



بررسی اثر پلاسمای سرد آرایه‌ای هلیوم و هلیوم اکسیژن در فشار اتمسفر بر باکتری *Escherichia coli* O157

غلامرضا، اطاعتی^{۱*}؛ مسعود، عبدوس^۲؛ مریم، خواجه علی^۳؛ فرهاد، شهبگلی^۱

۱- دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی انرژی و فیزیک

۲- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

۳- دانشگاه آزاد اسلامی - واحد کرج

چکیده:

امروزه یکی از کاربرهای مهم پلاسمای سرد، استریل کردن لوازمی است که آلوده به عوامل بیماری‌زا هستند. در این تحقیق اثر پلاسمای سرد بر روی رشد باکتری بیماری‌زای *E. coli* O157 که عامل بیماری اسهال خونی است به صورت کمی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است. این آزمایش‌ها با توجه به شکل آرایه‌ای جت پلاسمای هلیوم و هلیوم+اکسیژن با شعاع تاثیر معادل ۲.۵ سانتی‌متر بر روی سوسپانسیون طراحی شد. نتایج به دست آمده از آزمایش‌ها نشان دادند که با اثر دادن پلاسمای سرد اتمسفری تولید شده از گاز هلیوم و هلیوم+اکسیژن، می‌توان این باکتری را از بین برد و رشد آن را متوقف کرد. همچنین با افزایش زمان اثر پلاسمای، نتایج مطلوب‌تری حاصل شد.

کلید واژه

پلاسمای سرد فشار اتمسفری، باکتری *E. coli* O157، پلاسمای هلیوم، پلاسمای هلیوم + اکسیژن، پلاسمای جت آرایه‌ای.

۱- مقدمه

رفع آلودگی‌های میکروبی از ادوات و لوازم پزشکی در بیمارستان‌ها و مراکز درمانی یک مسئله‌ی مهم در حفظ بهداشت و جلوگیری از انتقال بیماری‌ها می‌باشد و هم‌چنین رفع آلودگی‌های میکروبی، شیمیایی و رادیواکتیو در جنگ‌های میکروبی، شیمیایی و رادیواکتیو یک مسئله‌ی مهم در درگیری‌های نظامی و یا اقدام‌های ضد تروریسم است. در گذشته رفع آلودگی با سفید کننده‌ها یا محلول‌ها صورت می‌گرفت که فرآیندی خطرناک بود. محلول‌های رفع آلودگی اغلب برای مواد فلزی، پلاستیکی، لاستیکی، رنگ، چرم و البته پوست انسان مضر بودند. از طرف دیگر نیز استفاده از روش‌های تر برای لوازم الکترونیکی، تجهیزات حساس مناسب نیستند [۱]. هم‌چنین این روش‌ها نیازمند حمل و نگهداری مواد شیمیایی جهت استفاده در رفع آلودگی می‌باشند که آزاد شدن تدریجی آن‌ها می‌تواند برای محیط زیست مضر باشد. استفاده از پلاسمای غیرحرارتی می‌تواند تمام این نقص‌ها را برطرف کند و تنها محدودیت آن عملیات تحت خلاء آن است که آن هم با استفاده از پلاسمای فشار اتمسفر برطرف می‌شود. پلاسمای غیرحرارتی که به آن پلاسمای غیر تعادلی یا سرد هم گفته می‌شود از الکترون‌ها، یون‌ها و ذرات خنثی تشکیل شده است. در پلاسمای غیرحرارتی، گونه‌های موجود در پلاسمای تعادل دمایی با یکدیگر نیستند و الکترون بیشترین دما را بین آنها دارد (۱ تا ۱۰ الکترون‌ولت) در حالی که دمای

یون‌ها و به طور تقریبی دمای پلاسما در حدود دمای اتاق می‌باشد و الکترون‌ها سهمی در افزایش دمای پلاسما ندارند. پلاسمای سرد فشار اتمسفری، یک نوع پلاسمای غیرتعادلی است که به وسیله یونیزه شدن گاز عامل و در فشار اتمسفر تولید می‌شود. آزمایش‌های انجام شده نشان داده‌اند که پلاسمای تولید شده قادر به از بین بردن آلودگی‌های میکروبی و شیمیایی است [۲]، [۳] و [۴].

۲- روش کار

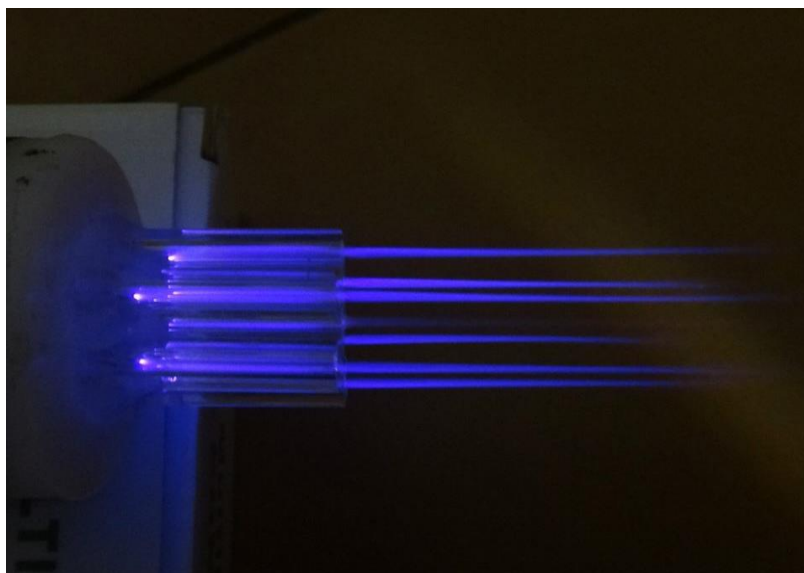
۲-۱- کشت و آماده‌سازی باکتری

با توجه به مطالعات انجام شده و انتظاری که از اثربخشی آنتی‌میکروبیال پلاسمای سرد بر روی باکتری‌های گرم منفی وجود دارد شمارش اولیه این باکتری در حد 1×10^7 cfu/ml در نظر گرفته شد [۵] و [۶]. نمونه سوسپانسیون اسپور باکتری در این آزمایشات در ظروف ۶ خانه‌ای استریل کشت سلولی ریخته شده و تحت تیمار با پلاسما قرار می‌گیرد. قطر و ارتفاع هر خانه‌ی ظرف به ترتیب معادل $3/5$ و $1/7$ سانتی‌متر بود و در هر بار آزمایش سوسپانسیون باکتری با کانت معین در آن ریخته شد. در هر خانه ضخامت سوسپانسیون در حجم ۳ میلی‌لیتر برابر با ۳ میلی‌لیتر بود. با توجه به ابعاد هر خانه طی نتایج تجربی مشخص شد که چنانچه حجم ۳ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور استفاده شود، نمونه در کف ظرف به طور یکنواخت پخش خواهد شد و در اثر تماس با جریان پلاسما و ایجاد دوران مناسب، کل نمونه در واحد زمان به طور یکنواخت تحت تاثیر پلاسما قرار خواهد گرفت. درحالی‌که اگر سوسپانسیون اسپور با حجم کم‌تر از ۳ میلی‌لیتر در ظرف مذکور ریخته شود، یکنواختی تاثیر پلاسما بر نمونه از بین می‌رود و در صورتی که از سوسپانسیون اسپور با حجم بیشتر از ۳ میلی‌لیتر استفاده گردد، با افزایش ضخامت نمونه، موجب کاهش تاثیر پلاسما تا عمق نمونه خواهد شد.

۲-۲- شرح دستگاه پلاسما جت و منبع تغذیه‌ی آن

در این آزمایش‌ها از دستگاه پلاسما جت تک الکترودی برای تولید پلاسما استفاده شده است. سیستم تک الکترودی دارای مزایای بسیاری است. مهم‌ترین مزیت سیستم تک الکترودی قابلیت حمل دستگاه و عدم نیاز به الکتروود دوم (زمین) است. این دستگاه شامل منبع تغذیه، پلاسما جت آرایه‌ای با ۷ آرایه و کپسول گاز مولد پلاسما می‌باشد. پلاسما جت شامل هفت نازل شیشه‌ای مجزا است که یکی در مرکز دایره و شش‌تای دیگر در محیط دایره‌ای به قطر حدود ۲ سانتی‌متر قرار دارد. پلاسما جت آرایه‌ای جهت استفاده پلاسمای گاز هلیوم و ترکیب آن با اکسیژن طراحی و ساخته شده است. قطر داخلی هر کدام از نازل‌های شیشه‌ای ۲ میلی‌متر می‌باشد و الکتروود آن‌ها از جنس مس است. الکتروود مسی با قطر $0/5$ میلی‌متر به صورت یک حلقه درون شیشه‌ی نازل گاز قرار گرفته است و با استفاده از قانون القای فارادی گاز شارش شده در نازل شیشه‌ای یونیزه شده و پلاسمای

حاصل، از دستگاه خارج می‌شود. شلنگ‌خور گاز در انتهای دستگاه روی بدنه نصب شده است. این سیستم برای تزریق گاز از بالای نازل به داخل آن طراحی شده است و از مزیت آن می‌توان به یکنواختی گاز شارش شده داخل نازل اشاره کرد. برای تولید پلاسمای سرد فشار اتمسفری از یک منبع تغذیه با محدوده ولتاژ زیر ۲ تا ۴ کیلوولت، ولتاژ بدون بار ۱۵ تا ۲۰ کیلوولت، محدوده‌ی جریان از ۱ تا ۱۰ میلی‌آمپر و محدوده‌ی فرکانسی منبع تغذیه ۲۰ تا ۴۵ کیلوهرتز استفاده شده است. طول پلاسمای حاصل از تخلیه‌ی الکتریکی در هر یک از آرایه‌ها در حدود ۴ الی ۶ سانتی‌متر خواهد بود و دمای آن به حداکثر ۴۰ درجه سانتی‌گراد می‌رسد. شکل ۱ پلاسمای تولید شده توسط دستگاه را نشان می‌دهد.



شکل ۱: پلاسمای تولید شده توسط پلاسمای جت آرایه‌ای با ۷ آرایه.

۲-۳- شرح آزمایش

به منظور انجام آزمایش‌ها، ۳ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری با تعداد 10^7 cfu/ml را در ظرف استریل ۶ خانه‌ای مخصوص کشت سلول از جنس پلی‌استایرن ریخته و در زمان‌های ۱، ۲ و ۳ دقیقه از فاصله‌ی ۳ سانتی‌متر تحت شارش پلاسمای گاز هلیوم با شار ۹ لیتر در دقیقه و ترکیب هلیوم با شار ۹ لیتر در دقیقه و اکسیژن با شار ۲۰ سی‌سی در دقیقه قرار گرفت. فرکانس منبع تغذیه در طول آزمایش‌ها ثابت و با مقدار ۲۶٫۵ کیلوهرتز در نظر گرفته شد. در زمان آزمایش بخشی از سوسپانسیون میکروبی در اثر برخورد پلاسمای با سطح آن تبخیر شد. در خاتمه‌ی مرحله شارش پلاسمای به منظور ثابت ماندن حجم سوسپانسیون، معادل با حجم تبخیر شده سرم فیزیولوژی استریل افزوده و سوسپانسیون را قبل از رقیق‌سازی به خوبی ورتکس نمودیم. سپس از آن رقت‌های 10^{-1} ، 10^{-2} و 10^{-3} تهیه و از هر رقت ۵۰ میکرولیتر را با استفاده از میله‌ی شیشه‌ای L شکل روی پلیت حاوی

محیط کشت مولر هینتون آگار با قطر ۹ سانتی متر به طور یکنواخت پخش کردیم و پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی گراد انکوبه گردید. سپس کلنی‌های رشد یافته در پلیت‌ها شمارش شده و کاهش تعداد باکتری‌ها در اثر تیمار با پلاسما محاسبه شد. برای افزایش دقت در نتایج به دست آمده، آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام شده و میانگین تکرارها در نظر گرفته شد. پارامترهای متغیر در این آزمایش‌ها شامل نوع گاز مولد پلاسما و زمان تیمار باکتری توسط پلاسما می‌باشد و سایر پارامترهای موثر نظیر، تعداد اولیه باکتری، فاصله‌ی جت پلاسما از سطح محیط کشت و فرکانس منبع تغذیه به صورت ثابت در نظر گرفته شده است. شکل ۲ نحوه‌ی تابش پلاسما را بر روی نمونه نشان می‌دهد.



شکل ۲: تابش پلاسمای آرایه‌ای بر روی نمونه.

۳- نتایج

در این تحقیق اثر پلاسمای سرد هلیوم و هلیوم+اکسیژن در فشار اتمسفر بر باکتری E.coli O^{۱۵۷} بررسی شد. پس از مشاهده و بررسی نمونه‌های قرار گرفته در معرض پلاسمای سرد، نتایج زیر به دست آمدند که در جدول ۱ جدول ۲ آورده شده‌اند:

جدول ۱: اثر پلاسمای سرد هلیوم بر رشد باکتری E.coli O^{۱۵۷} با تعداد اولیه 1×10^7 cfu/ml.

تعداد باکتری رشد کرده پس از تیمار توسط پلاسما (cfu/ml)	زمان تیمار باکتری توسط پلاسما (دقیقه)
$4,7 \times 10^6$	۱
$1,95 \times 10^5$	۲
۰	۳

جدول ۲: اثر پلاسمای سرد هلیوم+اکسیژن بر رشد باکتری E.coli O157 با تعداد اولیه 1×10^7 cfu/ml.

تعداد باکتری رشد کرده پس از تیمار توسط پلاسما (cfu/ml)	زمان تیمار باکتری توسط پلاسما (دقیقه)
6.3×10^6	۱
1.87×10^5	۲
۰	۳

۴- بحث و نتیجه‌گیری

پس از بررسی نتایج به دست آمده از آزمایش‌ها مشخص شد که بر اثر تابش پلاسما به مدت ۳ دقیقه بر روی سوسپانسیون میکروبی، تمام سلول‌ها کشته شدند یعنی ۶ واحد لگاریتمی در رشد باکتری کاهش حاصل شد. با افزایش زمان شارش پلاسما از جمعیت باکتری‌ها کاسته می‌شود و همچنین اثر پلاسمای هلیوم و ترکیب آن با اکسیژن بر ممانعت از رشد باکتری تقریباً برابر است. امروزه استفاده از پلاسمای سرد فشار اتمسفری برای استریلیزاسیون در کشورهای پیشرفته در حال بررسی است. یکی از مهم‌ترین اثرات این پلاسما، تخریب ساختارهای سطحی و مرگ میکروارگانیسم‌هاست که تحت فرآیندهای متفاوتی صورت می‌گیرد. پلاسما دارای کاربردهای زیادی است نظیر استریلیزاسیون مواد غذایی، رفع آلودگی از مواد و تجهیزات حساس به حرارت، تسریع در التیام زخم‌های عفونی خصوصاً در مواردی که عامل عفونت باکتری‌هایی با مقاومت نسبت به چند آنتی‌بیوتیک باشد. تولید پلاسمای سرد اتمسفری کم هزینه و دارای آلودگی و آسیب‌های زیست محیطی کمی است. در آینده امید می‌رود استفاده از پلاسمای سرد اتمسفری در درمان عفونت‌های پوستی انسان جایگزین درمان آنتی‌بیوتیکی گردد و همچنین در کنترل آلودگی و ضد عفونی بیمارستان‌ها و دیگر مکان‌ها به عنوان یک روش موثر مورد استفاده قرار بگیرد. لذا بررسی پارامترهای تاثیرگذار در تولید پلاسمای سرد اتمسفری مانند توان منبع تغذیه و اثر آن بر دیگر باکتری‌ها نیز حائز اهمیت است.



مراجع

- [۱] W. C. Zhu, B. R. Wang, H. L. Xi, and Y. K. Pu, "Decontamination of VX Surrogate Malathion by Atmospheric Pressure Radio-frequency Plasma Jet," *Plasma Chem Plasma Process*, vol. ۳۰, pp. ۳۸۱-۳۸۹, ۲۰۱۰.
- [۲] فرشاد صحبت‌زاده و همکاران، بررسی اثر پلاسمای پس تاب سرد اتمسفری بر قارچ کاندیدا آلبیکنس، مقاله نامه کنفرانس فیزیک ایران، صفحه ۴۸۹ تا ۴۹۲، سال ۱۳۹۰.
- [۳] فرشاد صحبت‌زاده و همکاران، بررسی پلاسمای سرد اتمسفری در فرکانس رادیویی ۱۳/۵۶ مگاهرتز، مقاله نامه کنفرانس فیزیک ایران، صفحه ۱۶۳۷ تا ۱۶۴۰، سال ۱۳۹۰.
- [۴] H. W. Herrmann et al; "Chemical Warfare Agent Decontamination Studies in the Plasma Decon Chamber", *IEEE TRANSACTIONS ON PLASMA SCIENCE*, vol ۳۰, (۲۰۰۲) ۱۴۶۰.
- [۵] Baron E.J, Finegold S.M, Diagnostic microbiology, ۸th edition, page ۳۷۱, ۱۹۹۰.
- [۶] جمشید ففقی، میکروبیولوژی تجربی اصول بنیادی و کاربردها، انتشارات راه کمال با همکاری انتشارات دانشگاه علوم پزشکی تهران، سال ۱۳۸۶.