

خواص الکتریکی میکوباکتریوم توبرکولوسیس و اندازه‌گیری هدایت الکتریکی آن و مقایسه با نتایج حاصل از اندازه‌گیری پتانسیل زتا

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 توجه به خطر عفونت حاصل از باکتری میکوباکتریوم توبرکولوسیس، شناسایی به‌موقع و سریع این باکتری اهمیت زیادی دارد. با پیشرفت فناوری‌های زیست حسگری، اخیراً استفاده از تکنولوژی‌های هدایت سنجی و اندازه‌گیری پتانسیل زتا به‌منظور شناسایی تعداد کم با سیل میکوباکتریوم توبرکولوسیس مورد توجه قرار گرفته‌اند. در این مطالعه کاندوکتانس یا هدایت الکتریکی و پتانسیل زتا در غلظت‌های مختلف با سیل میکوباکتریوم توبرکولوسیس بر مبنای CFU/ml اندازه‌گیری شدند و ملاحظه گردید که هم هدایت الکتریکی و هم پتانسیل زتا با افزایش غلظت باکتری به‌صورت خطی افزایش یافتند؛ بنابراین با توجه به نتایج این مطالعه و انطباق الگوی افزایش کاندوکتانس و پتانسیل زتا می‌توان از نتایج حاصله برای اندازه‌گیری تعداد باکتری استفاده نمود. در غلظت‌های مختلف سرم فیزیولوژیک به‌طور کلی با افزایش غلظت باکتری‌ها، کاندوکتانس به‌صورت خطی افزایش می‌یابد. همچنین در بخش‌هایی با افزایش غلظت باکتری‌ها کاندوکتانس کاهش می‌یابد که این پدیده مربوط به هیدروفوب بودن مواد لیپیدی در دیواره باکتری است. داده‌های به‌دست‌آمده در نمودارهای پتانسیل زتا نشان‌دهنده این هستند که به‌طور خالص بار سطحی باسیل‌ها منفی است. همچنین می‌توان حالت یکسانی نسبت به قرار گرفتن باکتری‌ها در معرض اندازه‌گیری هدایت الکتریکی و پتانسیل زتا را مورد توجه قرار داد. تکمیل بررسی حاضر می‌تواند امکان ساخت وسیله‌ای را فراهم سازد که بر اساس خواص الکتریکی باسیل سل و با استفاده از نتایج به‌دست‌آمده بتوان با به‌کارگیری یک سیستم تشخیص‌دهنده پرتابل، تعداد باکتری را به صورتی سریع و با دقت قابل قبول به دست آورد و با بهره‌گیری از آن در مناطق دوردست فاقد امکانات آزمایشگاهی کلینیکی، مقدمات لازم برای کنترل گسترش بیشتر باکتری را فراهم ساخت.

کلمات کلیدی: هیدروفوبیسیته، میکوباکتریوم توبرکولوسیس، هدایت سنجی یا کانداکتومتري، پتانسیل زتا

مقدمه

ساختمان شیمیایی باسیل سل

ساختمان شیمیایی باسیل سل با ساختار و شرایط محیط کشت تغییر می‌کند. البته به‌طور کلی ۵۰٪ وزن خشک باسیل، پروتئین و نوکلئوپروتئین و ۴۰٪ آن لیپیدهای مختلف و ۱۰٪ پلی ساکارید است. پروتئین‌ها و نوکلئوپروتئین‌ها در ایجاد آلرژی دخالت دارند. لیپیدهای موجود در دیواره نیز عامل مقاومت باسیل در برابر عوامل خارجی و اسیدها هستند. بعلاوه وجود لیپید در دیواره باکتری، انتقال مواد غذایی به داخل سلول بکندی صورت می‌گیرد. به همین دلیل رشد باسیل سل کند است. علاوه بر آن مواد لیپیدی به باکتری خاصیت هیدروفوبی می‌دهند. دیواره سلولی این باکتری ضخیم است و از سه لایه تشکیل شده است که در اطراف پرده‌ای سیتوپلاسمی قرار دارند. [1,2,3,4,5].

از نظر شیمیایی ساختمان دیواره سلولی این باکتری مشابه باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی نیست. بلکه این ساختمان شامل تعداد زیادی ملکول‌های درشت لیپوفیلیک است که ساختمان پیچیده‌ای دارند و از نظر بیولوژیک بسیار فعالند. لیپیدها تقریباً ۶۰٪ وزن خشک دیواره سلولی را تشکیل می‌دهند در نتیجه باکتری این توانایی را دارد که در برابر عوامل محیطی مقاومت کند. [1,2,3,4,5].

اسکلت دیواره سلولی از دو پلیمر پپتید و گلیکان و آرابینو گالاکتان تشکیل شده است که بوسیله پیوند دی استر به‌صورت کووالانس به یکدیگر متصلند. سه تفاوت مهم باعث جدایی پپتید و گلیکان میکوباکتریوم‌ها از سایر باکتری‌ها می‌شود:

- (۱) وجود N- گلیکولیل مورامیک اسید بجای مشتقات N- استیل مورامیک اسید
- (۲) وجود دو گروه آمید بر روی گلوتامات و مزودی آمینو پی میلک اسید (DAP) در زنجیره جانبی پپتیدها
- (۳) وجود ۲ نوع اتصال پپتیدی در پل عرضی D- آلانین مزو DAP و مزو DAP-DAP. بیش از ۷۰٪ اتصال پل عرضی در پپتیدوگلیکان به‌صورت اتصال پپتیدی بین گروه‌های مزو DAP است که فقط در میکوباکتریوم‌ها دیده می‌شود. [1,3,5,6].

اسید مورامیک پپتیدوگلیکان به آرابینوز پلیمر آرابینو گالاکتان بوسیله اتصال فسفو دی استر متصل می‌گردد. از هر ۱۰ گروه آرابینوز یکی از آنها بوسیله اسید میکولیک استر می‌شود. زنجیره‌های انتهایی آرابینوگالاکتان، اولیگوساکاریدهای خطی هستند که شاخص ایمونولوژیک محسوب می‌گردند. [1,3,6].

دیواره سلولی سالم حاوی مقدار زیادی پروتئین است که احتمالاً در سطح قرار گرفته و به‌صورت لیپوپروتئین یا گلیکوپروتئین است. این لیپیدها برای فعالیت دیواره سلولی ضروری‌اند. یکی از مهمترین پپتیدها که به مقدار فراوان دیده می‌شوند آمیدات- پلی آلفا- ال گلوتامیک است که فقط در میکوباکتریوم توبرکلوسیس و میکوباکتریوم بوویس وجود دارد. در برخی از نمونه‌ها ممکن است تا ۸٪ وزن کلی دیواره سلولی را تشکیل دهد. علاوه بر گلیکولیپیدهایی که به پپتیدوگلیکان متصل‌اند لیپیدهای مهم دیگری در سطح وجود دارند. [6, 1,3].

میکوباکتریوم توبرکلوسیس هوازی اجباری است و در غیاب اکسیژن رشد نمی‌کند و حتی کاهش مختصر در فشار اکسیژن باعث کاهش زیاد در میزان رشد باکتری می‌شود. این باکتری انرژی مورد نیاز خود را بوسیله اکسایش گلوکز یا گلیسرول به دست می‌آورد و CO_2 و آب ایجاد می‌کند. کاتالاز و پراکسیداز در تمام میکوباکتریوم‌ها برای تجزیه پراکسید هیدروژن وجود دارند. [1,3,4,5,6].

احتیاجات غذایی این باکتری‌ها زیاد نیست اما چون نسبت به بعضی مواد مانند اسیدهای چرب حساسیت دارند روی محیط‌های معمولی رشد نمی‌کنند و احتیاج به محیط‌های مخصوص دارند. در محیط کشت مایع به دلیل وجود ترکیبات هیدروفوب در سطح سلول، باکتری به‌صورت پرده‌ای در سطح مایع رشد می‌کند و در اثر

افزودن دتر جنت به محیط مایع، باکتری‌ها به صورت منتشر رشد کرده و باعث کدورت محیط می‌شوند. کمبود مختصر فلزات در رشد باکتری اثر عمده‌ای بر جای می‌گذارد. در میان فلزات کمبود آهن اثرات محسوستری دارد. بهترین دما برای رشد باکتری ۳۷ درجه سانتیگراد است؛ اما در دمای ۳۰ تا ۴۵ درجه سانتیگراد نیز رشد می‌کند. بهترین pH برای رشد آن حدود ۷ است. [1,2,3,4,5,6].

رشد این باکتری کند است. حداقل ۱۰ تا ۱۵ روز طول می‌کشد تا رشد آن آغاز گردد و ۶-۴ هفته زمان برای ظهور کلنی‌ها لازم است. به همین دلیل باید درب لوله‌های کشت را پس از ۲ هفته از انجام کشت بست تا محیط خشک نشود. کلنی باسیل سل ابتدا به شکل R (زبر و خشن) است. همچنین تکثیر بستگی به RNA پلیمر از مربوط به DNA باسیل دارد. [1,3,6,7].

مهمترین ویژگی مورفولوژیک باسیل میکوباکتریوم توبرکولوسیس لیپید زیاد در دیواره آن است. اسید میکولیک در واقع واحد ساختمانی دیواره سلولی این باکتری‌ها است. این اسیدهای چرب اشباع شده حجیم از نظر شیمیایی آلفا آکلیل، بتاهیدروکسیل هستند. ملکول آرابینو گالاکتان با استفاده از پیوند کووالانس به پتید و گلیکان و ۳۰ ملکول اسید میکولیک متصل می‌گردد و یک پل اتصال را بین لایه سخت و لایه‌های لیپوفیلیک خارجی دیواره سلولی برقرار می‌کند. میکوزید مهم دیگری که در ساختمان باسیل میکوباکتریوم توبرکولوسیس موجود است ماده‌ای با وزن ملکولی بالا بنام WAXD (موم D) محتوی اسید میکولیک و گلیکوپتید است. مخلوط موم D و پروتئین‌های باسیل سل باعث ایجاد واکنش افزایش حساسیت از نوع تأخیری نسبت به این باسیل می‌گردند. در حالیکه پروتئین به تنهایی از نظر ایمونولوژیک ضعیف است. فسفولیپیدهای میکوباکتریومی شامل کاردیولیپین، فسفاتیدیل اتانل آمین، فسفا تیدیل اینوزیتول و مانوفسفاتیدیل اینوزیت‌ها هستند. [1,4,6].

پتانسیل زتا

پتانسیل زتا بعنوان یک پتانسیل الکتریکی اطراف ذرات و سلول‌ها مطرح است. سلول‌ها در محلول به دلیل وجود خواص یونی و ترکیبات سازنده غشا (مانند پروتئین‌ها، لیپیدها و قندها) و پخش بار در سطح غشا دارای بار الکتریکی در این سطح هستند. گسترش بار در اطراف غشا باعث تأثیر بر روی یون‌های مجاور شده که نتیجه آن افزایش غلظت تعداد یون‌ها (یون‌های با بار الکتریکی مخالف) در نزدیکی غشا در محلول توسط یک لایه از یون‌های با بار مخالف محصور می‌شود (Fixed Layer) در قسمت خارجی لایه ثابت، تعداد زیادی از یون‌های با بارهای مختلف باعث تشکیل یک لایه ابری شکل (Could like region) می‌شوند. این دولایه الکتریکی در این ناحیه تشکیل می‌شود و در قسمت درونی آن یون‌هایی وجود دارند که به صورت قوی با سطح خارجی غشا اتصال یافته‌اند و در قسمت خارجی یون‌ها در حالت تعادل یونی هستند. [1,4,6].

پتانسیل موجود در این قسمت با افزایش فاصله از غشا کاهش می‌یابد. وقتی بر محیط مایع اطراف سلول میزان معینی از ولتاژ اعمال می‌شود سلول‌ها از طریق بار موجود در غشا بسمت الکترود با قطب مخالف بار غشا حرکت می‌کنند. حرکت سلول‌ها به دلیل اثر ولتاژ خارجی بر روی لایه ثابت و بر روی قسمتی از ناحیه پراکنده و قسمت بینابینی این دو ناحیه در سطح غشا است. پتانسیل این قسمت پتانسیل زتا نام دارد. پتانسیل زتا بعنوان بخش کاربردی بار الکتریکی سطح غشاء عمل می‌کند. ماهیت محیطی که سلول‌ها در آن قرار دارند شامل میزان یون‌ها و pH محیط بر روی پتانسیل زتا تأثیر می‌گذارد. بسیاری از مواد هنگام قرار گرفتن در آب یا سایر مایعات مقادیر مختلفی از پتانسیل زتا را نشان می‌دهند. همچنین ملکول‌های آبی که در مجاورت غشای سلولی وجود دارند تقریباً بی حرکت هستند و وجود آنها همراه با گروه‌های باردار در سطح غشا باعث تأثیر در انتشار یون‌های متحرک می‌شود. سطح غشای سلول‌های ایزوله شده معمولاً دارای بار منفی است. بار موجود در دو لایه الکتریکی با بار یون‌های مخالف محیط به تعادل می‌رسند. در صورتیکه سطح غشا

حرکت کند یک لایه نازک از محیط همراه با تعدادی یون با این غشا حرکت می‌کنند. در اغلب سلول‌ها پتانسیل زتا بین ۱۰- تا ۲۰- میلی‌ولت است. [1,4].

هر چه پتانسیل زتا بیشتر باشد احتمال تشکیل دولایه الکتریکی روی سطح سلول بیشتر می‌شود و تمایل به تجمع کمتر می‌گردد. [1, 6].

پتانسیل زتا مقدار دافعه بین ذرات مجاور را نشان می‌دهد. وقتی که پتانسیل زتا پایین می‌آید جاذبه بر دافعه غلبه کرده و تجمع حاصل می‌شود. ذرات یا سلول‌های دارای پتانسیل زتای بالا از نظر الکتریکی پایدار هستند جدول (۱) [6].

جدول (۱)

پتانسیل زتا (MV)	رفتار پایداری ذرات یا سلول‌ها
۰ تا ۵ ±	سریع تجمع حاصل می‌شود
۱۰ ± تا ۳۰ ±	ناپایدار
۳۰ ± تا ۴۰ ±	پایداری متوسط
۴۰ ± تا ۶۰ ±	پایداری خوب
بیش از ۶۱ ±	پایداری عالی

تکنیک‌های امپدانس برای شناسایی باکتری‌ها

تکنیک‌های امپدانس در حوزه میکروبیولوژی برای شناسایی و تعیین تعداد باکتری‌ها بکار می‌روند. روش عمومی امپدانس برای شناسایی رشد باکتری‌ها، میکروبیولوژی امپدانس نام دارد. این روش بر اساس اندازه‌گیری تغییرات در امپدانس الکتریکی یک کشت یا یک محلول فعال به‌دست‌آمده از رشد باکتری‌ها است. این روش به ما اجازه می‌دهد سلول‌های مرده را از سلول‌های زنده تشخیص دهیم و به‌صورت یک روش نسبتاً سریع در مدت ۲۴ ساعت باکتری‌ها را شناسایی می‌کند. [6,7]

در سال ۱۹۹۲ روش میکروبیولوژی امپدانس برای اولین بار پیشنهاد شد. سپس حالت‌های جدیدی از این روش به منظور در دسترس بودن بیشتر آن برای مطالعات شناسایی رشد باکتری‌ها ایجاد شدند. این حالت‌های جدید شامل استفاده از سیستم‌های الکتروود متفاوت و آنالیز امپدانس ترکیبات با استفاده از مدارهای معادل برای اصلاح سیستم‌های شناسایی هستند. [6]

با پیشرفت‌های انجام شده در میکرو نمودن تکنولوژی‌ها، استفاده از آرایه میکروالکترودها برای اندازه‌گیری تغییرات امپدانس مطرح گردید و سپس میکروبیولوژی امپدانس مینیاتوری به شکل چیپ ایجاد گردید. در نتیجه توسعه سریع این روش‌ها، زمان شناسایی بین ۳۰ دقیقه تا ۲۰ ساعت در مقایسه با روش‌های امپدانس براساس رشد باکتری‌ها تقلیل پیدا نمود. بویژه پیشرفت‌های اخیر در میکروتکنولوژی و نانو تکنولوژی الکترومکانیک و سازگاری بیوسنسورهای ساخته شده با سلول‌های باکتری هدف، باعث شناسایی بهتر سلول‌های باکتری بر روی سطح بیوسنسورها گردیده‌اند. [6,7]

میکروبیولوژی امپدانس

در میکروبیولوژی امپدانس تغییرات امپدانس معمولاً با استفاده از یک جفت الکتروود غوطه‌ور در کشت رشد یافته یا محلول واکنش دهنده اندازه‌گیری می‌شوند. [6,7]

اندازه‌گیری می‌تواند به دو طریق انجام شود یکی روش مستقیم و دیگری روش غیر مستقیم. در روش مستقیم یک جفت الکتروود فلزی در کشت که با باکتریهای مورد آزمایش انکوبه شده است غوطه‌ور می‌شوند. تغییر امپدانس در کشت بر اساس آزاد شدن متابولیت‌های یونی از سلول‌های سازنده ایجاد می‌شود. دو منشاء اصلی آزاد شدن یون بوسیله باکتری در محیط کشت وجود دارند یکی متابولیسم انرژی که اکسیژن و قند ترکیب می‌شوند و دی‌اکسید کربن و اسیدهای آلی ایجاد می‌شوند. مثلاً یک گلوکز غیر یونی به دو ملکول اسید لاکتیک تبدیل می‌شود که باعث افزایش هدایت (کنداکتیویته) کشت می‌گردد. بعلاوه در متابولیسم اسید لاکتیک ۳ ملکول اکسیژن ایجاد می‌شود که باعث تولید اسید کربنیک می‌شود. یون بی کربنات کوچکتر و متحرکتر و دارای هدایت یونی مؤثرتری از یون لاکتات است. یون‌های هیدروژن تقریباً ۷ برابر یون‌های نظیر یون سدیم هدایت یونی دارند. یون‌هایی نظیر K^+ و Na^+ به‌طور فعال از عرض کانال‌های یونی انتقال می‌یابند و در نتیجه پتانسیل غشا تغییر می‌کند و اختلافات فشار اسمزی بین درون و بیرون سلول ایجاد می‌گردد. در حالیکه متابولیسم انرژی منشأ اصلی آزاد شدن یون از سلول‌ها به محیط است، مبادله یون سهم کمتری در آزاد شدن یون از سلول‌ها دارد. این فرایند آزاد شدن یون باعث تغییراتی در هدایت کشت می‌شود که اساس اندازه‌گیری تغییرات امپدانس است. [6,7,8,9]

تکنیک غیر مستقیم، مستقیماً تغییر امپدانس در رشد کشت باکتریایی را اندازه نمی‌گیرد. در عوض الکتروودها در یک محلول جداگانه (معمولاً محلول هیدروکسید پتاسیم) فرو می‌روند. گازهای (در اصل CO_2) تولید شده از متابولیسم باکتریایی بوسیله محلول هیدروکسید پتاسیم جذب می‌شوند و باعث کاهش هدایت محلول می‌گردند. [1,8,9]

ویژگی‌های امپدانسی سلول‌ها

سلول‌ها شامل موادی با آرایش‌های فضایی و کمپلکس‌های مختلفند که خواص الکتریکی متفاوتی دارند. غشای سلول شامل یک دو لایه لیپیدی و تعدادی پروتئین است که ملکول‌های لیپیدی طوری آرایش یافته‌اند که گروه‌های قطبی‌شان رو به بیرون در محیط آبی قراردارند و زنجیره‌های هیدروکربن هیدروفوبشان بسوی داخل تشکیل دهنده یک غشای درونی هستند. درون سلول اندامک‌هایی وجود دارند که در اطرافشان غشاهایی هستند نظیر میتوکندریها، واکوئل‌ها و هسته. در حالیکه غشای سلول به‌صورت عایق‌بندی شده است

درون سلول بیشتر رسانا است. هدایت غشای سلول در حدود $10^{-7} \frac{S}{m}$ است در حالیکه هدایت درون سلول

بیش از $1 \frac{S}{m}$ است. هر کانال یونی منفرد به‌صورت یک مقاومت در نظر گرفته می‌شود و کل غشا شامل ترکیب

موازی این مقاومت‌ها (کانال‌های یونی) است. روی هم رفته مقاومت غشا می‌تواند بین $1 \frac{M\Omega}{\mu m^2}$ تا $100 \frac{M\Omega}{\mu m^2}$

بسته به نوع سلول و موقعیت قطعه غشا باشد. ظرفیت غشا نیز تقریباً $1 \frac{pf}{\mu m^2}$ است و ضخامت بیشتر

غشاهای زیستی حدود $8nm$ است. [1,7,8,9,10]

محاسبه هدایت (کندوکتانس) باکتری‌ها

باکتری‌ها به صورت زنجیره‌هایی در شکاف الکترودها قرار می‌گیرند؛ بنابراین می‌توان نوشت:

$$G_A(t) = G_T(t) + G_E \quad (۱)$$

که G_E کندوکتانس الکترودها بدون افزودن باکتری‌ها است و G_T کندوکتانس بعد از گیر انداختن باکتری‌ها است.

در این فرض شده است که G_E بعد از گیر افتادن سلول‌ها نیز تغییر نمی‌کند.

کندوکتانس G_T برابر است با:

$$G_T(t) = n(t) + G_P \quad (۲)$$

که $n(t)$ تعداد زنجیره‌های باکتری‌ها است.

G_P برابر است با:

$$G_P = \frac{G_B}{m} \quad (۳)$$

G_P کندوکتانس هر زنجیر، G_B کندوکتانس هر باکتری و m تعداد باکتری‌ها در هر زنجیر است.

تعداد کل باکتری‌های گیر افتاده برابر است با:

$$N(t) = mn(t) \quad (۴)$$

به طور نظری نشان داده شده است که:

$$N(t) = kpt \quad (۵)$$

که k یک ثابت است و p غلظت سلول‌ها است.

در نتیجه می‌توان نوشت

$$G_T(t) = \frac{kpG_B t}{m^2} \quad (۶)$$

و از اینجا G_T به دست می‌آید. [1,7,8,9]

لازم به توضیح است که بعد از محاسبه G_T می‌توان با استفاده از معادله (۳)، G_P را به دست آورد و از آنجا با استفاده از معادله (۲) و (۴)، $N(t)$ یعنی تعداد کل باکتری‌ها را محاسبه نمود.

برخی نکات مهم:

۱- ثابت k می‌تواند با افزایش پتانسیل الکترودها یا با گسترش محل گیر انداختن بزرگتر شود.

۲- G_E را می‌توان قبل از انجام آزمایش محاسبه نمود.

۳- هر چه شکاف الکترودها کوچکتر شود، مقدار m کاهش می‌یابد و حتی می‌توان شکاف را انقدر کوچک نمود که فقط یک باکتری در آنجا جای بگیرد (از مرتبه میکرومتر) البته کوچک کردن شکاف نباید به آزمایش خللی وارد کند.

۴- کندوکتانس G_B به اندازه، ساختار و خواص دی الکتریک باکتری‌ها و اجزای درونی آنها بستگی دارد. معمولاً کندوکتانس الکتریکی غشای سلولی خیلی کمتر از کندوکتانس ناحیه بین سلولی یا سیتوپلاسم است؛ بنابراین وقتی که تعداد زنجیره‌ها خیلی کم شود میزان کندوکتانس الکتریکی G_B یک سلول برای افزایش واضح در G_A کافی نیست. [1,10,11,12,13,14]

محلول Mc Farland

محلول Mc Farland یک محلول استاندارد باسیل سل است که برای کارهای آزمایشگاهی می‌توان از آن استفاده نمود. تعداد باسیل در هر میلی‌لیتر از این محلول مشخص است. جدول (۲) نشاندهنده ویژگی‌های غلظت‌های مختلف این محلول است. لازم به توضیح است به دلیل تجمع باسیل‌های سل و تشکیل cord Form که منجر به عدم توانایی اندازه‌گیری دقیق هدایت الکتریکی محلول می‌شود، باید قبل از هر مرحله آزمایش تا حد امکان محلول همگن شود. [1,6]

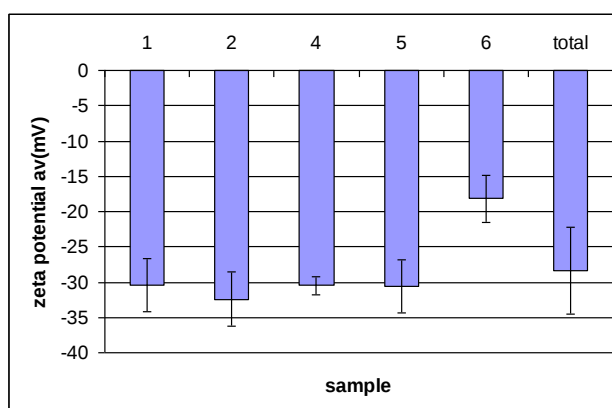
جدول (۲)

McFarland Standard No.	0.5	1	2	3	4
1.0% Barium chloride (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
1.0% Sulfuric acid (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6
Approx. cell density (1×10^8 CFU/mL)	1.5	3.0	6.0	9.0	12.0
% Transmittance*	74.3	55.6	35.6	26.4	21.5
Absorbance*	0.132	0.257	0.451	0.582	0.669

مواد و روشها

اندازه‌گیری پتانسیل زتا باسیل سل

برای اندازه‌گیری پتانسیل زتا از محلول Mc Farland ۰/۵ استفاده گردید. $100 \mu\text{lit}$ از این محلول درون کووت دستگاه DLS شرکت **Malvern** مدل **Zetasizer Nano** ساخت بریتانیا ریخته شد و با استفاده از محلول دوبار یونیزه آب مقطر حجم آن به $1/5 \text{ ml}$ رسید. اندازه‌گیری پتانسیل زتا ۸ دفعه و به فواصل زمانی ۵ دقیقه انجام شد. هر دفعه قبل از خواندن مقادیر محلول مورد نظر (که در هر آزمایش ۴ مقدار خوانده می‌شود) به‌منظور همگن شدن از ورتکس استفاده گردید. بعد از حذف سه مرحله که نتایج آنها بسیار متفاوت با سایر مراحل بودند میانگین کل (total) و انحراف معیار آن محاسبه و سپس نمودار میانگین پتانسیل زتا در برابر نمونه مربوط به ۵ مرحله اندازه‌گیری و حالت کلی (total) همراه با انحراف معیار رسم گردید. شکل (۱) نمودار (۱) - نمودار تغییرات پتانسیل زتا (mV) در غلظت‌های مختلف باکتری (CFU/ml). در این نمودار میانگین پتانسیل زتا در برابر نمونه مربوط به ۵ مرحله اندازه‌گیری و حالت کلی (total) همراه با انحراف معیار رسم شده است.



اندازه‌گیری هدایت الکتریکی محلول Mc Farland:

این آزمایش ۴ دفعه انجام شد. آزمایش شماره ۱ و ۲ از محلول Mc Farland ۰/۵ در غلظت‌های خاصی و در آزمایش شماره ۳ و ۴ از محلول Mc Farland ۱ در همان غلظت‌ها استفاده شد. غلظت‌های مختلف حاصل افزودن محلول‌های Mc Farland به محلول سرم فیزیولوژیک در غلظت‌های متفاوت هستند. جداول ۴، ۶، ۷، ۸ غلظت‌های متفاوت محلول سرم فیزیولوژیک و تعداد باسیل برداشته شده در نمونه مورد آزمایش را نشان می‌دهند.

رسم نمودارها

برای هر غلظت اصلی در هر آزمایش نمودارهایی در برنامه excel رسم شدند.

نتایج

آزمایش ۱

جداول (۳) و (۴) ویژگی‌های غلظت‌های مختلف مورد استفاده در این آزمایش را نشان می‌دهند. در هر مرحله $200 \mu\text{lit}$ از محلول Mc Farland نیم مورد استفاده قرار گرفت. آزمایش با استفاده از کانداکتومتر انجام شد و مقادیر کاندوکتانس در ۳ نوبت قرائت شدند. سپس برای هر حالت میانگین (av) و انحراف معیار (stdev) محاسبه و مطابق شکل (۲) نمودار کاندوکتانس در برابر غلظت سرم (V/V) همراه با انحراف معیار رسم گردید.

جدول (۳) داده‌های مربوط به غلظت‌های محلول سرم فیزیولوژیک و نمونه‌های مختلف از محلول‌های Mc Farland ۰/۵ و

مطابق با آزمایش ۱ و ۲. غلظت مولی اولیه سرم فیزیولوژیک $\frac{152 \text{ mol}}{\text{lit}}$ و تعداد یون‌های Na^+ و Cl^- در آن

$20 \times 15/9$ و بار الکتریکی این یون‌ها $4C/146$ است. به ترتیب در هر یک از حالت‌های $N-1$ ، $N-2$ ، $N-3$ ، $N-4$ ، $N-5$ و $N-6$ حجم محلول 20 ml ، 10 ml ، 5 ml ، 2 ml و 1 ml و $400 \mu\text{l}$ است که به هر

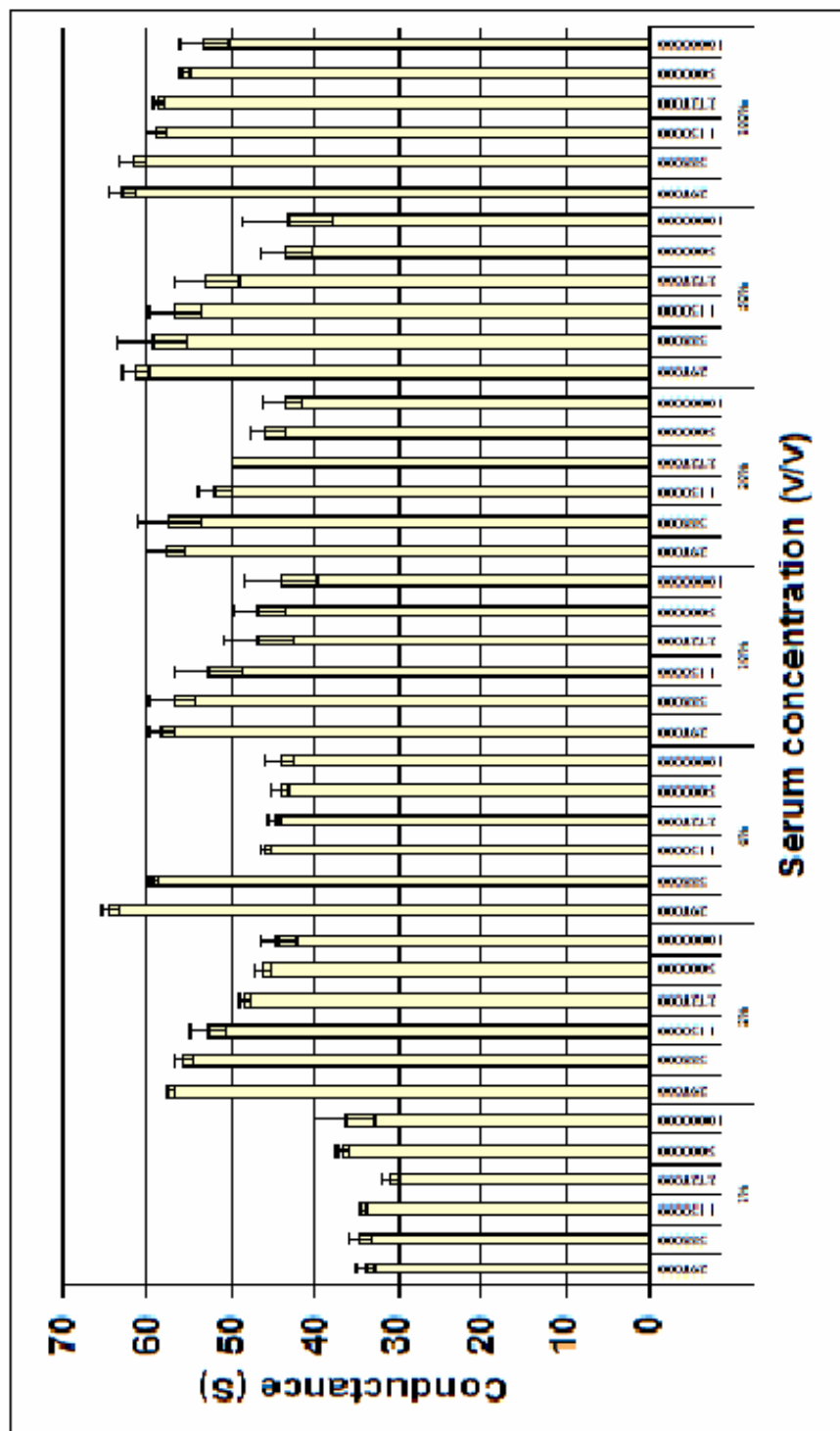
کدام، $200 \mu\text{l}$ از محلول Mc Farland ۰/۵ اضافه می‌شود (تعداد باسیل اولیه $3 \times 10^7 \frac{\text{cfu}}{\text{ml}}$ برای $200 \mu\text{lit}$ محلول

Mc Farland ۰/۵ و $\frac{6 \times 10^7 \text{ cfu}}{\text{ml}}$ برای $200 \mu\text{lit}$ محلول Mc Farland ۱ است)

شماره محلول	درصد حجمی (V/V)	غلظت مولی (mol/ml)	بار الکتریکی یون‌ها (C)	تعداد یون Na^+ و Cl^-
۱	۱٪	$1/52 \times 10^{-7}$	$1/464 \times 10^{-5}$	$9/15 \times 10^{15}$
۲	۲٪	$3/04 \times 10^{-7}$	$2/928 \times 10^{-5}$	$1/83 \times 10^{16}$
۳	۴٪	$6/08 \times 10^{-7}$	$5/856 \times 10^{-5}$	$3/66 \times 10^{16}$
۴	۱۰٪	$1/52 \times 10^{-6}$	$1/464 \times 10^{-4}$	$9/15 \times 10^{16}$
۵	۲۰٪	$3/04 \times 10^{-6}$	$2/928 \times 10^{-4}$	$1/83 \times 10^{17}$
۶	۵۰٪	$6/08 \times 10^{-6}$	$7/32 \times 10^{-4}$	$4/575 \times 10^{17}$
۷	۱۰۰٪	$1/52 \times 10^{-5}$	$1/464 \times 10^{-3}$	$9/15 \times 10^{17}$

جدول (۴) به هر یک از حالت‌های ۱ تا ۷ مربوط به جدول (۳)، $200 \mu l$ از محلول Mc Farland ۰/۵ اضافه شده بود. سپس از هر یک از حالت‌های $N-1$ تا $N-6$ به دست آمده $200 \mu l$ به منظور اندازه‌گیری کندوکتانس برداشت شد که تعداد باسیل در نمونه مربوط به هر یک از حالت‌های $N-1$ تا $N-6$ در این جدول آمده است.

حالت	تعداد باسیل در $200 \mu l$ برداشته شده از محلول
$N-1$	$2/97 \times 10^5$
$N-2$	$5/88 \times 10^5$
$N-3$	$1/15 \times 10^6$
$N-4$	$2/727 \times 10^6$
$N-5$	5×10^6
$N-6$	10^7



شکل (۲)- نمودار تغییرات کاندوکتانس (μS) سوسپانسیون باکتریایی در غلظتهای مختلف نسبت به حالت پایه محلول الکترولیت بدون باکتری نسبت به غلظت باکتری CFU/ml

شماره محل	درصد حجمی (V/V)	غلظت مولی (mol/ml)	بار الکتریکی یون‌ها (C))	تعداد یون Na^+ و Cl^-
۱	۱٪	$1/52 \times 10^{-7}$	$1/464 \times 10^{-5}$	$9/15 \times 10^{15}$
۲	۲٪	$3/04 \times 10^{-7}$	$2/928 \times 10^{-5}$	$1/83 \times 10^{16}$
۳	۳٪	$4/56 \times 10^{-7}$	$4/392 \times 10^{-5}$	$2/745 \times 10^{16}$
۴	۴٪	$6/08 \times 10^{-7}$	$5/856 \times 10^{-5}$	$3/66 \times 10^{16}$
۵	۵٪	$7/6 \times 10^{-7}$	$7/32 \times 10^{-5}$	$4/575 \times 10^{16}$
۶	۶٪	$9/12 \times 10^{-7}$	$8/784 \times 10^{-5}$	$5/49 \times 10^{16}$
۷	۷٪	$1/064 \times 10^{-6}$	$1/025 \times 10^{-4}$	$6/4 \times 10^{16}$
۸	۸٪	$1/216 \times 10^{-6}$	$1/171 \times 10^{-4}$	$7/32 \times 10^{16}$
۹	۹٪	$1/368 \times 10^{-6}$	$1/318 \times 10^{-4}$	$8/24 \times 10^{16}$
۱۰	۱۰٪	$1/52 \times 10^{-6}$	$1/464 \times 10^{-4}$	$9/15 \times 10^{16}$
۱۱	۲۰٪	$3/04 \times 10^{-6}$	$2/928 \times 10^{-4}$	$1/83 \times 10^{17}$
۱۲	۳۰٪	$4/56 \times 10^{-6}$	$4/392 \times 10^{-4}$	$2/745 \times 10^{17}$
۱۳	۴۰٪	$6/08 \times 10^{-6}$	$5/856 \times 10^{-4}$	$3/66 \times 10^{17}$
۱۴	۵۰٪	$7/6 \times 10^{-6}$	$7/32 \times 10^{-4}$	$4/575 \times 10^{17}$
۱۵	۶۰٪	$9/12 \times 10^{-6}$	$8/784 \times 10^{-4}$	$5/49 \times 10^{17}$
۱۶	۷۰٪	$1/064 \times 10^{-5}$	$1/025 \times 10^{-3}$	$6/4 \times 10^{17}$
۱۷	۸۰٪	$1/216 \times 10^{-5}$	$1/171 \times 10^{-3}$	$7/32 \times 10^{17}$
۱۸	۹۰٪	$1/368 \times 10^{-5}$	$1/318 \times 10^{-3}$	$8/24 \times 10^{17}$
۱۹	۱۰۰٪	$1/52 \times 10^{-5}$	$1/464 \times 10^{-3}$	$9/15 \times 10^{17}$

جدول (۵) داده‌های مربوط به غلظت سرم فیزیولوژیک و نمونه‌های مختلف از محلول‌های Mc Farland ۱ مطابق با آزمایش

۳ و ۴. غلظت مولی اولیه سرم فیزیولوژیک $\frac{mol}{lit}$ $0/152$ و تعداد یون‌های Na^+ و Cl^- در آن $9/15 \times 10^{20}$ و بار الکتریکی این یون‌ها $146/4C$ است. به ترتیب در هر یک از حالت‌های $N-1$ ، $N-2$ ، $N-3$ ، $N-4$ ، $N-5$ ، $N-6$ ، $N-7$ ، $N-8$ ، $N-9$ ، $N-10$ ، $N-11$ حجم محلول $20ml$ ، $18ml$ ، $16ml$ ، $14ml$ ، $12ml$ ، $10ml$ ، $8ml$ ، $6ml$ ، $4ml$ ، $2ml$ و $1ml$ است که به هر کدام، $200\mu l$ از محلول Mc

۱ Farland اضافه می‌شود (تعداد باسیل اولیه $\frac{cfu}{ml} \times 10^7 \times 3$ برای $200 \mu l$ محلول Mc Farland 0.5% و $\frac{cfu}{ml} \times 10^7 \times 6$ برای $200 \mu l$ محلول Mc Farland ۱ است)

حالت	تعداد باسیل در $200 \mu l$ برداشته شده از محلول
$N-1$	$5/94 \times 10^5$
$N-2$	$1/176 \times 10^6$
$N-3$	$2/3 \times 10^6$
$N-4$	$5/454 \times 10^6$
$N-5$	10^7
$N-6$	2×10^7

جدول (۶) به هر یک از حالت‌های ۱ تا ۷ مربوط به جدول (۵)، $200 \mu l$ از محلول Mc Farland ۱ اضافه شده بود. سپس از هر یک از حالت‌های $N-1$ تا $N-6$ به دست آمده $200 \mu l$ به منظور اندازه‌گیری کندوکتنس برداشت شد که تعداد باسیل در نمونه مربوط به هر یک از حالت‌های $N-1$ تا $N-6$ در این جدول آمده است.

حالت	تعداد باسیل در $200 \mu l$ برداشته شده از محلول
$N-1$	$2/97 \times 10^5$
$N-2$	$3/3 \times 10^5$
$N-3$	$3/7 \times 10^5$
$N-4$	$4/22 \times 10^6$
$N-5$	$4/92 \times 10^6$
$N-6$	$5/88 \times 10^6$
$N-7$	$7/32 \times 10^6$
$N-8$	$9/68 \times 10^6$
$N-9$	$1/43 \times 10^7$
$N-10$	$2/727 \times 10^7$
$N-11$	3×10^7

جدول (۷) به هر یک از حالت‌های ۱ تا ۱۱ مربوط به جدول (۳)، $200 \mu l$ از محلول Mc Farland 0.5% اضافه شده بود. سپس از هر یک از حالت‌های $N-1$ تا $N-11$ به دست آمده $200 \mu l$ به منظور اندازه‌گیری کندوکتنس برداشت شد که تعداد باسیل در نمونه مربوط به هر یک از حالت‌های $N-1$ تا $N-11$ در این جدول آمده است.

آزمایش ۲

جداول (۳) و (۷) ویژگی‌های غلظت‌های مختلف مورد استفاده در این آزمایش را نشان می‌دهند، در این آزمایش نیز مشابه آزمایش ۱ در هر مرحله $200 \mu lit$ از محلول Mc Farland نیم مورد استفاده قرار گرفت و نتایج کندوکتانس به‌دست‌آمده در ۳ نوبت همراه با میانگین (av) و انحراف معیار ($Stdev$) اندازه‌گیری شد و مطابق شکل (۳) نمودار کندوکتانس در برابر غلظت سرم (V/V) رسم گردید.

آزمایش ۳

جداول (۵) و (۶) ویژگی‌های غلظت‌های مختلف مورد استفاده در این آزمایش را نشان می‌دهند، در این آزمایش در هر مرحله $200 \mu lit$ از محلول Mc Farland ۱ مورد استفاده قرار گرفت و نتایج کندوکتانس به‌دست‌آمده در ۳ نوبت همراه با میانگین (av) و انحراف معیار ($Stdev$) به دست آمدند و مطابق شکل (۴) نمودار کندوکتانس در برابر غلظت سرم (V/V) رسم گردید.

آزمایش ۴

جداول (۵) و (۸) نشان‌دهنده غلظت‌های مختلف مورد استفاده در این آزمایش است، در این آزمایش و مشابه آزمایش ۳، $200 \mu lit$ از محلول Mc Farland ۱ در ۳ نوبت برای هر مرحله مورد استفاده قرار گرفتند و داده‌های به‌دست‌آمده در میانگین (av) و انحراف معیار ($Stdev$) به دست آمدند. مطابق شکل (۵) نمودار کندوکتانس در برابر غلظت سرم (V/V) رسم گردیده است.

حالت	تعداد باسیل در $200 \mu l$ برداشته شده از محلول
$N-1$	$5/94 \times 10^5$
$N-2$	$6/6 \times 10^5$
$N-3$	$7/4 \times 10^5$
$N-4$	$8/44 \times 10^6$
$N-5$	$9/84 \times 10^6$
$N-6$	$1/176 \times 10^7$
$N-7$	$1/464 \times 10^7$
$N-8$	$1/936 \times 10^7$
$N-9$	$2/86 \times 10^7$
$N-10$	$5/454 \times 10^7$
$N-11$	6×10^7

جدول (۸) به هر یک از حالت‌های ۱ تا ۱۱ مربوط به جدول (۵)، $200 \mu l$ از محلول Mc Farland ۱ اضافه شده بود. سپس از هر یک از حالت‌های $N-1$ تا $N-11$ به‌دست‌آمده $200 \mu l$ به‌منظور اندازه‌گیری کندوکتانس برداشت شد که تعداد باسیل در نمونه مربوط به هر یک از حالت‌های $N-1$ تا $N-11$ در این جدول آمده است.

بحث

در شکل (۱) - نمودار تغییرات پتانسیل زتا (mV) در غلظت‌های مختلف باکتری (CFU/ml). شده است. قبلاً گفتیم هر چه پتانسیل زتا بیشتر باشد احتمال تشکیل دولایه الکتریکی روی سطح باسیل بیشتر شده و تمایل به تجمع کمتر می‌گردد و وقتی پتانسیل زتا پایین می‌آید جاذبه بر دافعه غلبه کرده و تجمع حاصل می‌شود. داده‌های به‌دست‌آمده در نمودارهای زتا اولاً نشان‌دهنده این هستند که به‌طور خالص بار سطحی باکتری‌ها منفی است ثانیاً نشان می‌دهند که صرف‌نظر از چند مرحله اندازه‌گیری پتانسیل زتا، خطای زیادی در محاسبه مقدار این پتانسیل در زمان‌های مختلف مشاهده نمی‌شود؛ بنابراین احتمالاً می‌توان با در نظر گرفتن میزان خطای موجود حالت یکسانی نسبت به قرار گرفتن باکتری‌ها در معرض اندازه‌گیری هدایت الکتریکی را مورد توجه قرار داد. ثالثاً افزایش پتانسیل زتا ناشی از افزایش تعداد بارهای سطحی ذره مورد اندازه‌گیری قرار گرفته است. با وجود افزایش غلظت باکتری‌ها با ضریبی از ۱۰، میزان پتانسیل زتا با شیب خطی افزایش می‌یابد.

محتمل است که اگر اندازه‌گیری پتانسیل زتا برای تمام موارد آزمایشات ۱ تا ۴ انجام شوند نتایج به‌دست‌آمده در دو مرحله انطباق مناسبی داشته باشند.

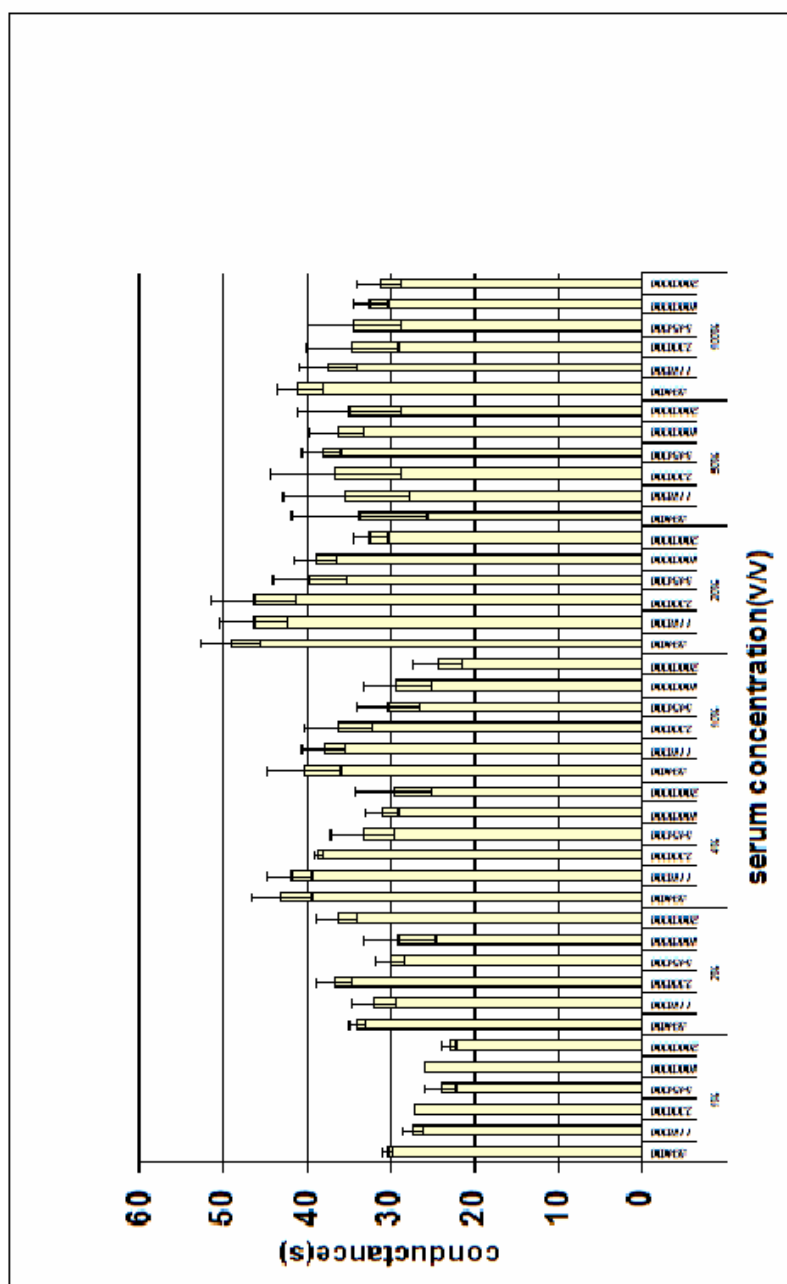
داده‌های به‌دست‌آمده در جداول همراه با نمودار مشاهده شده در شکل (۲) نشان می‌دهند که اولاً بطور کلی در غلظت‌های مختلف سرم فیزیولوژیک با افزایش غلظت، کاندوکتانس تقریباً به‌صورت خطی افزایش می‌یابد (که قابل پیش‌بینی است) و ثانیاً در بخش‌هایی با افزایش غلظت باکتری‌ها کاندوکتانس کاهش می‌یابد (حالت‌های نزولی در نمودار) که این پدیده مربوط به هیدروفوب بودن مواد لیپیدی در دیواره باکتری است. بررسی شکل (۲) و (۳) نشان‌دهنده اینست که در غلظت‌های ۰ تا ۱۰ و ۱۰^۶-۱۰^۸ و ۱۰^۸-۱۰^۶ CFU/ml نسبت

$\frac{G}{\rho}$ به ترتیب برابر است با ۰/۶، ۸×۱۰^{-۶} و ۱/۶×۱۰^{-۷} که همان مقدار G_B می‌باشد. شیب خطی افزایش کاندوکتانس از غلظت ۰ تا ۱۰ CFU/ml ، ۰/۶ از غلظت ۱۰ تا ۱۰^۶ CFU/ml ۸×۱۰^{-۶} و از غلظت ۱۰^۶ تا ۱۰^۸، ۱/۶×۱۰^{-۷} است. در غلظت‌های بین ۱۰^۲ تا ۱۰^۶ CFU/ml مقدار $\frac{G}{\rho}$ در حالت خطی برابر است با

۱۰^{-۵} اما در این غلظت‌ها همانطور که گفتیم می‌توان مقدار $\frac{G}{\rho} = G_B$ را به دست آورد. در این غلظت‌ها به‌طور

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 غلظت‌ها برابر است با (۸×۱۰^{-۴}) (μs) که بیشتر از مقدار

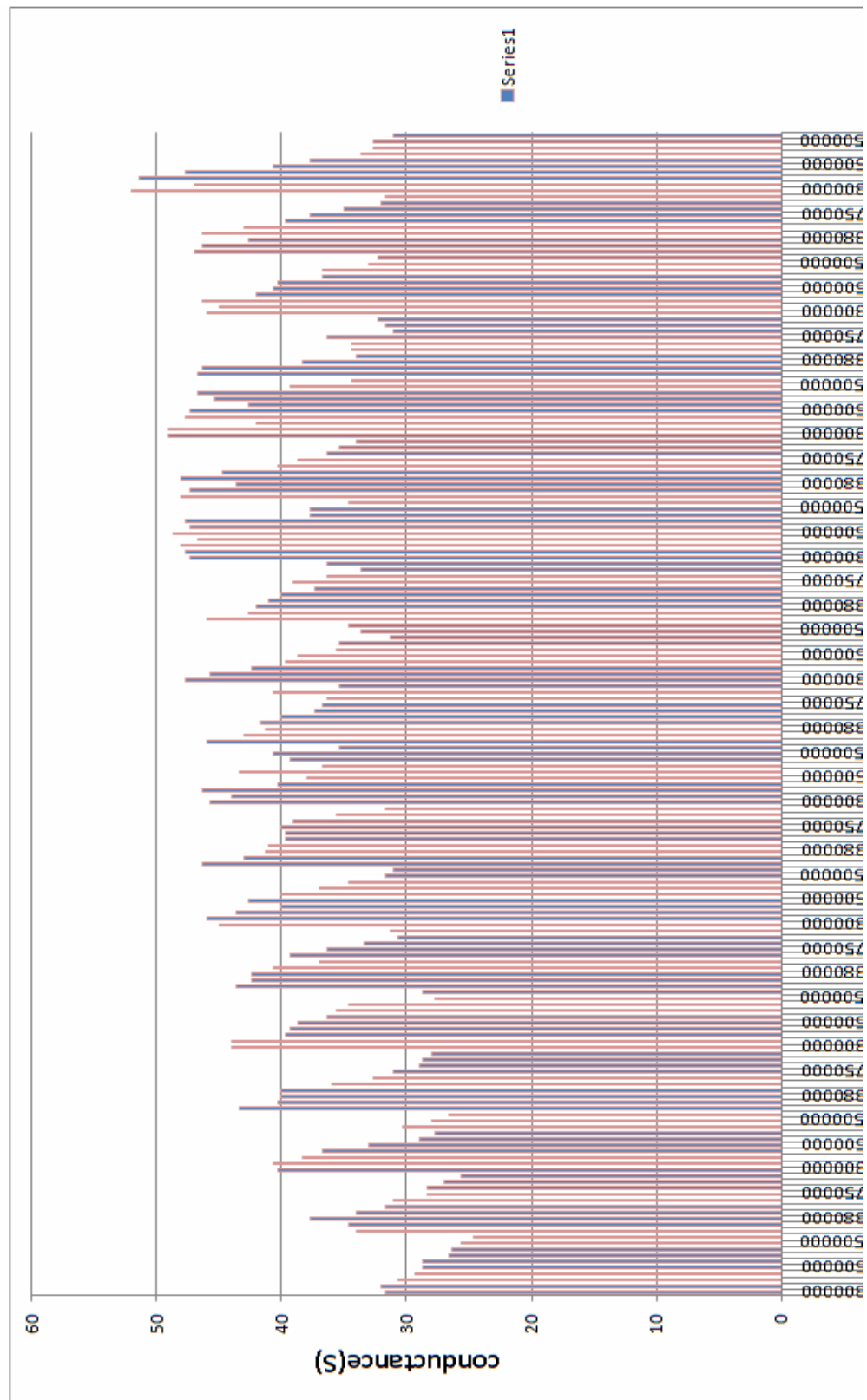
به‌دست‌آمده در حالت خطی با محاسبه‌ی $\frac{G}{\rho}$ است یعنی تشکیل حالت cord منجر به افزایش میزان تغییر کاندوکتانس (کاهش کاندوکتانس) شده است.



شکل (۳)- نمودار تغییرات کاندوکتانس (μS) سوسپانسیون باکتریایی در غلظتهای متفاوت از شکل (۲) و نسبت به حالت پایه محلول الکترولیت بدون باکتری نسبت به غلظت باکتری CFU/ml

بی‌نظمی‌های مشاهده شده در برخی نتایج (شکل‌های ۵ و ۴) احتمالاً مربوط به تفاوت در حالت‌های مختلف باکتری‌ها از حالت‌های انفرادی تا Cord Form است که باعث در معرض قرار گرفتن بیشتر یا کمتر دیواره باکتری‌ها در فرایند اندازه‌گیری می‌شود.

شکل (۴) بی‌نظمی‌های مشاهده شده در برخی نتایج مربوط به کاندوکتانس در غلظت‌های مختلف باکتری





شکل (۵)- بی‌نظمی‌های مشاهده شده در برخی نتایج مربوط به کاندوکتانس در غلظت‌های دیگری از باکتری

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. 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. با افزایش غلظت باکتری‌ها از 10^5 تا 10^8 CFU/ml

مقدار نسبت به دست‌آمده نشاندهنده افزایش بسیار زیاد هیدروفوبیسیته سطح باکتری‌ها است که این نتیجه را می‌توان به تمایل شدید باکتری‌ها به تجمع نسبت داد.

به‌طور 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 می‌باشد. همچنین تغییر نسبی اندازه ذره کمتر از تغییر نسبی پتانسیل زتا است؛ بنابراین مجدداً این نتیجه به دست می‌آید که نقش اصلی در کاهش نسبت تغییر پتانسیل زتا به تغییر غلظت بر عهده افزایش هیدروفوبیسیته با افزایش اندازه ذره (کلنی‌های باکتری) ناشی از تشکیل حالت cord است. با افزایش غلظت باکتری‌ها، تغییر کاندوکتانس سوسپانسیون باکتریایی نسبت به محلول الکتrolیت بدون باکتری، (در اصل تغییر کاندوکتانس در اینجا بمعنی کاهش کاندوکتانس است) به‌طور خطی با شیب افزایش می‌یابد که ناشی از افزایش هیدروفوبیسیته باکتری‌ها با افزایش غلظت است. زیاد بودن میزان تغییر نسبی کاندوکتانس نسبت به اندازه ذره (و نزدیک بودن آن به میزان تغییر پتانسیل زتا) نیز مجدداً، افزایش هیدروفوبیسیته باکتری‌ها با افزایش غلظت را مورد تأکید قرار می‌دهد؛ یعنی با افزایش غلظت باکتری‌ها میزان تغییر اندازه کلنی باکتری بسیار کم می‌شود. تفاوت بین این تغییر و تغییر پتانسیل زتا در این غلظت‌ها نشاندهنده افزایش میزان هیدروفوبیسیته با افزایش غلظت باکتری‌ها است.

کاندوکتانس محیط با تغییر اندازه کلنی‌های باکتری نیز تغییر کرده و با آن متناسب بود. تغییر اندازه کلنی‌های باکتری تا حدود غلظت 10^6 (CFU/ml) با شیبی تقریباً معادل تغییر کاندوکتانس محیط، صورت گرفت؛ اما در غلظت‌های بیشتر از آن شیب تغییر کاندوکتانس بیشتر از شیب تغییر اندازه کلنی‌های باکتری است. در نتیجه با وجود اینکه کلنی‌های باکتری خیلی بزرگتر نشده‌اند اما کاندوکتانس آنها کاهش بیشتری داشته است که این موضوع می‌تواند به افزایش هیدروفوبیسیته کلنی‌های باکتری در اثر تجمع و در نتیجه کاهش کاندوکتانس ارتباط داشته باشد.

جمع بندی

به‌منظور تشخیص باکتری میکوباکتریوم توبرکولوسیس و میزان غلظت آن در سرم فیزیولوژیک استفاده از تکنیک‌های کانداکتیویتی و اندازه‌گیری پتانسیل زتا می‌توانند مهم باشند. نتیجه مهمی که در این مطالعه به دست‌آمده است خطی بودن تغییرات این کمیتها با افزایش غلظت باکتری‌ها است که مربوط به حالت تجمع باکتری‌ها و در نتیجه افزایش هیدروفوبیسیته است. انطباق نتایج مربوط به اندازه‌گیریهای کاندوکتانس و پتانسیل زتا و حتی تفاوت مشخص موجود بین این اندازه‌گیریها در این زمینه بسیار مهمند. به‌طور 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. براساس این ویژگی می‌توانیم زیست حسگری طراحی

کنیم که با استفاده از آن بتوانیم غلظت باسیلها در نمونه های به دست آمده از بیماران را به دست آوریم. مناسب است مطالعات بیشتری درباره این موضوع مهم بویژه مربوط به موضوع بستگی خطی نتایج اندازه گیریهای هدایت سنجی و پتانسیل زتا با تعداد باسیلها و در نتیجه شناسایی تعداد باکتری ها انجام شوند.

منابع

1. 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 using interdigitated microelectrode (IME). Vol 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*, Mar 16, 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*, 96, 144–151.
8. Roberts, V. V. (2008). *Immunochemistry of mycolic acid antigens in tuberculosis*. University of Pretoria.
9. Baren, V., Havelkova, M., Kaustova, J., Dvorska, L., & Pavlik, I. (2006). Cell wall deficient forms of mycobacteria: A review. *Veterinární Medicina*, 51(7), 365–389.
10. Glickman, M., & Jacobs, 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 of the pathology of secondary disease. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 36(4), 371–386.
14. Gomez-Sjoberg, R., Morisette, T., & Bashir, R. (2005). Impedance microbiology-on-a-chip: Microfluidic bioprocessor for rapid detection of bacterial metabolism. *Journal of Microelectrode Clinical Systems*, 14(4)