

ساخت جت پلاسمای سرد فشار اتمسفری و بکارگیری آن در حذف باکتری *Enterococcus faecalis* از آب آناناس

فرشاد صحبت‌زاده^{۱*}، همایون یزدان‌شناس^۲، امیر شعبان‌نژاد^۳، امیرحسین سلطانی^۴ و حانیه حق‌پناه^۵

^۱ گروه فیزیک اتمی و مولکولی دانشگاه مازندران، دانشگاه مازندران، بابلسر f.sohbat@umz.ac.ir

^۲ گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی دانشگاه مازندران، دانشگاه مازندران، بابلسر homayoon.yazdanshenass@gmail.com

^۳ گروه فیزیک اتمی و مولکولی دانشگاه مازندران، دانشگاه مازندران، بابلسر amir.sh.arabi.1990@gmail.com

^۴ گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی دانشگاه مازندران، دانشگاه مازندران، بابلسر amir76.hosseini011@gmail.com

^۵ گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی دانشگاه مازندران، دانشگاه مازندران، بابلسر Hanieh31haqqanah@gmail.com

*آدرس رایانامه نویسنده مسئول: f.sohbat@umz.ac.ir

کلید واژه: پلاسمای سرد فشار اتمسفری، *Enterococcus faecalis*، ویتامین C

چکیده

Enterococcus faecalis یک باکتری تهدیدکننده زندگی است که در برابر مقادیر بالای آنتی بیوتیک یا مواد نگهدارنده شیمیایی مقاومت می‌کند. در این مطالعه، هدف ما بررسی غیرفعال شدن *E. faecalis* در آب آناناس تازه با پلاسمای اتمسفری تقویت شده توسط بخار سرد H_2O_2 / H_2O تولید شده توسط یک جت پلاسما است. تیمارهای پلاسمای جوی سرد برای ۳۰۰ ثانیه با جت پلاسما باعث کاهش $E. faecalis$ ۸.۲ log شد. علاوه بر این، یک مقدار ناچیز از کاهش ویتامین C پس از تیمار مشاهده شد. این نتایج نشان می‌دهد که استراتژی سریع پلاسمای جوی ما به طور موثر *E. faecalis* را در آب آناناس تازه غیرفعال می‌کند.

Construction of cold atmospheric pressure plasma jet and its use in removing *Enterococcus faecalis* bacteria from pineapple juice

Farshad Sohbatazadeh^{1,2,*}, Homayoon Yazdanshenas³, Amir Shabannejad^{1,2}, Amir-Hossain Soltani³ and Hanieh Haqqanah³

¹ Department of Atomic and Molecular Physics, Faculty of Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

² Plasma Technology Research Core, Faculty of Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

³ Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

*corresponding e-mail: f.sohbat@umz.ac.ir

Abstract

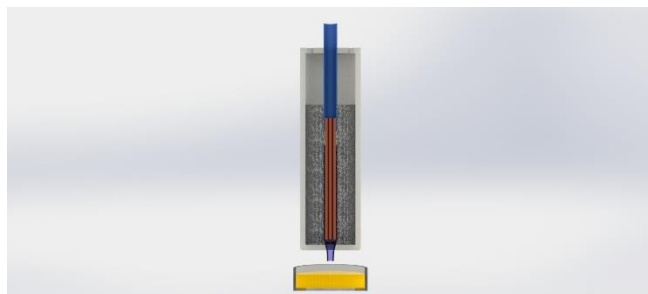
Enterococcus faecalis is a life-threatening bacterium that resists high levels of antibiotics or chemical preservatives. In this study, we aimed to investigate the inactivation of *E. faecalis* in fresh pineapple juice with cold atmospheric plasmas reinforced by H_2O_2/H_2O cold vapor generated by a plasma jet set up. Cold atmospheric plasmas treatments for 300 s with plasma jet caused an 8.2 log reduction of *E. faecalis*. Furthermore, a trifle of loss of vitamin C was observed after treatments. These results suggest that our rapid cold atmospheric plasmas strategy effectively inactivated *E. faecalis* in fresh pineapple juice.

Keywords: Atmospheric pressure cold plasma, *Enterococcus faecalis*, Vitamin C

مقدمه

تقاضای بازار برای آب میوه‌های بی خطر و با کیفیت بالا در حال افزایش است زیرا طعم دلپذیر و فواید غذایی آن‌ها برای مصرف‌کنندگان شناخته شده است. با این حال، خطرات بهداشتی آب میوه‌های آلوده نیز به خوبی ثبت شده است. از طرفی دیگر، غنای تغذیه‌ای بالای آب میوه‌ها می‌تواند محیط جذابی برای تکثیر میکروارگانیسم‌ها باشد [1]. میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌توانند در آب میوه‌ها به خوبی رشد کرده و تکثیر شوند و باعث ایجاد بیماری‌های عفونی در مصرف‌کنندگان شوند. *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) یک باکتری شناخته شده و خطرناک برای سلامتی در محصولات کشاورزی است. این باکتری‌های غیر متحرک، گرم مثبت هستند و توانایی ایجاد انواع عفونت‌های تهدید کننده زندگی را دارند که در میان آن‌ها آندوکاردیت و عفونت دستگاه ادراری شایع‌ترین هستند [2]. سویه‌های *E. faecalis* می‌توانند در دمای ۶۰ درجه رشد کرده و در برابر سطوح بالای بسیاری از عوامل ضد میکروبی مقاومت کنند [3]. معایب روش‌های نگهداری سنتی، تمایل به طراحی فناوری‌های جدید غیرحرارتی برای غیرفعال‌سازی میکروارگانیسم‌ها را برای ارتقا سطح ایمنی و کیفیت مواد غذایی ایجاد کرده است. این فناوری‌ها، از جمله پلاسمای سرد فشار اتمسفری، به ترکیب فرآیندهای فیزیکی و شیمیایی برای از کار انداختن یا غیرفعال کردن میکروارگانیسم‌های مختلف در دماهای پایین و زمان کوتاه درمان متکی هستند [4, 1]. روش‌های مختلفی برای تولید پلاسمای سرد مانند تخلیه سد دی الکتریک (DBD)، جت‌های پلاسما، کرونا و تخلیه مایکروویو وجود دارد [1]. از میان روش‌های فوق‌الذکر جت پلاسما می‌تواند یک پلاسمای سرد ضد میکروبی کم‌هزینه و موثر تولید و به ماده هدف وارد کند که باعث کمترین آسیب به خصوصیات تغذیه‌ای و پارامترهای فیزیکوشیمیایی در محصولات غذایی شود [5]. تا کنون، برخی از مطالعات برای غیرفعال کردن باکتری در آب میوه‌ها، از پلاسمای سرد فشار اتمسفری استفاده کرده‌اند [6]. Liao و همکاران و همچنین Xiang و همکاران فعالیت ضد میکروبی پلاسمای سرد را به ترتیب بر روی آب سیب آلوده به *Escherichia coli* و

Zygosaccharomyces rouxii بررسی کرد. Liao و همکاران به کمک پلاسمای سرد فشار اتمسفری موفق به کاهش $\log 4.3$ CFU / ml در آب سیب شدند و Xiang و همکاران نیز $\log 5$ CFU / ml کاهش مشاهده کردند [7, 8]. اهداف ما در این مطالعه (۱) طراحی و بهینه‌سازی یک دستگاه پلاسما جت برای فرآوری مواد غذایی در صنایع برای افزایش ایمنی و کیفیت مواد غذایی و (۲) بررسی تأثیر تیمارهای پلاسمایی بر غلظت ویتامین C و همچنین (۳) ایجاد یک استراتژی ابتکاری در درمان‌های پلاسما برای ضد عفونی مطمئن و سریع آب میوه‌ها.



شکل ۱. ساختار جت پلاسمای بکاررفته در این پژوهش

مواد و روش‌ها

تیمار پلاسما

استراتژی جدیدی که توسط ما در این مطالعه به کار گرفته شده است شامل جت پلاسمای سرد فشار اتمسفری با بخارات سرد پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و آب (H_2O) است. جت پلاسما شامل یک لوله مسی به عنوان الکترود تغذیه، یک لوله شیشه‌ای کوارتز به عنوان دی الکتریک و یک الکترود حلقه‌ای به عنوان زمینی که به سطح خارجی کوارتز پیچیده شده است (شکل ۱ را ببینید). گاز آرگون با بخارات H_2O_2 / H_2O از طریق لوله داخلی به شکاف تخلیه الکتریکی جریان می‌یابد. کل ساختار در داخل رزین اپوکسی به عنوان یک عایق الکتریکی با استعداد بالا قرار داده شد تا از وقوع جرقه الکتریکی جلوگیری شود. بدنه خارجی ساختار جت از PTFE (پلی تترا فلورو اتیلن) ساخته شده است. فرکانس، پیک ولتاژ و توان تخلیه برای ساختار جت پلاسما به ترتیب ۴٫۷ کیلوهرتز، ۱۴٫۴ کیلوولت و ۴٫۲ وات بود. از گاز خالص آرگون (۹۹٫۹۹٪) به عنوان گاز حامل برای انتقال بخارات



2.1). فاز متحرک به آرامی با سرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه آزاد شد و دمای ستون در ۵۰ درجه سانتی گراد ثابت شد. تشخیص‌ها با استفاده از یک آشکار ساز UV در طول موج ۲۶۸ نانومتر انجام شد.

آنالیز آماری

تمام آماده‌سازی‌ها سه بار انجام شده و هر آزمایش به طور جداگانه سه بار تکرار شد. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (SD) ارائه شدند. تفاوت بین گروه‌ها نیز با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS 24.0 (IBM, Armonk, NY, ایالات متحده آمریکا) گزارش شده است. روش انتخاب شده برای مقایسه داده‌ها ANOVA یک طرفه همراه با آزمون مقایسه چندگانه Duncan در سطح اطمینان ۹۵٪ و سطح معنی داری $p < 0.05$ بود.

بحث

میزان کاهش log باکتری

جمعیت *E. faecalis* در آب آناناس آلوده، قبل و بعد از تیمارهای پلاسما جت در جدول ۱ نشان داده شده است، در تیمارهای ۳۰ ثانیه‌ای هیچ تغییر قابل توجهی در جمعیت باکتری‌ها مشاهده نشد اما پس از رسیدن به زمان ۹۰ ثانیه، جمعیت شروع به کاهش قابل توجه کرد. سرانجام، کاهش ۸٫۲ log بعد از تیمار در مدت زمان ۳۰۰ ثانیه بدست آمد. تیمار نمونه‌ها بدون پلاسما اما در همان شرایط برای مدت مشابه باعث ضد عفونی کافی نشد. این نتایج نشان می‌دهد که جت پلاسما به طرز چشمگیری می‌تواند *E. faecalis* را از آب آناناس آلوده حذف کند.

جدول ۲. Log (cfu / ml) جمعیت باکتریایی در نمونه‌های کنترل (Ctrl) و نمونه‌های تیمار شده با جت پلاسما در زمان‌های مختلف درمان^{a, b}.

Samples	Log (cfu/ml)
Ctrl	8.20 $\pm$ 0.00 ^a
Jet 30"	7.73 $\pm$ 0.55 ^a
Jet 90"	5.70 $\pm$ 0.53 ^b
Jet 3'	3.36 $\pm$ 0.63 ^c
Jet 5'	0 $\pm$ 0.00 ^d

^a اختلاف معنی دار ($p < 0.05$) در هر ستون با حروف متفاوت تعیین شد.

^b مقادیر به معنای means $\pm$ SD (n=3) است.

H₂O₂ / H₂O از بطری مخلوط آب پراکسید هیدروژن به راکتور پلاسما استفاده شد. گاز آرگون که با ۴ slm (standard liters per minute) بر روی مخلوط جریان دارد، بخارات را از بطری مایع به داخل منطقه تخلیه گاز منتقل می‌کند. برای تنظیم و خواندن جریان گاز از یک کنترل کننده جریان-جرم Seven stars D07-19B و یک نمایشگر جریان Seven star D08-1F استفاده شده است. زمان درمان جت پلاسما مورد استفاده در این مطالعه ۳۰، ۹۰، ۱۸۰، ۳۰۰ ثانیه بود. نمونه‌ها در یک ظرف پتری قرار گرفتند و هر تیمار در سه تکرار انجام شد. سطح نمونه‌ها (آب آناناس) در فاصله ۱ سانتی متری از نوک مخروطی شکل نازل دی الکتریک در ساختار جت پلاسما قرار داده شد.

آماده‌سازی آبمیوه جهت تیمارهای پلاسمایی

برای تهیه آب آناناس تازه و بدون آلودگی، پنج آناناس از یک مزرعه جمع‌آوری شد. پس از شستشو، پوست آن‌ها را در یک هود بیولوژیکی کلاس III (LAMSYSTEM BMB-III- Laminar-S PROTECT 1E-C.001-120) کنده و آب آن‌ها گرفته شد. با انجام یک فیلتراسیون ساده در زیر کابینت ایمنی، پالپ‌ها و سایر ذرات ناخواسته با دقت حذف شدند.

آماده‌سازی باکتری و بررسی رشد یا عدم رشد

سویه استاندارد (*E. faecalis* (ATCC 29212) با غلظت $10^8 \times 1/5$ cfu/ml (نیم مک فارلند) در نمونه‌های آب آناناس تلقیح شده و نمونه‌ها به مدت ۳۰ ثانیه، ۹۰ ثانیه، ۱۸۰ ثانیه و ۳۰۰ ثانیه تحت تاثیر پلاسمای سرد اتمسفری در سیستم جت قرار گرفتند و سپس میزان log باکتری‌های باقی‌مانده با کمک روش pure plate شمارش شد.

اندازه‌گیری غلظت ویتامین C

ویتامین C قبل و بعد از تیمار پلاسمایی توسط روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) توصیف شده توسط Tyagi و همکاران تعیین شد [9]. غلظت ویتامین C در نمونه‌های تحت درمان و درمان نشده با استفاده از یک ستون Phenomenex Luna C18 و یک فاز متحرک استونیتریل و ۱۰ میلی مولار بافر ارتو فسفات دی هیدروژن پتاسیم تعیین شد (۶۰:۴۰، pH =

- [1] Misra, N. N., Tiwari, B. K., Raghavarao, K. S. M. S., & Cullen, P. J. (2011). Nonthermal plasma inactivation of food-borne pathogens. *Food Engineering Reviews*, 3(3-4), 159-170.
- [2] Kau, A. L., Martin, S. M., Lyon, W., Hayes, E., Caparon, M. G., & Hultgren, S. J. (2005). Enterococcus faecalis tropism for the kidneys in the urinary tract of C57BL/6J mice. *Infection and immunity*, 73(4), 2461-2468.
- [3] Amyes, S. G. (2007). Enterococci and streptococci. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29, S43-S52.
- [4] Bourke, P., Ziuzina, D., Boehm, D., Cullen, P. J., & Keener, K. (2018). The potential of cold plasma for safe and sustainable food production. *Trends in biotechnology*, 36(6), 615-626.
- [5] Cullen, P. J., Lalor, J., Scally, L., Boehm, D., Milosavljević, V., Bourke, P., & Keener, K. (2018). Translation of plasma technology from the lab to the food industry. *Plasma Processes and Polymers*, 15(2), 1700085.
- [6] Ozen, E., & Singh, R. K. (2020). Atmospheric cold plasma treatment of fruit juices: A review. *Trends in Food Science & Technology*.
- [7] Liao, X., Li, J., Muhammad, A. I., Suo, Y., Chen, S., Ye, X., ... & Ding, T. (2018). Application of a dielectric barrier discharge atmospheric cold plasma (Ddb-Acp) for Eshcherichia coli inactivation in apple juice. *Journal of food science*, 83(2), 401-408.
- [8] Xiang, Q., Liu, X., Li, J., Liu, S., Zhang, H., & Bai, Y. (2018). Effects of dielectric barrier discharge plasma on the inactivation of Zygosaccharomyces rouxii and quality of apple juice. *Food Chemistry*, 254, 201-207.
- [9] Tyagi, G., Jangir, D. K., Singh, P., Mehrotra, R., Ganesan, R., & Gopal, E. S. R. (2014). Rapid determination of main constituents of packed juices by reverse phase-high performance liquid chromatography: an insight in to commercial fruit drinks. *Journal of food science and technology*, 51(3), 476-484.

مقایسه غلظت ویتامین C قبل و بعد از تیمار پلاسما

غلظت ویتامین C در نمونه‌های کنترل و تیمار شده در جدول ۲ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌کنید غلظت ویتامین C در نمونه‌های کنترل، معادل 0.09 ± 0.00 mgr/100mL بود. این غلظت پس از تیمارهای ۳۰ ثانیه‌ای و ۹۰ ثانیه‌ای تغییر محسوسی نکرد. اما در تیمار ۱۸۰ ثانیه‌ای غلظت آن به 0.08 ± 0.01 mgr/100mL تقلیل یافت که در مقایسه با نمونه‌های کنترل و ۳۰ ثانیه و ۹۰ ثانیه تغییری معنی‌دار می‌باشد. پس از تیمار ۳۰۰ ثانیه‌ای غلظت ویتامین C به 0.07 ± 0.01 mgr/100mL کاهش یافت که این غلظت نیز در مقایسه با نمونه‌های کنترل و ۳۰ ثانیه و ۹۰ ثانیه تغییری معنی‌دار می‌باشد اما در مقایسه با تیمار ۱۸۰ ثانیه‌ای معنی‌دار نیست.

جدول ۲. غلظت ویتامین C در نمونه‌های کنترل (Ctrl) و تیمار شده با جت پلاسما در زمان‌های مختلف^{a, b}.

Samples	Vitamin C
Ctrl	0.09 ± 0.00^a
Jet30"	$0.09 \pm 0.00^{a, b}$
Jet90"	$0.09 \pm 0.00^{a, b}$
Jet3'	$0.08 \pm 0.01^{b, c}$
Jet5'	$0.07 \pm 0.01^{c, d}$

^a اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$) در هر ستون با حروف متفاوت تعیین شد.

^b مقادیر به معنای $\text{means} \pm \text{SD}$ ($n=3$) است.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، کارایی جت پلاسما در غیرفعال‌سازی *E. faecalis* در آب آناناس بررسی شد. نتایج نشان داد که قرار گرفتن در معرض جت پلاسما در توان ۴,۲ W برای ۳۰۰ ثانیه منجر به کاهش ۸,۲ log از سلول‌های *E. faecalis* در آب آناناس می‌شود. تیمارهای پلاسمایی در زمان‌های ۱۸۰ ثانیه و ۳۰۰ ثانیه منجر به تقلیل قابل اغماضی در مقدار ویتامین C می‌شود. در آینده، مطالعات و تحقیقات باید بر روی پیشنهاد روش‌های بهینه‌تر و کم‌هزینه‌تر متمرکز شده و دستگاه‌هایی برای کاربردهای گسترده در صنایع غذایی طراحی کرده و ارائه دهند.

مرجع‌ها