل انجام برای شناسایی میکوباکتریوم توبرکولوسیس و همچنین پیشگیری موثر از عفونت باکتری سل، استفاده از روش های دیگر ضروری است. بطور کلی جدی بودن مخاطره سل در سرتاسر جهان توسعه روش های شناسایی سریعتر و حساستر را ضروری می کند. (۳و۲و۱)

۱-۲- بیوالکتریک میکوباکتریوم توبرکولوسیس

در سال های اخیر با پیشرفت تکنولوژی بیوسنسورها بویژه در جهت تشخیص بیماری، نگهداری مواد غذایی، فرایندهای زیستی و حفاظت از محیط زیست کاربردهای فراوانی پیدا شده اند. بیوسنسورها بطور اختصاصی عمل کرده و دارای حساسیت زیادی هستند که اجازه می دهد شناسایی طیف وسیعی از آنالیتها در نمونه های زمینه ای پیچیده با مراحل آماده سازی مختصر نمونه انجام شود. (1,3,4)

گروه های باردار موجود در دیواره باکتری می توانند در قدرت های یونی یا pH محیط های سوسپانسیون مجتمع یا جدا شده و حتی می توانند به یک سطح باردار نظیر یک باکتری دیگر یا یک سوبسترا متصر گردند. این پدیده ملکول های باردار را وادار می کند که بر اساس نوع سطحی که به آن می پیوندند کنفورماسیون متفاوتی داشته باشند. بعلاوه سطح سلول باکتریایی می تواند نسبت به حلال ها و یون های خاصی نفوذپذیر گردد و این پدیده ناشی از حضور یک آرایه پپتیدوگلیکان بصورت ناحیه ضمیمه به سطح یا کپسول است. این ملکول ها درون دیواره سلولی باکتریایی توزیع شده و باعث ایجاد یک لایه دوگانه الکتریکی می شود. بطور کلی وقتی یک سطح باردار در تماس با یک محلول الکترولیت قرار می گیرد یک لایه دوگانه الکتریکی (EDL) شکل می گیرد. در این حالت یک توزیع فضایی بار در اصل شامل بارهای مخالف در محلول ایجاد می شود تا در نهایت با بارهای سطحی به یک تعادل برسد. پتانسیل الکتریکی در سطح سلول باکتریایی معمولاً بر اساس تحرک الکتروفوریتیک، اندازه گیری می شود. بارهای سطحی سلول های باکتریایی از جدا شدن یا پروتونیزه شدن گروه های کربوکسیل، فسفات و آمینو و تغییرات pH بدست می آیند. ثابت های تفکیک مؤثر گروه های سطحی سلول باکتریایی به خواص محیطی نظیر

هیدروفوبیستیه موضعی و پتانسیل الکتریکی بستگی دارند. در مقادیر pH فیزیولوژیک بین ۵ و ۷ بیشتر گونه‌های باکتریایی دارای بار منفی هستند. یعنی تعداد گروه‌های کربوکسیل و فسفات بیشتر از تعداد گروه‌های آمینو می‌شوند. (1,2,3,4,5)

۱-۳- شناسایی باسیل مایکوباکتریوم بر اساس پتانسیل زتا

پتانسیل زتا ζ بصورت پتانسیل الکتریکی در یک مدل هیدرودینامیک همراه با شکاف در نظر گرفته می‌شود. در این مدل یک لایه مایع فرضی روبروی سطح ذره در نظر گرفته می‌شود و در طی عمل الکتروфороз لایه مایع نسبت به سطح حرکت می‌کند. محل مربوط به مدل لغزش بطور کلی چند نانومتر در اطراف سطح ذره است. با فرض اینکه لایه دوگانه نازک و کندوکتانس سطح کم باشد، در حالتی که بارهای سطحی ثابتند تغییر غلظت الکترولیت بطرف بالا یا پایین می‌تواند باعث حرکت در جهت متضاد یکنوع بار (مثبت یا منفی) شود و جهت حرکت به علامت بارها بستگی ندارد بلکه به بزرگی آنها بستگی دارد. سرعت حرکت نیز به اندازه و غلظت الکترولیت وابسته است. (2,3,5,6)

یون‌ها در سیال در یک لایه بسته بشدت جذب سوبسترا می‌شوند و در نتیجه غیر متحرک می‌گردند. این لایه، لایه اشترن نام دارد با بکار بردن یک میدان الکتریکی خارجی می‌توان تعدادی از این یون‌ها را از این لایه خارج نمود در نتیجه آنها بسوی الکتروود دارای بار مخالف حرکت می‌کنند. در این حالت پتانسیل این شکاف همان پتانسیل زتا است. (2,3,4,6,7)

ذرات تحت تأثیر پتانسیل زتا بسوی الکتروود دارای بار مخالف حرکت می‌کنند. مشخصه اصلی الکتروфоретیک ذرات تحرک الکتروфоретیک (μ) است که برابر است با نسبت سرعت ذره (u) به شدت میدان الکتریکی (E):

$$\mu = \frac{u}{E} \quad (\text{Eq-1})$$

تحرک الکتروфоретیک با پتانسیل زتای ذره افزایش می‌یابد و با ویسکوزیته η کاهش می‌یابد. تطابق یکسان μ و ζ به اندازه ذره بستگی دارد. (3,4,5,6,7,8)

ناحیه دی الکتریک مجاور دیوارهای سلولی و عدم تماس با مایع نزدیک دیواره باعث افزایش میزان بار مرتبط با لایه دوگانه در فاز مایع می‌شود. یون‌ها در این لایه به سمت الکتروود دارای بار مخالف حرکت می‌کنند و مایع را با خود می‌کشند در نتیجه فرایند الکترواسمتیک آب انجام می‌شود^۵. ذرات قطبی نه تنها با یکدیگر اندرکنش می‌کنند بلکه همچنین باعث تغییر شدت میدان در ناحیه مجاور سلول می‌شوند. توانایی راندن ذرات بسوی یک الکتروود دارای بار مخالف می‌تواند برای تعیین غلظت آنها بکار رود. اگر میدان به اندازه کافی قوی باشد، ذرات می‌توانند بطور برگشت ناپذیر جذب سطح شوند. (4,5,6,7,8)

۱-۴- شناسایی باکتری مایکوباکتریوم توپرکولوزیس بر اساس کاندوکتانس

کاندوکتانس توانایی یک محلول دارای یون در عبور دادن یک جریان الکتریکی (معکوس امپدانس الکتریکی) است. کاندوکتانس یک محلول بستگی به غلظت، تحرک یون‌ها، ظرفیت یون‌ها و دما دارد. کاندوکتانس می‌تواند بوسیله کاربرد یک جریان الکتریکی (I) بین دو الکتروود و اندازه‌گیری ولتاژ بدست

آمده (V) اندازه گیری شود. در طی این فرایند، کاتیون ها به الکتروود منفی مهاجرت می کنند و آنیون ها به الکتروود مثبت و محلول بصورت یک هدایت کننده الکتریکی عمل می کند. (7,8,9,10)

کندوکتانس با غلظت افزایش یا کاهش می یابد. (8,9,10,11,12)

در این مطالعه سعی می شود با مقایسه نتایج مربوط به تغییر پتانسیل زتا، اندازه کلنی های باکتری و تغییر کندوکتانس، معیار نسبتاً دقیقی برای شناسایی تعداد باکتری در نمونه مورد آزمایش بدست آید.

۲- مواد و روشها

طور کلی در این مطالعه سه آزمایش انجام شد در یک آزمایش تغییرات پتانسیل زتای سوسپانسیون باکتریایی نسبت به محلول الکتروولیت بدون باکتری در غلظتهای مختلف باکتری بر اساس $\frac{cfu}{ml}$ اندازه گیری شدند و در آزمایش دوم اندازه کلنی باکتریایی در هر غلظت باکتری اندازه گیری شد. در هر دوی این روشها از دستگاه DLS شرکت Malvern مدل Zetasizer Nano ساخت بریتانیا استفاده گردید. در روش سوم تغییرات کندوکتانس سوسپانسیون باکتریایی نسبت به محلول الکتروولیت بدون باکتری در غلظتهای مختلف باکتری ($\frac{cfu}{ml}$) اندازه گیری شدند. در این روش از دستگاه کانداکتیویتی متر شرکت WTW مدل Cond 3110 ساخت آلمان-امریکا استفاده گردید. سپس نتایج بدست آمده از سه آزمایش با هم مقایسه شدند.

محلول الکتروولیت مورد استفاده محلول سرم فیزیولوژیک ($NaCl 0.1\% \frac{W}{V}$) بود و سوسپانسیون باکتریایی اولیه از محلول مک فارلند ۰/۵ (با غلظت $10^8 \frac{cfu}{ml}$) با رقیق شدن و در نتیجه بدست آوردن محلول مک فارلند ۰/۵، ($0.33\% \frac{V}{V}$) با غلظت $10^8 \frac{cfu}{ml}$ حاصل گردیده بود.

غلظتهای مختلف باکتری در هر ۳ آزمایش بر اساس $\frac{cfu}{ml}$ عبارتند از 10^1 و 10^2 و 10^3 و 10^4 و 10^5 و 10^6 و 10^7 و 10^8 و 10^9 و 10^{10} که برای بدست آوردن هر یک از این غلظتها محلول سوسپانسیون باکتریایی اولیه هر دفعه ۱۰ بار (برحسب $\frac{V}{V}$) با استفاده از محلول الکتروولیت رقیق شده بود.

در هر اندازه گیری ۱ ml از سوسپانسیون باکتریایی بمدت ۳ دقیقه مورد آزمایش قرار گرفت.

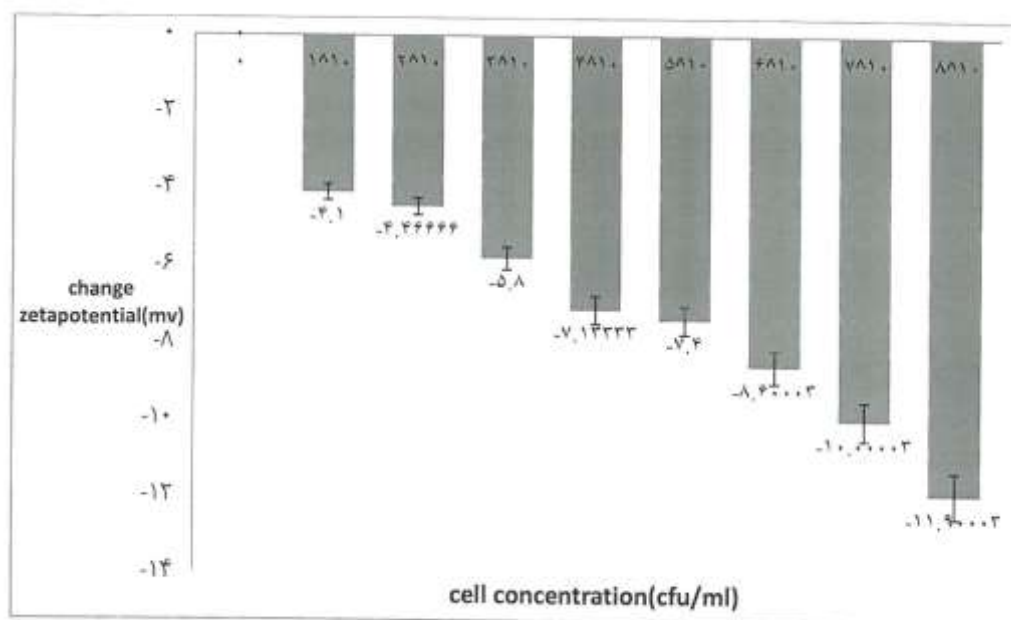
جنس الکتروودهای مورد استفاده در اندازه گیری کندوکتانس استیل با طول ۵ cm و فاصله ۰/۵ cm بود. مقادیر کندوکتانس اندازه گیری شده در آزمایشات مختلف بر اساس μS بودند.

برای اندازه گیری پتانسیل زتا و اندازه کلنی های باکتریایی با استفاده از دستگاه DLS، ابتدا ۱ ml محلول الکتروولیت بدون باکتری و سپس به ترتیب غلظتهای باکتری 10^1 ، 10^2 ، 10^3 ، 10^4 ، 10^5 ، 10^6 و 10^7 و 10^8 درون کووت دستگاه قرار گرفتند هر دفعه اندازه گیری ۴ دقیقه طول کشید. برای هر غلظت چهار نتیجه بدست آمدند و نتیجه نهایی گزارش شده میانگین این نتایج بود. نتایج گزارش شده بصورت تفاوت مقدار در هر غلظت باکتریایی نسبت به محلول الکتروولیت بدون باکتری بود.

در روش اندازه گیری کاندوکتانس، هر بار $200 \mu\text{l}$ از محلول الکترولیت بدون باکتری و غلظت‌های مختلف درون سلول تهیه شده ریخته شدند و در مدت حدود ۱ دقیقه الکترودها درون سوسپانسیون قرار گرفتند. هر آزمایش ۴ دفعه تکرار شد و بر اساس میانگین گیری از آنها، نتیجه نهایی گزارش گردید. در این آزمایش نیز، نتایج گزارش شده بصورت تفاوت مقدار در هر غلظت باکتریایی نسبت به محلول الکترولیت بدون باکتری بود.

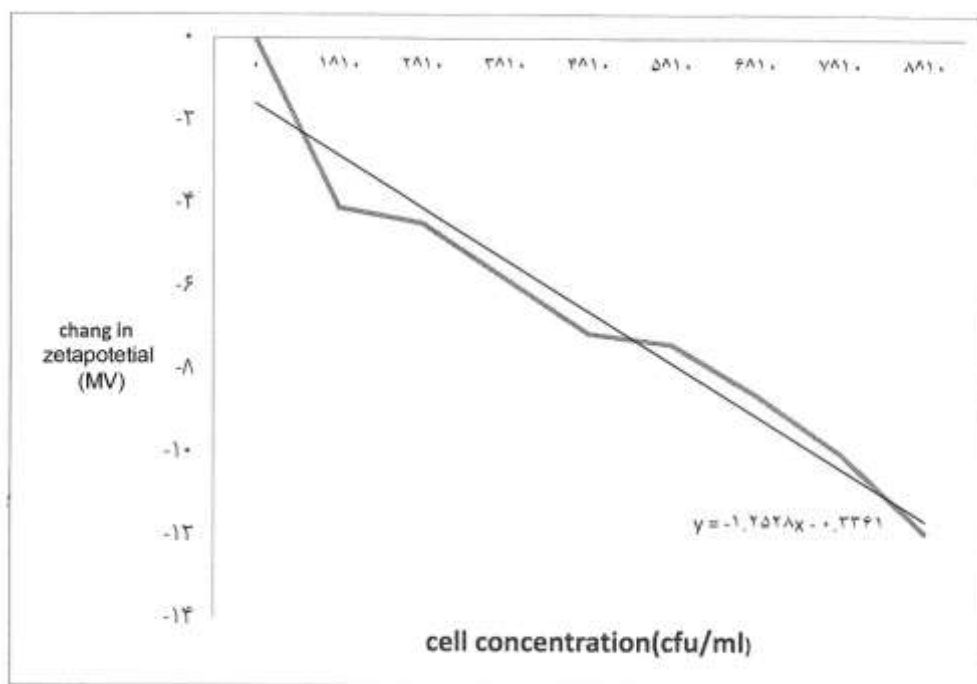
۳- نتایج

نتایج بدست آمده در هر یک از روشهای آزمایش با استفاده از نرم افزار اکسل مورد آنالیز قرار گرفتند. سپس نمودارهای ستونی و پیوسته مربوط به این نتایج رسم گردیدند. در آزمایش اول بعد از میانگین گیری، نمودار تغییرات پتانسیل زتا نسبت به غلظت باکتری بصورت ستونی (شکل ۱) و بصورت پیوسته (شکل ۲) رسم گردید.



شکل (۱) - نمودار ستونی تغییرات پتانسیل زتا سوسپانسیون باکتریایی در غلظت‌های مختلف (MV) و غلظت باکتری بر حسب

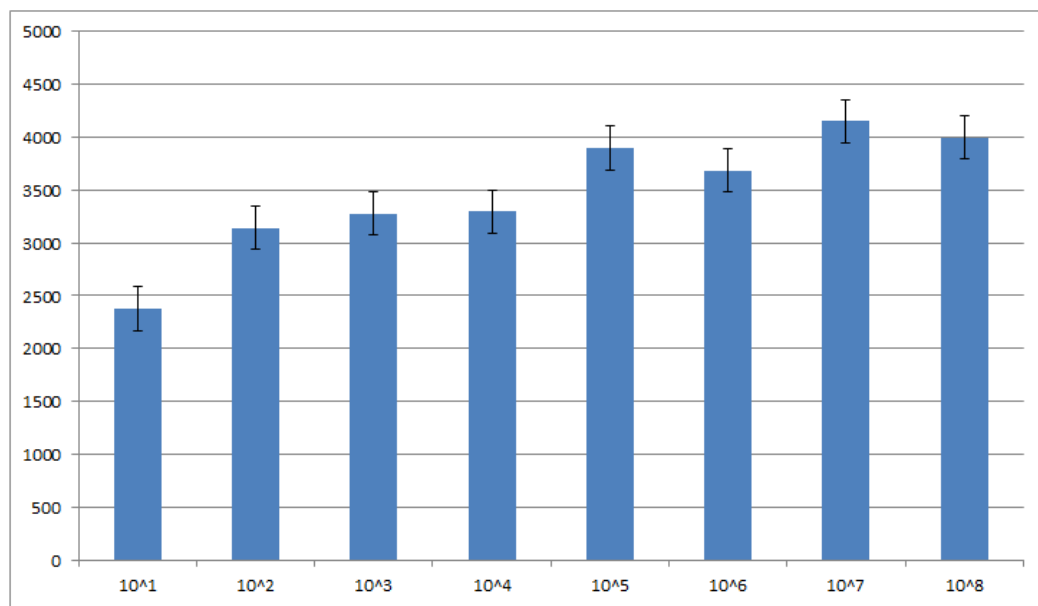
$$\left(\frac{\text{cfu}}{\text{ml}}\right)$$



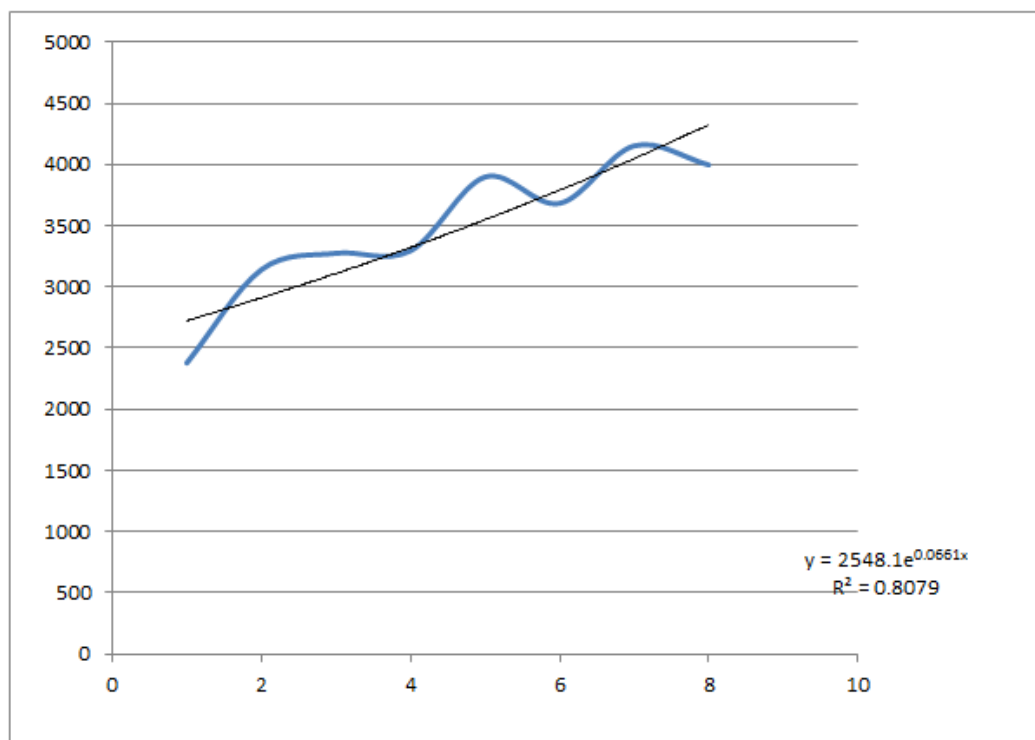
شکل (۲) - نمودار پیوسته تغییرات پتانسیل زتا سوسپانسیون باکتریایی در غلظت‌های مختلف (MV) نسبت به غلظت باکتری

$$\text{بر حسب } \left(\frac{\text{cfu}}{\text{ml}}\right)$$

در آزمایش دوم نمودار اندازه کلنی باکتریها نسبت به غلظت باکتری بصورت ستونی (شکل ۳). بصورت پیوسته (شکل ۴) رسم شد و در آزمایش سوم نمودار تغییرات کاندوکتانس سوسپانسیون باکتریایی نسبت به غلظت باکتری بصورت ستونی (شکل ۵) و بصورت پیوسته (شکل ۶) رسم شدند.

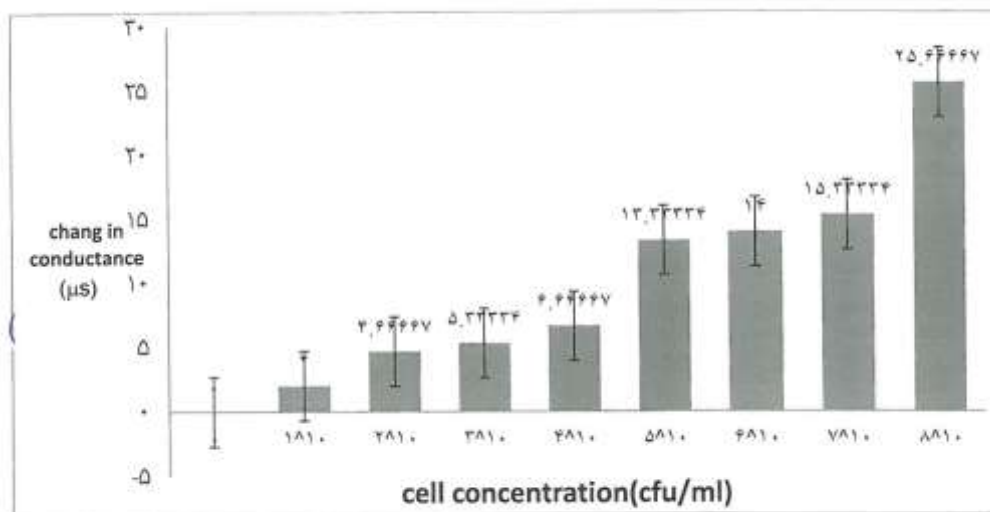


شکل (۳) - نمودار ستونی تغییرات اندازه کلنی باکتری بر حسب میکرون در غلظت‌های مختلف بر حسب $\left(\frac{\text{cfu}}{\text{ml}}\right)$

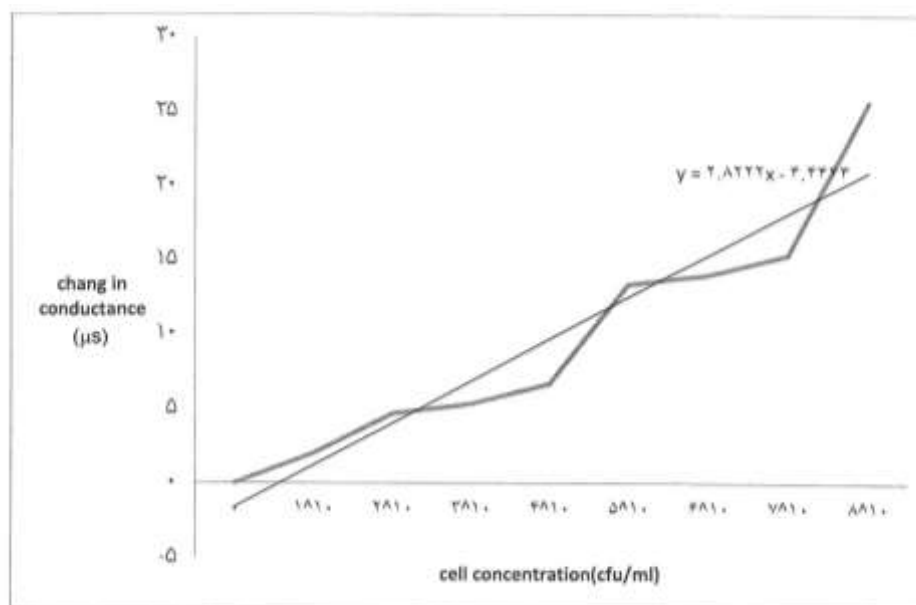


Cell Concentration $\left(\frac{\text{cfu}}{\text{ml}}\right)$

شکل (۴) - نمودار پیوسته تغییرات اندازه کلنی باکتری بر حسب میکرون در غلظت‌های مختلف بر حسب $\left(\frac{\text{cfu}}{\text{ml}}\right)$

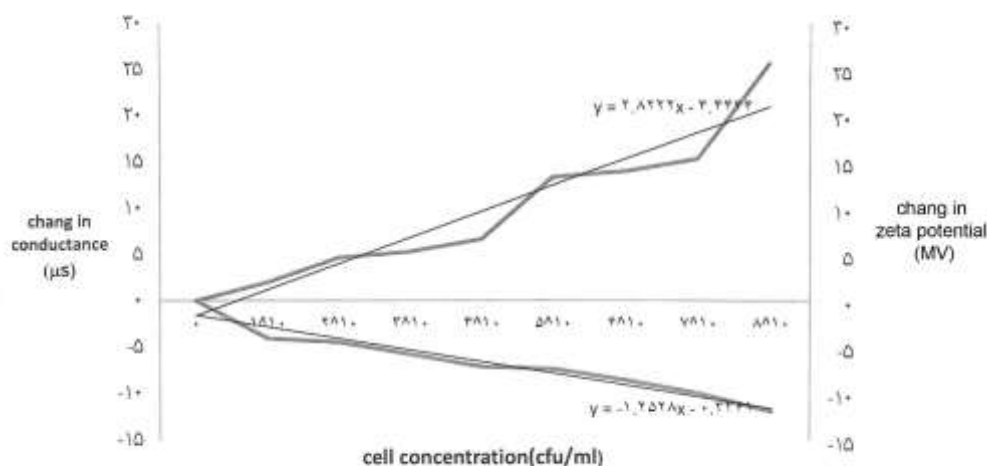


شکل (۵) - نمودار ستونی تغییرات کاندوکتانس باکتری بر حسب μS در غلظت‌های مختلف بر حسب $\left(\frac{\text{cfu}}{\text{ml}}\right)$



شکل (۶) - نمودار پیوسته تغییرات کاندوکتانس باکتری بر حسب μS در غلظت‌های مختلف بر حسب $\left(\frac{\text{cfu}}{\text{ml}}\right)$

در شکل (۷) نمودارهای پیوسته مربوط به تغییرات پتانسیل زتا و تغییرات کاندوکتانس بر هم منطبق شدند تا بتوان نتیجه مشخصی بر این اساس بدست آورد. همچنین در شکل (۸) نمودارهای پیوسته مربوط به تغییرات پتانسیل زتا و اندازه کلنی‌های باکتری بر هم منطبق شدند.



شکل (۷) - نمودار خطی تغییر کاندوکتانس و تغییر پتانسیل زتا در غلظت‌های مختلف باکتری بر حسب $\left(\frac{\text{cfu}}{\text{ml}}\right)$

۴- بررسی نتایج

بررسی نتایج بدست آمده در آزمایش اندازه گیری تغییر پتانسیل زتا بر حسب غلظت باکتری نشان می‌دهد که با افزایش غلظت باکتریها بر حسب $\frac{\text{cfu}}{\text{ml}}$ از 10^1 تا 10^8 بصورت خطی مقدار تغییر پتانسیل زتا (نسبت به حالت محلول الکترولیت بدون باکتری) از 4mv به 12mv می‌رسد. افزایش پتانسیل زتا ناشی از افزایش تعداد بارهای سطحی ذره مورد اندازه گیری قرار گرفته است. نکته مهم اینست که هر چند غلظت باکتریها هر دفعه ۱۰ برابر می‌شود اما میزان پتانسیل زتا با شیب خطی افزایش می‌یابد. در هر حالت مقایسه ای بین دو غلظت می‌توان نسبت تغییر پتانسیل زتا به تغییر غلظت را بعنوان معیاری از هیدروفوبیسیته سطحی باکتری در نظر گرفت هر چقدر این مقدار کمتر باشد نشان‌دهنده هیدروفوبیسیته بیشتر است. نتایج بدست آمده در هر حالت در جدول (۱) نشان داده شده اند. بررسی نتایج نشان می‌دهد که با افزایش غلظت باکتریها از $10^1 \frac{\text{cfu}}{\text{ml}}$ تا $10^8 \frac{\text{cfu}}{\text{ml}}$ ، مقدار نسبت بدست آمده که نشان‌دهنده افزایش بسیار زیاد هیدروفوبیسیته سطح باکتریها است که این نتیجه را می‌توان به تمایل شدید باکتریها به تجمع و تشکیل cord form نسبت داد. از طرف دیگر با افزایش تجمع باکتریها ویسکوزیته نمونه مورد آزمایش افزایش می‌یابد و تحرک الکتروفورتیک آنها کاهش می‌یابد. از آنجا که انطباق تغییر تحرک الکتروفورتیک و پتانسیل زتا به اندازه ذره بستگی دارد، تغییر اندازه کلنی‌های باکتریها در غلظتهای مختلف اندازه گیری شدند و در جدول (۲) سه مقدار تغییر نسبی پتانسیل زتا، تغییر نسبی کاندوکتانس و تغییر اندازه ذره مقایسه گردیدند.

حالت	غلظت‌های باکتری مورد مقایسه ($\frac{cfu}{ml}$)	نسبت تغییر پتانسیل زتا به تغییر غلظت $\frac{mvml}{cfu}$
۱	$10^1 - 10^2$	$4/4 \times 10^{-3}$
۲	$10^2 - 10^3$	$1/7 \times 10^{-3}$
۳	$10^3 - 10^4$	$1/7 \times 10^{-4}$
۴	$10^4 - 10^5$	$4/4 \times 10^{-6}$
۵	$10^5 - 10^6$	$1/7 \times 10^{-6}$
۶	$10^6 - 10^7$	$1/5 \times 10^{-7}$
۷	$10^7 - 10^8$	2×10^{-8}

جدول (۱) محاسبه نسبت تغییر پتانسیل زتا به تغییر غلظت باکتری در حالت‌های مختلف

حالت	غلظت‌های باکتری مورد مقایسه ($\frac{cfu}{ml}$)	تغییر نسبی پتانسیل زتا	تغییر نسبی کاندوکتانس	تغییر نسبی اندازه ذره
۱	$10^1 - 10^2$	۰/۱	۱/۲۵	۰/۲۹
۲	$10^2 - 10^3$	۰/۳۶	۰/۱۱	۰/۰۶
۳	$10^3 - 10^4$	۰/۲۸	۰/۳	۰/۰۳
۴	$10^4 - 10^5$	۰/۰۵	۱	۰/۱۷
۵	$10^5 - 10^6$	۰/۲۱	۰/۰۷	-۰/۰۵
۶	$10^6 - 10^7$	۰/۱۵	۰/۰۷	۰/۱۷
۷	$10^7 - 10^8$	۰/۲	۰/۷	-۰/۰۴
میانگین	-	۰/۱۹	۰/۵	۰/۰۹

جدول (۲) مقایسه تغییر نسبی کاندوکتانس سوسپانسیون باکتریایی با تغییر نسبی پتانسیل زتا و اندازه ذره همراه با میانگین بدست آمده در هر حالت

دقت در نتایج مربوط به جدول (۲) نشان می‌دهد که تغییر نسبی اندازه ذره کمتر از تغییر نسبی پتانسیل زتا است. بنابراین مجدداً این نتیجه بدست می‌آید که نقش اصلی در کاهش نسبت تغییر پتانسیل زتا به تغییر غلظت بر عهده افزایش هیدروفوبیسیته با افزایش اندازه ذره (کلنی‌های باکتری) است که ناشی از تشکیل حالت cord است. (12,13,14)

بررسی نمودارهای شکل‌های (۵) و (۶) نشان می‌دهند که با افزایش غلظت باکتریها، تغییر کاندوکتانس سوسپانسیون باکتریایی نسبت به محلول الکترولیت بدون باکتری، بطور خطی با شیب مورد نظر افزایش

می یابد که ناشی از افزایش هیدروفوبیسیته باکتریها با افزایش غلظت است. همانطور که قبلاً بیان شد جدول (۲) تغییر نسبی پتانسیل زتا را با تغییر نسبی کاندوکتانس و تغییر نسبی اندازه ذره مقایسه می کند.

زیاد بودن میزان تغییر نسبی کاندوکتانس نسبت به اندازه ذره (و حتی نسبت به پتانسیل زتا) نیز مجدداً، افزایش هیدروفوبیسیته باکتریها با افزایش غلظت را مورد تأکید قرار می دهد.

ثابت سلول k برابر است با نسبت فاصله بین الکترودها (d) به مساحت یا طول الکترودها (a) (در اینجا طول الکترودها):

$$k = \frac{d}{a} \quad (9)$$

در این مطالعه مقدار k برابر است با $\frac{1}{5}$ بنابراین می توان نسبت مقدار $\frac{G_B}{m^2}$ را بدست آورد (جدول ۲). با توجه به اینکه G_B کاندوکتانس یک باکتری است و قاعدتاً باید ثابت باشد بنابراین تنها عامل متغیر m یعنی تعداد باکتریها در زنجیر است که می تواند تعیین کننده تجمع باکتریها و تشکیل cord باشد. هر چه مقدار m بیشتر باشد یعنی تعداد باکتری بیشتری در زنجیر هستند و حالت تجمع باز شده است در نتیجه حاصل کسر $\frac{G_B}{m^2}$ کوچکتر خواهد بود. (13,14,15,16)

۵- خواص سلولی - ملکولی میکوباکتریوم توبرکولوسیس و ارتباط آن با نتایج بدست آمده

تفاوت اصلی میکوباکتریوم توبرکولوسیس با بیشتر باکتریها مربوط به خواص غیر معمول فیزیوشیمیایی سطح سلولی آن است. این سطح کاملاً دینامیک است و پاسخهای متفاوتی به شرایط مختلف محیطی می دهد.

دیواره سلولی این باکتری که نامتقارن است شامل یک بخش داخلی ساخته شده از اسید میکولیک متصل به یک داربست پپتیدوگلیکان - آرایینوگلاکتان و یک بخش خارجی غیر کووالان بصورت تجمع لیپیدها و پروتئین ها است. لایه خارجی دیواره سلولی یک دولایه لیپیدی مشابه غشای خارجی است و تقریباً ۸nm قطر دارد که منطبق بر اندازه پروتئین های غشای خارجی نظیر پورین ها است. لیپیدهای دیواره سلولی شامل گلیکولیپیدها و فسفولیپیدها (نظیر غشای خارجی) است. ناحیه لایه میکولات حدود ۹nm قطر دارد و کنفورماسیون آن بصورت باریک و فشرده است. (8,9,12,13,14)

وجود زنجیرهای بلند اسید میکولیک در دیواره سلولی باعث کاهش توانایی انتقال الکترون، ناپایداری حرارتی و قابلیت نفوذ داروهای هیدروفوب می شود. بطور کلی ترکیب ملکولی اسید میکولیک تعیین کننده سیالیت و تجمع ملکول دیواره سلولی است. (8,9,10,11,12)

۶- جمع بندی

بمنظور تشخیص باکتری میکوباکتریوم توبرکولوسیس و میزان غلظت آن در یک سوسپانسیون استفاده از تکنیک های کانداکتیویتی و اندازه گیری پتانسیل زتا می توانند مهم باشند. نتیجه مهمی که در این مطالعه بدست آمده است خطی بودن تغییرات این کمیتها با افزایش غلظت باکتریها است که مربوط به حالت تجمع باکتریها و در نتیجه افزایش هیدروفوبیسیته است. بنابراین بطور کلی می توان با در نظر گرفتن بستگی خطی غلظت باکتریها با تغییر کاندوکتانس و پتانسیل زتا، غلظتهای مجهول باکتری در نمونه های مورد نظر را

با استفاده از یک بیوسنسور پرتابل محاسبه نمود. چنین بیوسنسوری همچنانکه قبلاً بیان نمودیم میتواند علاوه بر دارا بودن دقت و سرعت تشخیص بالا در مناطق کمتر توسعه یافته کارایی زیادی داشته باشد.

منابع

1. Pourmir, A. R., Bahrmand, A. R., Etefagh Far, S. H., Hadizadeh Tasbiti, A. R., & Yari, Sh. (2016). Electrical impedance spectroscopy (EIS) for rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* bacilli (MTB) in suspensions using interdigitated microelectrode (IME), *71*(5), 1–8.
2. Moule, M. G., & Cirillo, J. D. (2020). *Mycobacterium tuberculosis* dissemination plays a critical role in pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*(65), 1–12.
3. Muhammad-Tahir, Z., & Alocilja, E. C. (2003). A conductometric biosensor for biosecurity. *Biosensors and Bioelectronics*, *18*, 813–819.
4. Yang, L., & Bashir, R. (2008). Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. *Biotechnology Advances*, , 135–150.
5. Poortinga, A. T., Bos, R., Norde, W., & Busscher, H. J. (2002). Electric double layer interactions in bacterial adhesion to surfaces. *Surface Science Reports*, *47*, 1–32.
6. Zhou, L., He, X., He, D., Wang, K., & Qin, D. (2011). Biosensing technologies for *Mycobacterium tuberculosis* detection: Status and new developments. *Clinical and Developmental Immunology*, *2011*, 1–8.
7. Suehiro, J., Shutou, M., Hatano, T., & Hara, M. (2003). High sensitive detection of biological cells using dielectrophoretic impedance measurement method combined with electroporabilization. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *96*, 144–151.
8. Roberts, V. V. (2008). Immunochemistry of mycolic acid antigens in tuberculosis (Master's thesis, University of Pretoria).
9. Baren, V., Havelkova, M., Kaustova, J., Dvorska, L., & Pavlik, I. (2006). Cell wall deficient forms of mycobacteria: A review. *Veterinarni Medicina*, *51*(7), 365–389.
10. Glickman, M., & Jacobs, W. R. (2001). Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: Dawn of a discipline. *Cell*, *104*(2), 477–485.
11. Ljungh, A., Yanagisawa, N., & Wadstrom, T. (2006). Using the principle of hydrophobic interaction to bind and remove wound bacteria. *Journal of Wound Care*, *15*(4).
12. Julian, E., Roldan, M., Sanchez-Chardi, A., Astola, O., Agusti, G., & Luquin, M. (2010). Microscopic cords, a virulence-related characteristic of *Mycobacterium tuberculosis*, are also present in nonpathogenic mycobacteria. *Journal of Bacteriology*, *192*(7), 1751–1760.
13. Hunter, R. L., Olsen, M. R., Jagannath, C., & Actor, J. K. (2006). Multiple roles of cord factor in the pathogenesis of primary, secondary, and cavity tuberculosis. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, *36*(4), 371–386.
14. Balasingham, S., Davidsen, T., Szpinda, I., Frye, S., & Tonjum, T. (2009). Molecular diagnostics in tuberculosis: Basis and implications for therapy. *Molecular Diagnosis & Therapy*, *13*(3), 137–151.
15. He, F., Zhao, J., Zhang, L., & Su, X. (2003). A rapid method for determining *Mycobacterium tuberculosis* based on a bulk acoustic wave impedance biosensor. *Talanta*, 935–941.

16. Sinha, S., Kosalai, K., Arora, S., Namane, A., Sharma, P., Gaikwad, A. N., Brodin, P., & Cole, S. T. (2005). Immunogenic membrane-associated proteins of *Mycobacterium tuberculosis* revealed by proteomics. *Microbiology*, 151, 2411–2419.