

بررسی تغییرات پتانسیل زتا و هدایت سنجی (کانداکتیویمتری) دیواره سلولی میکوباکتریوم توبرکولوسیس و شمارش تعداد باکتریها بر مبنای این تغییرات و نقش هیدروفوبیسیته

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

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

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

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

چکیده

با توجه به خطر باکتری میکوباکتریوم توبرکولوسیس و گستردگی آلودگی به این باکتری، شناسایی به موقع و سریع آن از اهمیت زیادی برخوردار است. روش‌های شناسایی کشت پایه هر چند در غلظت‌های کم با سیل قابلیت کاربرد دارند اما در زمان طولانی قابل استفاده اند و روش میکروسکوپی اسمیر AFB گرچه در زمان نسبتاً کوتاه مناسب است اما در غلظت‌های کم با سیل مناسب نیست. استفاده از روش‌هایی نظیر PCR، ELISA و نظایر آنها گرچه دو مشکل ذکر شده را تا حدودی حل می‌کنند، اما بسیار گرانقیمت بوده و در همه جا عملی نیستند. با پیشرفت تکنولوژی حسگری، اخیراً استفاده از تکنولوژی کانداکتیویمتری بمنظور شناسایی تعداد کم با سیل میکوباکتریوم توبرکولوسیس مطرح گردیده که بر اساس آن از دو نوع میدان AC و DC استفاده می‌گردد. در این مطالعه هدایت الکتریکی (کاندوکتانس) و پتانسیل زتا در غلظت‌های مختلف با سیل بر مبنای CFU/ml در میدانهای AC و DC اندازه‌گیری شدند 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 CFU/ml تغییر کاندوکتانس از $4\mu S$ تا $34\mu S$ افزایش یافت. همچنین میزان تغییر پتانسیل زتا در این بازه غلظت از $-4mV$ در غلظت 10^1 CFU/ml به $-12mV$ در غلظت 10^8 CFU/ml افزایش یافت. همچنین مقایسه بین اندازه کلونی‌ها با کاندوکتانس و پتانسیل زتا نیز انجام گردید. به اینصورت که مشخص شد تغییر نسبی اندازه کلونی‌ها کمتر از تغییر نسبی پتانسیل زتا و تغییر نسبی کاندوکتانس است. با افزایش غلظت باکتری‌ها، هیدروفوبیسیته آنها افزایش می‌یابد که کمتر بودن افزایش اندازه کلونی‌ها نسبت به میزان تغییر پتانسیل زتا و کاندوکتانس نشاندهنده آن است؛ بنابراین با توجه به نتایج این مطالعه و بررسی الگوی افزایش کاندوکتانس و پتانسیل زتا سعی می‌شود از نتایج آن برای اندازه‌گیری تعداد باکتری استفاده شود. تکمیل بررسی حاضر می‌تواند امکان ساخت وسیله‌ای را فراهم سازد که با استفاده از آن بتوان نوع و تعداد باکتری را با بکارگیری یک سیستم تشخیص دهنده پرتابل، بصورتی سریع و با دقت قابل قبول انجام داد و با بهره‌گیری از آن در مناطق دوردست فاقد امکانات آزمایشگاهی و کلینیکی، مقدمات لازم برای کنترل گسترش بیشتر باکتری را فراهم ساخت.

کلمات کلیدی: هیدروفوبیسیته، میکوباکتریوم توبرکولوسیس، کانداکتیویمتری، پتانسیل زتا

۱-مقدمه

۱-۱ اهمیت شناسایی میکوباکتریوم توبرکولوسیس

میکوباکتریوم توبرکولوسیس یک باکتری پاتوژن بسیار خطرناک است که باعث ایجاد بیماری سل می‌شود. سل نام گروهی از عفونت‌های باکتریایی است که بوسیله اعضای خانواده میکوباکتریوم توبرکولوسیس ایجاد می‌شود و می‌تواند باعث عفونت شش‌ها (ریوی) و همچنین کلیه‌ها، گره‌های لنفاوی، استخوان‌ها و مفاصل (ریوی-فوقانی) گردد. اخیراً مشخص شده است که حدود یک سوم جمعیت انسان‌ها در سراسر جهان بوسیله باسیل سل آلوده شده‌اند. سل یک مخاطره جدی برای سلامت است که می‌تواند متعاقب سندروم عفونت سیستم ایمنی (AIDS) پدیدار گردد. پدیدار شدن گونه‌های مقاوم نسبت به دارو و اپیدمی ایدز از جمله دلایل اصلی گسترش مجدد سل هستند. تشخیص سریع و درمان متعاقب آن بطور قابل ملاحظه‌ای باعث کنترل سل می‌شوند زیرا یک بیمار بطور میانگین از طریق دستگاه تنفس بیماری را به ۱۲ تا ۱۵ نفر در سال منتقل می‌کند [1,2,3,4].

در نتیجه، تدوین شیوه‌های جدید تشخیصی سریع و حساس به ویژه با توجه به گسترش و توزیع میکوباکتریوم توبرکولوسیس بسیار ضروری می‌باشد. در بسیاری مناطق از روش‌های سنتی بویژه روش‌های کشت پایه استفاده می‌شود که شامل کشت سلولی و تقویت سلولی هستند اما زمان مورد نیاز برای این روش‌ها معمولاً زیاد است، زیرا این باکتری دارای رشد آهسته‌ای است. با کشت سلولی، با وجود زمان بر بودن آن، می‌توان غلظت‌های کم میکوباکتریایی را شناسایی نمود. روش میکروسکوپی اسمیر AFB سریع و ارزان است و می‌تواند جایگزین مناسبی باشد، اما قادر به شناسایی باکتری در غلظت‌های کم نیست. روش‌های PCR، آگلوتیناسیون لاتکس، ELISA، اندازه‌گیری‌های پرتوی و فلوسایتومتری در جهت شناسایی سریع میکوباکتریوم توبرکولوسیس پیشنهاد شده‌اند. البته این روش‌ها نمی‌توانند نتایج شناسایی را فوراً ارائه نمایند بلکه نیازمند بهره‌گیری از تجهیزات پیچیده، دقیق و حساس هستند و کاربرد آنها مستلزم وجود مارکرهای خاص می‌باشد؛ بنابراین بمنظور توسعه روش‌های حساس، دقیق، سریع و قابل انجام در نقاط کم برخوردار در جهت پیشگیری موثر از عفونت سل، استفاده از روش‌های دیگر ضروری است [1,2,3,4].

۲-۱ بیوالکتریک دیواره سلولی میکوباکتریوم توبرکولوسیس

با پیشرفت تکنولوژی بیوسنسورها بویژه در جهت تشخیص بیماری، نگهداری مواد غذایی، فرایندهای زیستی و حفاظت از محیط زیست کاربردهای فراوانی پیدا شده‌اند. بیوسنسورها بطور اختصاصی عمل کرده و دارای حساسیت زیادی هستند که اجازه می‌دهد شناسایی طیف وسیعی از آنالیتها نظیر خلط، بزاق، سرم و ادرار با مراحل آماده‌سازی مختصر انجام شود. گروه‌های باردار موجود در دیواره باکتری می‌توانند در قدرت‌های یونی یا pH محیط‌های سوسپانسیون مجتمع یا مجزا را شکل داده و یا به یک سطح باردار نظیر یک باکتری دیگر یا یک سوپسترا متصل گردند. ملکول‌های باردار بر اساس نوع سطحی که به آن می‌پیوندند کنفورماسیون متفاوتی بخود می‌گیرند. بعلاوه تغییر آرایه پپتیدو گلیکان که بصورت ناحیه ضمیمه به سطح یا کپسول در سطح سلول باکتریایی قرار گرفته است می‌تواند آن را نسبت به حلال‌ها و یون‌های خاصی نفوذپذیر نماید. این ملکول‌ها که درون دیواره سلولی باکتریایی توزیع شده‌اند باعث ایجاد یک لایه دوگانه الکتریکی می‌شوند. از طرفی سطح سلول باکتریایی یک سطح بسیار دینامیک است که از طریق جذب و ماکرو ملکول‌های خاص، باعث بروز یک پاسخ قوی به تغییرات محیطی می‌گردد؛ بنابراین با توجه به دینامیک و پیچیدگی ساختمانی دیواره باکتری‌ها، اتصال باکتری به بسترهای مختلف در قالب اندرکنشهای متفاوتی صورت می‌گیرد که با اتصال ساده ذرات کلونیدی سنتز شده‌ی به سطوح خارجی متفاوت هستند [1,2,3,4,5].

زمانیکه یک سطح باردار در تماس با یک محلول الکترولیت قرار می‌گیرد یک لایهٔ دوگانهٔ الکتریکی (EDL) شکل می‌گیرد. در این حالت یک توزیع فضایی از بارهای مخالف موجود در محلول ایجاد می‌شود و در نهایت با بارهای سطحی به یک تعادل می‌رسد. پتانسیل الکتریکی در سطح سلول باکتریایی معمولاً بر اساس تحرک الکتروفوریتیک، اندازه‌گیری می‌شود این پتانسیل با تحرک الکتروفوریتیک ارتباط مستقیم نداشته بلکه به دینامیک و موقعیت لحظه‌ای گروه‌های باردار در سطح سلول بستگی دارد. بار سطحی باکتری در اثر جدا شدن یا پروتونیزه شدن گروه‌های کربوکسیل، فسفات و آمینو و یا تغییر pH محیط ایجاد می‌گردند. ثابت‌های تفکیک مؤثر گروه‌های سطحی به خواص محیطی نظیر هیدروفوبیسیته موضعی و پتانسیل الکتریکی آنها بستگی دارند. در pH های فیزیولوژیک بین ۵ و ۷، بیشتر گونه‌های باکتریایی دارای بار منفی بوده و تعداد گروه‌های کربوکسیل و فسفات در آنها بیشتر از گروه‌های آمینی می‌شوند [1,3۴,5,6].

روش‌های تعیین بار سطحی باکتریایی شامل تیتراسیون پروتون، میکروالکتروفورز ویژه و اسپکتروسکوپی دی الکتریک هستند. تیتراسیون پروتون عبارتست از افزودن پروتون‌ها بصورت غلظت مشخصی از اسید به یک سوسپانسیون باکتریایی و اندازه‌گیری pH حاصل از آن که بر این اساس بار سطحی باکتری با توجه به تعداد پروتون‌های جذب شده به سطح باکتری بدست می‌آید. در روش اسپکتروسکوپی دی الکتریک، بستگی کاندوکتانس سوسپانسیون به فرکانس موج AC ایجاد کننده میدان الکتریکی و بر اساس اطلاعات مربوط به لایهٔ دوگانه الکتریکی ویژه ایجاد شده بخاطر حضور باکتری‌ها، اندازه‌گیری می‌شود [1,3,5,6].

۳-۱ شناسایی باسیل مایکوباکتریوم توبر کولوسیسی بر اساس پتانسیل زتا

پتانسیل الکتروستاتیک (پتانسیل زتا ζ) باکتری‌ها در اثر ایجاد یک حالت میکروالکتروفورز ویژه، شکل می‌گیرد. پتانسیل زتا بصورت پتانسیل الکتریکی در یک مدل هیدرودینامیک شکاف یا لغزش واجد گروه‌های باردار ثابت و متحرک قرار گرفته در یک حدواسط در نظر گرفته می‌شود. در مدل لغزش یک لایهٔ مایع فرضی در مجاورت سطح ذره در نظر گرفته شده و میزان تحرک آن در طی عمل الکتروفورز لایهٔ مایع نسبت به سطح ذره اندازه‌گیری می‌شود. ضخامت لایهٔ مایع در اطراف سطح ذره در مدل لغزش در حدود چند نانومتر است. پتانسیل زتا اغلب معادل با پتانسیل نفوذ لایهٔ دوگانه (ψ_d) در نظر گرفته می‌شود. با فرض اینکه لایهٔ دوگانه نازک و کندوکتانس سطح کم باشد، در حالتی که بارهای سطحی ثابت در نظر گرفته شوند، افزایش یا کاهش غلظت الکترولیت می‌تواند باعث حرکت در جهت متضاد بار (مثبت یا منفی) صورت گیرد. جهت این حرکت به علامت و بزرگی بارها بستگی دارد. سرعت حرکت نیز قویاً به اندازه و غلظت الکترولیت وابسته است [1,5,6].

یون‌ها در سیال در یک لایهٔ بسته بشدت جذب سوبسترا می‌شوند و در نتیجه غیر متحرک می‌گردند. این لایه، لایهٔ اشترن نام دارد و با بکار بردن یک میدان الکتریکی خارجی می‌توان تعدادی از آنها را از این لایه خارج کرده و بسوی الکتروود دارای بار مخالف سوق داد. پتانسیل ایجاد شده در این حالت در شکاف، همان پتانسیل زتا است [6].

ذرات تحت تأثیر پتانسیل زتا بسوی الکتروود دارای بار مخالف حرکت می‌کنند. مشخصهٔ اصلی الکتروفوریتیک ذرات تحرک الکتروفوریتیک (μ) است که بر اساس معادله [۱]، برابر نسبت سرعت ذره (u) به شدت میدان الکتریکی (E) است.

$$\mu = \frac{u}{E} \quad (۱)$$

تحرک الکتروفوریتیک با پتانسیل زتای ذره افزایش یافته و با ویسکوزیتهٔ η کاهش می‌یابد. تطابق یکسان μ و ζ به اندازهٔ ذره بستگی دارد [6].

در هنگام استفاده از میدان‌های DC، یک پیچیدگی ناشی از حرکت ذره در محیط یونی تحرک مایع مجاور دیوارهای سلولی مشاهده می‌شود. وجود ناحیه دی الکتریک مجاور دیوارهای سلولی و عدم تماس مستقیم آن با مایع نزدیک دیواره باعث افزایش میزان بار در دو لایه الکتریکی می‌شود. یون‌ها در این لایه به سمت الکتروود دارای بار مخالف حرکت کرده و مایع را نیز با خود می‌کشند و در اثر آن فرایند الکترواستاتیک آب انجام می‌شود. ذرات قطبی نه تنها با یکدیگر اندرکنش می‌دهند بلکه باعث تغییر شدت میدان در ناحیه مجاور سلول نیز می‌گردند میزان توانایی راندن ذرات بسوی یک الکتروود با بار مخالف می‌تواند در جهت تعیین غلظت، ته نشینی یا کریستالیزه شدن کلونیدی آنها بکار رود. اگر میدان به اندازه کافی قوی باشد، ذرات می‌توانند بطور برگشت ناپذیر جذب سطح شوند [6].

۴-۱ شناسایی باکتری مایکوباکتریوم توبرکولوسیس بر اساس هدایت الکتریکی یا کاندوکتانس

کاندوکتانس توانایی یک محلول دارای یون‌های فلزی در عبور دادن یک جریان الکتریکی با تأثیر از میدان‌های AC و فرکانس‌های خاص است. جریان در محلول‌ها بوسیله کاتیون‌ها و آنیون‌ها حمل می‌شود در حالیکه این کار در فلزات بوسیله الکترون‌ها صورت می‌گیرد. کاندوکتانس یک محلول بستگی به: غلظت، تحرک و ظرفیت یون‌ها و دما دارد. کاندوکتانس می‌تواند براساس یک جریان الکتریکی (I) بین دو الکتروود و با توجه به اختلاف پتانسیل اعمال شده اندازه‌گیری شود. در طی این فرایند، کاتیون‌ها به طرف الکتروود منفی و آنیون‌ها به سمت الکتروود مثبت حرکت کرده و محلول بصورت یک هدایت کننده الکتریکی عمل می‌کند.

معمولاً کاندوکتانس در محلول‌های آبی الکترولیت (که دارای یون هستند) اندازه‌گیری می‌شود. بار یون‌ها در محلول باعث تسهیل هدایت جریان الکتریکی می‌شود و کاندوکتانس یک محلول تا حدودی با افزایش غلظت یون‌ها افزایش می‌یابد. [1,3,5,6,7].

۵-۱ خواص سلولی - ملکولی دیواره سلولی میکوباکتریوم توبرکولوسیس

تفاوت اصلی میکوباکتریوم توبرکولوسیس با بیشتر باکتری‌ها مربوط به خواص غیر معمول فیزیکیوشیمیایی سطح سلولی آن است. دلیل ناتراوایی پوشش سلول این باکتری هنوز کاملاً مشخص نیست اما مشاهده شده است که این پوشش استاتیک نبوده و کاملاً دینامیک است و پاسخ‌های متفاوتی به شرایط مختلف محیطی می‌دهد. پوشش سلولی میکوباکتریوم توبرکولوسیس شامل سه لایه اصلی است: غشای سیتوپلاسمی، دیواره سلولی و کپسول. غشای سیتوپلاسمی این باکتری مشابه سایر باکتری‌ها است و شامل انواع لیپیدها، گلیکولیپیدها و پروتئین‌ها است در صورتیکه کپسول شامل پلی ساکاریدها و پروتئینی است، [7,8,9]

دیواره سلولی این باکتری که نامتقارن بوده و شامل یک بخش داخلی ساخته شده از اسید میکولیک متصل به یک داربست پپتیدوگلیکان - آرابینوگالاکتان و یک بخش خارجی غیر کووالان بصورت تجمع لیپیدها و پروتئین‌ها است. لایه خارجی دیواره سلولی یک دولایه لیپیدی مشابه غشای خارجی است و تقریباً ۸nm قطر دارد. لیپیدهای دیواره سلولی شامل گلیکولیپیدها و فسفولیپیدها (نظیر غشای خارجی) است. ناحیه لایه میکولات حدود ۹nm قطر دارد. [6,7,9]

اسید میکولیک بطور متوسط ۵۰ درصد وزن خشک سلول میکوباکتریایی را شامل می‌شود. این اسید، یک هیدروکسی اسید است و ساختار پایه آن بصورت $R^2CH(OH)CH(R^1)COOH$ است که R^1 یک شاخه آلکان $(C_{22} - C_{24})$ و R^2 یک زنجیر آلکیل $(C_{30} - C_{60})$ شامل گروه‌های عاملی مختلف است. تفاوت اصلی بین انواع اسیدهای میکولیک مربوط به طول زنجیر اصلی و طول زنجیرهای مربوط به گروه‌های عاملی آنها است. [1,6,7, 9]

وجود زنجیره‌های بلند اسید میکولیک در دیواره سلولی باعث کاهش توانایی انتقال الکترون، ناپایداری حرارتی و قابلیت نفوذ داروهای هیدروفوب می‌شود. بطور کلی ترکیب ملکولی اسید میکولیک تعیین کننده سیالیت و تجمع ملکول دیواره سلولی است. [6,7,8]

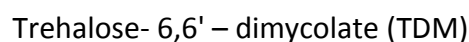
دیواره سلولی میکوباکتریایی بخاطر مقادیر زیاد لیپید و بویژه هیدروفوبیسیته بالای آن در مقایسه با سایر باکتریها عامل مقاومت زیاد این باکتری در برابر سیستم ایمنی است؛ و ناتراوایی زیاد آن شده است. [6,7,8,9,10]

کل ترکیبات دیواره سلولی میکوباکتریایی عبارتند از:

۱- پپتید و گلیکان (شامل (- D- alanine) - meso- diaminopimelyl - D- isoglutaminyl - L- alanyl - ۲- آرابینو گالاکتان (AG) ۳- اسید میکولیک ۴- لیپوآرابینومانان ۵- گلیکولیپیدهای دفعی (Los) ۶- گلیکولیپیدهای فنلی (PGL) ۷- گلیکوپپتیدولیپیدها (GPL) ۸- واکسها ۹- ترهالوز acylated ۱۰- سولفولیپیدها ۱۱- گلیسروفسولولیپیدها ۱۲- پروتئینها (شکل ۱) [9]

بیماریزایی میکوباکتریوم توبرکولوسیس بیشتر به دلیل وجود ساختار طنابی (Cord Factor) است که عامل ایجاد اندرکنش‌های هیدروفوب بین این باکتری‌ها بویژه در غلظت‌های بالا می‌شود [11].

اولین بار Cord Factor بوسیله Gardner Middlebrook در سال ۱۹۴۷ بعنوان عامل تعیین کننده در بیماریزایی میکوباکتریوم توبرکولوسیس معرفی شد. سپس Hubert Bloch پیشنهاد کرد که پیدایش این Cord نتیجه تجمع لیپیدهای سطحی باکتری است پس مشخص شد ساختار شیمیایی آن بصورت زیر است:



Retzinger و همکارانش نشان دادند که تک لایه‌های TDM در نتیجه اندرکنش هیدروفوب تجمعات پایدار و صلب (rigid) بصورت خودبخود تشکیل می‌دهند؛ و بر این اساس Behling و Schabbing یک مدل ملکولی از این ساختار ارائه نمودند. هر تک لایه بصورت یک کریستال دو بعدی منظم خطی هیدروفیل مرکب از دومین‌های trehalose هیدروفیل و میکولات هیدروفوب است. این تک لایه هم در حالت Invitro و هم در حالت Invivo پایدار است. در یک سوسپانسیون فاقد ترکیبات هیدروفوب، TDM استوانه‌های میسلی شکل تشکیل می‌دهد؛ که بصورت یک پوشش هیدروفیل مرکب از نیمه‌های trehalose هستند که در اثر شکل‌گیری آن گروه‌های اسید میکولیک در مرکز ساختار کاملاً محبوس می‌گردند. سرانجام TDM با دیگر لیپیدها در دیواره سلولی میکوباکتریایی تشکیل کمپلکس می‌دهد و یک دو لایه همراه با Lipoarabinomannan (LAM) تشکیل می‌گردد.

اندازه و بهم پیوستگی زنجیره‌های هیدروکربنی اسید میکولیک باعث ایجاد پایداری فوق‌العاده و ناتراوایی دیواره سلولی میکوباکتریایی شده است.

TDM یک ملکول amphiphile بوده و باعث تشکیل میسل در سوسپانسیون با کنفیگوراسیون منظم پایدار بر روی نواحی هیدروفوب می‌گردد. [11].

در این تحقیق سعی شده است با مقایسه نتایج مربوط به تغییر پتانسیل زتا، اندازه کلنی‌های باکتری و تغییر کاندوکتانس، معیار نسبتاً دقیقی برای شناسایی تعداد باکتری در نمونه مورد آزمایش بدست آید.

۲- مواد و روشها

۲-۱ مواد

باکتری مورد استفاده در این آزمایش مشخصات منبع نوع باکتری میکوباکتریوم توبرکولوسیس بدست آمده از محیط کشت لوونشتاین - یسنن از نمونه خلط بیماران با غلظت ۰/۵ مک فارلند بود. محلول تمامی مواد استفاده شده از شرکت Chem China خریداری شده اند. الکترولیت مورد استفاده محلول سرم فیزیولوژی ۰/۹٪ NaCl (W/V) و سوسپانسیون باکتریایی اولیه از محلول مک فارلند ۰/۵ (۳× ۱۰^۸ CFU/ml) تشکیل شده بود که هشت مرتبه و هر مرتبه ۱۰ برابر رقیق شد تا غلظت نهایی باکتری به یک CFU/ml رسید.

۲-۲ اندازه گیری کندوکتانس

تغییرات کندوکتانس سوسپانسیون باکتریایی نسبت به محلول الکترولیت بدون باکتری در غلظتهای مختلف باکتری CFU/ml با استفاده از دستگاه کانداکتیویته متر CONDUCTIVITY METER شرکت WTW مدل Cond 3110 ساخت آلمان-امریکا اندازه گیری شد و بر اساس μS گزارش گردیدند. الکترودهای مورد استفاده از جنس استنلس استیل با طول ۴cm و فاصله ۱ cm بودند.

۲-۳ بررسیهای میکروسکوپی

برای مشاهده ساختار طنابی (cord form) از میکروسکپ نوری مدل MCX50 ساخت شرکت micros کشور بریتانیا با بزرگنمایی عدسی ۱۰۰× و رنگ آمیزی زیل-نیلسن استفاده گردید و آرایش و توزیع باکتریها در محیط کشت نیز در غلظتهای مختلف با استفاده از میکروسکپ اینورت مدل IM3 کشور دانمارک در بزرگنمایی X40 صورت گرفت.

۲-۴ اندازه گیری پتانسیل زتا و اندازه کلنی ها

پتانسیل زتای سوسپانسیون باکتریایی نسبت به محلول الکترولیت بدون باکتری در غلظتهای مختلف باکتری بر اساس CFU/ml، اندازه گیری گردید و اندازه کلنی باکتریایی در هر غلظت باکتری با استفاده از دستگاه DLS، شرکت Malvern مدل Zetasizer Nano ساخت بریتانیا اندازه گیری شد.

۲-۵ محاسبات نظری

کاندوکتانس

مقدار اندازه گیری شده کندوکتانس توسط کانداکتومتر $G_A(t)$ (که تابع زمان است) برابر است با:

$$G_A(t) = G_T(t) + G_E \quad (2)$$

که G_E و $G_T(t)$ (تابع زمان) به ترتیب عبارتند از کاندوکتانس الکتروود سالم و باکتریهای موجود. فرض می شود که کاندوکتانس الکتروود G_E حتی وقتی سلولها بین الکتروودها قرار می گیرند، تغییر نمی کند.

کاندوکتانس $G_T(t)$ برابر است با :

$$G_T(t) = n(t)G_p \quad (۳)$$

که $n(t)$ تعداد کل زنجیرهای باکتری و G_p کاندوکتانس یک زنجیر است. اگر زنجیرها هم اندازه باشند و خواص دی الکتریک یکسانی داشته باشند G_p می تواند از این رابطه بدست آید :

$$G_p = \frac{G_B}{m} \quad (۴)$$

که G_B و m به ترتیب عبارتند از کاندوکتانس هر سلول و تعداد سلول موجود در هر زنجیر. از ترکیب دو معادله (۳) و (۴) می توان نوشت :

$$G_T(t) = \frac{n(t)G_B}{m} \quad (۵)$$

تعداد کل باکتریهای موجود در بین الکترودها $N(t)$ برابر است با :

$$N(t) = Mn(t) \quad (۶)$$

بطور نظری می توان گفت که تعداد $N(t)$ می تواند بوسیله معادله زیر بیان شود که با گذشت زمان بطور خطی افزایش می یابد.

$$N(t) = K\rho(t) \quad (۷)$$

K یک ثابت و ρ غلظت سلولها است. از ترکیب معادلات (۵) و (۷) می توان کاندوکتانس $G_T(t)$ را به اینصورت بدست آورد :

$$G_T(t) = \frac{K\rho G_B t}{m^2} \quad (۸)$$

۲-۶ بررسی های آماری

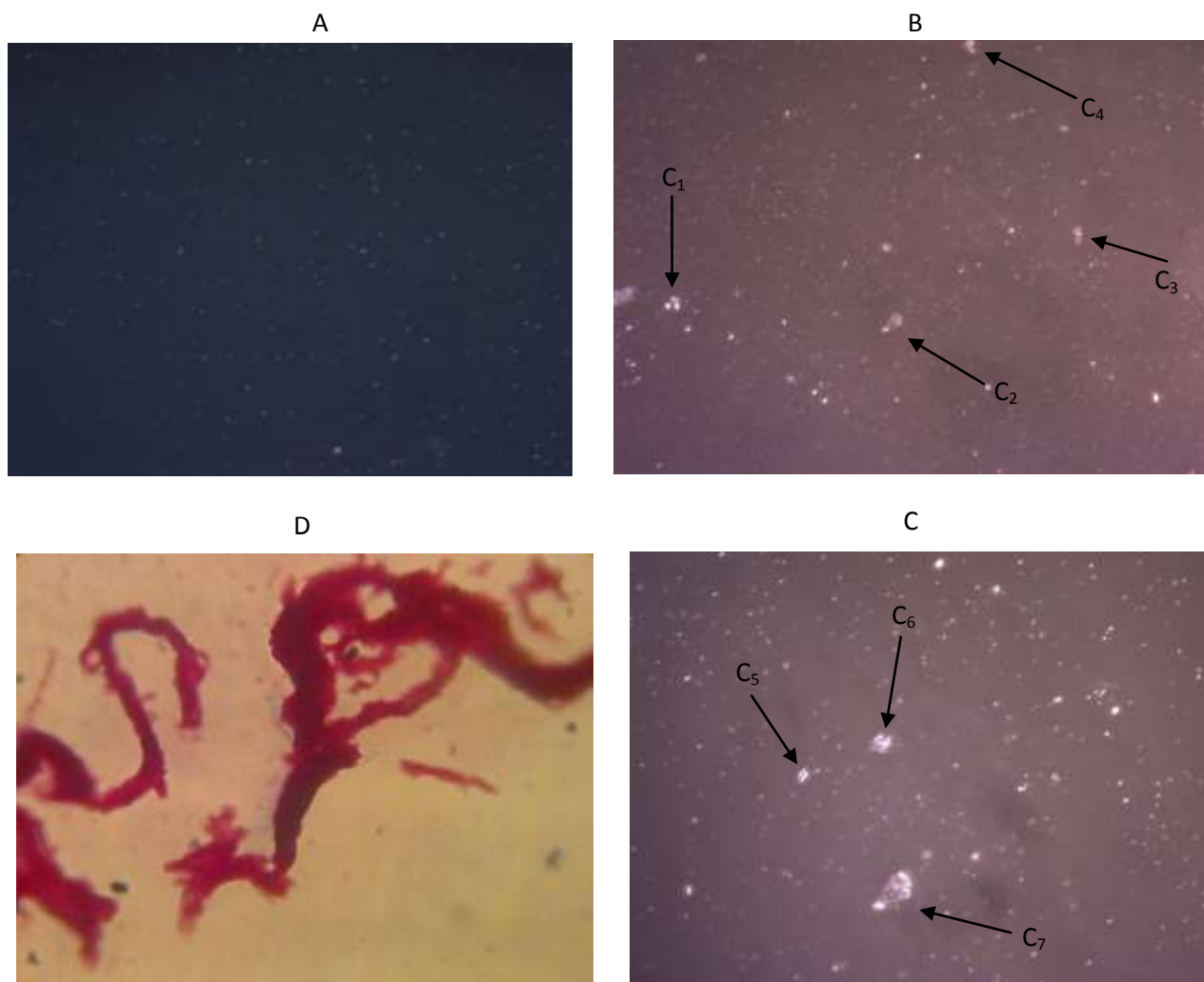
نتایج بدست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS و EXCEL مورد ارزیابی آماری قرار گرفته و با هم مقایسه گردیدند. هر آزمایش چهار مرتبه تکرار گردید و نتایج بر اساس student -t test مقایسه شده و در صورتیکه $p < 0.05$ بود، تفاوت شاخص تشخیص داده شده و نتیجه بصورت میانگین $\pm SD$ نشان داده شدند.

۳-نتایج

۳-۱ توزیع و آرایش های باکتری در محیط کشت

تصاویر باکتریها در غلظت های مختلف باکتری براساس چگونگی آرایش باکتریها، بصوت تک باکتریها و کلنی با استفاده از میکروسکپ نوری اینورت (با بزرگنمایی عدسی ۴۰) بدست آمدند و مورد تجزیه و تحلیل

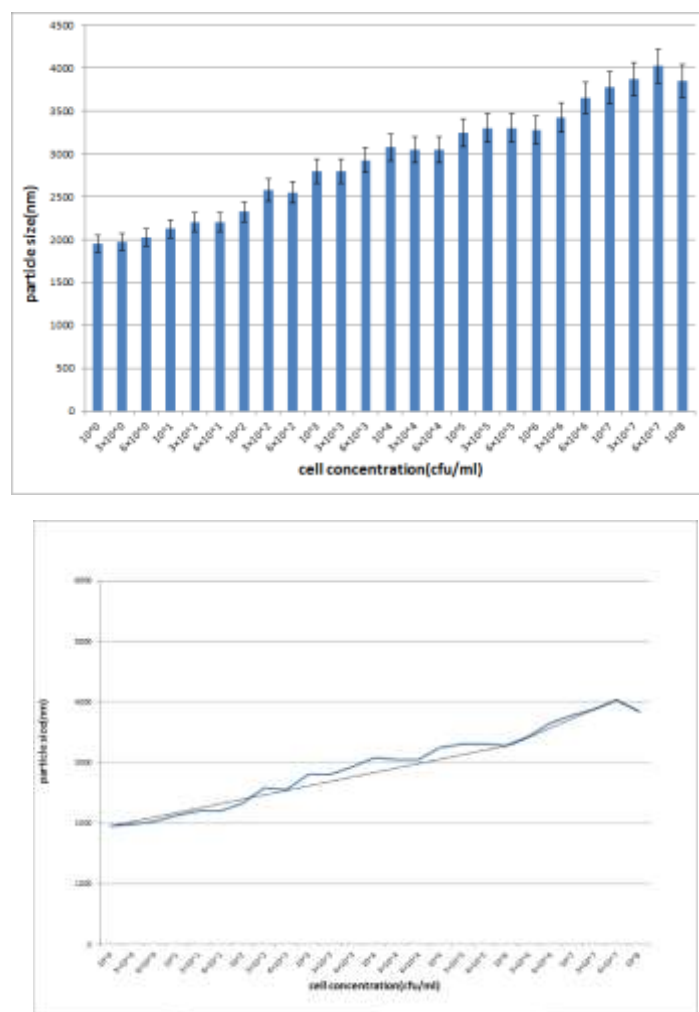
مورفولوژیکی قرار گرفتند. همچنین طناب‌های باکتریایی با استفاده از میکروسکپ نوری (با بزرگنمایی عدسی ۱۰۰) و رنگ‌آمیزی زیل-نیلسن بدست آمدند (شکل ۱)



(شکل ۱) - عکس میکروسکپ اینورت با بزرگنمایی عدسی ۴۰ به ترتیب (A) تک باکتری، (B) کلنی‌های دارای تعداد باکتری کم و (C) کلنی‌های دارای تعداد باکتری بیشتر. مد تصویربرداری فاز کنتراست است. کلنی‌ها با حروف C₁ تا C₇ نشان داده شده‌اند. با وجود غیر مشخص بودن تعداد باکتری‌ها در هر کلنی، به نظر می‌رسد کلنی C₁ واجد ۴ باکتری و کلنی‌های C₂، C₃ و C₄ واجد ۲ باکتری هستند. (D) عکس میکروسکپ نوری زایس با بزرگنمایی عدسی ۱۰۰× از شکل طنابی باکتری (Cord Form) در رنگ‌آمیزی زیل-نیلسن

۲-۳ اندازه کلنی باکتریها در غلظت های مختلف باکتری

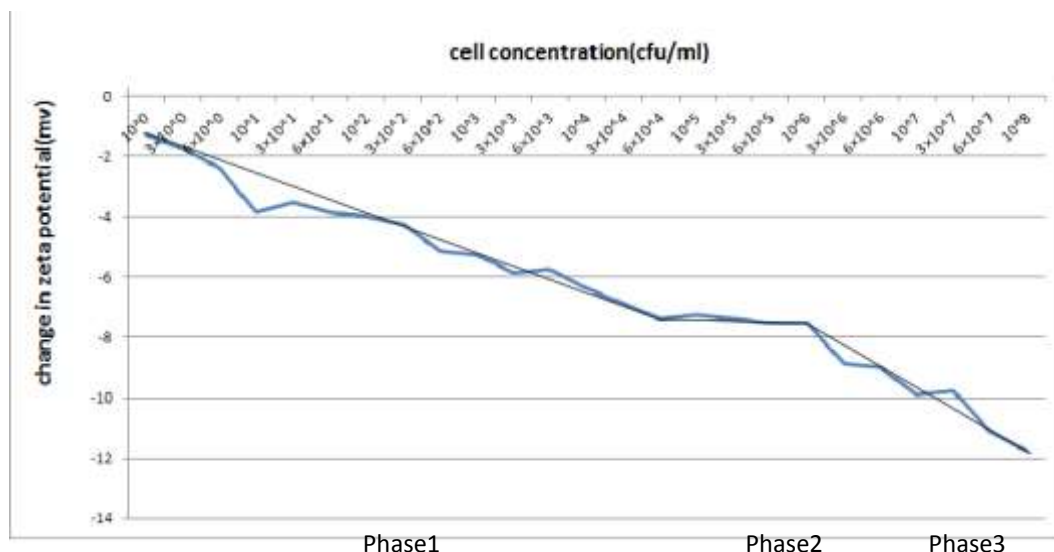
اندازه کلنی باکتری‌ها با افزایش غلظت باکتری‌ها بصورت خطی افزایش یافت. این افزایش در غلظتهای ۱۰^۶-۰، ۱۰^۷-۶×۱۰^۷ و ۱۰^۸-۱۰^۷ (CFU/ml) بترتیب با شیب ۳ / ۰ و ۵ / ۰ و ۷ / ۰ تغییر کردند. (شکل ۲)



(شکل ۲) - نمودار تغییرات اندازه کلنی باکتری بر حسب نانومتر در غلظت‌های مختلف بر حسب CFU/ml

۳-۳ ارتباط بین تغییر پتانسیل زتا و غلظت (تعداد) باکتریها

پتانسیل زتا متناسب با غلظت باکتریهای موجود در محیط، تا 10^5 CFU/ml، بصورت خطی افزایش پیدا کرده و شیب آن 0.5 - و در غلظت‌های 10^5 - 10^6 آهنگ تغییرات بسیار کند شده و تقریباً صفر است و در غلظت‌های 10^6 - 10^8 CFU/ml مقدار شیب برابر 0.6 - گردید (شکل ۳).



(شکل ۳) - نمودار تغییرات پتانسیل زتا (mV) در غلظت‌های مختلف باکتری (CFU/ml). در این گراف سه منطقه متفاوت از نظر شیب تغییرات پتانسیل زتا در غلظت‌های مختلف باکتری ملاحظه می‌گردد بطوریکه در محدوده پتانسیل‌های ۰ تا -۷mV فاز ۱، -۷mV تا -۱۲mV فاز ۲، و -۱۲mV تا -۱۴mV فاز ۳ که به ترتیب متناظر با غلظت‌های ۰ تا 10^{-5} ، 10^{-5} تا 10^{-6} و 10^{-6} تا 10^{-8} (CFU/ml) بودند ملاحظه گردیدند. هریک از آزمایشات ۴ دفعه تکرار شده اند.

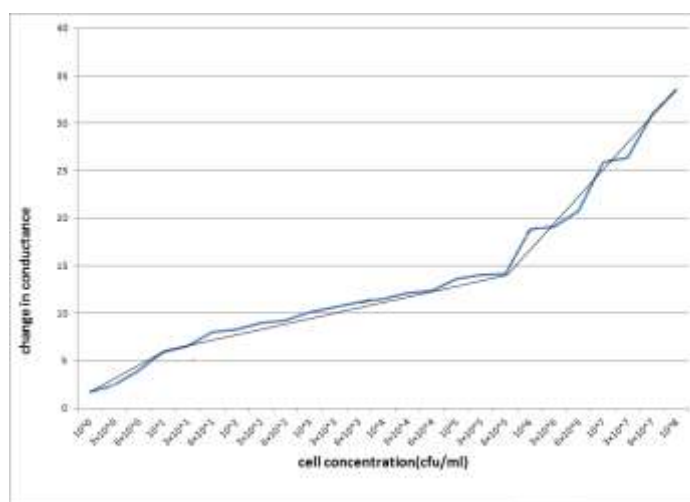
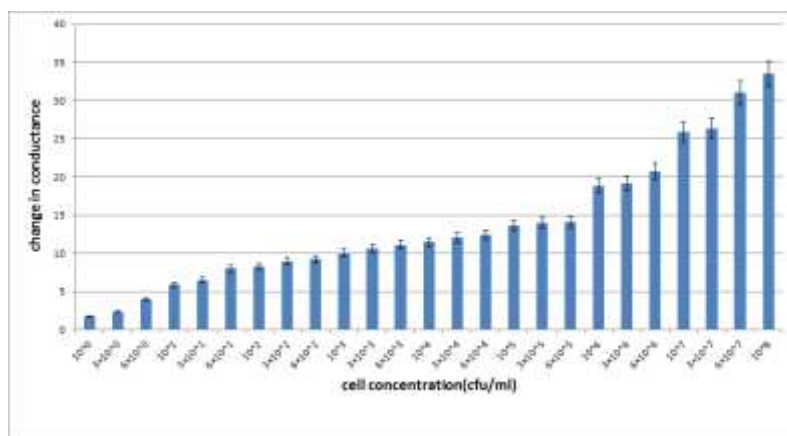
بررسی نتایج بدست آمده در آزمایش اندازه گیری تغییر پتانسیل زتا بر حسب غلظت باکتری نشان می‌دهد که با افزایش غلظت باکتریها بر حسب $\frac{\text{CFU}}{\text{ml}}$ از ۰ تا 10^8 بصورت خطی مقدار تغییر پتانسیل زتا (نسبت به حالت محلول الکترولیت بدون باکتری) از ۰ به -۱۲mV می‌رسد. افزایش پتانسیل زتا ناشی از افزایش تعداد بارهای سطحی ذره مورد اندازه گیری قرار گرفته است. با وجود افزایش غلظت باکتریها با ضریبی از ۱۰، میزان پتانسیل زتا با شیب خطی افزایش یافت.

بررسی شکل (۳) نشان می‌دهد که در غلظت‌های ۰ تا $10^5 \frac{\text{CFU}}{\text{ml}}$ مقدار $\frac{\xi}{\rho}$ متوسط یا همان شیب خط تقریباً نیم است؛ یعنی برای یک باکتری بطور میانگین مقدار ξ برابر با نیم میلی ولت است. در غلظت‌های 10^5 تا $10^6 \frac{\text{CFU}}{\text{ml}}$ و 10^6 تا $10^8 \frac{\text{CFU}}{\text{ml}}$ بطور متوسط به ترتیب برابر با تقریباً صفر و شش دهم میلی ولت است.

در حالیکه بررسی شکل (۲) نشان می‌دهد که در غلظت‌های ۰ تا 10^6 و 10^6 تا $6 \times 10^7 \frac{\text{CFU}}{\text{ml}}$ مقدار $\frac{s}{\rho}$ برابر با سه دهم و نیم است (اندازه متوسط یک تک باکتری برابر است با ۲۰۰۰ nm). مقدار $\frac{s}{\rho}$ در غلظت‌های 6×10^7 تا $10^8 \frac{\text{CFU}}{\text{ml}}$ برابر با هفت دهم است.

۳-۴ کاندوکتانس سوسپانسیون باکتریایی در غلظت های مختلف

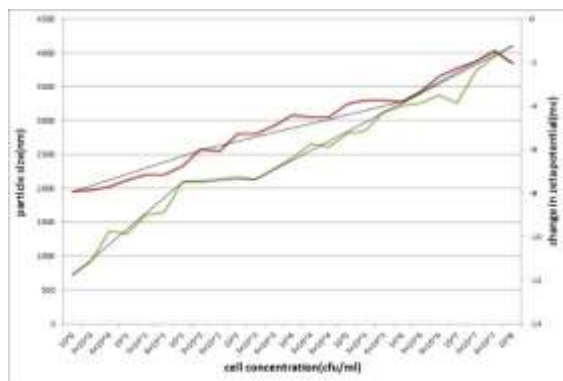
کاندوکتانس سوسپانسیون باکتریایی با افزایش غلظت محلول الکترولیت افزایش یافت. شیب خطی افزایش کاندوکتانس از غلظت ۰ تا ۱۰ CFU/ml، ۰/۶ و از غلظت ۱۰ تا ۱۰^۶ CFU/ml و همچنین از غلظت ۱۰^۶ تا ۱۰^۸، به ترتیب دو دهم و نه دهم است (شکل ۴). در غلظت های بین ۱۰ تا ۱۰^۶ CFU/ml مقدار $\frac{G}{\rho}$ در حالت خطی برابر است با دودهم اما در این غلظت ها باید مقدار $\frac{G}{\rho} = G_B$ را با استفاده از رابطه (۸) بدست آورد. براساس تصاویر بدست آمده (شکل ۱) در این غلظت ها بطور میانگین تعداد باکتری در هر زنجیر (m) برابر است با ۴ در نتیجه اگر زمان آزمایش ۱ دقیقه باشد و مقدار $k = 0/2$ را در نظر بگیریم مقدار G_B در این غلظت ها بطور میانگین برابر با هفت دهم است که بیشتر از مقدار بدست آمده در حالت خطی با محاسبه $\frac{G}{\rho}$ است یعنی تشکیل حالت cord منجر به افزایش میزان تغییر کاندوکتانس (کاهش کاندوکتانس) شده است.



(شکل ۴)- نمودار تغییرات کاندوکتانس (μS) سوسپانسیون باکتریایی در غلظت های مختلف نسبت به حالت پایه محلول الکترولیت بدون باکتری نسبت به غلظت باکتری CFU/ml

۴- بحث و نتیجه گیری

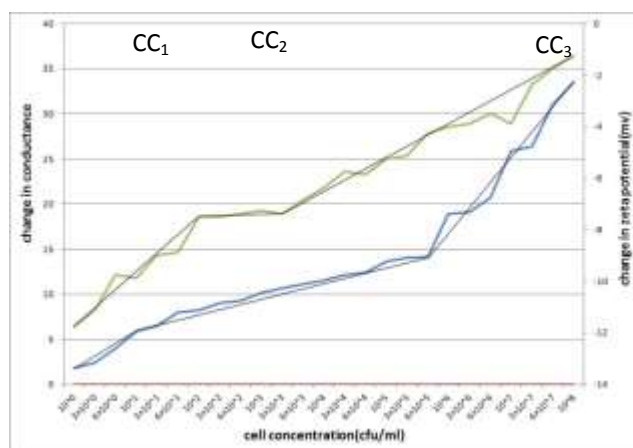
شیب تغییرات پتانسیل زتا در غلظت‌های کمتر از 10^5 CFU/ml بیشتر از شیب تغییرات اندازه کلنی باکتری‌ها است اما در غلظت‌های بیش از 10^5 CFU/ml شیب تغییرات پتانسیل زتا کاهش یافته و به شیب تغییرات اندازه کلنی باکتری‌ها نزدیک می‌شود (شکل ۵). در هر حالت مقایسه ای بین دو غلظت می‌توان نسبت تغییر پتانسیل زتا به تغییر غلظت را بعنوان معیاری از هیدروفوبیسیته سطحی باکتری در نظر گرفت هر چقدر این مقدار کمتر باشد نشان‌دهنده هیدروفوبیسیته بیشتر است.



(شکل ۵) - مقایسه تغییر پتانسیل زتا (خط سبز رنگ) و تغییر اندازه کلنی‌های باکتری (خط قرمز رنگ)

با افزایش غلظت باکتری‌ها از 10^5 تا 10^8 CFU/ml، مقدار نسبت بدست آمده نشان‌دهنده افزایش بسیار زیاد هیدروفوبیسیته سطح باکتری‌ها است که این نتیجه را می‌توان به تمایل شدید باکتری‌ها به تجمع نسبت داد.

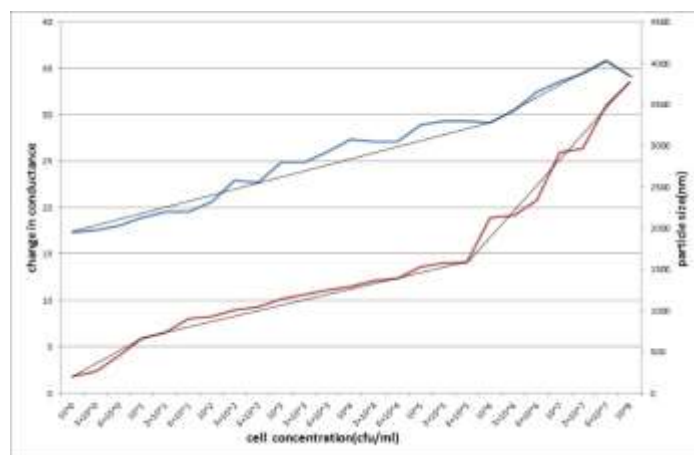
بطور کلی شیب تغییرات پتانسیل زتا و شیب تغییرات کاندوکتانس متفاوت بوده و مقایسه بین تغییر پتانسیل زتا و تغییر کاندوکتانس انجام شده نشان‌دهنده تغییرات خطی در محدوده‌های خاصی از غلظت باکتری است. شیب تغییرات پتانسیل زتا و کاندوکتانس در مناطق فاز (۱) CC_1 و فاز (۳) CC_3 مشابه یکدیگر می‌باشند (شکل ۶). شیب تغییرات خطی در هریک از مناطق فوق بدست آمده و بر اساس آن ارتباط بین پتانسیل زتا و کاندوکتانس در آن منطقه خاص بصورت زیر بدست آمد.



(شکل ۶)- مقایسه تغییر کاندوکتانس (خط آبی رنگ) و تغییر پتانسیل زتا (خط سبز رنگ). مناطق مختلف که در آنها شیب تغییرات خطی پتانسیل زتا و کاندوکتانس یکسان بودند بصورت مناطق CC1، CC2، و CC3 نشان داده شدند که بترتیب مربوط به محدوده های غلظتی 10^2-10^5 ، 10^5-10^8 و 10^8 باکتری می باشند.

تغییر نسبی اندازه ذره کمتر از تغییر نسبی مقدار پتانسیل زتا است؛ بنابراین نقش اصلی در کاهش نسبت تغییر پتانسیل زتا به تغییر غلظت مرتبط با افزایش هیدروفوبیسیته و افزایش اندازه ذره (کلنی های باکتری) ناشی از تشکیل حالت طنابی (cord) است. با افزایش غلظت باکتریها، تغییر کاندوکتانس سوسپانسیون باکتریایی نسبت به محلول الکترولیت بدون باکتری، بطور خطی نسبت به شیب افزایش می یابد که ناشی از افزایش هیدروفوبیسیته باکتریها همراه با افزایش غلظت است. زیاد بودن میزان تغییر نسبی کاندوکتانس نسبت به اندازه ذره نیز افزایش هیدروفوبیسیته باکتریها با افزایش غلظت را مورد تأکید قرار می دهد؛ یعنی با افزایش غلظت باکتری ها میزان تغییر اندازه کلنی باکتری خیلی کم می شود. تفاوت بین این تغییر و تغییر پتانسیل زتا در این غلظت ها نشاندهنده افزایش میزان هیدروفوبیسیته با افزایش غلظت باکتری ها است.

کاندوکتانس محیط با تغییر اندازه کلنی های باکتری تغییر می نماید و با آن متناسب است (شکل ۷). تغییر اندازه کلنی های باکتری تا حدود غلظت 10^6 (CFU/ml) با شیبی تقریباً معادل تغییر کاندوکتانس محیط، صورت می گیرد. در غلظت های بیشتر از آن شیب تغییر کاندوکتانس بیشتر از شیب تغییر اندازه کلنی های باکتری است. در نتیجه با اینکه کلنی های باکتری خیلی بزرگتر نشده اند اما کاندوکتانس آنها کاهش بیشتری داشته و این موضوع می تواند مرتبط با افزایش هیدروفوبیسیته کلنی های باکتری در اثر تجمع و کاهش کاندوکتانس باشد.



(شکل ۷) مقایسه تغییر کاندوکتانس (خط قرمز رنگ) و تغییر اندازه کلنی‌های باکتری (خط آبی رنگ)

غلظت 10^6 CFU/ml شیب تغییرات کاندوکتانس و اندازه کلنی‌های باکتری مقادیر تقریباً یکسانی نشان دادند اما در غلظت‌های بیشتر، در اثر افزایش هیدروفوبیسیته ناشی از تجمع باکتری‌ها شیب تغییر کاندوکتانس بیشتر از شیب تغییر اندازه کلنی‌های باکتری بود.

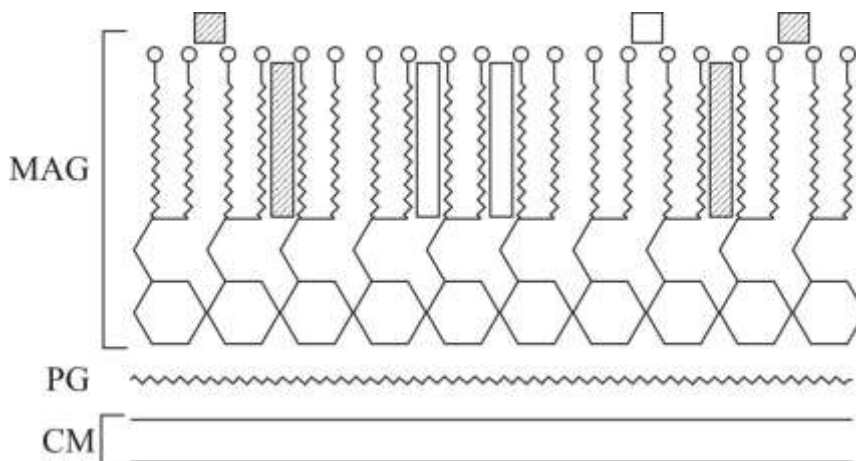
از طرف دیگر با افزایش تجمع باکتری‌ها ویسکوزیته نمونه مورد آزمایش افزایش می‌یابد و تحرک الکتروفورتیک آنها کاهش می‌یابد. از آنجا که انطباق تغییر تحرک الکتروفورتیک و پتانسیل زتا به اندازه ذره بستگی دارد. با افزایش ویسکوزیته و در نتیجه کاهش تحرک الکتروفورتیک (μ) پتانسیل زتا نیز می‌تواند افزایش یابد و ذرات تحت تأثیر این پتانسیل باید بسوی الکترود دارای بار مخالف حرکت نمایند اما به دلیل خاصیت هیدروفوبیسیته بالای ایجاد شده در نتیجه تجمع باکتری‌ها، حرکت بارها و در نتیجه کاندوکتانس کاهش می‌یابد (تغییر کاندوکتانس زیاد است).

بعلاوه بررسی‌های نظری نشان می‌دهند که حساسیت می‌تواند با افزایش G_T در نتیجه غلظت سلولی ρ و زمان شناسایی t ، بهبود یابد. کاندوکتانس G_B بستگی به اندازه، ساختار و خواص دی‌الکتریک باکتری و اجزای درونی اش دارد. در نتیجه هر باکتری، کاندوکتانس ذاتی دارد که می‌تواند تا حدی تحت تأثیر حالت فیزیولوژیک یا محیط خارجی قرار گیرد [9]. از طرف دیگر ثابت سلول k برابر است با نسبت فاصله بین الکترودها (d) به مساحت یا طول الکترودها (a) (در اینجا طول الکترودها):

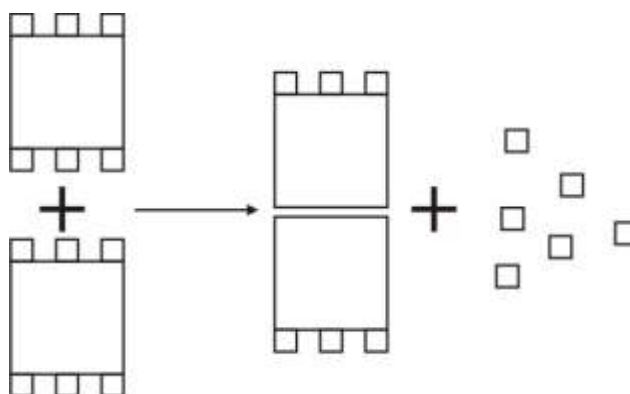
$$k = \frac{d}{a} \quad (9)$$

در این مطالعه مقدار k برابر است با $\frac{1}{5}$ بنابراین بر اساس معادله (۸) می‌توان نسبت مقدار $\frac{G_B}{m^2}$ را بدست آورد. با توجه به اینکه G_B کاندوکتانس یک باکتری است و قاعداً باید ثابت باشد بنابراین تنها عامل متغیر m یعنی تعداد باکتری‌ها در زنجیر است که می‌تواند 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.

براساس اصل هیدروفوبیک وقتی دو ملکول در حالت کلونید بایکدیگر تجمع حاصل می‌کنند آنتروپی افزایش می‌یابد. گرچه هیدروفوبیسیته یک نیروی واقعی نیست اما تجمع با یکدیگر به اندرکنش هیدروفوب نسبت داده می‌شود. (شکل ۲) [10].



(شکل ۸) - نمودار شماتیک پوشش سلولی میکوباکتریوم توبرکولوسیس. بطور مشابه با دیواره سلولی اکثر باکتری‌ها، پوشش سلولی میکوباکتریوم توبرکولوسیس شامل یک غشای سلولی (CM) و یک لایه پپتیدوگلیکان (PG) است. در مقایسه با دیگر باکتری‌ها، در دیواره سلولی میکوباکتریوم توبرکولوسیس یک لایه ضخیم هیدروفوبیک اسید میکولیک استری شده بنام میکولیل آرابینو گالاکتان (MAG) وجود دارد. یک تنوع از لیپیدهای واحد و گلیکولیپیدها بطور غیر کووالان به پوشش سلولی متصل شده‌اند و شامل ترهالوزدی میکولات، پتیوسرول دی میکوسرات و لیپوآرابینومانان هستند. این ترکیبات در پایداری باکتری در برابر سیستم ایمنی نقش دارند.



(شکل ۹) - اصل هیدروفوبیک: دو ملکول هیدروفوب مجتمع شده با یکدیگر

همچنانکه قبلاً هم گفتیم بیماریزایی میکوباکتریوم توبرکولوسیس بیشتر به دلیل وجود Cord Factor است که عامل ایجاد اندرکنش‌های هیدروفوب بین این باکتری‌ها بویژه در غلظت‌های بالا می‌شود و این موضوع در اینجا نیز تایید می‌گردد [10,11,12,13].

۵- جمع بندی

بمنظور تشخیص باکتری میکوباکتریوم توبرکولوسیس و میزان غلظت آن در یک سوسپانسیون استفاده از تکنیک‌های کانداکتیویتی و اندازه گیری پتانسیل زتا می‌توانند 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. بطور کلی در این زمینه می‌توان با در نظر گرفتن بستگی خطی غلظت باکتریها با تغییر کاندوکتانس و پتانسیل زتا، غلظتهای مجهول باکتری در نمونه‌های مورد نظر را محاسبه نمود.

منابع

1. 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.
2. Glickman, M., & Jacobs, R. (2001). Microbial pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis: Dawn of a discipline. *Cell*, 104(2), 477-485.
3. 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 of the pathology of secondary disease. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 36(4), 371-386.
4. 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.
5. 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).
6. Moule, M. G., & Cirillo, J. D. (2020). Mycobacterium tuberculosis dissemination plays a critical role in pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 65.
7. Muhammad-Tahir, Z., & Alocilja, E. C. (2003). A conductometric biosensor for biosecurity. *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 813-819.
8. 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.
9. Pourmir, A. R., Bahrmand, A. R., Ettefagh Far, S. H., Hadizadeh Tasbiti, A. R., & Yari, Sh. (2016). Electrical impedance spectroscopy (EIS) for rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis bacilli (MTB) in suspensions with using interdigitated microelectrode (IME). *Vol 71*(5), 1-8.
10. Roberts, V. V. (2008). Immunochemistry of mycolic acid antigens in tuberculosis. University of Pretoria.
11. Suehiro, J., Shutou, M., Hatano, T., & Hara, M. (2003). High sensitive detection of biological cells using dielectrophoretic impedance measurement method combined with electroporation. *Sensors and Actuators B*, 96, 144-151.
12. Yang, L., & Bashir, R. (2008). Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. *Biotechnology Advances*, 135-150.

13. 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