اثرات پلاسمای سرد اتمسفری بر شیر گاوی و قارچ *Candida albicans* تلقیح شده به آن

اباصلت حسین زاده کلاگر[1*]، معصومه دیلمی[2]، فرشاد صحبت زاده[3]، سیده ندا سیادتی[4]

١- استاد گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران
٢- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر
٣- دانشیار گروه فیزیک اتمی و مولکولی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
٤- دانشجوی دکتری فیزیک اتمی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر

(تاریخ دریافت: ٩٤/١٠/٣٠ تاریخ پذیرش: ٩٥/٠٥/٣١)

چکیده

امروزه یکی از روش‌های نوین، استفاده از پلاسمای سرد فشار اتمسفری در استریل سازی و فرآوری محصولات لبنی است. هدف این تحقیق، مطالعه اثرات پلاسمای سرد اتمسفری بر شیر و کاندیدا آلبیکنس (*Candida albicans*) تلقیح شده به آن است. برای این منظور، از شیر گاوی سترون حاوی ٣٪ چربی، قارچ *کاندیدا آلبیکنس* و پلاسمای روبشی تولید شده به روش تخلیه سد دی الکتریک استفاده گردید. کشت این قارچ در محیط عمومی LB مایع انجام شد و حدود 10^5 × ٥/٥ کلنی در میلی لیتر شیر تلقیح شدند. سپس شارش پلاسما روی شیر تلقیح شده در زمان های مختلف صفر (کنترل)، ١، ٣، ٦، ٩ و ١٢ دقیقه صورت گرفت. تغییرات محتوایی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC) و پراکسیداسیون لیپیدهای شیر به ترتیب با استفاده از روش FRAP و روش تیوباربیتوریک اسید سنجش شدند. نتایج نشان داد با افزایش زمان شارش پلاسما میزان غیر فعال سازی قارچ ها افزایش می‌یابد. حداقل مدت زمان لازم برای استریل سازی شیر آلوده و عدم رشد کلنی‌های قارچ ٩ دقیقه است، بطوریکه پس از شارش به این مدت هیچ گونه تکثیر و یا رشدی در محیط کشت LB جامد مشاهده نشد. همچنین مقایسه مقادیر اندازه گیری شده MDA و TAC پس از شارش، در نمونه‌های شیر تلقیح شده و کنترل نشان داد هیچ گونه اختلاف معنی داری بین آنها در مقایسه با شاهد وجود ندارد. بر این اساس استفاده از پلاسمای سرد فشار اتمسفری روبشی می تواند برای سترون سازی شیر گاو آلوده به قارچ *کاندیدا آلبیکنس* مورد توجه محققین این صنعت قرار گیرد.

کلید واژگان: پلاسمای سرد فشار اتمسفری، پاتوژن زدایی، شیرگاو، قارچ *کاندیدا آلبیکنس*

[*] مسئول مکاتبات: ahcolagar@umz.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-17]

۱- مقدمه

امروزه روش های مرسوم برای کنترل فساد و ایمنی میکروبی مواد غذایی، مانند روش های حرارتی، انجماد و غیره با تقاضای مصرف کنندگان برای مواد غذایی آماده به مصرف و تازه، سازگار نیست. بنابراین، تلاش محققان در جهت گسترش یک روش متفاوت و موثر ضد میکروبی است تا بتوانند اعمال فرآوری روی مواد غذایی را به حداقل ممکن برسانند. یکی از فناوری های ضد میکروبی گسترش یافته برای سترون سازی سطوح آلوده، استفاده از پلاسمای غیرحرارتی اتمسفری است[۱]. این فناوری که بر مبنای استفاده از گازهای یونیزه و تولید شده در دمای اتاق و در فشار اتمسفری می باشد، از اواسط سال های ۱۹۹۰ مورد توجه قرار گرفت اما استفاده از آن به عنوان یک روش های آلودگی زدایی میکروبی مواد غذایی همچنان مورد توجه محققان قرار دارد[۱و۲]. یکی از اهداف، فهمیدن مکانیسم های برهمکنش پلاسما با سلول ها ،در سطح سلولی و مولکولی است [۳]. تخلیه سد دی الکتریک یا DBD (Dielectric-barrier discharge) یکی از انواع روش‌های تولید پلاسمای سرد است. عمل شارش یا تخلیه بین دو الکترود که حداقل یکی از آن‌ها با یک لایه دی الکتریک پوشانده شد، صورت می‌گیرد. این تخلیه با اعمال ولتاژ بالای متناوب بین دو الکترود انجام گرفته و وجود یک لایه دی الکتریک مانع از عبور جریان شدید میان دو الکترود و وقوع جرقه می‌گردد [٤]. یک تخلیه الکتریکی، همچون پلاسما، بسته به شرایط و چگونگی تخلیه می‌تواند منبع خوبی از الکترون‌ها، یون‌ها، تابش فرابنفش و رادیکال‌های آزاد باشد. این ویژگی پلاسماها توانایی آن‌ها را در غیر فعال سازی باکتری‌ها و دیگر میکروارگانیسم‌ها آشکار کرده است. از این رو در بسیاری موارد از پلاسما برای رفع آلودگی میکروبی استفاده می‌شود [۵]. پلاسما شامل یون های مثبت و منفی، الکترون ها، اتم ها و مولکول ها، شبه پایدارها، رادیکال های آزاد، وفوتون ها می باشد [٦]. تاکنون، تحقیقات اندکی درباره‌ی امکان استفاده از پلاسما به منظور افزایش سطح ایمنی و کیفی مواد غذایی مایع انجام شد [۷و۸]. شیر یک ماده غذایی مایع و بسیار مغذی است که حاوی لیپیدها، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها (لاکتوز)، اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها و مواد معدنی است [۹]. به دلیل خواص تغذیه ای شیر، این ماده غذایی محیط مناسبی برای رشد بسیاری از میکروارگانیسم‌ها به خصوص انواع پاتوژن های بیماری زا از جمله کاندیدا آلبیکنس و اشرشیاکلی و لیستریا مونوسیتوژنز و بروسلا وغیره است [۱۰]. به منظور از بین بردن این میکروارگانسیم های بیماری زا از روش‌های حرارتی از قبیل پاستوریزاسیون و استریلیزاسیون استفاده می‌شود. اما دماهای بالای مورد استفاده در این روش‌ها، مانند استریلیزاسیون UHT (Ultra-high temperature processing) می‌توانند روی بسیاری از فاکتورهای کیفی شیر مانند طعم، رنگ و محتوای غذایی شیر اثر بگذارند که به عنوان نمونه می‌توان به تخریب بخشی از برخی ویتامین‌ها اشاره کرد [۱۱]. به طور کلی باکتری ها عامل فساد در شیر می باشند وتوجه کمی هم به توانایی رشد مخمر ها در شیر شده است.با وجود این طیف وسیعی از مشاهدات توانایی مخمر ها را در سوخت و ساز اجزای شیر نشان می دهد.به خصوص بیشتر این مشاهدات را در انواعی از پنیرها داریم.فساد شیر غلیظ َشده وماست توسط مخمر های جداشده از شیر پاستوریزه و همچنین مطالعات قبلی انجام شده در سال ۱۹۸۷ توسط فلیت (Fleet) و میان (Mian) که پتانسیل رشد قابل توجه ی مخمر را در شیر فرآوری شده ی UHT نشان داد. در حال حاضر، اطلاعات کمی در مورد سینتیک و اساس بیوشیمیایی رشد مخمر در شیر شناخته شده است.از جمله قارچ هایی که در شیر امکان رشد و تکثیر را دارد *کاندیدا آلبیکنس* می باشد [۱۲]. یکی از شایعترین بیماری های ایجاد شده توسط گونه های فرصت طلب کاندیدا بیماری کاندیدازیس می باشد که نقش عمده را در ایجاد این بیماری *کاندیدا آلبیکنس* دارا است سیر بالینی این بیماری در انواع حاد و مزمن و اسپورادیک دیده می شود [۱۳]. روش تکثیر مخمر *کاندیدا آلبیکنس* به روش جوانه زدن می باشد واز جمله قارچ های تک سلولی محسوب میشود وبسته به شرایط رشد می تواند میسلیوم (Mycelium) کاذب یا حقیقی ایجاد کند و قادر به هم تولید مثل جنسی وهم غیر جنسی می باشد [١٤].کاندیازیس دهانی و یا برفک دهانی از معمول ترین شکل بیماری کاندیدازیس می باشد گرچه کاندیدا به مقدار کم در حیطه ی دهان وجود دارد اما ممکن است بعضی از مواد مثل آنتی بیوتیک ها این نظم را بهم زده و افزایش رشد آنها و ایجاد بیماری را باعث شوند و این ضایعات در دهان به شکل پلاکی نرم و زرد تا شیری دیده می شوند [۱۵-۱۷]. در

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-17]

روش بررسی آنتی اکسیدانهای تام TAC ، فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها بر اساس قدرت آن‌ها در احیاء یون فریک (Fe^{3+}) به یون فرو (Fe^{2+}) اندازه‌گیری می‌گردد. در روش FRAP (Ferric reducing ability of plasma) از TPTZ (2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine) استفاده می‌شود، این ماده میل زیادی جهت اتصال با یون فریک دارد و با آن کمپلکس Fe^{3+}-TPTZ تشکیل می‌دهد. این کمپلکس در حالت طبیعی بدون رنگ است اما اگر یون فریک توسط آنتی‌اکسیدان‌ها به یون فرو احیاء گردد، این کمپلکس ایجاد رنگ آبی می‌کند. با اندازه‌گیری شدت این رنگ توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۵۹۳ نانومتر می‌توان تا حدودی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های تام را سنجید [۱۸]. گروه سولفدریل موجود در شیر احتمالا دلیل افزایش پایداری اکسیداتیو در شیر حرارت داده می باشد. این گروه ممکن است یک فعالیت آنتی اکسیدانی کلی را ایجاد کند گروه های سولفیدریل به عنوان جاذب رادیکال های آزاد عمل می کنند، و در نتیجه به عنوان آنتی اکسیدان ها، در سیستم های بیولوژیکی و دیگرسیستم ها به کار می رود. تنوع گسترده ای در محتوای سولفیدریل شیر خام وشیر گرما دیده مشاهده می شود. با این حال یک توافق عمومی است که محتوای کلی گروه سولفیدریل واکنش پذیر در مقایسه شیرخام و شیرحرارت دیده در شیرخام بالاترین سطح را داشته و در اثرحرارت کاهش می یابد [۱۹]. اندازه‌گیری مالون دی آلدئید یا MDA (Malondialdehyde) به‌عنوان یک شاخص مناسب جهت بررسی وضعیت اکسیداتیوی مورد استفاده قرار می‌گیرد[۲۰]. محصولات اولیه پراکسیداسیون لیپیدها نظیر LOOHترکیبات ناپایداری هستند که طی واکنش های چند مرحله‌ای به ترکیبات ثانوی دیگری نظیر آلدئیدها و کتون ها شکسته می‌شود. از آنجا که MDA در مقایسه با دیگر ترکیبات آلدهیدی پایدارتر است به‌عنوان یک ابزار تشخیصی مناسب جهت اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپید، به روش تیوباربیتوریک اسید، به‌کار می رود [۲۱]. اساس این روش، که یک روش مناسب برای اندازه‌گیری سطح مالون دی آلدئید می باشد، بر پایه واکنش مالون دی آلدئید تحت شرایط دمایی بالا (۹۰-۱۰۰ درجه سانتیگراد) و اسیدی با معرف تیو بابیتوریک اسید یا TBA (2-thiobarbituric acid) است. در اثر این واکنش دو مول H_2O و یک مول MDA-TBA تولید می‌شود [۲۲]. کمپلکس حاصل از MDA-TBA ایجاد رنگ صورتی کم رنگی می‌کند که با چشم غیرمسلح قابل مشاهده است. این کمپلکس رنگی می‌تواند با حلالهای آلی از قبیل بوتانول استخراج شود. شدت این تغییر رنگ در طول‌موج ۵۳۲ تا ۵۳۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر قابل اندازه‌گیری است [۲۳]. در لیپید پراکسیداسیون شیر گسترش طعم اکسیده در شیر با اکسیداسیون خودکار شیر در ارتباط است با این حال شروع مکانیزم حقیقی آن که توسط هیدروپراکسیدها شکل می گیرد به طور رضایت بخشی توضیحی داده نشد. اما مکانیسم اکسیداسیون عمومی و خودکار یک فرایند زنجیره ای شامل $R'' + O_2 \rightarrow ROO^{o}$ ، $RH + O_2 \rightarrow ROOH$ و $2ROOH \rightarrow ROO'' + RO'' + H_2O$ می باشد. واضح ترین توضیح برای تشکیل هیدروکسیلاز (ROOH) واکنش مستقیم بین اسید چرب غیر اشباع RH واکسیژن می باشد. بنابراین گزارشی ریبوفلاوین به عنوان یک حساس کننده نسبت به نور در عمل تخریب لیپو پروتئین چگالی کم شیر ظاهر می شود [۲٤]. از آن جا که تحقیقات اندکی درباره‌ی پاتوژن زدایی مواد غذایی مایع توسط پلاسما انجام شده و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* نیز به عنوان یک عامل بیماری زا در شیر شناسایی شد این مطالعه اثر پلاسمای سرد اتمسفری را روی قارچ تلقیح شده به شیر و تأثیر مدت زمان‌های مختلف تابش پلاسما بر غیرفعال سازی این قارچ و همچنین تاثیر تابش پلاسما را بر لیپید پراکسیداسیون و آنتی اکسیدان های تام شیر بیان می کند.

۲- مواد و روش ها

۲-۱-ساختار پلاسمای سرد

ساختار اصلی تولید پلاسما در این مقاله تخلیه سد دی الکتریک است. این ساختار شامل دو الکترود استوانه ای از جنس مس به ارتفاع ۱۲ میلی متر و قطر ٤٠ میلی متر است. هر یک از الکترودها بین دو صفحه‌ی مستطیل شکل به ابعاد ۱۸×۱۱۰×۱۵۰ میلی متر از جنس پلکسی گلاس سوار شدند. از هوا به عنوان منبع گازی برای تشکیل پلاسما یکنواخت در فضای میان دو الکترود با اعمال ولتاژ، میان دو الکترود استفاده شد. شکل ۱ نمایی از پلاسمای سرد اتمسفری تولید شده میان دو الکترود در هوا در حین پردازش شیر را نشان می‌دهد. در این شکل، استریمرهای ریز با

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-17]

نور آبی و بنفش، که بیانگر جایگزینی یون ها و الکترون ها در آرایه هایی از خطوط جریان می باشد، دیده می شوند.

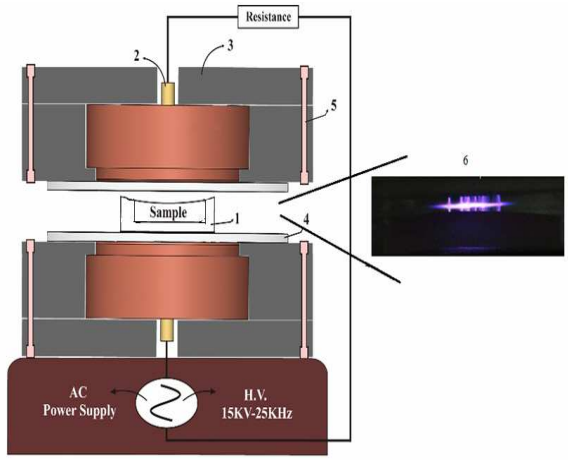

Fig 1 The outline structure cold atmospheric dielectric barrier: (1) Location of samples; (2) Copper electrode; (3) Plexiglas plate; (4) Glass plate; (5) Screw; (6) Plasma treatment on sample container

۲-۲- کشت، آماده سازی و تهیه CFU

در این آزمایش نمونه های لیوفیلیزه‌ی قارچ *کاندیدا آلبیکنس* (*Candida albicans* PTCC 5027) جهت انجام آزمایش از پژوهشکده زیست فناوری در سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. در این مطالعه، جهت کشت قارچ، از محیط کشت *Luria Bertani* یا LB (حاوی ٤٠ گرم گلوگز، ۳ گرم عصاره مخمر، ۱۰ گرم پپتون به ازای هر لیتر) استفاده شد. جهت شمارش کلنی یا CFU (colony-forming unit) از روش عمومی رقت سریالی محیط کشت رشد یافته (از رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-7}) استفاده گردید. از هر یک از رقت‌ها به طور جداگانه ۵۰ میکرولیتر درون پلیت‌های حاوی محیط کشت LB جامد ریخته شد و به صورت کامل توسط میله شیشه‌ای L شکل پخش گردید و پس از ١٦ ساعت انکوبه شدن در ۲۵۰ rpm و دمای ۳۷-۳۰ درجه سانتیگراد، بهترین رقت قابل شمارش انتخاب شد سپس تعداد کلنی‌ها در هر پلیت شمارش گردید. محیط های کشت مایع و جامد حاوی کشت حاوی محلول کلرامفنیکل حل شده در متانل، با غلظت نهایی ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر بود.

۲-۳- تلقیح و تیمار نمونه ها با پلاسما

مقدار ۵۰ میکرولیتر از قارچ *کاندیدا آلبیکنس* رشد یافته در محیط کشت LB مایع، به ۱۵ میلی لیتر شیر استریلیزه حاوی ۳٪ چربی، که قبلاً عدم وجود فلور میکروبی آن تأیید گردید، به عنوان نمونه آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. به منظور رشد بهتر کاندیدا در شیر از محلول ۱۵درصد NaCl استفاده شد. بعد از حدود ۲۰-١٦ ساعت انکوبه شدن در شرایط فوق، محیط حاوی کاندیدا رشد یافته به دست آمد. به منظور تهیه محیط کشت تازه مقدار ۵۰ میکرولیتر از آن را به ۱۵ میلی لیتر شیر استریل شده تلقیح و انکوبه شد تادر شرایط فوق، به کدورت یک مک فارلند با OD_{600nm} برابر ۰/۰۵ رسانده شد، که متناظر با $5/5 \times 10^{5}$ کلنی قارچ در هر میلی لیتر است. نمونه‌ها در دو گروه شاهد (کنترل) و گروه آزمایش یا تیمار (نمونه‌های تحت تأثیر پلاسما) تهیه شدند. نمونه‌های شیر توسط پلاسمای سرد اتمسفری روبشی در زمان‌های مختلف صفر (به عنوان شاهد) ۱، ۳، ٦، ۹، ۱۲ دقیقه، تحت شارش پلاسمای روبشی قرار گرفتند. از هر نمونه مقدار ۵۰ میکرو لیتر درون ظروف حاوی محیط کشت LB جامد (تهیه شده به روش فوق)، ریخته شد و با میله شیشه‌ای L شکل، گستره یکنواختی تهیه شد. تعداد کلنی رشد یافته از هر نمونه پس از ١٦ ساعت انکوبه شدن در شرایط فوق، شمارش گردیدند.

۲-٤- اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانهای تام به روش FRAP

فعالیت آنتی اکسیدان های تام به روش توانایی احیایی یون آهن ۳ ظرفیتی یا همان روش FRAP (ferric reducing ability of plasma) که اولین بار توسط بنزی در سال ١٩٩٦ ابداع گردید [۲۵]. با اندکی تغییر توسط حسین زاده کلاگر و همکاران (۲۰۰۹) در سه تکرار اندازه گیری شد [٢٦]. برای این منظور نمونه ها پس از شارش، سریعا برای اندازه گیری آنتی اکسیدانها مورد بررسی قرار گرفت. برای اندازه گیری TAC، از محلول های استاندارد $FeSO_4.7H_2O$ (در غلظت های مختلف ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار) و محلول کار FRAP (شامل 30mM Acetate buffer pH 3.6؛ 10mM TPTZ [2,4,6-tri - pyridyl-s-triazine] و 20mM Ferric chloride)، بصورت تازه با نسبت های ۱۰ (استات):۱ (TPTZ): ۱ ($FeCl_3$) استفاده

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-17]

شد. بعد از آماده سازی محلول ها، داخل هر لوله آزمایش (بسته به تعداد نمونه ها) حدود ١/٥ میلی لیتر محلول FRAP را اضافه نموده و به مدت ٥ دقیقه آنها را در دمای ٣٧ درجه در حمام آب گرم نگه داشته شدند. سپس مقدار ٥٠ میکرولیتر از هر نمونه (نمونه صفر و نمونهای تیمار شده با پلاسما) به لوله ها اضافه شدند و مجددا در حمام آب گرم به مدت ١٠ دقیقه در دمای فوق، حرارت گرفتند. بعد از این مدت، لوله ها را از حمام خارج کرده و به مدت ٢ دقیقه در rpm ١٠٠٠٠سانتریوفوژ شدند سپس جذب نمونه ها را در طول موج ٥٩٣ نانومتر قرائت شد. با استفاده از نمودار استاندارد غلظت TAC در نمونه ها به کمک نرم افزار کامپیوتریExcel محاسبه گردید.

٢-٥- اندازه گیری غلظت مالون دی آلدئید با روش TBA

غلظت MDA با استفاده از متد تیوباربیتوریک اسید شرح داده شده توسط چاپارزاده و همکاران (٢٠١٤) با اندکی تغییر در سه تکرار اندازه گیری گردید [٢٧]. در این روش ١٠٠میکرولیتر از نمونه شیر قبل (زمان صفر، به عنوان شاهد) و بعد از شارش با پلاسما را با یک میلی لیتر از تری کلرواسید ١٠٪ (10% Trichloroacetic acid/TCA) مخلوط گردید سپس٤٠٠ میکرولیتر معرف TBA ٠/٥درصد در آب، به آن اضافه شد و پس از نیم ساعت انکوبه شدن در آب جوش، بلافاصله به مدت ٥ دقیقه روی یخ قرار گرفت. بعد ١٥ دقیقه سانتریفیوژ در rpm ١٠٠٠٠ جذب چگالی نوری (OD) هریک از محلول های رویی نمونه ها، در طول موج ٥٣٤ قرائت شد. غلظت MDA بر حسب نانو مول بر میلی لیتر برابر [6.41× OD] است.

٣- نتایج

اثر پلاسمای سرد روبشی برقارچ های تلقیح شده به شیر به روش CFU پس از تابش پلاسما مورد بررسی قرار گرفت (شکل٢A). نتایج نشان داد پس از شارش پلاسما به مدت ١، ٣ و٦ دقیقه روی نمونه‌های حاوی ^{٦}١٠× ٣١ کلنی در میلی لیتر، تعداد کلنی‌های رشد یافته به ترتیب به $^{-٢}$ ١٠ ×١٤/٦، $^{-٢}$ ١٠ ×١٤/٤ و $^{-٢}$ ١٠ ×١٤/٢ در هر میلی لیتر کاهش یافت اما پس از شارش ٩ و ١٢ دقیقه روی نمونه‌ها، هیچ قارچی وجود نداشت بطوریکه تعداد کلنی‌های رشد یافته به صفر رسید. میزان کاهش تعداد کلنی‌های رشد یافته، پس از مدت زمان‌های مختلف تابش پلاسما، با استفاده از رابطه‌ی [log reduction= log (N_0/N)]، که در این رابطه N_0 تعداد کلنی‌ها پیش از تابش پلاسما و N تعداد کلنی‌ها پس از تابش پلاسما است، نشان داد که تابش پلاسمای سرد اتمسفری در محدوده زمانی یک الی ٦ دقیقه باعث کاهش تقریبا ثابتی در تعداد قارچ های موجود در شیر است اما وقتی که زمان شارش به بیش از ٩ دقیقه می رسد این تعداد به صفر می رسد (شکل٢B).

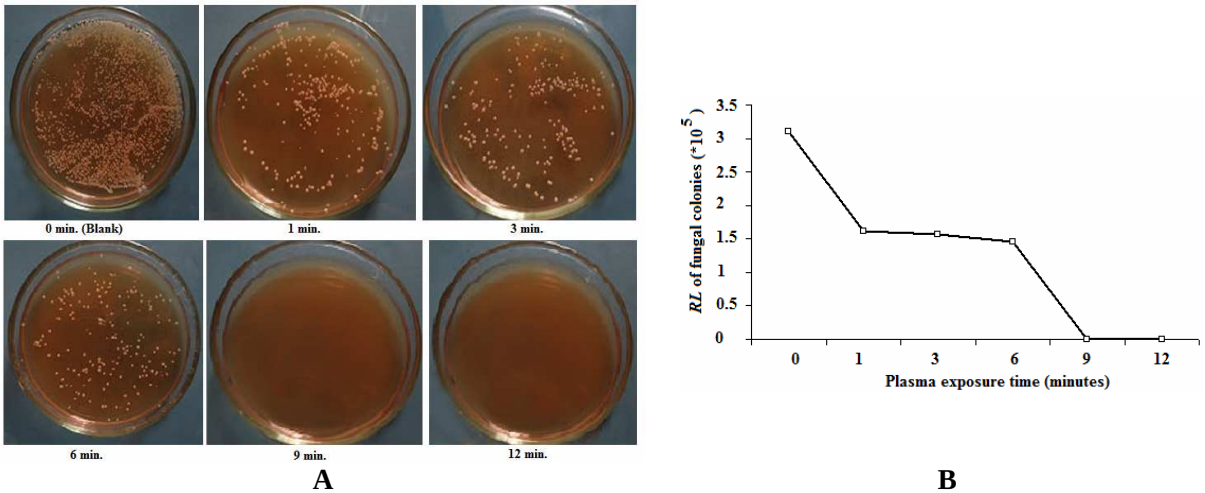

Fig 2 Cold atmospheric plasma treatment effects on number *of Candida albicans* inoculated in milk after 4 times dilution (10^{-4}) and Logarithmic graph reduction: (A) sample treatment of plasma respectively for 0 (control), 1, 3,6, 9 and 12 minutes (min.); (B) Reduced logarithmic (*RL*) of fungal colonies grown on solid media

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-17]

در مطالعه دیگر اثر شارش پلاسما روی پراکسیداسیون لیپیدها و سطح ترکیبات آنتی اکسیدانی شیرهای شارش شده در زمان های مختلف با پلاسما بررسی شد. تجزیه تحلیل آماری از میزان لیپید پراکسیداسیون صورت گرفته با اندازه گیری سطح MDA موجود در شیر نشان داد بین سطح MDA در زمان صفر (شاهد) دارای اختلاف معنا داری در سطح $p< ۰/۰۵$ نمی باشد. همچنین تجزیه تحلیل آماری بین میزان TAC نیز در سطح $p< ۰/۰۵$، با نمونه های شارش نشده اختلاف معنی داری را نشان نداد (شکل۳).

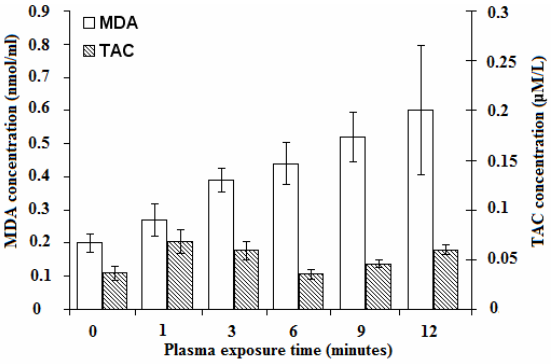

Fig 3 The Malondialdehyde (MDA) and total antioxidant (TAC) levels in milk samples, which is treatment by cold atmospheric plasma, at various time 0 (control), 1, 3,6, 9 and 12 minutes.

٤- بحث

استفاده از پلاسما بسته به شرایط و چگونگی تخلیه الکتریکی، آن می تواند منبع خوبی از الکترون ها، یون ها، پرتو فرابنفش و رادیکال های آزاد باشد. این خصوصیت پلاسما، توانایی آن ها را در غیرفعال کردن باکتری ها و دیگر میکروارگانیسم ها را افزایش می دهد لذا استریلیزاسیون موادی که دارای محدودیت در استفاده از اتوکلاو، حرارت، اشعه و یامواد شیمیایی دارند، استفاده می شود [۲۸و۲۹]. به منظور آلودگی زدایی مواد غذایی به وسیله پلاسما، به طوری که تغییرات نامطلوب در آن ایجاد نشود، باید گاز پلاسما در دمای اتاق یا نزدیک به آن باشد. تا چند دهه اخیر، این کار به وسیله ی اعمال خلا صورت می گرفت که کاری سخت و پرهزینه بود اما اخیرا پیشرفت تکنولوژی منابع تولید پلاسما، باعث گشته که امکان تولید پلاسمای پایدار در دمای محیط و در فشار اتمسفری با استفاده از تجهیزات نسبتا ساده و ارزان قیمت میسر گردد [۳۰]. از آنجایی که شیر یک منبع غنی از املاح و ویتامین ها می باشد و روش های موجود حرارتی امکان آسیب به آنها را دارا می باشد. بر اساس نتایج این تحقیق تابش پلاسمای سرد اتمسفری به صورت روبشی در زمان بیش از ۹ دقیقه، باعث حذف کلنی های قارچ تلقیح شده به شیر شد. بطوریکه سبب کاهش لگاریتمی تعداد کلنی قارچ در شارش بیش از ۹ دقیقه در مقایسه با شارش های قبل آن شد، که احتمالا مربوط به گروه های عاملی متصاعد شده از شارش پلاسما از جمله گونه‌های فعال شیمیایی و ذرات باردار در پلاسمای سرد اتمسفری است. از آنجائیکه در تولید این پلاسما از هوا استفاده شد می تواند علاوه بر تولید ازن (O_3) گونه های فعال دیگری همچون O^o، O^-، O_3^-، O_2^-، OH، Ar* و اکسیژن سینگلت یا $O2^1\Delta g$ (Singlet oxygen) را نیز می تواند تولید کند [۲۸و۳۱]. تجزیه تحلیل آماری این تحقیق برای اولین بار نشان دارد که تولید و شارش پلاسمای بصورت روبشی بر میزان پراکسیداسیون لیپیدی و آنتی اکسیدان کل شیر اثر معنی داری ندارد. که نشان دهنده ی این است که استریلیزاسیون با تابش پلاسما می تواند مورد توجه محققین در صنایع مواد غذایی قرار گیرد. و استفاده از پلاسما در مدت زمان گفته شده نه تنها موجب استریلیزاسیون کامل شیر از گونه های بیماری زا می شود بلکه تاثیر نامطلوبی بر مواد تشکیل دهنده ی شیر از جمله لیپیدها و ظرفیت آنتی اکسیدانی موجود در آن ندارد می تواند به عنوان یک روش مناسب در استریلیزاسیون مورد توجه قرار گیرد.

٥- منابع

[1] Fernandez, A., Shearer, N., Wilson, D.R., and Thompson, A. 2012. Effect of microbial loading on the efficiency of cold atmospheric gas plasma inactivation of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. International Journal of Food Microbiology, 152(3): 175-180.

[2] Noriega, E., Shama, G., Laca, A., Díaz, M., and Kong, M. G. 2011. Cold atmospheric gas plasma disinfection of chicken meat and chicken skin contaminated with Listeria innocua. Food Microbiology, 28(7): 1293-1300.

[3] Fridman, G., Shekhter, A.B., Vasilets, V.N., Friedman, G., Gutsol, A., and Fridman, A.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-17]

2008. Applied plasma medicine. Plasma Processes and Polymers, 5: 503-533.
[4] Kogelschatz, U. 2003. Dielectric-barrier discharges: their history, discharge physics, and industrial applications. Plasma Chemistry and Plasma Processing, 23(1): 1-46.
[5] Ikawa, S., Kitano, K. and Hamaguchi, S. 2010. Effects of pH on bacterial inactivation in aqueous solutions due to low temperature atmospheric pressure plasma application. Plasma Processes and Polymers, 7(1): 33-42.
[6] Surowsky, B., Fröhling, A., Gottschalk, N., Schlüter, O. and Knorr, D. 2014. Impact of cold plasma on Citrobacter freundii in apple juice: Inactivation kinetics and mechanisms. International Journal of Food Microbiology, 174: 63-71.
[7] Nehra, V., Kumar, A., and Dwivedi, H.K. 2008. Atmospheric non-thermal plasma sources. Int J Eng, 2(1): 53-68.
[8] Gurol, C., Ekinci, F.Y., Aslan, N. and Korachi, M. 2012. Low temperature plasma for decontamination of *E. coli* in milk. International Journal of Food Microbiology, 157(1): 1-5.
[9] Claeys, W.L., Cardoen, S., Daube, G., De Block, J., Dewettinck, K., Dierick, K and Herman, L. 2013. Raw or heated cow milk consumption review of risks and benefits food control, 31(1): 251-262.
[10] Sharma, P., Bremer, P., Oey, I. and Everett, D.W. 2014. Bacterial inactivation in whole milk using pulsed electric field processing. International Dairy Journal, 35(1): 49-56.
[11] Bermúdez-Aguirre, D., Corradini, M.G., Mawson, R. and Barbosa-Cánovas, G.V. 2009. Modeling the inactivation of Listeria innocuain raw whole milk treated under thermo-sonication. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 10(2): 172-178.
[12] Roostita, R., and Fleet, G.H. 1996. Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. International Journal of Food Microbiology, 31(1): 205-219.
[13] Sanglard, D., Ischer, F., Marchettti, O., and Entenza, J. 2003. CalcineurinA of Candida albicans: involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. Molecular Microbiology; 48: 959-976.
[14] Sudbery, P. 2001.The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septin ring localisation. Molecular Microbiology, 41: 19-31.
[15] Al-Karaawi, Z.M., Manfredi, M., Waugh, A.C., McCullough, M.J., Jorge, J., Scully, C., and Porter, S.R. 2002. Molecular characterization of *Candida* spp isolated from the oral cavities of patients from diverse clinical settings. Oral Microbiology and Immunology; 17(1):44-49.
[16] Heald, A.E., Cox, G.M., Schell, W.A., Bartlett, J.A., and Perfect, J.R. 1996. Oropharyngeal yeast flora and fluconazole resistance in HIV-infected patients receiving long-term continuous versus intermittent fluconazole therapy. AIDS, 10:263-268.
[17] Canuto, M., Rodero, F., and Ducasse, V. 2000. Determinants for the development of oropharyngeal colonization or infection by fluconazole-resistant *Candida* strains in HIV-infected patients. Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases; 19: 593-601.
[18] Dai, J., and Mumper, R.J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules, 15(10):7313-7352.
[19] Taylor., M.J., and Richardson, T. (1980). Antioxidant activity of skim milk: effect of heat and resultant sulfhydryl groups. Journal of Dairy Science, 63(11):1783-1795.
[20] Laudat, A., Lecourbe, K., Guechot, J., and Palluel, A.M. 2002. Values of sperm thiobarbituric acid- reactive substance in fertile men. Clin Chim Acta, 325, 113-5.
[21] Maneesh, M. and Jayalekshmi, H. 2006. Role of reactive oxygen species and antioxudants on pathophysiology of male reproduction. Indian J Clin Biochem, 21: 80-9.
[22] Ge´rard-Monnier, D., Erdelmeier, I., Re´gnard, K., Moze-Henry, N., Yadan, J.C., and Chaudie`re, J.G. 1997. Reactions of N-Methyl-2-phenlindole with Malondialdehyde and 4-Hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. Chemical Research in Toxicology, 11:1176-1183.
[23] Rao, B., Soufir, J.C., Martin, M., and David, G. 1989. Lipid peroxidation in human spermatozoa as relatd to midpiece

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-17]

abnormalities and motility. Gamete Research, 24(2): 127-134.
[24] Aurand, L.W., Boone, N.H., and Giddings, G. G. 1977. Superoxide and singlet oxygen in milk lipid peroxidation. Journal of Dairy Science, 60(3):363-369.
[25] Benzie, I.F.F. 1996. Lipid peroxidation: A review of causes, consequences, measurement and dietary influences. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 47: 233-262.
[26] Hosseinzadeh Colagar, A., Bidmeshkipour, A., and Gholinezhad Chari, M. 2009. Total antioxidant capacity and malondialdehyde levels in seminal plasma among the varicocele-suffering men. Journal of Ilam University of Medical Sciences, 17(2): 15-23.
[27] Chaparzadeh, N., Aftabi, Y., Dolati, M., Mehrnejad, F., and Pessarakli, M. 2014. Salinity Tolerance Ranking of various wheat landraces from the west of the urmia saline lake in Iran by using physiological parameters. Journal of Plant Nutrition, 37(7):1025-1039.
[28] Ikawa, S., Kitano, K., and Hamaguchi, S. 2010. Effects of pH on bacterial inactivation in aqueous solutions due to low-temperature atmospheric pressure plasma application. Plasma Processes and Polymers, 7(1):33-42.
[29] Hosseinzadeh Colagar, A., Alavi, O., Motallebi, S., and Sohbatzadeh, F. 2016. Decontamination of *Streptococcus pyogenes* and *Escherichia coli* from solid surfaces by singlet and triplet atmospheric pressure plasma jet arrays. Arabian Journal for Science and Engineering, 41:2139-2145.
[30] Noriega, E., Shama, G., Laca, A., Díaz, M., and Kong, M.G. 2011. Cold atmospheric gas plasma disinfection of chicken meat and chicken skin contaminated with *Listeria innocua*. Food Microbiology, 28(7): 1293-1300.
[31] Hosseinzadeh Colagar, A., Memariani, H., Sohbatzadeh, F., and Omran, A.V. 2013. Nonthermal atmospheric argon plasma jet effects on *Escherichia coli* biomacromolecules. Applied Biochemistry and Biotechnology, 171(7): 1617-1629.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-17]

The Effects of Scanning Cold Atmospheric Plasma Jet on Bovin's Milk and its Inoculated *Candida albicans*

Hosseinzadeh Colagar, A. [1*], Deylami, M. [2], Sohbatzadeh, F. [3], Siadati, S. N. [4]

1. Professor, Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Postal Code 47416-95447, Iran.
2. MSc Student of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.
3. Assoc. Prof., Department of Atomic and Molecular Physics, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.
4. Ph.D Student in Atomic and Molecular physics, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.

(Received: 2016/01/20 Accepted: 2016/08/21)

Now a day, one of the new methods, using ionized gasses generated by cold atmospheric plasma (CAP) for the purpose of sterilization of dairy products. In this research, the effects of CAP on to inoculated milk and *Candida albicans* were studied. Therefore, Sterilized milk with 3% fat, *Candida albicans* fungi and CAP produced by dielectric barrier discharge (DBD) were used. *Candida albicans* culturing was done in liquid Luria-Bertani (LB) medium and about 5.5×10^5 colonies per milliliter of milk were inoculate. Then, the treatment of CAP on inoculated milk was done for 1, 3, 6, 9 and 12 minutes. In order to determine the CFU analysis, the treated samples were cultured on LB medium. Also, The variations of total content of free radicals and total antioxidant capacity (TAC) of milk after CAP treatment assayed by FRAP analysis, and Also lipid peroxidation of milk detected by evaluation malondialdehyde (MDA) using thiobarbituricacid. The results showed that by increasing the time of CAP treatment, the inactivity of fungi cells was enhanced. And, the minimum time required for sterilization of contaminated milk and *Candida albicans* growth ceasing is 9 minutes. Generally, after this period of treatment time no growth was seen in the solid LB medium. As well as, comparing assayed levels of MDA and TAC between treated and control samples showed no significant differences. These results proposed that the CAP treatment could be appropriate way for sterilization of *Candida albicans*-contaminated cow milk.

Keywords: Cold atmospheric plasma jet, Bovin's milk, *Candida albicans*, Pathogen removal

* Corresponding Author E-Mail Address: ahcolagar@umz.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-17]