«مقاله پژوهشی»
10.30495/JFH.2020.671488

اثر پلاسمای سرد اتمسفری بر میزان رشد و قدرت تشکیل بیوفیلم در *استافیلوکوکوس اورئوس*های جداشده از شیر گاو مبتلا به ورم پستان

فرهاد جهاندیده[۱]، جلال شایق[۲*]، سمیه حسین‌زاده[۲]

۱. دانش‌آموخته دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شبستر، ایران
۲. استادیار گروه دامپزشکی، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شبستر، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات: Jalalshayegh@iaushab.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹۸/۹/۱۰ پذیرش نهایی: ۹۸/۱۱/۸)

چکیده

استافیلوکوکوس اورئوس به‌عنوان یکی از باکتری‌های مهم بیماری‌زا در صنعایع شیر است که قادر به تولید بیوفیلم می‌باشد. بیوفیلم تولید شده توسط این باکتری باعث مقاومت آن در برابر عوامل ضدمیکروبی می‌گردد. غیرفعال کردن میکروارگانیسم‌ها با استفاده از پلاسمای سرد اتمسفری یکی از روش‌های جدید در صنعایع غذایی می‌باشد. در این مطالعه جهت بررسی اثر ضدباکتریایی و ضدبیوفیلمی پلاسمای سرد اتمسفری، از دستگاه تخلیه سد دی‌الکتریک استفاده شد. تعداد ۲۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌دست‌آمده از شیر گاوهای مبتلا به ورم‌پستان بالینی، در بازه‌های زمانی ۵ تا ۲۰ ثانیه در معرض پلاسما قرارگرفت و اثر ضدباکتریایی آن با اندازه‌گیری قطر هاله مهار رشد محاسبه شد. برای ارزیابی اثرات ضدبیوفیلمی، جدایه‌ها به‌مدت ۵ ثانیه تحت تیمار با پلاسما قرار گرفتند و پس از ۲٤ ساعت میزان تشکیل بیوفیلم بررسی شد. نتایج نشان داد که با افزایش زمان شارش پلاسما بر جدایه‌ها، کاهش قابل‌توجهی در میزان رشد باکتری‌ها مشاهده می‌شود. همچنین آنالیز آماری نتایج حاصل از الایزا ریدر نشان داد که در معرض قرارگیری جدایه‌ها با پلاسما به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) باعث کاهش تولید بیوفیلم شده است. این نتایج حاکی از آن است که پلاسما می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های آلودگی‌زدایی حرارتی باشد. با این‌حال، کاربرد آن مستلزم انجام مطالعات بیشتر با هدف تعیین شدت و مدت‌زمان مواجهه میکروارگانیسم‌ها با پلاسما است.

واژه‌های کلیدی: پلاسمای سرد اتمسفری، تخلیه سد دی‌الکتریک، *استافیلوکوکوس اورئوس*، بیوفیلم، شیر

مقدمه

شیر گاو به‌عنوان غذایی کامل و سرشار از مواد مغذی می‌تواند عمده نیازهای بدن انسان را تأمین کند (Haug *et al*., 2007). کیفیت و کمیت شیر با بافت مناسب پستانی جهت تولید شیر، کارایی سلول‌های ترشحی در ساختن اجزاء تشکیل‌دهنده شیر و فراهم بودن مواد مغذی برای گاو ارتباط دارد. از عواملی که تولید شیر گاو و کیفیت و ارزش غذایی آن را تحت تأثیر قرار می‌دهد، بیماری ورم‌پستان می‌باشد (Batavani *et al*., 2007).

گزارش‌های اخیر حاکی از آن است که باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در زمره عوامل بیماری‌زای حائز اهمیت در صنعت فرآورده‌های شیر می‌باشد (Dai *et al*., 2019). در حیوانات این باکتری عامل ۱۸-٤/۱ درصد عفونت‌های باکتریایی داخل پستانی است که می‌تواند وارد شیر شده و با تولید توکسین باعث ایجاد مسمومیت غذایی و دیگر عفونت‌ها در انسان گردد (Wendlandt *et al*., 2013; Rola *et al*., 2015). هم‌چنین این باکتری به‌علت ایجاد مقاومت روزافزون در برابر داروهای ضدباکتریایی به‌صورت یکی از نگرانی‌های سلامت عمومی مطرح می‌باشد (Gajdács, 2019). آلودگی به این میکروارگانیسم در انواع مختلف فرآورده‌های شیر از جمله در طول فرایند تولید پنیر به‌اثبات رسیده است (Mirzaei *et al*., 2012).

از مهم‌ترین عوامل در افزایش بیماری‌زایی و مقاومت *استافیلوکوکوس اورئوس* در برابر عوامل ضدمیکروبی توانایی تشکیل بیوفیلم است (Langsrud, 2009). بیوفیلم انباشتی از سلول‌های میکروبی روی سطوح مختلف است که در داخل نوعی ماتریکس خارج‌سلولی و بی‌شکل احاطه شده‌اند (Jamal *et al*., 2018).

در صنایع غذایی، تشکیل بیوفیلم میکروبی می‌تواند منبع بالقوه آلودگی محصولات و فرآورده‌های غذایی و انتقال بیماری باشد (Chen *et al*., 2015). از این‌رو کنترل و از بین بردن بیوفیلم باکتری‌های بیماری‌زا از اهمیت ویژه‌ای در پزشکی و صنایع غذایی برخوردار است. امروزه روش‌های مرسوم جهت کنترل فساد و ایمنی میکروبی مانند روش‌های حرارتی، انجماد و غیره که می‌توانند روی بسیاری از فاکتورهای کیفی شیر از جمله طعم، رنگ و محتوای غذایی آن اثر بگذارند، پاسخگوی تقاضای مصرف‌کننده برای مواد غذایی آماده به مصرف و تازه نیست؛ بنابراین نیازمند روش متفاوت و مؤثر جهت کاهش اعمال فرآوری بر روی مواد غذایی می‌باشد. یکی از فناوری‌های ضدمیکروبی توسعه‌یافته برای استریل کردن سطوح آلوده و مواد غذایی، استفاده از پلاسمای سرد اتمسفری است. این فناوری از سال ۱۹۹۰ میلادی مورد توجه قرارگرفته است اما استفاده از آن به‌عنوان یکی از روش‌های آلودگی‌زدایی میکروبی در صنایع غذایی همچنان مورد توجه است. این تکنیک بر مبنای استفاده از گازهای یونیزه و تولیدشده در دمای اتاق و در فشار اتمسفری می‌باشد (Noriega *et al*., 2011; Fernandez *et al*., 2012).

یکی از انواع روش‌های تولید پلاسمای سرد اتمسفری، تخلیه سد دی‌الکتریک (Dielectric Barrier Discharge: DBD) است. عمل تخلیه بین دو الکترود که حداقل یکی از آن‌ها با لایه دی‌الکتریک پوشانده شده است، صورت می‌گیرد. این تخلیه با اعمال ولتاژ بالای متناوب بین دو الکترود انجام‌گرفته و وجود یک‌لایه

دی‌الکتریک مانع از عبور جریان شدید میان دو الکترود و وقوع جرقه می‌گردد. یون‌ها و گونه‌های فعال هیدروکسیل، اکسیژن، اوزون، پراکسیدهیدروژن و همچنین نور ماوراءبنفش در اثر یونیزاسیون گاز و ایجاد پلاسما به‌وجود می‌آیند و از اصلی‌ترین عوامل نابودسازی میکروارگانیسم‌ها توسط پلاسمای سرد به‌شمار می‌روند. از این‌رو، در بسیاری از موارد از پلاسما برای رفع آلودگی میکروبی استفاده می‌شود (Olatunde *et al*., 2019). در مطالعه‌ای به این نتیجه رسیدند که به‌کارگیری پلاسمای سرد اتمسفری با روش DBD می‌تواند یک تکنیک باارزش در آلودگی‌زدایی، جهت از بین بردن سلول‌های پلانکتونیک و بیوفیلم باکتری‌هایی مثل *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس به متی‌سیلین و *اشرشیا کولای* بکار رود (Joshi *et al*., 2010). در تحقیق دیگری فعالیت ضدباکتریایی مؤثر پلاسمای سرد DBD را در مدت‌زمان کوتاه نشان دادند و پتانسیل آن را برای استفاده متداول در آلودگی‌زدایی در بیمارستان‌ها تأیید کردند (Cahill et al., 2014).

با توجه به وجود اطلاعات اندک در مورد امکان استفاده از پلاسمای سرد اتمسفری جهت افزایش سطح ایمنی و کیفی مواد غذایی، هدف تحقیق حاضر بررسی اثرات ضدمیکروبی و ضدبیوفیلمی پلاسمای سرد اتمسفری روی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از ورم‌پستان گاوی است.

مواد و روش کار

- جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

در کل تعداد ۲۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* در این تحقیق استفاده شد. این جدایه‌ها قبلاً از شیر گاوهای مبتلا به فرم بالینی ورم‌پستان ارجاع شده به کلینیک‌های دامپزشکی استان تهران جداسازی شده بودند. جدایه‌ها با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی استاندارد شناسایی و با تکثیر ژن اختصاصی *استافیلوکوکوس اورئوس nuc* (Brakstad *et al*., 1992) مورد تأیید قرار گرفته بودند. جدایه‌های بالینی ورم‌پستان از این‌رو انتخاب شدند که طبق نتایج مطالعات قبلی قدرت تشکیل بیوفیلم جدایه‌های بالینی ورم‌پستان بیشتر از سایر موارد بوده است (Pereyra *et al*., 2016). از *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 19312 به‌عنوان سویه استاندارد استفاده شد.

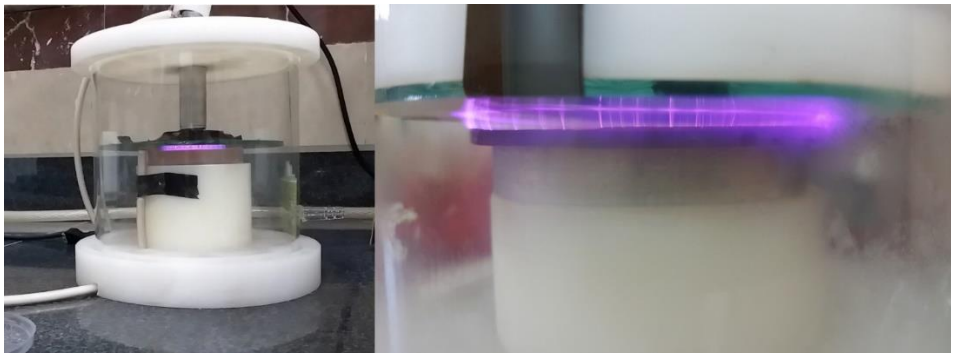
- قابلیت تولید بیوفیلم جدایه‌ها

جهت بررسی قابلیت تولید بیوفیلم جدایه‌ها از روش میکروتیتر پلیت (Microtiter Plates Assay) و رنگ‌سنجی با کریستال‌ویوله توصیف‌شده در مطالعات قبلی با کمی تغییر استفاده شد (Ebrahimzadeh and Hanifian, 2017). این آزمون با سه بار تکرار انجام گردید. بدین‌ترتیب که مقدار ۲۰۰ میکرو لیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی تهیه‌شده در محیط تریپتیکاز سوی براث (Ibresco, Italy) حاوی یک درصد گلوکز (OD_{600}= 0.3, ~10^7 CFU/ml) به سه چاهک اضافه شد. جهت جلوگیری از دهیدراتاسیون، میکروپلیت‌ها با پارافیلم پوشانده شده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۲٤ ساعت گزمخانه‌گذاری گردیدند. سپس میکروپلیت‌ها به‌آرامی با محلول استریل PBS (Baharafshan, Iran) شست‌وشو داده شده و به‌مدت ۲۰ دقیقه به‌صورت وارونه بر روی کاغذ صافی قرار گرفتند تا خشک شوند. در مرحله بعد، به همه چاهک‌ها مقدار ۱۵۰ میکرولیتر رنگ کریستال‌ویوله (Merck, Germany) یک درصد اضافه شده و بعد از ۳۰ دقیقه

شست‌وشو و در شرایط محیطی خشک گردیدند. سپس میزان تشکیل بیوفیلم با افزودن ۱۵۰ میکرو لیتر اتانول ۹۵ درصد و اندازه‌گیری شدت رنگ ایجاد شده با دستگاه الایزا ریدر (Anthos 2020, Austria) در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. از محیط کشت TSB تلقیح نشده به‌عنوان کنترل منفی و از اتانول ۹۵ درصد به‌عنوان بلانک دستگاه الایزا ریدر استفاده گردید. همچنین میزان تشکیل بیوفیلم به روش میکروسکوپی نیز مورد بررسی قرار گرفت.

- ساختار پلاسمای سرد اتمسفری

دستگاه پلاسمای سرد اتمسفری توسط گروه فیزیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر طراحی و ساخته شد. ساختار اصلی تولید پلاسما در این تحقیق، تخلیه سد دی‌الکتریک یا DBD است. این ساختار شامل دو الکترود تخت از جنس آلومینیوم با قطر ۸۰ میلی‌متر است. از شیشه با ضخامت ۳ میلی‌متر و با قطر ۱۳ سانتی‌متر به‌عنوان عایق استفاده گردید. از هوا به‌عنوان منبع گازی برای تشکیل پلاسمای یکنواخت در فضای میان دو الکترود با اعمال ولتاژ، میان دو الکترود استفاده شد. شکل (۱) نمایی از پلاسمای سرد اتمسفری تولیدشده میان دو الکترود در هوا حین پردازش نمونه را نشان می‌دهد. در این شکل، استیمرهای ریز با نور آبی و بنفش که بیانگر جایگزینی یون‌ها و الکترون‌ها در آرایه‌هایی از خطوط جریان می‌باشد، دیده می‌شوند.



شکل (۱)- نمایی از پلاسمای سرد اتمسفری تولید شده میان دو الکترود در هوا. دستگاه تخلیه سد دی‌الکتریک (سمت چپ)، استیمرهای تولید شده با نور آبی- بنفش (سمت راست)

- اثر ضد باکتریایی پلاسمای سرد اتمسفری

فعالیت ضد باکتریایی پلاسما با استفاده از روش پلیت انجام شد. جدایه‌های باکتریایی در لوله حاوی محیط مولر هینتون براث (Ibresco, Italy) تلقیح شده و به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گزمخانه‌گذاری گردیدند. سپس کدورت هر کدام از سوسپانسیون‌های باکتریایی در طول‌موج ٦۰۰ نانومتر تنظیم شد و به‌وسیله سواب بر روی چهار محیط کشت مولر هینتون آگار (Ibresco, Italy) به‌صورت چمنی (Spread Plate Method) کشت داده شدند. پس از ۳ الی ۵ دقیقه که سطح آگار خشک شد، پلیت‌ها در معرض پلاسمای سرد اتمسفری قرار گرفتند. بدین

ترتیب که فاصله سطح محیط کشت با الکترود ۵ میلی‌متر، فرکانس اعمال‌شده ۵۰ هرتز، توان ۱۲۵ وات و ولتاژ دستگاه ۱۲ کیلوولت بوده و از زمان‌های ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ ثانیه جهت بررسی اثر ضدباکتریایی پلاسما استفاده شد. پس از در معرض قرارگیری جدایه‌ها، پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۲٤ ساعت به‌صورت هوازی گزمخانه‌گذاری شدند. در نهایت میزان اثر ضدباکتریایی پلاسما با مشاهده و اندازه‌گیری قطر هاله مهار رشد با کولیس ارزیابی شد. این آزمون برای هر نمونه با سه بار تکرار انجام پذیرفت.

- اثر ضد بیوفیلمی پلاسمای سرد اتمسفری

برای بررسی اثر ضدبیوفیلمی پلاسمای سرد اتمسفری، ابتدا جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با پلاسما تیمار شده و سپس قدرت تشکیل بیوفیلم توسط هرکدام از آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. لازم به‌ذکر است در آزمایش‌های اولیه، به‌دنبال اثر ضدباکتریایی پلاسما، نتایج حاصل از تیمار با زمان‌های کمتر از ۵ ثانیه و بیشتر از ۲۰ ثانیه نشان داد که نقطه زمانی ۵ ثانیه نتایج مناسب‌تری را به دنبال دارد. برای این منظور، هر کدام از جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در محیط TSB حاوی یک درصد گلوکز کشت‌شده و پس از ۲٤ ساعت گزمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، سوسپانسیون باکتریایی با غلظت 10^7 تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر تهیه گردید. در مرحله بعد، مقدار ۲۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون تهیه‌شده به‌داخل پلیت استریل ریخته شده و پلیت به‌مدت ۵ ثانیه در معرض پلاسما قرار گرفت. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قبل و بعد از در معرض قرارگیری به‌داخل سه چاهک میکروپلیت ریخته شدند. در ادامه نمونه‌ها در دو گروه شاهد (کنترل) و گروه آزمایش یا تیمار (نمونه‌های تحت پلاسما) به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گزمخانه‌گذاری گردیدند و آزمایش سنجش تولید بیوفیلم طبق دستورالعمل ذکر شده انجام پذیرفت.

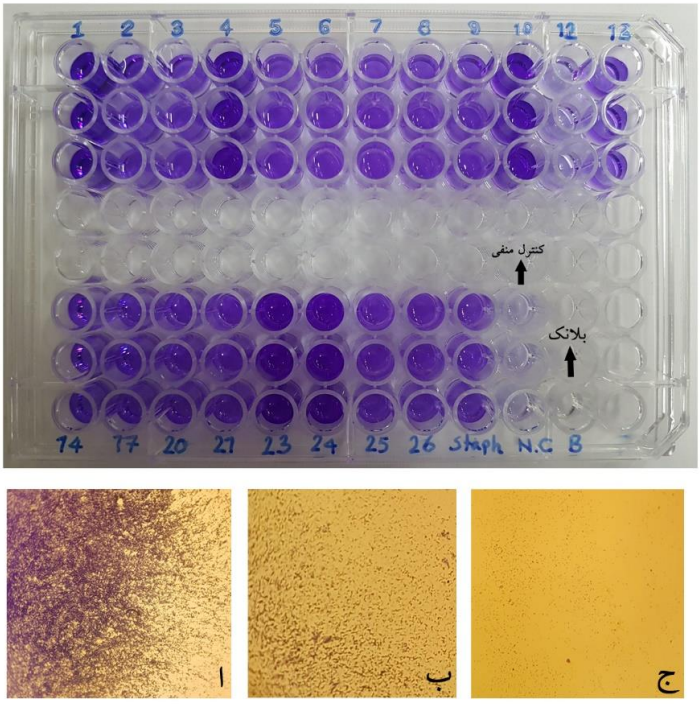
- آنالیز آماری

جهت بررسی تفاوت در میزان تشکیل بیوفیلم بین گروه‌های تیمار و گروه کنترل از آنالیز آماری Paired t-test و از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۸) استفاده گردید.

یافته‌ها

- قابلیت تولید بیوفیلم

داده‌های به‌دست‌آمده از الایزا ریدر نشان داد که همه جدایه‌ها قادر به تولید بیوفیلم با درجات مختلف بودند. نتایج نشان داد که مقدار OD در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و جدایه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر از OD کنترل منفی بود که این اختلاف ازنظر آماری معنی‌دار بود (جدول ۱). شکل (۲) نتایج آزمون ماکروسکوپی و میکروسکوپی تشکیل بیوفیلم در جدایه‌ها را نشان می‌دهد.



شکل (۲)- نتایج آزمون ماکروسکوپی و میکروسکوپی تشکیل بیوفیلم در جدایه‌ها؛ شکل بالا: میزان تشکیل بیوفیلم در میکروپلیت به‌روش رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله؛ شکل‌های پایین: تفاوت میکروسکوپی با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر میزان‌های مختلف بیوفیلم را نشان می‌دهد: الف) جدایه‌های ۱، ٤، ۱۰، ۲۳ و ۲٤، ب) بقیه جدایه‌ها، ج) جدایه ۱۲.

- اثر ضد باکتریایی پلاسمای سرد اتمسفری

اثر پلاسمای سرد اتمسفری روی رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با اندازه‌گیری قطر هاله مهار رشد، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد پس از شارش پلاسما به‌مدت ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ ثانیه روی جدایه‌ها، کاهش قابل‌توجهی در میزان رشد باکتری پس از ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری مشاهده شد (شکل ۳). در زمان‌های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ ثانیه هیچ باکتری در قسمت مرکزی پلیت باقی نمانده بود. میانگین قطر هاله مهار رشد در زمان‌های ۲۰، ۱۵، ۱۰ و ۵ ثانیه به‌ترتیب ۲±۷۰، ۲±٦۱، ۲±۵۰ و ۲±۳۵ میلی‌متر مربع بود.

شکل (۳)- اثر پلاسمای سرد اتمسفری بر روی رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در زمان‌های مختلف

- اثر ضد بیوفیلمی پلاسمای سرد اتمسفری

میزان تشکیل بیوفیلم در جدایه‌ها پس از قرار گرفتن به‌مدت ۵ ثانیه در معرض پلاسمای سرد اتمسفری کاهش یافت. آنالیز آماری داده‌های به‌دست‌آمده از الایزا ریدر با آزمون Paired t-test نشان داد که در معرض قرارگیری جدایه‌ها با پلاسما در سطح احتمالی یک درصد به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) باعث کاهش تولید بیوفیلم می‌گردد (جدول ۱).

جدول (۱)- میانگین OD بیوفیلم به‌دست‌آمده از جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* قبل و بعد از تیمار با پلاسمای سرد اتمسفری

شماره نمونه	میانگین OD بیوفیلم جدایه‌ها	
	قبل از تیمار	(بعد از تیمار)
۱	۰/۲۸۳	۰/۲۲۳
۲	۰/۱۱۲	۰/۰۹٤
۳	۰/۱۵۱	۰/۱۳٦
٤	۱/۰۱٤	۰/۹۱۳
۵	۰/۱۵۵	۰/۱۳۲
٦	۰/۱۲٤	۰/۱۱۹
۷	۰/۱۳۷	۰/۱۲۹
۸	۰/۱٤۲	۰/۱۳۸
۹	۰/۱۱٦	۰/۱۱۰
۱۰	۱/۰۰۷	۰/۹۰۰
۱۲	۰/۰۸۷	۰/۰۸۷
۱۳	۰/۱۲٦	۰/۱۲۱
۱٤	۰/۰۹٤	۰/۰۹۱

ادامه جدول (۲)- میانگین OD بیوفیلم بدست آمده از جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* قبل و بعد از تیمار با پلاسمای سرد اتمسفری

شماره نمونه	میانگین OD بیوفیلم جدایه‌ها	
	قبل از تیمار	قبل از تیمار
۱۷	۰/۱٤۲	۰/۱۳۸
۲۰	۰/۱٤۲	۰/۱۲۹
۲۱	۰/۱۳۸	۰/۱۱۱
۲۳	۱/۰۲۹	۰/۹۲۰
۲٤	۰/۲٦٥	۰/۲۰٤
۲٥	۰/۱۱۰	۰/۱۰۱
۲٦	۰/۱۰٥	۰/۰۹۳
نمونه استاندارد	۰/۱۱۰	۰/۱۰۸
کنترل منفی	۰/۰٤	۰/۰٤

بحث و نتیجه‌گیری

توانایی تشکیل بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس* در صنایع غذایی و از جمله فرآورده‌های لبنی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Langsrud, 2009; Xing *et al.*, 2016). در این بین شیر خام محیط مناسبی برای انتقال میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد بیوفیلم است که ایمنی مواد غذایی را به‌خطر می‌اندازند (Marchand *et al.*, 2012).

در مطالعه حاضر، تمامی ۲۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از ورم‌پستان بالینی گاو قادر به تولید بیوفیلم بودند. این نتیجه نشان می‌دهد که جدایه‌های تولید کننده بیوفیلم می‌توانند با موارد ورم‌پستان بالینی گاو ارتباط داشته باشند. در مطالعه‌ای که روی ٤۰ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از شیر گاوهای مبتلا به ورم‌پستان بالینی و تحت‌بالینی انجام‌شده بود، میزان تشکیل بیوفیلم قوی در ۷۰ درصد جدایه‌ها مربوط به نمونه‌های بالینی بودند (Pereyra *et al.*, 2016). هم‌چنین در مطالعه حاضر مشخص شد با وجود این‌که همه جدایه‌های مورد مطالعه قادر به تولید بیوفیلم بودند اما قدرت تولید بیوفیلم در آن‌ها متفاوت بود که این امر می‌تواند ناشی از تنوع در سویه‌های این‌گونه باشد (Tasse *et al.*, 2018).

بیوفیلم تولید شده توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* باعث مقاومت باکتری نسبت به مواد پاک‌کننده و ضدعفونی‌کننده شیمیایی از جمله سدیم‌هیپوکلریت، هیدروژن‌پراکسید، پراستیک اسید و روش‌های دیگر از جمله استفاده از ترکیبات طبیعی مثل اسانس و عصاره‌های گیاهی، باکتریوسین‌ها و نیز آب الکترولیز و اوزن می‌باشد (Van Houdt and Michiels, 2010). در میان روش‌های مختلف جهت از بین بردن بیوفیلم، پلاسمای سرد اتمسفری اثر قابل‌توجهی را در برابر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها، از جمله سویه‌های تشکیل-

دهنده بیوفیلم مقاوم بـه آنتـی‌بیوتیـک نشـان داده اسـت (Ziuzina *et al*., 2015).

در مطالعه حاضر، از تخلیـه سـد دی‌الکتریـک بـرای تولید پلاسمای سرد اتمسفری با ولتاژ بالا استفاده شـد و قـدرت ضـدباکتریایی و ضـدبیوفیلمی آن در برابـر *استافیلوکوکوس اورئـوس*هـای جـدا شـده از مـوارد ورم‌پستان بالینی گاو مورد بررسی قرار گرفت. با توجـه به نتایج به‌دسـت‌آمده در مطالعـه مـا، بـا افـزایش زمـان شـارش پلاسـمای سـرد اتمسـفری بـر روی جدایـه‌هـا، کاهش قابل‌توجهی در میزان رشـد بـاکتری‌هـا مشـاهده گردید. این نتیجه در توافق با نتایج به‌دست آمده از سایر مطالعات است که نشان دادند پلاسمای سـرد اتمسـفری باعث کاهش رشد باکتری‌های گرم مثبـت و گـرم منفـی شـده اسـت (Daeschlein *et al*., 2012; Mai-Prochnow *et al*., 2016). هم‌چنـین در مطالعـه‌ای، اثـر ضدمیکروبی پلاسما بر برخی باکتری‌های منتقلـه از غـذا مورد بررسی قرار گرفـت و مشـخص شـد کـه پـس از تیمار با پلاسما، میزان میکروارگانیسم‌ها به‌مقـدار زیـادی کـاهش یافتـه اسـت (Ulbin-Figlewicz *et al*., 2015). مطالعـه دیگـر نشـان داد پلاسـمای سـرد یـک روش غیرگرمایی و غیرمخرب بوده که قابلیت میکروب‌زدایـی بالایی دارد. یافته‌های این تحقیق که در راسـتای مطالعـه حاضر است، نشان داد افزایش زمان تابش باعث افزایش میزان قدرت میکروب‌زدایـی پلاسـمای سـرد مـی‌گـردد (Saba *et al*., 2013). در مطالعه دیگری نشان دادند کـه میزان باکتری‌کشی روش DBD بستگی به تراکم سـلولی و زمان در معرض قرارگیری باکتری‌ها با پلاسمای سـرد اتمسفری دارد (Joshi *et al*., 2010). در مطالعه‌ای که از *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌عنوان مدلی برای بررسی اثر پلاسمای سرد اتمسفری استفاده کردنـد، نشـان داده شـد که این روش با توجه به زمان در معرض قرارگیری، اثـر تخریبی زیـادی روی ایـن بـاکتری دارد (Hamed and Mahmood., 2003).

در مطالعه حاضر، میزان تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های تیمار شده با پلاسما در طـی ۵ ثانیـه بـه‌طور معنـی‌داری ($p<۰/۰۵$) کاهش یافت. این نتیجه می‌توانـد در راسـتای مطالعات انجام شده در این زمینه باشد. در مطالعه‌ای اثـر ضدمیکروبی پلاسمای سرد اتمسفری تولید شده توسـط تخلیه سد دی‌الکتریک بر میزان تولید بیوفیلم در باکتری *انتروکوکوس فکالیس* بررسـی شـد و نشـان دادنـد کـه قابلیت تولید بیوفیلم در جدایه‌ها به‌مقدار زیادی کـاهش یافت (Jiang *et al*., 2012). در مطالعه دیگر نیـز نشـان دادند که فناوری پلاسمای سرد اتمسفری یک اسـتراتژی مـؤثر بـرای غیرفعـال کـردن تولیـد بیـوفیلم مـی‌باشـد (Ziuzina *et al*., 2015). هم‌چنـین در مطالعـه دیگـری نشان داده شد که پلاسمای سـرد اتمسـفری تولیـد شـده توسط تخلیه سد دی‌الکتریـک توانـایی قابـل‌توجهی در کاهش تشکیل بیوفیلم باکتری‌هـا دارد (Razuqi *et al*., 2017). بااین‌حال، نوع بـاکتری تولیدکننـده بیـوفیلم بـر روی عملکرد پلاسمای سـرد اتمسـفری اثـر مـی‌گـذارد (Ziuzina *et al*., 2015). این تکنیـک نسـبت بـه سـایر فناوری‌های موجود در مورد آلـودگی‌زدایـی در صـنعت مواد غـذایی، مزایـایی دارد، از جملـه: (۱) یـک فرآینـد خشک است؛ (۲) به انرژی بسـیار کمـی نیـاز دارد؛ (۳) به‌راحتی با محیط تولید مواد غذایی سازگار می‌شود؛ (٤) گونه‌های واکنشی گازها در عرض چند دقیقـه تـا چنـد ساعت پس از تیمار به حالت گاز اولیه برمی‌گردنـد؛ (۵) به‌مدت‌زمان کوتاهی جهت آلودگی‌زدایی نیـاز دارد؛ (٦)

سازگار با محیط‌زیست هست (از گازهای طبیعی شامل نیتروژن، آرگون، اکسیژن، هیدروژن استفاده می‌شود) (Mishra *et al*., 2016). اما به دلیل این‌که مطالعات زیادی در مورد کاربرد این فناوری در سیستم‌های غذایی واقعی وجود ندارد، اثرات پلاسمای سرد اتمسفری بر خواص غذایی و شیمیایی مواد غذایی به‌خوبی مشخص نیست و بنابراین بایستی مطالعات بیشتری در مورد معایب این تکنیک نیز صورت پذیرد.

با توجه به نتایج این مطالعه می‌توان به این جمع‌بندی رسید که پلاسمای سرد اتمسفری به‌عنوان یک استراتژی بالقوه جهت آلودگی‌زدایی در صنعت مواد غذایی مطرح بوده که با آلودگی‌زدایی در مدت‌زمان کم باعث عاری شدن شیر از گونه‌های بیماری‌زا می‌گردد. همچنین با اثر بر روی تولید بیوفیلم توسط میکروارگانیسم‌ها باعث کاهش آلودگی در مواد غذایی و خطوط تولید مواد غذایی، سطوح و تجهیزات می‌گردد؛ اما با توجه به این‌که طی تحقیقات انجام شده تاکنون بین اعمال ولتاژ و میزان اثرگذاری پلاسمای سرد اتمسفری روی میکروارگانیسم‌های مختلف رابطه دقیقی به‌دست نیامده است، تحقیقات بیشتر در این زمینه لازم و ضروری به‌نظر می‌رسد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه نویسنده اول می‌باشد. بدین‌وسیله از گروه دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر و هم‌چنین از سرکار خانم دکتر شیوا شه‌شناس جهت کمک‌های تکنیکی در بخش پلاسما، سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

- Batavani, R.A., Asri, S. and Naebzadeh, H. (2007). The effect of subclinical mastitis on milk composition in dairy cows. Iranian Journal of Veterinary Research, 8(3): 205-211.
- Brakstad, O.G., Aasbakk, K. and Maeland, J.A. (1992). Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. Journal of Clinical Microbiology, 30(7): 1654-1660.
- Cahill, O. J., Claro, T., O'Connor, N., Cafolla, A. A., Stevens, N. T., Daniels, S. *et al*., (2014). Cold air plasma to decontaminate inanimate surfaces of the hospital environment. Applied and Environal Microbiology, 80(6): 2004–2010.
- Chen, D., Zhao, T. and Doyle, M.P. (2015). Control of pathogens in biofilms on the surface of stainless steel by levulinic acid plus sodium dodecyl sulfate. International Journal of Food Microbiology, 207: 1-7.
- Daeschlein, G., Scholz, S., Arnold, A., von Podewils, S., Haase, H., Emmert, S. *et al*., (2012). In vitro susceptibility of important skin and wound pathogens against low temperature atmospheric pressure plasma jet (APPJ) and dielectric barrier discharge plasma (DBD). Plasma Processes and Polymers, 9(4): 380-389.

- Dai, J., Wu, S., Huang, J., Wu, Q., Zhang, F., Zhang, J. *et al*., (2019). Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from pasteurized milk in china. Frontiers in Microbiology. 10: 641-641.
- Ebrahimzadeh, K. and Hanifian, S. (2017). Contamination rate, antibiotic susceptibility profile, biofilm formation and presence of TSST-1 gene in *Staphylococcus aureus* strains. Journal of Food Hygiene, 6(4): 1-15. [In Persian]
- 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.
- Gajdács, M. (2019). The Continuing threat of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antibiotics (Basel), 8(2): 52.
- Hamad, R.H.Ȧ. and Mahmood, M.A. (2013). Deactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* using plasma needle at atmospheric pressure. International Journal of Engineering and Technology, 3(5): 1848-1852.
- Haug, A., Høstmark, A.T. and Harstad, O.M. (2007). Bovine milk in human nutrition-a review. Lipids in Health and Disease, 6: 25-25.
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M.A. *et al*., (2018). Bacterial biofilm and associated infections. Journal of the Chinese Medical Association, 81(1): 7-11.
- Jiang, C., Schaudinn, C., Jaramillo, D.E., Webster, P. and Costerton, J.W. (2012). In vitro antimicrobial effect of a cold plasma jet against *enterococcus faecalis* biofilms. International Scholarly Research Notices Dentistry, 295736.
- Joshi, S. G., Paff, M., Friedman, G., Fridman, A. and Brooks, A. D. (2010). Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in planktonic form and biofilms: A biocidal efficacy study of nonthermal dielectric-barrier discharge plasma. American Journal of Infection Control, 38(4): 293-301.
- Langsrud, S. (2009). Biofilm formation by Gram-positive bacteria including *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium avium* and *Enterococcus* spp. in food processing environments, Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, pp. 250-269.
- Mai-Prochnow, A., Clauson, M., Hong, J., Murphy, A.B. (2016). Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. Scientific Reports, 6: 38610.
- Marchand, S., De Block, J., De Jonghe, V., Coorevits, A., Heyndrickx, M. and Herman, L. (2012). Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 11(2): 133-147.
- Mirzaei, H., Javadi, A., Farajli, M., Shah-Mohammadi, A.R., Monadi, A.R. and Barzegar, A. (2012). Prevalence of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin in traditional cheese and cream: a study in city of Tabriz, Iran. Journal of Veterinary Research, 67(1): 65-70. [In Persian]
- Mishra, R., Bhatia, S., Pal, R., Visen, A. and Trivedi, H. (2016). Cold plasma: emerging as the new standard in food safety. International Journal of Engineering and Science, 6 (2): 15-20.
- Noriega, E., Shama, G., Laca, A., Diaz, 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.
- Olatunde, O.O., Benjakul, S. and Vongkamjan, K. (2019). Dielectric barrier discharge cold atmospheric plasma: Bacterial inactivation mechanism. Journal of Food Safety, e12705.
- Pereyra, E.A., Picech, F., Renna, M.S., Baravalle, C., Andreotti, C.S., Russi, R. *et al*., (2016). Detection of *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm-producing genes and their expression during internalization in bovine mammary epithelial cells. Veterinary Microbiology, 183: 69-77.
- Razuqi, N., Muftin, F., Murbat, H. and Abdalameer, N. (2017). Influence of dielectric-barrier discharge (DBD) cold plasma on water contaminated bacteria. Annual Research & Review in Biology, 14: 1-9.

- Rola, J.G., Sosnowski, M., Ostrowska, M. and Osek, J. (2015). Prevalence and antimicrobial resistance of coagulase-positive staphylococci isolated from raw goat milk. Small Ruminant Research, 123(1): 124-128.
- Saba, V., Ramazani, K. and Hashemi, H. (2013). Bacterial sterilization using dielectric barrier discharge plasma in atmoshpheric pressure. Journal of Army University of Medical Sciences, 11(3): 196-199. [In Persian]
- Tasse, J., Trouillet-Assant, S., Josse, J., Martins-Simões, P., Valour, F., Langlois-Jacques, C. *et al*., (2018). Association between biofilm formation phenotype and clonal lineage in *Staphylococcus aureus* strains from bone and joint infections. PLoS One, 13(8): e0200064-e0200064.
- Ulbin-Figlewicz, N., Jarmoluk, A. and Marycz, K. (2015). Antimicrobial activity of low-pressure plasma treatment against selected foodborne bacteria and meat microbiota. Annals of Microbiology, 65(3): 1537-1546.
- Van Houdt, R. and Michiels, C.W. (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. Journal of Applied Microbiology, 109(4): 1117-1131.
- Wendlandt, S., Schwarz, S. and Silley, P. (2013). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a food-borne pathogen. Annual Review of Food Science and Technology, 4: 117-139.
- Xing, X., Zhang, Y., Wu, Q., Wang, X., Ge, W. and Wu, C. (2016). Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from goat milk powder processing plants. Food Control, 59: 644-650.
- Ziuzina, D., Boehm, D., Patil, S., Cullen, P.J. and Bourke, P. (2015). Cold plasma inactivation of bacterial biofilms and reduction of quorum sensing regulated virulence factors. PLoS One, 10(9): e0138209-e0138209.

"Research article"
10.30495/JFH.2020.671488

Effect of cold atmospheric plasma on growth and biofilm formation of *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic bovine milk

Jahandideh, F.[1], Shayegh, J.[2*], Hosseinzadeh, S.[۲]

1. Graduated in Veterinary Medicine, Shabestar Branch, Islamic Azad University, Shabestar, Iran
2. Assistant Professor, Department of Veterinary Medicine, Shabestar Branch, Islamic Azad University, Shabestar, Iran

Corresponding author: Jalalshayegh@iaushab.ac.ir
(Received: 2019/12/1 Accepted: 2020/1/28)

Abstract

Staphylococcus aureus is one of the most important pathogenic bacteria in the dairy products industry that is capable of biofilm formation. Biofilm formation by these bacteria has been led to resistance to antimicrobial agents. Inactivation of microorganisms using cold atmospheric plasma is one of the new approaches in the food industry. In this study, to evaluate the antibacterial and anti-biofilm effect of cold atmospheric plasma, a dielectric barrier discharge system was used. Twenty isolates of *S. aureus* from clinical bovine mastitis milk were exposed to plasma from 5 to 20 Sec and their antibacterial activity was estimated by recording the growth zone of inhibition. Plasma treatment was performed punctually for 5 Sec to assess the possible effects of plasma treatment on bacterial biofilm-formation activity after 24 h. The results show that a remarkable reduction in the growth of bacteria by increasing the flow of plasma. Moreover, statistical analysis of the ELISA reader results showed that the exposure of the isolates to plasma, significantly ($p< 0.05$) reduced the biofilm formation. These results suggest that plasma can be a suitable alternative method for thermal sterilization techniques. However, its application requires further studies to determine the severity and duration of exposure of microorganisms to plasma.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Cold atmospheric plasma, Dielectric barrier discharge, *Staphylococcus aureus*, Biofilm, Milk