کاربرد نانوتکنولوژی در بررسی خصوصیات ریزساختاری دیواره باکتریهای پروبیوتیک تحت تنش

فریده طباطبایی یزدی[۱]-علی مرتضوی[۲]- هاشم پورآذرنگ[۳]- محمد حسین توسلی[۴]

آدرس محل کار: دانشگاه فردوسی مشهد- دانشکده کشاورزی- گروه علوم و صنایع غذایی ص. پ ۱۱۶۳-۹۱۷۷۵

Email:Tabutabai@Ferdowsi.um.ac.ir

چکیده

بکارگیری امواج فراصوت بعنوان یک تکنولوژی جدید غیر حرارتی برای نگهداری مواد غذایی در برابر انواع میکروارگانیسم های مولد فساد و بیماری زا مطرح می باشد، زیرا کاویتاسیون و تنش برشی ناشی از فشار امواج فراصوت قادر به تخریب غشاء های سلولی میکروارگانیسم ها می باشد. در این تحقیق ویژگی های ظاهری و خصوصیات ریزساختاری انواع باکتریهای پروبیوتیک پس از تیمار با شوک فراصوت در فرکانس ثابت ۲۰ کیلوهرتز و زمانهای ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ دقیقه به کمک فن آوری نانو، میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین و میکروسکوپ الکترونی به دو روش SEM و TEM مورد مطالعه و مقایسه قرار گرفته است. نتایج نشان می دهد زمان بکارگیری تنش فراصوت اثر معنی داری بر حجم و اندازه کلنی ها دارد، و قادر است صدماتی به پوشش سلولی باکتری های پروبیوتیک به شکل، ایجاد میکرو ترک، میکرو حفره و یا پاره گی کامل ایجاد نماید، بنابراین می توان نتیجه گرفت که بکارگیری شوک فراصوت در زمان های مختلف به عنوان یک روش موثر کاربردی ($P < ۰/۰۵$) جهت تغییر مدل ساختار و ایجاد تغییراتی در میزان نفوذپذیری باکتری های پروبیوتیک به منظور امکان استفاده بیشتر این باکتری ها در فرآوری محصولات لبنی مطرح گردد.

واژه های کلیدی: روش SEM و TEM در میکروسکوپ الکترونی، باکتریهای پروبیوتیک، شوک فراصوت

۱-استادیار

۲-استاد

۳- استاد

۴- کارشناس آموزشی

مقدمه

مواج فراصوت باعث تشکیل کاویتاسیون[1] در محلول های آبکی می شوند که عامل موثر در تخریب
پوشش سلولی میکروارگانیسم ها می باشد، هر حباب به منزله میکروراکتوری عمل می کند که متلاشی شدن آن سبب تولید دمایی در حدود ۵۰۰۰ درجه سانتی گراد و فشاری معادل ۲۰۰۰ اتمسفر می شود. متلاشی شدن هر حباب منجر به تنش برشی شدید در مایع اطراف و شکسته شدن و تخریب پیوندهای شیمیایی موجود در ساختمان دیواره و غشائ سلول باکتری های می شود (۴).

بعضی از باکتری ها بویژه اسپورها نسبت به امواج فراصوت مقاوم می باشند و بکاربردن چند ساعت امواج فراصوت بر روی آنها تأثیری نخواهد داشت (۱۴)، گزارش هایی مبنی بر کاربرد امواج فراصوت در پاستوریزاسیون شیر وجود دارد، بیشترین کاهش تعداد جمعیت میکروبی پس از ۳۰ دقیقه تیمار با امواج فراصوت در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد بوده است (۱۳). یکی از کاربردهای اصلی امواج فراصوت در بیوتکنولوژی، شکستن سلول های بیولوژیکی و آزاد کردن محتویات آنها از جمله آنزیم هااست، بسته به شدت و فرکانس امواج, ساختمان سلولی و ماهیت محیط سونیکاسیون تأثیر امواج متفاوت می باشد(۲) .

باکتریهای پروبیوتیک مکمل غذایی متشکل از نژادهای خاصی از لاکتوباسیلوس ها، بیفیدوباکتریوم ها و استرپتوکوکوس ها هستند که منجر به بروز اثرات مفید در سلامتی مصرف کننده می شود. بررسی ویژگی های ریزساختاری دیواره و غشاء سلولی پروبیوتیک ها تحت تأثیر عوامل مختلف و به کمک روش های پیشرفته نانو و تکنیک های جدید بسیار اهمیت دارد و می تواند محدوده بزرگنمایی مورد نیاز را برای مطالعه مرفولوژی و فیزیولوژی، همچنین تعیین ترکیبات مفید و موثر پروبیوتیک ها و امکان انتقال آنها از دیواره سلولی به محیط خارج فراهم نماید (۱۵).

قدرت تفکیک و بزرگنمایی در میکروسکوپ الکترونی جهت تصویر برداری از ریز ساختارهای میکروبی کوچکتر از یک نانومتر و بزرگنمایی ۱۰۰۰ تا ۱/۰۰۰/۰۰۰ برابر است، بنابراین نسبت به انواع میکروسکوپ نوری عمق میدان و تنوع بیشتری را در مشاهدات میکروسکوپی فراهم می نماید، به هر صورت اندازه کوچکترین جزئیاتی که معمولا" در یک میکروسکوپ نوری قابل تشخیص است به ۲۰۰ نانومتر محدود می شود در حالی که در هر میکروسکوپ الکترونی عبوری[1] و روبشی[2] استفاده از عدسی ها و کویل های کنترل کننده مسیر پرتو الکترونی این امکان را بوجود آورده است که بتوان بزرگنمایی های مختلف را بدون تعویض فیزیکی یا حرکت عدسی ها بدست آورد (۹و۱۵). مشاهده و تصویر

1- Cavitasion
[1] - Transmission electron microscopy(TEM)
2 - Scanning electron microscopy(SEM)

گرفتن از میکروارگانیسم ها به کمک میکروسکوپ الکترونی عبوری و روبشی در مقایسه با میکروسکوپ نوری محدودیت های زیادی دارد که یکی از آنها نمونه سازی است تکنیک های آماده سازی در روش TEM به دو صورت است، برداشتن مواد ناخواسته توسط روشهای شیمیایی یا مکانیکی تا باقی ماندن یک نمونه نازک و بریدن نمونه توسط یک کارد یا در امتداد صفحات کریستالوگرافی به صورتی که یک نمونه بسیار نازک یا بخش بسیار نازکی از یک نمونه تولید شود(۱۰).

آماده سازی نمونه جهت روش SEM، شامل آماده سازی نمونه هادی به وسیله تکنیک های استاندارد انجام می گیرد. اما در مواد غیر هادی نظیر باکتری ها معمولا" نمونه ها با لایه نازکی از کربن، طلا یا آلیاژ طلا پوشش داده می شوند تا بین نمونه و پایه اتصال الکتریکی برقرار شود. نمونه ها باید عاری از مایعاتی با فشار بخار بالا نظیر آب، محلول های پاک کننده آلی و فیلم های روغنی باشند(۱۱).

هدف اصلی در این پژوهش بررسی امکان بکارگیری شوک فراصوت در تخریب غشاء و دیواره سلولی باکتری های پروبیوتیک به منظور افزایش نفوذپذیری آن ها جهت خروج و آزاد کردن آنزیم ها و محتویات درون سلولی و یا متصل به دیواره است که می توانند سبب بهبود فرآوری محصولات لبنی شوند.

مواد و روشها

مواد اولیه: شیر پاستوریزه

۲/۵ درصد چربی، ۱۰/۵ درصد ماده خشک، ۳/۳ درصد پروتئین و ۶/۵-۶/۵۶ = pH از کارخانه شیر پاستوریزه مشهد

استارترهای خالص:

باکتری های پروبیوتیک شامل لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس[1]، لاکتوباسیلوس کازی[2]، لاکتوباسیلوس بولگاریکوس[3]، استرپتوکوکوس ترموفیلوس[4] و لاکتوکوکوس لاکتیس زیر گونه کرموریس[5] از شرکت (CHR-HANSENS

محلول های شیمیایی:

گلوترآلدئید، اسمیم تتراکسید ۱٪ ، اتانل - استن خالص، رزین اپون[6] و رزین پلی مرایزسی[7] از کمپانی مرک آلمان.

دستگاه ها: میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین Olympse مدل BH_2، اولتراسونیک Dr.hielscher مدل CE، میکروسکوپ الکترونی TEM مدل 912 AB، SEM مدل 1450VP و اولترامیکروتوم مدل LKB.

---

[1] - *Lactobacillus acidophilus*
[2] - *Lactobacillus casei spp.rhamnosus*
[3] - *Lactobacillus bulgaricus*
[4] - *streptococcus thermophilus*
[5] - *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*
[6] - *Epon*
[7] - *Polymerisec*

فعال نمودن و تهیه مایه کشت پروبیوتیک ها:

بسته های حاوی کشت های لیوفیلیزه باکتری های پروبیوتیک براساس دستورالعمل شرکت سازنده در زیر هود و کنار شعله تحت شرایط کاملا استریل به محیط کشت اختصاصی MRS برات استریل اضافه شدند و به مدت ۱۶ الی ۱۸ ساعت در دمای ۲۲/۳درجه سانتی گراد در اینکوباتور قرار گرفتند پس از این مدت جهت اعمال تیمارهای تنش فراصوت در لوله های مجزای استریل و درپیچ دار تقسیم شده و مورد استفاده قرار گرفتند.

تهیه نمونه برای روش نوری:

پس از تشکیل پرگنه درون پلیت ها، رنگ آمیزی باکتری های پروبیوتیک به روش گرم و نیومن – لامپرت [1] انجام شد و سپس شکل و ویژگی های ظاهری آنها در زیرمیکروسکوپ نوری بررسی گردید.

تهیه نمونه برای روش SEM:

جهت مشاهده باکتری های پروبیوتیک تحت بررسی به روش SEM رسوب سوسپانسیون اولتراسانتریفوژ شده باکتری ها ازر روی صافی میکروبی با قطر ۰/۲۲ میکرومتر تحت خلاء عبور داده شد، سپس خشک گردیده و به وسیله بارش ذرات پلاتین هادی شدند.

تهیه نمونه برای روش TEM:

جهت مشاهده باکتری های پروبیوتیک تحت بررسی به روش TEM رسوب سوسپانسیون اولتراسانتریفوژ شده باکتری ها در گلوترآلدئید حاوی بافر فسفات ۳٪ به مدت ۱۵ ساعت و در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار می گیرد، سپس چند نوبت با آب مقطر شستشو شده و در اسمیم تتراکسید ۱٪ حاوی بافر فسفات به مدت ۱۵ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار می گیرد. سپس با کمک سری درجه بندی اتانل- استن آبگیری و خشک می شوند، ابتدا با رزین اپون و سپس رزین پلی مرایزسی فیکسه می گردند و در آخر به کمک دستگاه اولترامیکروتوم برش داده شوند.

نتایج و بحث

نتایج بررسی ویژگی های ریزساختاری باکتری های پروبیوتیک قبل و بعد از تنش با امواج فراصوت با فرکانس ثابت ۲۰ کیلوهرتز و در زمانهای ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ دقیقه نشان می دهد که در زمان های کمتر از ۲۰ دقیقه تنش فراصوت، کلنی های پروبیوتیک بر روی محیط کشت رشد می یابند، اما اندازه کلنی های تشکیل شده بسیار کوچک است. در بررسی خصوصیات ظاهری سلولی با کمک میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین مشخص گردید که افزایش زمان تنش فراصوت منجر به ایجاد

[1] - *Newman- Lampert*

پیوستگی در بین لاکتوباسیل های پروبیوتیک و ایجاد استرپتوباسیلوس یا فیلامنت[1] در محیط کشت شده است، این امر ممکن است نتیجه فعال شدن پلی مرهای پروتئینی ویژه ای به نام FrsZ در پوشش سلولی باکتری های تنش یافته باشد که منجر به پیوستگی بیشتر واحدهای سلولی می شوند. نتایج بدست آمده نشان دهنده تأثیر پذیری بیشتر انواع لاکتوباسیل های پروبیوتیکی در مقایسه با انواع لاکتوکوکوس های پروبیوتیک در برابر شوک امواج فراصوت بوده است.

در شکل های ۱، ۲ و ۳ تصاویر میکروسکوپی (میکروسکوپ نوری) باکتری های قبل از تنش و بعد از تنش امواج ماوراء صوت در زمان کمتر و بیشتر از ۲۰ دقیقه مشاهده می شود.

همانطور که در شکل ۱ ملاحظه می گردد، قبل از تنش با امواج فراصوت لاکتوکوکوس ها و لاکتوباسیل های پروبیوتیک سالم و رنگ پذیری کاملی دارند. در صورتی که پس از اعمال تنش امواج فراصوت (شکل ۲) قابلیت تجمع پذیری لاکتوکوکوس های پروبیوتیک افزایش یافته و شروع به تشکیل فلامینت می نمایند، لاکتوکوکوس های پروبیوتیک تحت تأثیر صدمات دیواره پوششی قابلیت رنگ پذیری خود را از دست داده اند.

نتایج بررسی ویژگی های ریزساختاری باکتری های پروبیوتیک قبل و بعد از تیمار با شوک فراصوت که به کمک میکروسکوپ الکترونی SEM و TEM انجام گرفته نشان می دهد که امواج فراصوت در زمانهای مختلف موجب تغییرات و صدمات قابل ملاحظه ای در پوشش سلولی و مقاطع برش خرده سلول باکتری های پروبیوتیک، به شکل ایجاد میکروترک[2]، میکروحفره[3] و پاره گی[4] می شود. بسته به زمان بکارگیری تنش، میزان تغییرات به جا مانده در ویژگی های ظاهری متفاوت است. اعمال تنش فراصوت در زمان کوتاه موجب ایجاد صدماتی نظیر میکروترک و میکرو حفره در باکتری های شده پروبیوتیک که امکان بازیافت وترمیم بخش های صدمه دیده سلول پیش بینی می شود در حالی که زمان های طولانی تر بکارگیری تنش فراصوت منجر به پاره گی پوشش سلول و انهدام کامل آن شده است.

بررسی روند تغییرات تأثیر مدت زمان شوک فراصوت بر حجم واندازه سلولی انواع باکتری های پروبیوتیک تحت تأثیر تیمار تنش فراصوت کاملا معنی دار است ($P < ۰/۰۵$). مقایسه ضخامت پوشش و دیواره سلولی قبل و بعد از اعمال تنش فراصوت نشان دهنده کاهش قطر داخلی سلول و ضخامت پوشش سلولی است (شکل ۷و ۹) عملکرد فیزیولوژیکی باکتری های پروبیوتیک به شدت تابع ویژگی های ساختاری پوشش سلولی یعنی دیواره و غشاء سیتوپلاسمی است که به وسیله اعمال شوک فراصوت تأثیر پذیرفته و لذا ایجاد تغییراتی نظیر میزان انتقال

[1] - Filament

[2] - Micro- crack
[3] - Micro- void
[4] - Rapture

آنزیم ها و نفوذ پذیری پوشش سلولی قابل پیش بینی می باشد. این نتایج می تواند امکان استفاده بیشتر باکتری های پروبیوتیک را در فرآوری محصولات لبنی فراهم آورد زیرا با وجود کاهش جمعیت باکتری های پروبیوتیک تحت تنش فراصوت در زمان های بالاتر از ۲۰ دقیقه نسبت به نمونه های شاهد، روند تغییرات معنی دار فعالیت های متابولیسمی پروبیوتیک ها تحت تیمار تنش فراصوت به عنوان یک روش موثر برای حضور بیشتر موادو متابولیت های مفید سلولی نظیر آنزیم ها در باکتری های پروبیوتیک و تولید محصولات لبنی می باشد. در شکل های شماره ۴ و ۵ تصاویر میکروسکوپی SEM لاکتوباسیل ها و لاکتوکوکوس ها مشاهده می گردد.

شکل ۴ تصویر SEM لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس است که روی صافی میکروبی ۰/۲۲ میکرومتر به دام افتاده است.

شکل ۵ تصویر میکروسکوپی SEM دو نوع کوکوس پروبیوتیک استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوکوکوس کرموریس را نشان می دهد که به کمک صافی میکروبی ۰/۲۲ میکرومتر مشخص شده اند.

شکل های ۶ ، ۷، ۸ و ۹ تصاویر میکروسکوپی TEM لاکتوباسیل ها و لاکتوکوس ها را قبل و بعد از تیمار با امواج ماوراء صوت نشان می دهد. همانطور که در شکل شماره ۶ ملاحظه می گردد دیواره و پوشش سلولی سالم و ضخامت آن ۷۲ نانومتر است و ضخامت داخلی سلول ۷۶۰ نانومتر می باشد در صورتی که پس از تنش با امواج فراصوت، همانطور که در شکل شماره ۷ ملاحظه می گردد ضخامت دیواره تحت تنش فراصوت به ۴۰ نانومتر و ضخامت داخلی سلول به ۶۴۰ نانومتر کاهش یافته است. علاوه بر این صدماتی چون پاره گی، میکرو ترک و میکرو حفره نیز ملاحظه می شود.

شکل شماره ۸ یک لاکتوکوکوس پروبیوتیک با دیواره سالم را نشان می دهد، ضخامت دیواره ۷۰ نانومتر و ضخامت داخلی سلول ۵۲۵ نانومتر است که پس از تنش با امواج فراصوت همانطور که در عکس شماره ۹ ملاحظه می گردد ضخامت دیوار به ۵۰ نانومتر رسیده و قطره داخلی سلول به ۴۷۵ نانومتر کاهش یافته است، علاوه بر این که پاره گی به طور مشخص در سلول ملاحظه می گردد.

منابع

[1.] Brodbent, J. R., Oberg, J.C., wang, H. and Wei, L. Attributes of the heat shock response in three species of dairy Lactobacillus. Syst Appl microbial 20: 12-19. 1997.

[2] Dubbs, C.A. Ultrasonic effects on enzymes, Clinical chemistry 12:181-186. 1996.

[3] Duwat, P., Ehrlich, S.D., and Gruss, A. Effects of metabolic flux on stress response pathways in lactococcus lactis. Mol Microbiol 31,845-858. 1999.

bacterial flora of milk , J: Dairy science 38:598-604. 1995.

[5] Gomes AMP, Xavier Malcata, F. Bifidbacterium ssp. And lactobacillus acidophilus: biological biochemical, technological and therapeutically properties relevant for use as probiotics. Trends food Sc. & Techn. 10:139-157. 1999.

[6] Holzapfer, W., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J., and Schilinger., V. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. American J clin Nutr, 73:365-373. 2001.

[7] Jeffery, R., Broadbent and Chan, L. Effect of Heat shock on cold shock tratmeant on the resistance of lactococcos lactis, western dairy center. USA. 1999.

[8] Kalab, M, Yan and yiu, S.H. Food microstracture . 6:181-189. 1987.

[9] Kalab, M. Talking a bout electron microscope of foods, Food microscopy Blog. 6:170-181. 2005.

[10] Karic, M. , Gantar, M., and Kalab. 1985. Food microstructure. 4:297-306.

[11] Krivanek, O. L., and Paterson, J., H. Ultramicroscopy, 32: 313-319. 1990.

[12] Leapman, R., D and Sun, S. Ultramicroscopy. 59: 71.-78. 1995.

[13] Nouroozi, J., Mirzaii, M. Study of the characteristites of lactobacillus plantarum isolated from sausage in Iran, crobiological

[14] department, Medical Science University, Tehran-Iran .Internet. 2004.

[15] Piyascana, P., Moareb , E. and Mcrellar. Inactivation of microbes using ultrasound: a review, Food Microbiology, 87:207-216. 2003.

[16] Rallu, F., Gruss, A. and Maguin, E. Lactococcus lactis and stress, Antonie Leeuwenhoek. 70:243-251. 1996.

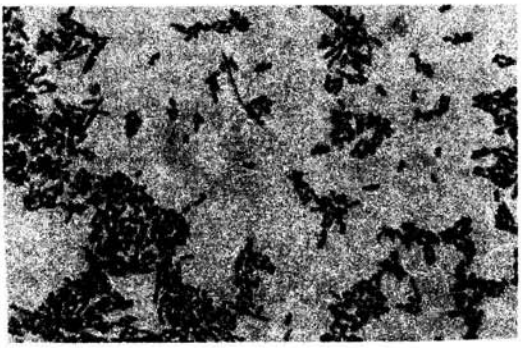
[17] Sale, f. j, Burgos, J. and Condon, S. Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes, New methods of food preservation. ISBN, 960:215-230. 1995.

[18] Sandholm, M. Technological challenges for future probiotic foods. Int. Dairy Jurnal 12:73-82. 2002.

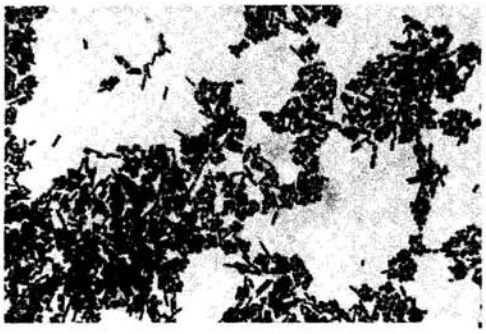
[19] Shah, N.P. Functional foods from probiotics and prebiotics, Food Technol, 55(11):46-53. 2001.

[20] Zavaglia. A., Kociukinski, G., Perez., P., and de Antoni, G. Isolation and characterization of Bifidobaclerium strains for probiotics formulation. J Food Prot 61:865-873. 1998.

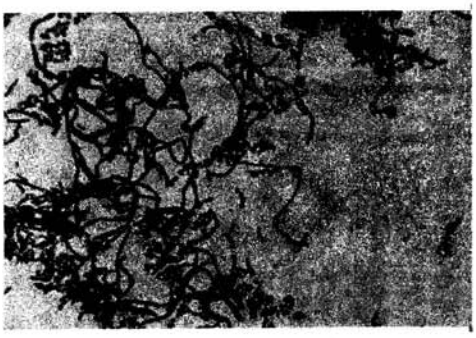
[21] Zombonelli, C. and Chiarari, C. Effects of lactic acid bacteria autolysis on sensorial charcteristics of fermented foods. UDC 579, 864 ISSN B30:9862. 2002.



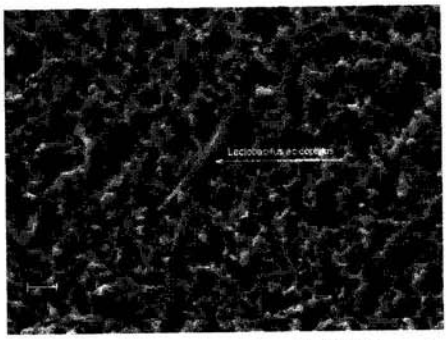
شکل۱ - تصویر میکروسکوپ نوری از باکتری های پروبیوتیک در نمونه های شاهدو بدون تنش با امواج فراصوت



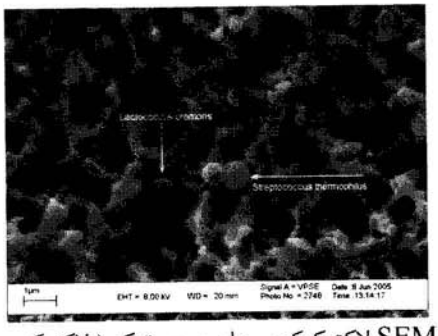
شکل ۲- تصویر میکروسکوپ نوری باکتری های پروبیوتیک درنمونه هایی که کمتر از ۲۰ دقیقه تحت تنش امواج فراصوت بوده اند.رنگ پذیری کمتر در برخی از لاکتوکوکوس های پروبیوتیک ناشی از صدمه ای است که به پوشش سلولی وارد شده است.



شکل ۳- تصویر میکروسکوپ نوری باکتری های پروبیوتیک در نمونه هایی که بیشتر از ۲۰ دقیقه تحت تأثیر تنش امواج فراصوت قرار گرفته اند، تشکیل فیلامنت در نمونه های لاکتوباسیل مشهود است.



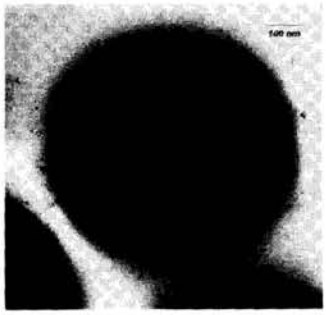
شکل ۴- عکس میکروسکوپی SEM لاکتوباسیل های پروبیوتیک(لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس)



شکل ۵- عکس میکروسکوپی SEM لاکتوکوکوس های پروبیوتیک (لاکتوکوس لاکتیس زیرگونه کرموریس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس)

شکل ۶- عکس میکروسکوپی TEM لاکتوباسیل های پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس کازئی) قبل از تیمار با امواج فراصوت

شکل ۷- عکس میکروسکوپی TEM لاکتوباسیل های پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس کازئی) پس از تیمار با امواج فراصوت (زمان بیشتر از ۲۰ دقیقه)، کاهش ضخامت داخلی و ضخامت پوشش سلولی مشاهده می گردد.



شکل۸- عکس میکروسکوپی TEM لاکتوکوکوس های پروبیوتیک قبل از تیمار با شوک فراصوت.

شکل ۹- عکس میکروسکوپی بروش TEM لاکتوکوکوس های پروبیوتیک بعد از تیمار با شوک فراصوت زمان بالاتر از ۲۰ دقیقه، پاره گی و کاهش ضخامت پوشش سلولی نسبت به نمونه شاهد مشاهده می گردد.