بررسی اثرات پلاسما جت سرد آرگون بر مایکوتوکسین اکراتوکسین A تولید شده توسط جدایه‌های مختلف گونه‌های آسپرژیلوس نیگری

سحر حسن‌پور[۱]، منصور بیات[۱]، آرش چایچی‌نصرتی[۲و*]، محمود قرآن‌نویس[۳]، سیدجمال هاشمی[٤]

چکیده

مایکوتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه قارچ‌های رشته‌ای می‌باشند و از نظر ساختمانی غالباً هیدروکربن‌های حلقوی می‌باشند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات از بین برندگی پلاسما جت سرد آرگون بر اکراتوکسین A تولید شده توسط سویه‌های آسپرژیلوس نیگری می‌باشد. از محصولات گندم، ذرت، جو دوسر، آرد و برنج از شمال کشور ایران نمونه‌گیری انجام شد. گونه‌های قارچی جهت شناسایی روی محیط چاپکس و جهت استخراج اکراتوکسین A روی محیط‌های سابورو دکستروز براث همراه با عصاره مخمر (SB + YE) و سابورو دکستروز براث بعلاوه عصاره مالت (SB + ME) کشت داده شدند. از گاز آرگون جهت ایجاد پلاسما و به منظور پاکسازی مایکوتوکسین‌ها استفاده شد. میانگین غلظت اولیه اکراتوکسین A در محیط ME+SB از ۲۲/۲۳µg/kg در زمان‌های ٦۰ و ۳٦۰ ثانیه به ترتیب به غلظت‌های ۳۸/۳٦ و ٤/۸۲ µg/kg رسیده است و در محیط YE+SB از µg/kg ۳۸/۳٤ به غلظت‌های ۲۵/۸۸ و ۲/٤۷ µg/kg رسیده است. در مقایسه Log/Lin با Lin/Log میزان غلظت اولیه اکراتوکسین A در محیط ME+SB از µg/kg ۳۹/۲۲٤ در زمان‌های ٦۰ و ۳٦۰ به ترتیب به غلظت‌های ۲۲/۲٦ و ۸/٤۱٤ µg/kgرسیده و در محیط YE+SB از ۳۱/۵۰ به ترتیب به غلظت‌های ۲۲/٦۸ و ۸/۹۵ µg/kg رسیده است.

بررسی آماری کاهش تغییرات اوکراتوکسین تولید شده از سوی جدایه‌های قارچی به‌طور معنی‌دار را نشان داد. این اتفاق تا افزایش ۳٦۰ ثانیه تیمار با پلاسما جت در محیط (YE+SB) تغییرات کاهشی مقدار اکراتوکسین همچنان معنی‌دار بوده است. لذا از سیستم پلاسما جت می‌توان جهت از بین بردن مایکوتوکسین‌های قارچی در جهت افزایش کیفیت مواد غذایی استفاده نمود.

واژگان کلیدی: *آسپرژیلوس، اکراتوکسین A، پلاسما جت سرد*

تاریخ دریافت:۱۳۹٦/۱۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/٤/۲۷

مقدمه

آسپرژیلوس‌ها یکی از شایع‌ترین قارچ‌های محیطی می‌باشند به طوری‌که کونیدی‌های آن‌ها را به آسانی می‌توان از سطح میوه‌ها، نان و دانه‌های غلات جدا نمود. آسپرژیلوس‌ها به راحتی قادرند در خـاک، آب، روی نبـاتـات، پـوسـت و مخاط به صورت ساپروفیت رشد کرده و به علت دارا بودن خاصیت آنتی‌ژنیکی و انتشار وسیع محیطی می‌توانند ایجاد بیماری‌های ازدیاد حساسیتی کنند (۱٤). رشد آنها بسته به گونه متغیر بوده ولی اغلب سریع‌الرشد بوده و در مناطق گرمسیر و نیمه‌گرمسیر شایع‌ترند.گونه‌های آسپرژیلوس، توکسین‌هایی با سمیت زیاد و با تأثیرات مهم و طولانی مدت را تولید می‌کنند. آسپرژیلوس‌ها در دماهای مختلف و شرایط خشکی رشد کرده و به علت انتشار گسترده، عامل بروز عفونت‌های بیمارستانی و بیماری‌های مختلف در انسان می‌باشند (۵).

مایکوتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه قارچ‌های رشته‌ای می‌باشند و از نظر ساختمانی غالباً هیدروکربن‌های حلقوی و به ندرت خطی می‌باشند (۲). اکثراً وزن مولکولی پایینی دارند و به همین دلیل، به تنهایی فاقد خاصیت آنتی ژنیک بوده و قادر به تحریک سیستم ایمنی میزبان نیستند. براساس تمایل به بافت هدف، تحت عناوین مختلفی نظیر هپاتوتوکسین، نوروتوکسین، نفروتوکسین و کاردیوتوکسین نامگذاری می‌شوند. در مقابل عوامل فیزیکی نظیر حرارت، آسیاب کردن و سایر اعمالی که برروی مواد غذایی خام تا مراحل بسته بندی اعمال می‌گردد مقاوم می‌باشند. جزء مسمومیت‌زاهای بالقوه هستند زیرا تحت شرایط مختلف باعث آلودگی مواد غذایی می‌شوند (۱۳و ۳).

تشکیل مایکوتوکسین‌ها یک مشکل جهانی محسوب می‌شود و مطابق با آمار سازمان کشاورزی تقریبا ۲۵٪ دانه‌های زراعی جهان آلوده به مایکوتوکسین‌ها هستند و طبق گزارش WHO مایکوتوکسین‌هـا یکی از عوامل موثر در بروز بیماری‌های ناشی

۱- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ازاد اسلامی، واحد علوم وتحقیقات تهران، تهران، ایران

*۲- دانشیار قارچ‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران (achn@iau-lahijan.ac.ir)

۳- استاد فیزیک، دانشگاه ازاد اسلامی، واحد علوم وتحقیقات تهران، تهران، ایران

٤- گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی دانشکده بهداشت و علوم بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

از غذا گزارش شده‌اند. اکراتوکسین‌ها اولین بار توسط وان در مرو و همکاران در سال ۱۹٦۵ در حین جداسازی قارچ‌های مولد سم از غلات و گیاهان در آزمایشگاه شناسایی شدند (۱). اکراتوکسینیکی از مهمترین سموم قارچی و شامل خانواده‌ای از متابولیت‌های ثانویه سمی تولید شده توسط چندین گونه از قارچ‌های جنس آسپرژیلوس و پنیسیلیوم هستند و منجر به اختلالات هورمونی، سمیت حاد و مزمن، عوارض کلیوی و کبدی در انسان می‌شوند و به علت قدرت سمی و سرطان‌زا بودن ضرورت پیدا می‌کند که روش‌های شناسایی آن خیلی سریع و اختصاصی گسترش یابد (۱۲و ٤).

اکراتوکسین‌ها شامل حداقل هفت توکسین مختلف از نظر ساختمانی است که وابستگی نزدیکی به هم دارند. اکراتوکسین های A، B و C اعضایی از این خانواده که به میزان بیشتری در نمونه‌ها یافت می‌شوند اما شناخته شده‌ترین و سمی‌ترین آنها نیز نوع A است (۱۰و ۷). اکراتوکسین A یک مایکوتوکسین ایزوکومارین کلرینه مشتق شده از فنیل آلانین است که توسط برخی از گونه‌های پنسیلیوم وآسپرژیلوس توکسین‌زا به دنبال رشد بر روی مواد غذایی و خوراک دام تولید می‌شود و یک نفروتوکسین بالقوه است. آسپرژیلوس کربوناریوس و آسپرژیلوس نایجر به عنوان عمده‌ترین منابع تولید اکراتوکسین A می‌باشند. انواع کپک‌های دیگر ایجاد کننده اکراتوکسینA، آسپرژیلوس آلیاسئوس، آسپرژیلوس ملوس، پنی سیلیوم ویریدیکاتوم، پنی سیلیوم سیلیکوم و پنی سیلیوم واریابل هستند (۱۷و ۱٦).

به کاربردن سیستم‌های پلاسمایی یک روش جدید برای استریل نمودن است. پلاسمای سرد یا غیر حرارتی یکی از انواع پلاسما می‌باشد که با استفاده از تخلیه گاز به صورت ساده و سریع تولید می‌شود. استرلیزاسیون به روش پلاسمای غیرحرارتی در فشارهای گازی پایین تقریباً اولین روش استرلیزاسیون به روش پلاسما است. مزیت‌های استفاده از پلاسما زمانی روشن می‌شود که از گازهایی مثل هوا، هلیم، مخلوطی از هلیم و اکسیژن یا نئون واکسیژن استفاده شود چون این گازها دارای خاصیت میکروب کشی نیستند و زمانی که پلاسما تابش می‌کند خاصیت میکروب کشی پیدا می‌کند (۱۸و ۹). هدف از این مطالعه بررسی اثرات پلاسما جت سرد آرگون بر مایکوتوکسین اکراتوکسین A تولید شده توسط جدایه های مختلف گونه های آسپرژیلوسی متعلق به سکشن نیگری می‌باشد.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری

از محصولات گندم، ذرت، جو دوسر، آرد و برنج از شمال کشور ایران نمونه گیری انجام شد. نمونه های جمع آوری شده به منظور تعیین میزان اکراتوکسین A آسپرژیلوس و بررسی اثر پلاسما جت بر روی آن، بلافاصله به آزمایشگاه منتقل گردید و در دمای ٤ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

محیط کشت‌های مورد استفاده

از محیط‌های کشت چاپکس آگار، سابورو دکستروز آگار، سابورو دکستروز براث، مالت اکستراکت آگار و یست اکستراکت آگار (شرکت مرک آلمان) جهت کشت و غنی سازی نمونه های جداسازی شده استفاده شد.

انجام کشت در محیط چاپکس آگار

با استفاده از کشت سوزنی نمونه های جمع آوری شده در محیط چاپکس آگار کشت داده شد و جهت ایزولاسیون جدایه های تولید کننده اکراتوکسین A، نمونه ها به مدت ١٤ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. تمامی جدایه های آسپرژیلوسی با استفاده از خصوصیات مورفولوژیک و ماکروسکوپی با کمک کلیدهای شناسایی رفرانس از جمله میزان رشد، ویژگیهای ماکروسکوپی کلنی مثل شکل، رنگ، بافت، توپوگرافی مورد بررسی قرار گرفتند.

کشت در محیط مایع

از محیطهای سابورو دکستروز براث به همراه مالت اکستراکت (ME+SB) و همچنین سابورو دکستروز براث به همراه یست

اکستراکت (YE+SB)جهت افزایش میزان تولید مایکوتوکسین استفاده شد. نمونه‌های موردنظر به محیط مایع منتقل شده و در دمای ۲۵°c به مدت ۱٤ روز انکوبه شدند. برای جلوگیری از خشک شدن محیطها از بافر نمکِ فسفات استفاده شد.

تهیه اسلاید کالچر از نمونه‌های منتخب

این آزمون برای شناسایی قارچ روی اسلاید و شناسایی آن از طریق رنگ آمیزی انجام گرفت.

استخراج مایکوتوکسین از محیط سابورو دکستروز براث به همراه عصاره مالت و مخمر

پس از دو هفته گرمخانه گذاری جهت استخراج و تخلیص مایکوتوکسین تولید شده توسط سویه‌های خالص نیاز به محیط بدون سلول می‌باشد، برای این کار لوله‌های حاوی محیط کشت مایع را به مدت ۱۵min ورتکس شد. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر حلال استخراجی (حاوی استونیتیدیل ۱۰۰ میلی لیتر، استون ۲۰۰ میلی لیتر، اتانول ۱۰۰ میلی لیتر و متانول ۱۰۰ میلی لیتر) به آن افزوده و در دو نوبت در دو زمان ۱۵دقیقه‌ای ورتکس شدند. در مرحله آخر با استفاده از قیف و کاغذ صافی فاز رویی را جدا و درون میکروتیوب‌های استریل انتقال داده شد

استخراج مایکوتوکسین ها از محیط چاپکس آگار

با استفاده از اسکالپل استریل محیط چاپکس آگار حاوی کلنی را در ابعاد ۱×۳ برش داده و درون لوله‌های فالکون استریل حاوی ۵cc بافر نمکِ فسفات تلقیح گردید و به مدت ۱۵min ورتکس شد. سپس با استفاده از حلال استخراجی و کاغذ صافی واتمن جهت انجام مراحل استخراج استفاده شد.

آنالیز اکراتوکسین A به روش الایزا

کیت آنزیمی و استانداردهای اکراتوکسین A از شرکت r-biopharm آلمان تهیه گردید. کیت‌های اکراتوکسین A (R5402) از نوع آنزیم ایمنواسی رقابتی برای تعیین مقادیر این سموم در مواد غذایی می‌باشند. طبق پروتکل کیت روش استخراج انجام گرفت.

۵۰ میکرولیتر از محلول‌های استاندارد اکراتوکسین A (۰، ۵، ۱۰، ۲۰ و ٤۰ ppb یا میکروگرم بر کیلوگرم) و ۵۰ میکرولیتر از نمونه های آماده شده برای آزمون، هریک در دو تکرار به طور جداگانه در چاهک های پلیت میکروتیتر ریخته شد. پس از آن، ۵۰ میکرولیتر آنزیم کونژوکه به هر چاهک افزوده گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردید. سپس ۵۰ میکرولیتر محلول آنتی بادی ضد اکراتوکسین به هر چاهک افزوده شد و به آرامی میکروپلیت را تکان داده و چاهک ها با آب مقطر یا آب دیونیزه سه بار شستشو داده شدند. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا/کروموژن به هر چاهک اضافه گردید به آرامی میکروپلیت را تکان داده و در فضای تاریک در دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردید. در مرحله آخر، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده به هر چاهک اضافه شد، به آرامی میکروپلیت را تکان داده و پس از ۱۰ دقیقه در ٤۵۰ نانومتر در دستگاه خواننده ELISA(دستگاه Biotech-ELX 800) اندازه گیری شد. اطلاعات مربوط به میزان جذب (OD) هر حفره به تفکیک ثبت شد. با کسر میزان جذب نمونه‌ها و استانداردها بر میزان جذب استاندارد صفر، درصد جذب به دست آمد. براساس میزان درصد جذب نمونه استاندارد و میزان اکراتوکسین موجود در نمونه‌ها، استاندارد منحنی کالیبراسیون رسم شد و به دنبال آن براساس درصد جذب هر نمونه و انطباق با منحنی کالیبراسیون میزان اکراتوکسین هر نمونه در مقیاس میکروگرم بر کیلوگرم به دست آمد.

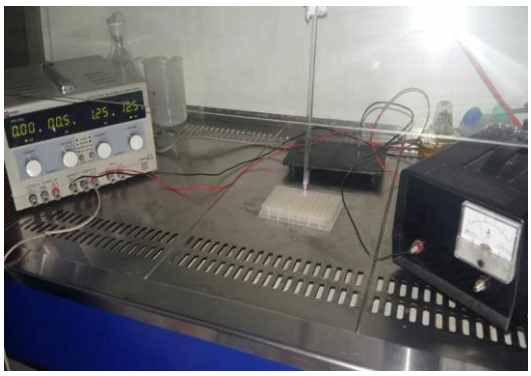
پاکسازی مایکوتوکسین‌ها با پلاسما جت سرد اتمسفری

از گاز آرگون جهت ایجاد پلاسما و به منظور پاکسازی مایکوتوکسینها استفاده شد(نگاره۱). محفظه ای که پلاسما درون آن تشکیل می‌شود بصورت هلیکس بوده و پلاسما جت بیشترین تماس را با سطح مایکوتوکسین در حال عبور دارد. دو سر هلیکس ایجاد شده تبدیل به سه راه می‌شود تا امکان ورود همزمان گاز و مایکوتوکسین فراهم شود و در محل خروج این

دو بتوانند از یکدیگر تفکیک گردند. جهت انجام آزمایشات ابتدا خروجی منبع تغذیه روی ولتاژ ۵۰ کیلو ولت، توان ۱۰۰ وات و فرکانس الکترون ۳۰ کیلو هرتز تنظیم شد و مقادیر آن با پروب ولتاژ بالا و اسیلوسکوپ اندازه گیری شدند. سپس با برقراری جریان گاز با سرعت گاز ٦ لیتر بر دقیقه و ایجاد اختلاف پتانسیل بالا بین دو الکترود، اثر پلاسما جت اتمسفری سرد گاز آرگون در مدت زمان های ۳۰، ٦۰ و ۳٦۰ ثانیه مورد بررسی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

یافته‌های به دست آمده از آزمایش و اطلاعات جمع‌آوری شده با نرم‌افزار $SPSS_{18}$ و آزمون تحلیل واریانس یکطرفه جهت مقایسه میزان اکراتوکسین A در نمونه‌های گندم، ذرت، جو دوسر، آرد و برنج مورد تجزیه و تحلیل آماری قرارگرفت.



نگاره ۱ـ سیستم پلاسما جت مورد استفاده

نتایج

جداسازی سویه‌ها

از ۵ منبع مختلف (گندم، ذرت، جو دوسر، آرد و برنج) به تعداد ۱۲ سویه از گونه‌های مختلف جنس‌آسپرژیلوس جدا و شناسایی شدند (۵ سویه آسپرژیلوس نایجر، ۳ سویه آسپرژیلوس کربوناریوس، ۳ سویه آسپرژیلوس فوتیدوس و ۱ سویه نیز مربوط به آسپرژیلوس یوروتیوم) بودند. از ٤ نمونه با منبع گندم، ذرت، جو و برنج آسپرژیلوس نایجر، از ۳ نمونه با منبع گندم آسپرژیلوس کربوناریوس، از ۳ نمونه با منبع گندم و جو آسپرژیلوس فوتیدوس و از ۱ نمونه با منبع گندم و جو آسپرژیلوس یوروتیوم جداسازی شدند. جهت کنترل از سوش استاندارد آسپرژیلوس نایجر استفاده شد.

آنالیز غلظت اکراتوکسین A در دو محیط سابورو دکستروز براث به همراه مالت اکستراکت (ME+SB) و یست اکستراکت (YE+SB) قبل و بعد از تابش پلاسما ابتدا رنگ سنجی اکراتوکسین A تولیدی نمونه ها اندازه گیری شد و در مرحله بعد با توجه به منحنی استاندارد اکراتوکسین A و نمونه استاندارد آسپرژیلوس، میزان غلظت اکراتوکسین A نمونه ها (نمودار های H_1 تا H_{12}) قبل و بعد از تیمار با پلاسما جت بصورت ترسیم نمودارهای lin/Log و جداول Log/Lin تعیین شد.

بررسی میزان غلظت اکراتوکسین A بدست آمده از تحلیل نمودارهای Lin/Log. در محیط سابروز دکستروز براث + مالت اکستراکت و یست اکستراکتمیانگین میزان غلظت اولیه اکراتوکسین در محیط ME+SB از ۳۵/۲٦٤ میکروگرم بر کیلوگرم در زمان‌های ٦۰و۳٦۰ ثانیه به ترتیب به غلظت‌های ۱۸/۳٤ و ۱۲/۰۰۸ میکروگرم بر کیلوگرم به دست آمد و در محیط YE+SB از ۲۸/٦۲۵ میکروگرم بر کیلوگرم در همان زمان‌ها به ترتیب به غلظت‌های ۱۹/٤۸٦ و ۱٤/٦۰۷ میکروگرم بر کیلوگرم رسیده است.

بررسی میزان غلظت اکراتوکسین A بدست آمده از تحلیل جداول Log/Lin. در محیط سابروز دکستروز براث+ مالت اکستراکت و یست اکستراکت میانگین میزان غلظت اولیه اکراتوکسین A در محیط ME+SB از ٤۳/۲۲ میکروگرم بر کیلوگرم در زمان های ٦۰ و ۳٦۰ ثانیه به ترتیب به غلظت‌های ۲٦/۳۸ و ٤/۸۲ میکروگرم بر کیلوگرم رسیده است و در محیط YE+SB از ۳٤/۳۸ میکروگرم بر کیلوگرم در همان زمان‌ها به ترتیب به غلظت‌های ۲۵/۸۸ و ۲/٤۷ میکروگرم بر کیلوگرم رسیده است. در مقایسه Log/Lin با Lin/Log میزان غلظت اولیه اکراتوکسین A در محیط ME+SB از ۳۹/۲٤۲ میکروگرم

بر کیلوگرم در زمان‌های ٦٠ و ٣٦٠ به ترتیب به غلظت‌های ٢٢/٣٦ و ٨/٤١٤ میکروگرم بر کیلوگرم رسیده و در محیط YE+SB از ٣١/٥٠ به ترتیب به غلظت‌های ٢٢/٦٨ و ٨/٥٣ میکروگرم بر کیلوگرم به دست آمد.

همانطور که از نمودارهای Lin/Log و جداول Log/Lin فوق میتوان استنباط کرد توکسین‌زدایی و اکراتوکسین A با کمک تاباندن گاز آرگون در مدت زمان های ٦٠ و٣٦٠ ثانیه بررسی شد. در این بررسی‌ها مشخص شد سم‌زدایی اکراتوکسین A در مورد تمامی نمونه‌ها با موفقیت انجام گرفته و نشان از کارایی بالای اثر پلاسما جت اتمسفری سرد در این زمینه بخصوص در صنایع غذایی می‌باشد. مقایسه Lin/Log و Log/Lin بعد از ٦٠ و ٣٦٠ ثانیه در جدول ١ نشان داده شده است.

جدول١ـ مقایسه Lin/Log و Log/Lin بعد از ٦٠ و ٣٦٠ ثانیه

مقایسه Lin/Log و Log/Lin در محیط‌های مورد بررسی	مقدار اولیه	بعد از ٦٠ ثانیه	بعد از ٣٦٠ ثانیه
ME+SB (Lin/Log)	٣٥/٢٦٤	١٨/٣٤	١٢/٠٠٨
YE+SB (Lin/Log)	٣٨/٦٢٥	١٩/٤٨٦	١٤/٦٠٧
ME+SB (Log/Lin)	٤٣/٢٢	٢٦/٣٨	٤/٨٢
YE+SB (Log/Lin)	٣٤/٣٨	٢٥/٨٨	٢/٤٧
مقایسه ME+SB	٣٩/٢٤٢	٢٢/٣٦	٨/٤١٤
مقایسه YE+SB	٣١/٥	٢٢/٦٨	٨/٥٣

بررسی رابطه همبستگی پیرسون (Lin/Log) در میزان غلظت اکراتوکسین A در دو محیط (ME+SB) و (YE+SB)

میزان کاهش اکراتوکسین A در محیط (ME+SB) پس از ٦٠ و ٣٦٠ ثانیه تیمار با پلاسما جت بیش از کاهش آن در محیط (YE+SB) بوده و همسویی معنی‌دار آماری مشاهده گردید. یعنی میزان اکراتوکسین در محیط (ME+SB) بعد از ٦٠ و ٣٦٠ ثانیه تیمار به ترتیب به میزان ٥٢/٠٠٪ و ٦٥/٩٤٪ کاهش یافته و در محیط (YE+SB) به ترتیب به میزان ٣١/٩٣٪ و ٥١/٠٢٪ کاهش داشته است.

جدول ٢ـ غلظت اکراتوکسین قبل و بعد از تابش (Lin/Log)

غلظت بعد از ٣٦٠ ثانیه تابش (میکروگرم/کیلوگرم)	غلظت بعد از ٦٠ ثانیه تابش (میکروگرم/کیلوگرم)	غلظت اولیه (میکروگرم/کیلوگرم)	اکراتوکسین A
١٢/٠٠٨	١٨/٣٤	٣٥/٢٦٤	اکراتوکسین A/ ME+SB
١٤/٦٠٧	١٩/٤٨٤	٢٨/٦٢٥	اکراتوکسین A/ YE+SB

مطابق با جدول ٢، در بررسی مقدار تغییرات اکراتوکسین پس از تیمار با پلاسماجت بعد از ٦٠ و ٣٦٠ ثانیه علیرغم کاهش مقدار عددی میانگین توکسین، همسویی معنی‌داری آماری در محیط (ME+SB) مشاهده نگردید.

میزان اکراتوکسین در محیط (ME+SB) بعد از ٦٠ ثانیه تیمار به میزان ٥٢/٠٠٪ کاهش و بعد از ٣٦٠ ثانیه تیمار (از ٦٠ تا ٣٦٠ ثانیه) به میزان ٣٤/٥٢ ٪ یافته است. همین‌طور در خصوص محیط (YE+SB) پس از تیمار با پلاسماجت به مقدار ٦٠ ثانیه و ٣٦٠ ثانیه همبستگی معنی‌دار در تغییرات میانگین اوکراتوکسین علیرغم کاهش مقدار عددی مشاهده نگردید.

میزان اکراتوکسین در محیط (YE+SB) بعد از ٦٠ ثانیه تیمار به میزان ٣١/٩٣ ٪ کاهش و بعد از ٣٦٠ ثانیه تیمار (از ٦٠ تا ٣٦٠

ثانیه) به میزان ۲۵/۰۳ ٪ یافته است. با تیمار ٦۰ ثانیه مقدار اکراتوکسین در محیط (ME+SB) به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. با تیمار ۳٦۰ ثانیه مقدار اوکراتوکسین در محیط به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. دامنه تغییرپذیری (دامنه کاهشی) اوکراتوکسین A پس از ۳٦۰ ثانیه تیمار با پلاسماجت در محیط (ME+SB) و (YE+SB) تغییرات معنی‌دار به‌همراه داشته است.

بحث

نتایج این پژوهش با سایر مطالعات انجام شده در سال‌های گذشته منطبق است، از آن جمله می‌توان به پژوهش‌های ذیل اشاره کرد؛ در مطالعاتی که در کشور ایران انجام گرفته حسین‌زاده و همکاران که اثرات پلاسمای سرد اتمسفری را بر روی شیر گاو و قارچ کاندیدا آلبیکنس نشان دادند برای این منظور، از شیر گاوی سترون حاوی ۳٪ چربی، قارچ کاندیدا آلبیکنس و پلاسمای روبشی تولید شده به روش تخلیه سددی الکتریک استفاده گردید. سپس شارش پلاسما روی شیر تلقیح شده در زمان‌های مختلف صفر (کنترل)، ۱، ۳، ٦، ۹ و ۱۲ دقیقه صورت گرفت. نتایج نشان داد با افزایش زمان شارش پلاسما میزان غیرفعال‌سازی قارچ‌ها افزایش می‌یابد. حداقل مدت زمان لازم برای استریل سازی شیر آلوده و عدم رشد کلنی‌های قارچ ۹ 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 اندازه‌گیری شده mda و tac پس از شارش، در نمونه‌های شیر تلقیح شده و کنترل نشان داد هیچ گونه اختلاف معنی‌داری بین آنها در مقایسه با شاهد وجود ندارد. بر این اساس استفاده از پلاسمای سرد فشار اتمسفری روبشی می‌تواند برای سترون‌سازی شیر گاو آلوده به قارچ کاندیدا آلبیکنس مورد توجه محققین این صنعت قرار گیرد(۲۰).

در مطالعه دیگری بر روی مشخصه یابی اثر فاصله و زمان پلاسما جت بر روی مخمر ساکارومایسس سرویزیه انجام گرفت در این پژوهش به مطالعه قارچ‌زدایی به روش پلاسمای سرد در فشار اتمسفر پرداخته شد. برای تولید پلاسما از منبع تغذیه ولتاژ بالای شبه‌سینوسی و از جت پلاسمایی با قطر نازل ۲ میلی‌متر به‌عنوان مولد تولید پلاسما استفاده شد. به‌منظور مطالعه‌ی برهم‌کنش پلاسما با میکروارگانیسم‌ها از مخمر ساکارومایسس سرویزیه استفاده شد، زیرا ساختار این مخمر بسیار شبیه ساختار برخی از قارچ‌های بیماریزا و همچنین بافتهای بدن انسان است. نتایج حاکی از آن است که پالسمای سرد، توانایی غیرفعال کردن و از بین بردن قارچ‌های مخمری را دارد. این اثرگذاری بسته به مدت زمان تابش پلاسما و فاصله نازل از سطح نمونه متفاوت است به‌طوری که در فاصله ۹ میلیمتری و پس از ۳ دقیقه تابش پلاسما شاهد بهترین اثرگذاری و در نتیجه مرگ کامل سلول‌های مخمر بودند (۲۰).

Siciliano و همکارانش در سال ۲۰۱٦ اثر پلاسمای جت سرد در فشار اتمسفری را روی آفلاتوکسین آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتکوس بر روی مواد غذایی از جمله آجیل بررسی کردند در این تحقیق آنها به بهینه کردن شرایط اثر پلاسما از جمله گازهای وروردی (N_2 – ۰/۱ ٪ : O_2) و (۱ ٪ : O_2– ۲۱ ٪ : O_2) و توان (٤۰۰، ۷۰۰، ۱۰۰۰، ۱۱۵۰ وات) موفق به حذف مایکوتوکسین پس از ۱۲ دقیقه شدند. از اثر پلاسما جت بر روی مایکوتوکسین‌ها که از گاز آرگون برای ایجاد پلاسما استفاده کردند و توانستند مایکوتوکسین‌های تولید شده توسط آسپرژیلوس‌ها را از بین ببرند و اکراتوکسین تولیدی جدایه‌ها که به غلظت ۲۵ نانوگرم بر گرم بود را به میزان ۹۵٪ پس از یک دقیقه تابش حذف کنند (۱۹).

در سال ۲۰۱٦ lee و همکارانش اثر پلاسمای میکروویو در فشار اتمسفر که از گاز آرگون برای ایجاد پلاسما استفاده می کردند را برای مطالعه اثر پلاسما در از بین بردن میکروارگانیسم‌ها در پارچه‌های ابریشمی استفاده کردند و دستاورد آنها در این بررسی حذف کامل میکروارگانیسم‌های استافیلوکوکوس ارئوس وقارچ های پنی سیلیوم بود (۱۱).

اولین آزمایش‌های ضد میکروبی به وسیله‌ی پلاسمای غیر حرارتی در اوایل دهه‌ی نود انجام شد و هدف این آزمایش‌ها پیدا کردن تکنولوژی جایگزین برای استرلیزاسیون مواد حساس به حرارت بوده است. نتایج به ویژه در مقایسه با روش‌های پرخطر، مانند آنهایی که گازهای سمی به کار می‌برند بسیار امیدوار کننده بودند. اما دو مرحله مهم قبل از کاربرد صنعتی این فرآیند احتیاج بود. اولی تعریف خود پلاسما و شرایط عملی آن بود. دومی بستگی به مقاومت هدف و نتیجه‌ی مطلوب تاثیرگذاری پلاسما دارد (۸). Hayashi و همکارانش در ۲۰۱۳استرلیزاسیون به وسیله‌ی پلاسما جت را انجام دادند. آنها ترکیب گازهای اکسیژن ـ هلیم و آرگون ـ اکسیژن را بررسی کردند و دریافتند که ترکیب گازهای آرگون واکسیژن در ٤٠ ثانیه توانست باکتری‌های باسیلوس تروژینسیس را از بین ببرد در صورتی که گاز هلیم و اکسیژن در ۱۸۰ ثانیه توانست تعداد باکتری‌ها را کاهش دهد. آنها همچنین تأثیر دما را بر روی استرلیزاسیون بررسی و گاز هلیم وآرگون را در دماهای ۵۵ و ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد انجام دادند و دریافتند که هرچه دما بالاتر میزان استریلیزاسیون بیشتر است (٦).

در ۲۰۰٦ Ohkawa و همکاران گزارش کردند که پلاسمای اتمسفری را که با فرکانس ۲۷/۱۲ مگا هرتز ایجاد شده بود را مورد مطالعه قرار دادند که پلاسمای آنها بین دو سطح دی الکتریک که الکترودها پشت آنها قرار گرفته بودند و جنس دی الکتریک‌ها از کوارتز ۳ میلی‌متر بود تشکیل شد و اثر آنتی باکتریال پلاسمای آنها در مورد باکتری‌هایی که اسپور تولید می‌کردند مانند باسیلوس آئروفائوسو ژئو باسیلوس استئارو ترموفیلوس و همچنین یک کپک و شبه مخمر کاندیدا آلبیکنس و آسپرژیلوس نایجر مورد مطالعه قرار گرفت و شرایط آزمایشگاهی ایده‌آل را جهت یافتن یک روش عمده برای حالت‌های مختلف، اثر میکروب‌کشی، دمای گاز بی‌اثر و همچنین پخش شدن یکنواخت پلاسما بین دو الکترود مشخص کردند (۱۵).

پلاسمای سرد به‌عنوان فناوری نوین می‌تواند در عرصه‌های مختلفی از صنایع غذایی و کشاورزی با ارائه راهکارهای مناسب و کارامد گامی مؤثر در جهت ارتقاء اهداف صنایع غذایی بخصوص در زمینه‌های مایکوتوکسین زدایی بردارد. در نتیجه تیمار با پلاسماجت این موضوع را اثبات می‌نماید که صرف‌نظر از محیط کشت و شرایط آن، افزایش زمان تیمار با پلاسماجت همواره کاهش مقدار اوکراتوکسین A را در پی خواهد داشت. بررسی آماری غیرپارامتریک مقادیر بدست آمده از آزمون الایزا براساس توابع Lin/Log و Log/Lin و مقایسه بین این دو تابع نشان می‌دهد که کاهش تغییرات مقدار اوکراتوکسین تولید شده از سوی جدایه‌های قارچی مورد آزمون به‌طور معنی‌دار مشاهده می‌گردد. این اتفاق تا افزایش۳٦۰ ثانیه تیمار با پلاسماجت در محیط (YE+SB) تغییرات کاهشی مقدار اکراتوکسین همچنان معنی‌دار بوده است. لذا از سیستم پلاسما جت می‌توان جهت از بین بردن مایکوتوکسین‌های قارچی در جهت افزایش کیفیت مواد غذایی استفاده نمود.

فهرست منابع

1- Alshannaq, A., Yu, J.H. (2017). Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food.IJERPH, 14(6), 632.
2- Bennett, J. W., Klich, M. (2003). Mycotoxins. Clinical Microbiology Reviews, 16(3), 497-516.
3- Calvo, A. M., Cary, J. W. (2015). Association of fungal secondary metabolism and sclerotial biology. Frontiers in Microbiology, 6, 62.
4- el Khoury, A., Atoui, A. (2010). Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. Toxins, 2(4), 461-493.
5- Haleem Khan, A. A., Mohan Karuppayil, S. (2012). Fungal pollution of indoor environments and its management. Saudi J Biol Sci, 19(4), 405-426.

6- Hayashi, N., Akiyoshi, Y., Kobayashi, Y., Kanda, K., Ohshima, K., Goto, M. (2013). Inactivation characteristics of Bacillus thuringiensis spore in liquid using atmospheric torch plasma using oxygen. Vacuum, 88(Supplement C), 173-176.
7- Heussner, A. H., Bingle, L. E. H. (2015). Comparative Ochratoxin Toxicity: A Review of the Available Data. Toxins, 7(10), 4253-4282.
8- Hoon Park, J., Kumar, N., Hoon Park, D., Yusupov, M., Neyts, E. C., Verlackt, C. C. W. (2015). A comparative study for the inactivation of multidrug resistance bacteria using dielectric barrier discharge and nano-second pulsed plasma. Scientific Reports, 5, 13849.
9- Jacobs, P., Kowatsch, R. (1993). Sterrad Sterilization System: a new technology for instrument sterilization. Endosc Surg Allied Technol, 1(1), 57-58.
10- Kőszegi, T., Poór, M. (2016). Ochratoxin A: Molecular Interactions, Mechanisms of Toxicity and Prevention at the Molecular Level. Toxins, 8(4), 111.
11- Lee, J., Lee, E. Y., Kim, S.H., et al(2013). Staphylococcus aureus Extracellular Vesicles Carry Biologically Active β-Lactamase. AAC, 57(6), 2589-2595.
12- Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, . Malir, J., Toman, J. (2016). Ochratoxin A: 50 Years of Research. Toxins, 8(7), 191.
13- Milićević, D. R., Škrinjar, M., Baltić, T. (2010). Real and Perceived Risks for Mycotoxin Contamination in Foods and Feeds: Challenges for Food Safety Control. Toxins, 2(4), 572-592.
14- Mousavi, B., Hedayati, M. T., Hedayati, N., Ilkit, M., & Syedmousavi, S. (2016). Aspergillus species in indoor environments and their possible occupational and public health hazards. CMM, 2(1), 36-42.
15- Ohkawa, H., Akitsu, T., Tsuji, M., Kimura, H., Kogoma, M., Fukushima, K. (2006). Pulse-modulated, high-frequency plasma sterilization at atmospheric-pressure. Surface and Coatings Technology, 200(20), 5829-5835.
16- Ostry, V., Malir, F., Ruprich, J.. (2013). Producers and Important Dietary Sources of Ochratoxin A and Citrinin. Toxins, 5(9), 1574-1586.
17- Pitt, J. I. (1987). Penicillium viridicatum, Penicillium verrucosum, and production of ochratoxin A. AEM, 53(2), 266-269.
18- Rutala, W. A., Weber, D. J. (2001). New disinfection and sterilization methods. EID, 7(2), 348-353.
19- Siciliano, I., Spadaro, D., Prelle, A., Vallauri, D., Cavallero, M., Chiara, G., (2016). Use of Cold Atmospheric Plasma to Detoxify Hazelnuts from Aflatoxins. Toxins, 8(5), 125.
20- Hoseinzadeh-Colagar A., Deyami M., Sohbatzadeh, F., Siadati, S.N. (2017). The effect of scanning cold atmospheric plasma jet on bovins milk and its inoculated Candida albicans. JFST, 68 (14), 103-111.