



In Vitro Biocontrol of *Escherichia coli* Through the Immobilization of its Specific Lytic Bacteriophage on Cellulose Acetate Biodegradable Film

Samaneh Faraji¹, Yahya Maghsoudlou^{1*}, Morteza Khomeiri¹, Mahboube Kashiri¹, Arash Babaei²

1. Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Industries, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Malayer University, Malayer, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2018/12/08
Accepted: 2019/02/13
Available online: 2019/03/06

Article Subject:

Antimicrobial Substance

IJMM 2019; 12(6): 399-408

Corresponding author:

Yahya Maghsoudlou

Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Industries, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Email:

y.maghsoudlou@gau.ac.ir

Use your device to scan and read the article online



Abstract

Background and Aims: Bacteriophages are mandatory bacterial parasites that are harmless to human and animal, which are used by dipping or spraying in food as natural antimicrobial agents. The use of these methods leads to wasting or trapping of phage in food, but its immobilization on the polymer surface facilitates the contact of phage with the host cell at the food surface. Therefore, the aim of this study was to immobilize the lytic phage of *Escherichia coli* on the cellulose acetate film and investigate of its antimicrobial effect.

Materials and Methods: *Escherichia.coli* bacteria was incubated at 37°C for 24 hours, and the antimicrobial effect of phages was evaluated through plaque forming. The cellulose acetate film was prepared by casting, then modified by plasma, and immersed in a suspension of phage (10¹⁰ PFU/ml) and incubated at 37 °C for 24 hours with slow shaking, then the number of immobilized phages was estimated. To confirm the immobilization, FESEM was done. The antimicrobial effect of the active film was evaluated by disk diffusion and the release rate and antimicrobial activity of immobilized phages were investigated in 14 days.

Results: Phages formed clear plaques against *E.coli*. Modification of film by plasma resulted in uniform immobilization (10⁸ PFU/ml) that FESEM revealed it. The active film (with zone diameter 12 mm) showed stronger antimicrobial effect than the antibiotic ampicillin (positive control sample with zone diameter 8 mm). 11 days after the immobilization, the number of immobilized phages decreased from 10⁸ to 10⁶ (PFU/ml) and released from the film surface, afterwards did not release. The antimicrobial activity of active film was decreased due to the absence of host bacteria continuously in 15 days, so that the host bacteria population increased from 3 to 5.3 LOG CFU/ml.

Conclusions: In spite of reducing the antimicrobial activity of cellulose acetate active film over the time, due to the presence of host bacteria at food surface and its high potential in destroying the host bacteria, it can be used to increase of food safety in food packaging.

Keywords: *Escherichia coli*, Bacteriophage, Antimicrobial agents, Cellulose acetate, Food packaging

Copyright © 2019, Iran J Med Microbiol This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

How to cite this article:

Faraji Kafshgari S, Maghsoudlou Y, Khomeyri M, Kashiri M, Babaei A. In Vitro Biocontrol of *Escherichia coli* Through the Immobilization of its Specific Lytic Bacteriophage on Cellulose Acetate Biodegradable Film. Iran J Med Microbiol. 2019; 12 (6) :399-408



بیوکنترل باکتری /شیرشیا از طریق تثبیت باکتریوفاژ لیتیک اختصاصی آن بر فیلم زیست تخریب پذیر استات سلولز در شرایط آزمایشگاهی

سمانه فرجی کفشگری^۱، یحیی مقصدلو^{۱*}، مرتضی خمیری^۱، محبوبه کشیری^۱، آرش بابایی^۲

۱. گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران
۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و هدف: باکتریوفاژها انگل های اجباری باکتریایی و بی خطر برای انسان و حیوان هستند که با روش های غوطه وری یا اسپری به عنوان عوامل ضد میکروبی طبیعی در مواد غذایی به کار می روند. استفاده از این روش ها موجب هدر رفتن و یا به دام افتادن فاژ در مواد غذایی می شود؛ اما تثبیت آن بر سطح پلیمر، تماس فاژ با سلول میزبان در سطح مواد غذایی را تسهیل می کند. لذا هدف این مطالعه، تثبیت فاژ لیتیک /شیرشیا بر فیلم استات سلولز و بررسی اثر ضد میکروبی آن بود.

مواد و روش کار: باکتری /شیرشیا به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری و اثر ضد میکروبی فاژها از طریق تشکیل پلاک ارزیابی شد. فیلم استات سلولز به روش قالب ریزی تهیه و سپس تحت تیمار پلاسما اصلاح و در سوسپانسیون از محلول فاژ (۱۰^{۱۰} PFU/mL) غوطه ور و به مدت ۲۴ ساعت با لرزش آرام در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری شد. سپس تعداد فاژهای تثبیت شده تخمین زده شد. برای تأیید تثبیت فاژها، تصویربرداری FESEM انجام گرفت و اثر ضد میکروبی فیلم فعال با روش انتشار دیسک ارزیابی و میزان انتشار و فعالیت ضد میکروبی فاژهای تثبیت شده طی ۱۴ روز بررسی شد.

یافته ها: فاژها پلاک های واضحی علیه باکتری /شیرشیا تشکیل دادند. اصلاح فیلم از طریق پلاسما منجر به تثبیت یکنواخت ۱۰^۸ PFU/mL فاژ شد که تصاویر FESEM آن را تأیید کرد. فیلم فعال (با قطر هاله ۱۲ میلی متر) نسبت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین (نمونه کنترل مثبت با قطر هاله ۸ میلی متر) اثر ضد میکروبی قوی تری داشت. پس از گذشت ۱۱ روز، تعداد فاژهای تثبیت شده از ۱۰^۸ به ۱۰^۶ (PFU/ml) کاهش و از سطح فیلم انتشار یافتند و پس از آن انتشاری صورت نگرفت. فعالیت ضد میکروبی فیلم فعال طی ۱۵ روز، به علت حضور نداشتن مداوم باکتری میزبان کاهش یافت؛ به نحوی که جمعیت باکتری میزبان از ۳ به ۳ LOG CFU/mL افزایش یافت.

نتیجه گیری: علی رغم کاهش فعالیت ضد میکروبی فیلم فعال استات سلولز طی زمان، به علت حضور باکتری میزبان در سطح مواد غذایی و پتانسیل بالای فیلم فعال در نابودی باکتری میزبان، می توان از آن به منظور افزایش ایمنی غذا در بسته بندی مواد غذایی استفاده کرد.

کلمات کلیدی: /شیرشیا، باکتریوفاژ، عوامل ضد میکروبی، استات سلولز، بسته بندی مواد غذایی

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۷/۰۹/۱۷

پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۲۴

انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۱۲/۲۵

موضوع:

مواد ضد میکروبی

IJMM1397;12(6): 399-408

نویسنده مسئول:

یحیی مقصدلو

گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران

پست الکترونیک:

y.magsoudlou@gau.ac.ir

مقدمه

افزایش می دهند. این گونه فیلم ها به محض تماس با سطح ماده غذایی، از رشد میکروبی جلوگیری می کنند (۱). فیلم های ضد میکروبی نوع خاصی از بسته بندی های فعال هستند که ترکیبات ضد میکروبی موجود در آنها، از فساد میکروبی مواد غذایی جلوگیری کرده و خطر رشد میکروارگانیسم های بیماری زا را کاهش می دهند (۲). در واقع بسته بندی فعال شامل برهم کنش هایی بین غذا، ماده

رشد میکروبی در سطح مواد غذایی، از عوامل عمده فساد مواد غذایی است. امروزه به دلیل وجود نگرانی های زیست محیطی و افزایش تقاضای مصرف کنندگان برای محصولات غذایی با کیفیت و ماندگاری بیشتر، به استفاده از فیلم ها و پوشش های زیست تخریب پذیر توجه بیشتری می شود. برخی از این فیلم ها حاوی مواد ضد میکروبی هستند؛ بنابراین عمر نگهداری مواد غذایی را

غذایی، می‌تواند از غیرفعال شدن فاژها طی فراوری مواد غذایی جلوگیری کند (۹). یکی از روش‌های استفاده از فاژها در بسته‌بندی، تثبیت فاژهای لیتیک بر سطح ماده بسته‌بندی است. تثبیت فاژها روی پلیمر مناسب، تماس فاژ با سلول میزبان موجود در سطح مواد غذایی را تسهیل می‌کند، این در حالی است که افزودن فاژ مایع به مواد غذایی موجب به دام افتادن فاژ در ماتریکس مواد غذایی می‌شود. در این روش ابتدا سطح پلیمر، اصلاح شده و معمولاً فاژها از قسمت سر (بار منفی) به جاذب متصل شده و از طریق گیرنده‌های موجود در سطح باکتری، مواد ژنتیکی خود را وارد سلول باکتری کرده و آن را تجزیه کرده و حفراتی به نام پلاک در محیط کشت ایجاد می‌کند (۱۰). تغییر سطح یک پلیمر به‌عنوان یک پیش‌نیاز برای اتصال ترکیبات بیولوژیک محسوب می‌شود؛ به‌دلیل آنکه بیومولکول‌ها برای اتصال به پلیمرها به گروه‌های عاملی خاصی نیاز دارند که این حالت به‌طور معمول در پلیمرها وجود ندارد و تحت عملیات خاصی به‌نام ایجاد خواص عملکردی در سطح پلیمر با تکنولوژی پلاسما میسر می‌شود (۱۱). در روش‌های شیمیایی با وجود سادگی، امکان تغییر نامناسب مشخصات مکانیکی، هدررفتن محلول‌های آلی و سمی بودن برخی از این محلول‌ها وجود دارد که سبب محدودیت کاربرد این‌گونه روش‌ها می‌شود. در مقابل، روش‌های فیزیکی در اصلاح سطوح پلیمری نسبت به روش‌های شیمیایی، دارای بازدهی و کارایی بیشتری هستند. اصلاح سطح پلیمر از طریق پلاسما به‌عنوان یک روش فیزیکی، به‌واسطه الکترون‌ها، اتم‌ها، ذرات برانگیخته، رادیکال‌ها سبب رخ‌دادن فرایندهای شیمیایی بر سطح می‌شود که می‌تواند سطح پلیمر را از لحاظ شیمیایی فعال کرده و خواصی چون چسبندگی را در آن تقویت کند. پلاسما با ایجاد رادیکال‌های آزاد، ترکیبات آلی اشباع‌نشده، پیوندهای متقابل بین مولکول‌های پلیمر و قطع زنجیره‌های پلیمری در سطح پلیمر، موجب فعال شدن سطح و همچنین افزایش دسترسی سطح می‌شود (۱۲). تکنولوژی استفاده از فاژهای تثبیت‌شده برای کنترل و شناسایی باکتری‌های بیماری‌زا، محققان را ملزم به استفاده از جاذب‌های زیستی مناسب کرده است (۱۳). سلولز یکی از فراوان‌ترین پلیمرهای طبیعی است که به‌دلیل داشتن ترکیب و ویژگی‌های فیزیکی مناسب و مقرون‌به‌صرفه و سازگاری با محیط‌زیست، می‌تواند به‌عنوان پلیمری مناسب برای تثبیت مواد بیولوژیکی به کار رود (۱۰). استات سلولز نیز یکی از مشتقات سلولزی است که پلیمری زیست‌تخریب‌پذیر، آمورف، بی‌بو و غیرسمی است (۱۴) که پیش‌بینی می‌شود بتواند پلیمر مناسبی برای تثبیت فاژها باشد. از آنجایی که تاکنون در ایران از فاژها در

بسته‌بندی (یا پوشش) و اتمسفر‌گازی داخل بسته است که در عین حال که کیفیت و امنیت محصول را حفظ می‌کند، قادر به افزایش ماندگاری آن نیز هست (۳). /شرشیا یک باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است که بسیاری از عفونت‌های انسانی مثل گاستروانتریت، مننژیت نوزادان، عفونت کیسه صفرا و مجاری صفراوی، عفونت‌های ادراری و نارسایی‌های کلیوی در کودکان را موجب می‌شود. /شرشیا یکی از عوامل مهم بیماری‌های معده‌ای روده‌ای در انسان است. چهار راه برای انتقال این باکتری به انسان تعریف شده است: انتقال غذازاد، انتقال از طریق آب، تماس با حیوانات و انتقال شخص به شخص که مواد غذایی آلوده به آنها، راهی مناسب برای انتقال این عفونت به انسان است. مواد غذایی با منشأ دامی مانند گوشت، طیور، فراورده‌های غیرپاستوریزه شیر و سوسیس از جمله مهم‌ترین مواد غذایی در انتقال این باکتری به انسان محسوب می‌شوند. در برخی موارد، سبزیجات آلوده به‌ویژه کاهو، اسفناج، سبزی‌های خوراکی، خیار و آب‌میوه‌های غیرپاستوریزه نیز در انتقال آن به انسان نقش دارند (۴). لذا کنترل کیفیت این فراورده‌ها در مراحل تولید، بسته‌بندی و توزیع، حائز اهمیت است (۵). پیدایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها به‌طور عمده ناشی از افزایش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها است که در حال حاضر این مسئله به‌عنوان یک خطر جدی تلقی می‌شود (۶). یکی از روش‌های اجتناب از آلودگی مواد غذایی، عرضه مواد غذایی به‌صورت بسته‌بندی است. به‌کاربردن مقادیر کنترل‌شده‌ای از مواد ضد میکروبی در مواد بسته‌بندی می‌تواند موجب افزایش ماندگاری مواد غذایی شود. با افزایش آگاهی مصرف‌کنندگان مواد غذایی از اثرات مضر نگهدارنده‌های شیمیایی، توجه بشر به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی معطوف شده است (۷). باکتریوفاژها (فاژها) انگل‌های اجباری باکتریایی هستند که برای انسان و حیوان بی‌خطر هستند؛ لذا می‌توانند به‌عنوان عوامل ضد میکروبی طبیعی مناسب در مواد غذایی و یا درمان عفونت‌های باکتریایی انسان به‌کار روند (۸). فاژها می‌توانند در تمام سطوح تولید مواد غذایی از مزرعه تا فراوری و یا ذخیره‌سازی مواد غذایی برای کنترل باکتری‌های بیماری‌زا به کار روند. فاژها می‌توانند با روش‌های غوطه‌وری و یا اسپری کردن در مواد غذایی استفاده شوند؛ اما این روش‌ها موجب هدررفتن و یا غیرفعال شدن ذرات فاژ توسط بقایای مواد ضد عفونی‌کننده‌ای که برای تمیز کردن سطوح فراوری به کار می‌روند، می‌شوند. همچنین استفاده مداوم از فاژها در محیط فراوری، احتمال ایجاد مقاومت باکتریایی ناشی از تداوم حضور فاژ و باکتری را فراهم می‌سازد. بنابراین استفاده از فاژهای لیتیک در بسته‌بندی مواد

آماده‌سازی سویه باکتری، فعال‌سازی و تقویت فاز لیتیک اختصاصی/شرشیاکلی

آمپول لیوفیلیزه باکتری/شرشیا در شرایط استریل و در زیر هود لامینار شکسته شد. سپس با استفاده از سمپلر، حدود ۰/۵ میلی‌لیتر از محیط کشت NB استریل به آن اضافه شد تا سوسپانسیون باکتری حاصل شود. سپس سوسپانسیون باکتری به محیط کشت جامد LB منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شد (۱۸). برای فعال‌سازی فاز مدنظر، ابتدا محیط کشت مایع LB به وسیله کلسیم کلرید غنی سازی شد. تکثیر فازها با استفاده از روش آگار دولایه انجام و سپس پلیت‌ها در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند (۱۰).

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی و مشاهده پلاک فاز و تعیین تیتراژ

ابتدا باکتری/شرشیا به مدت یک شبانه‌روز در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در محیط کشت مایع LB گرم‌خانه‌گذاری شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری میزبان به ۵ میلی‌لیتر محیط نیمه‌جامد LB اضافه و به یک پلیت LB منتقل شد. ۱۵ دقیقه صبر کرده تا محیط سفت شد. سپس از فاز رقت سریال تهیه کرده و ۱۰ میکرولیتر از محلول فاز، به سطح باکتری‌هایی که فعال شده و در فاز رشد قرار گرفته‌اند، اضافه و به صورت چمنی پخش شدند. پلیت‌ها به مدت یک شبانه‌روز در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شدند. سپس با مشاهده پلاک‌ها، به توانایی فاز در تجزیه‌کردن باکتری میزبان پی برده و با شمارش تعداد پلاک‌ها از طریق (رابطه ۱)، تعداد ذرات فاز در سوسپانسیون مشخص شد (۱۹).

$$\text{PFU/ml} = \frac{\text{تعداد پلاک‌ها}}{\text{حجم محلول فاز برده شده روی پلیت} \times \text{رقت}} = \text{تعیین تعداد فاز}$$

تثبیت فاز بر سطح فیلم استات سلولز و تأیید آن با میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM) (Field-Emission Scanning Electron Microscope)

برای تثبیت فاز بر سطح فیلم، ابتدا فیلم‌های اصلاح‌شده با تیمار پلاسما و اصلاح‌نشده به ابعاد ۲×۲ سانتی‌متر برش زده شدند. سپس در ۵ میلی‌لیتر از محلول فاز با تعداد مشخص (PFU/ml) ۱۰^{۱۰}، غوطه‌ور شده و به مدت ۱ شبانه‌روز در دمای ۴ درجه سلسیوس با لرزش آرام انکوبه‌گذاری شدند. سپس فیلم‌ها از محلول حاوی فاز خارج شده و میزان فاز باقی‌مانده در محلول از طریق تهیه

مواد بسته‌بندی استفاده نشده است، هدف از این مطالعه تثبیت فاز لیتیک اختصاصی باکتری/شرشیا بر فیلم استات سلولز و ارزیابی کارایی ضد میکروبی فیلم فعال حاصل، به منظور کنترل رشد این باکتری در شرایط آزمایشگاهی است.

مواد و روش‌ها

باکتری/شرشیا (۱۳۳۰: ATCC) به عنوان باکتری میزبان (هدف) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه و فاز لیتیک اختصاصی آن که به خانواده تکتی‌ویریده تعلق داشت نیز به روش Zare و همکاران (۱۳۹۴) از فاضلاب ایزوله شد (۱۵).

مواد: استات سلولز، استون، ان، ان - دی متیل استامید و گلیسرول (مرک، آلمان)، SM بافر (۵/۸ گرم NaCl، ۲ گرم MgSo4، ۵۰ میلی‌لیتر Tris-HCl ۱ مولار، ۵ میلی‌لیتر محلول ۲ درصد وزنی - حجمی ژلاتین) (مرک، آلمان)، محیط کشت‌های نوترینت براث (Nutrient Broth- NB)، مولر هینتون آگار (Mueller Hinton Agar- MHA) و لوریا برتانی (Luria Bertani-LB) (مرک، آلمان).

تولید و اصلاح فیلم استات سلولز با تکنیک پلاسما

فیلم استات سلولز به روش قالب‌ریزی (Casting) تهیه شد. برای این منظور ابتدا محلول ۴ درصد وزنی - حجمی استات سلولز از طریق افزودن تکه‌های استات سلولز در حلال تهیه شد که حلال‌های استفاده‌شده استون و ان، ان - دی متیل استامید (با نسبت ۲:۱) بود. سپس به میزان ۰/۵ درصد حجم حلال (وزنی - حجمی)، گلیسرول به عنوان نرم‌کننده اضافه شد و محلول حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. در مرحله بعد، محلول پلیمری تهیه‌شده در قالب‌های شیشه‌ای به قطر ۱۰ سانتی‌متر ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در آن با دمای ۴۵ درجه سلسیوس قرار داده شد و پس از خشک‌شدن، فیلم‌ها از سطح قالب جدا و برای تجزیه و تحلیل‌های بعدی در دسیکاتور حاوی سیلیکاژل نگهداری شدند (۱۶). برای اصلاح فیلم نیز، برش‌هایی از فیلم استات سلولز به اندازه ۲×۲ سانتی‌متر تهیه و به مدت ۳۰ ثانیه در اتاقکی به قطر ۳۰ سانتی‌متر، در توان ۴۰ وات و فشار ۲۳۰ میلی‌تور تحت تیمار پلاسمای اتمسفری کم‌فشار قرار گرفتند. سپس فیلم‌های تیمار شده در پوشش‌های در بسته گذاشته و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند (۱۷).

این سوسپانسیون قرار داده شد و میزان باکتری باقی مانده در سوسپانسیون طی ۴ آزمون در روزهای ۱، ۵، ۱۰ و ۱۵ پس از ذخیره سازی فیلم های فعال و شاهد اندازه گیری شد (۲۲).

یافته ها

مشاهده اثر ضد میکروبی فاژ و تشکیل پلاک و تعیین

تیتراژ آن

فاژ اختصاصی باکتری *اشرشیا*، در محیط کشت LB حاوی باکتری *اشرشیا* پلاک های واضحی تشکیل دادند که از طریق نقاط لیز شده و حفرات تشکیل شده در سطح محیط کشت به وضوح قابل رؤیت شدند (شکل ۱). تعداد فاژهای موجود در محلول نیز با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شده و 10^{10} PFU/ml تخمین زده شد.



شکل ۱. باکتری های *اشرشیا* لیز شده و پلاک های ایجاد شده از طریق فاژ با استفاده از روش آگار دولایه

ارزیابی تعداد فاژهای تثبیت شده بر سطح فیلم استات سلولز

پس از غوطه ور کردن فیلم های استات سلولز اصلاح شده با تیمار پلاسما و اصلاح نشده در محلول حاوی 10^{10} PFU/ml به مدت ۲۴ ساعت و خارج کردن فیلم ها از محلول، میزان فاژهای به دام افتاده (تثبیت شده) بر فیلم ها از طریق تفاضل فاژهای موجود در محلول اولیه که با تعیین تیتراژ به دست آمد و فاژهای موجود در محلول پس از خروج فیلم، تخمین زده شد. نتایج حاصل نشان داد که از میزان فاژ اولیه، 10^2 PFU/ml فاژ در محلول باقی مانده که نشان می دهد 10^8 PFU/ml فاژ بر سطح فیلم تثبیت شده است. تصاویر FESEM گرفته شده از سطح فیلم های اصلاح شده، به خوبی تأیید کننده تثبیت یکنواخت فاژها بر سطح فیلم استات سلولز بوده که در شکل ۲ آمده است. همچنین بر سطح فیلم اصلاح نشده نیز 10^4 PFU/ml فاژ شمارش شده که نشان دهنده جذب و اتصالات فیزیکی و تصادفی فاژها به سطح پلیمر بوده که در اثر شست و شوی سطح فیلم در

رقت سریال با روش آگار دولایه تعیین شد. از تفاضل تعداد فاژ اولیه برای تثبیت بر بستر پلیمری و تعداد فاژ باقی مانده در محلول، تعداد فاژهای به دام افتاده (تثبیت شده) محاسبه شد. قبل از استفاده، فیلم ها سه مرتبه در SM بافر شست و شو داده شدند (۱۰). برای تأیید تثبیت شدن فاژها بر سطح فیلم استات سلولز نیز تصویربرداری FESEM (شرکت ZEISS آلمان - مدل Sigma VP) استفاده شد. قبل از عکس برداری از نمونه ها، فیلم ها به مدت ۵ دقیقه با لایه ای از طلا پوشانده شدند. از سیستم تحلیل تصویری با شتاب ولتاژ ۲۶ کیلووات استفاده شد (۲۰).

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی فیلم فعال استات سلولز

برای بررسی اثر ضد میکروبی فیلم فعال از روش انتشار دیسک استفاده شد. ابتدا دیسک هایی به قطر ۶ میلی متر از فیلم فعال استات سلولز تهیه و در پلیت حاوی محیط کشت MHA که از قبل با سوسپانسیونی از باکتری های *اشرشیا* با غلظت 10^6 CFU/ml تلقیح شده است، قرار گرفت. فیلم فاقد فاژ به عنوان کنترل منفی و دیسک حاوی آمپی سیلین نیز به عنوان کنترل مثبت انتخاب شدند. سپس پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری شدند. ناحیه بازدارندگی از طریق اندازه گیری قطر هاله رشد نیافتگی تعیین شد (۲۱).

ارزیابی انتشار و قابلیت ضد میکروبی فاژهای تثبیت شده

طی زمان در محیط مایع

به منظور ارزیابی انتشار فاژهای تثبیت شده از سطح فیلم استات سلولز، برش هایی به قطر ۲/۵ سانتی متر از فیلم فعال تهیه و در ظرف حاوی ۱۰ میلی لیتر SM بافر، قرار گرفت. پس از گذشت ۵ دقیقه، از محلول بافری موجود در ظرف، رقت سریال تهیه شده و میزان فاژهای منتشر شده به محلول با روش آگار دولایه بررسی شد. این آزمون به صورت روزانه از اولین روز تثبیت فاژ بر سطح فیلم تا ۱۴ روز انجام شد (۲۱).

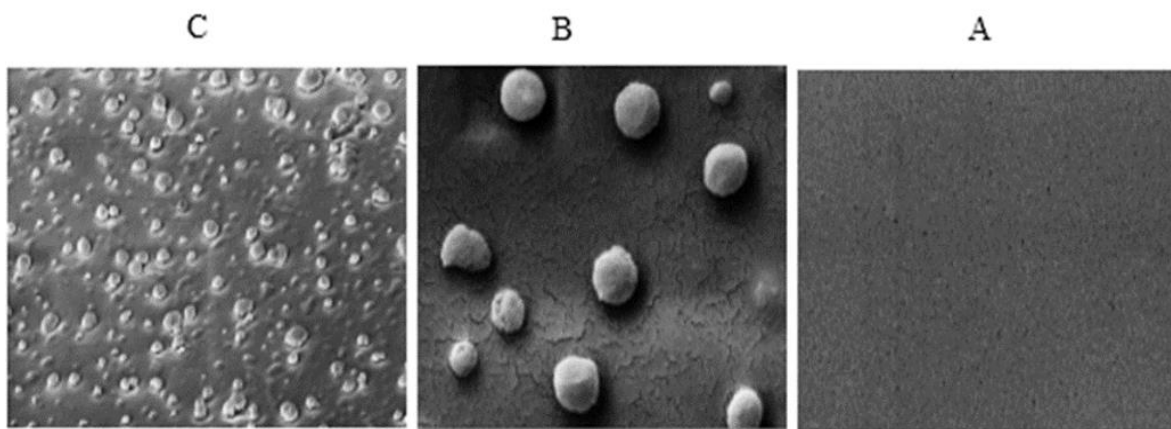
برای ارزیابی قابلیت ضد میکروبی فاژهای تثبیت شده بر سطح فیلم طی ۱۵ روز، فیلم فعال در ظرف غیر قابل نفوذ به هوا در دمای اتاق (۲۵ درجه سلسیوس) ذخیره و از باریم کلرید اشباع نیز برای ایجاد رطوبت نسبی ۸۶-۸۰ درصد استفاده شد. باکتری میزبان نیز به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری شد. سپس سوسپانسیونی از باکتری با رقت 10^3 CFU/ml تهیه و برش هایی به قطر ۲/۵ سانتی متر از فیلم های فعال و شاهد (فیلم اصلاح نشده و اصلاح شده توسط پلاسما) تهیه و در ۹ میلی لیتر از

منفی، هیچ‌گونه هاله رشدنیافتگی تشکیل نداد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که اصلاح فیلم با پلاسما، هیچ‌گونه اثر ضد میکروبی در آن ایجاد نکرده است. دیسک آمپی‌سیلین نیز به‌عنوان نمونه کنترل مثبت هاله رشدنیافتگی به قطر ۸ میلی‌متر تشکیل داد. قطر هاله رشدنیافتگی اطراف فیلم فعال استات سلولز ۱۲ میلی‌متر بود که نشانگر اثر ضد میکروبی فاژ لیتیک اختصاصی نسبت به باکتری / شرشیا است. میزان این اثر از آنتی‌بیوتیک به‌کاررفته نیز بیشتر بود.

محلول SM بافر، میزان آن به حد غیرقابل‌شمارش کاهش یافته است.

مشاهده فعالیت ضد میکروبی فیلم فعال استات سلولز

اثر ضد میکروبی فیلم زیست‌فعال استات سلولز، در محیط کشت MHA تلقیح شده با / شرشیا در دمای ۳۷ درجه سلسیوس ارزیابی شد. فعالیت ضد میکروبی فازهای تثبیت‌شده علیه باکتری مذکور، به‌صورت کمی و کیفی در محیط آزمایشگاه با مشاهده و اندازه‌گیری قطر هاله رشدنیافتگی تعیین شد. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، فیلم استات سلولز فاقد فاز به‌عنوان نمونه کنترل



شکل ۲. تصاویر FESEM از فازهای لیتیک اختصاصی شرشیا تثبیت‌شده بر سطح فیلم استات سلولز

A: فیلم استات سلولز فاقد فاز (نمونه کنترل)؛ B: فازهای تثبیت‌شده بر سطح فیلم استات سلولز؛ C: تراکم و یکنواختی فازهای تثبیت‌شده بر سطح فیلم استات سلولز اصلاح‌شده

ارزیابی انتشار فازهای تثبیت‌شده از سطح فیلم و قابلیت ضد میکروبی آنها در محیط مایع طی زمان

پس از قراردادن فیلم اصلاح‌شده با تیمار پلاسما در سوسپانسیون از فاژ با غلظت 10^{10} PFU/ml، به میزان 10^8 PFU/ml از ذرات فاژ بر سطح آن تثبیت شد. انتشار فازها از سطح فیلم طی ۱۴ روز اندازه‌گیری شد که نتایج آن در شکل ۴ آورده شده است. همان‌طور که از شکل ۵ مشاهده می‌شود، پس از گذشت ۱۱ روز از زمان تثبیت فازها بر سطح فیلم، میزان فازهای تثبیت‌شده از 10^8 به 10^6 کاهش یافت. دلیل این امر می‌تواند وجود اتصالات ضعیف میان برخی از فازها با سطح پلیمر باشد که در اثر قرارگیری روزانه در محلول بافری به‌مدت ۱۱ روز، به درون محلول منتشر شده‌اند. همچنین پس از روز ۱۱ تا پایان روز ۱۴ کاهش در میزان فازهای تثبیت‌شده مشاهده نشد که بیانگر ایجاد اتصالات قوی میان بسیاری از فازها با سطح پلیمر بوده است. همان‌طور که گفته شد،

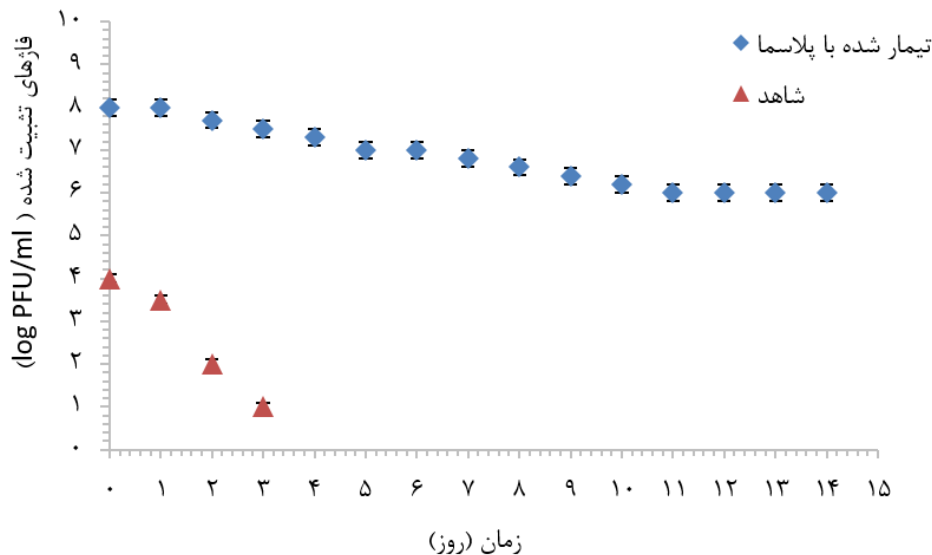


شکل ۳. اثر ضد میکروبی فیلم زیست‌فعال استات سلولز دارای فاژ لیتیک اختصاصی / شرشیا علیه باکتری / شرشیا

A: نمونه کنترل منفی (فیلم فاقد فاژ)، B: فیلم فعال (دارای فاژ تثبیت‌شده)، C: نمونه کنترل مثبت (دیسک آمپی‌سیلین)

شناسایی رسیده است. این مسئله کارایی تیمار پلاسما در اصلاح سطح فیلم استات سلولز و در نتیجه کارایی آن در تثبیت فاژ بر سطح فیلم را به خوبی نشان می‌دهد.

فیلم شاهد (تیمار نشده با پلاسما) پس از غوطه‌ور شدن در سوسپانسیون فاژ با غلظت 10^{11} PFU/ml، حدود 10^4 ذره فاژی را از طریق جذب فیزیکی به سطح خود جذب کرده که نتایج ارزیابی انتشار فاژ آن نشان داد که این میزان در روز سوم به زیر حد



شکل ۴. نمودار انتشار فازهای تثبیت شده از سطح فیلم استات سلولز (فعال و فاقد فاز) طی زمان

جمعیت باکتری‌ها را از 10^3 CFU/ml به زیر حد شناسایی (کمتر از ۱ سیگل لگاریتمی) کاهش داده است. اما با گذشت زمان، میزان اثر ضد میکروبی فیلم فعال کاهش یافته است؛ به طوری که در روز ۱۵ پس از ذخیره سازی فیلم‌ها، جمعیت باکتریایی افزایش و به $5/3$ (log CFU/ml) رسیده است و فیلم فعال نتوانسته مانند روزهای اولیه پس از تولید و تثبیت فاژ، مانع رشد میکروبی شود. این مسئله مربوط به ازدست رفتن بقای فاژ در فیلم در شرایط آزمایشگاهی است؛ زیرا فیلم فعال طی ذخیره سازی در تماس با ماده غذایی نبوده است. در نتیجه فازهای تثبیت شده بر سطح آن نیز در تماس با باکتری نبوده‌اند. بنابراین می‌توان گفت که فازها نمی‌توانند به مدت طولانی بدون باکتری میزبان به بقای خود ادامه دهند. با این حال می‌دانیم که عمر نگهداری محصولات یخچال گذاری شده معمولاً بین ۱۰-۳ روز است؛ چنانچه از این فیلم فعال در کنترل جمعیت باکتریایی این محصولات استفاده شود، می‌تواند کارآمد واقع شود.

نتایج ارزیابی قابلیت ضد میکروبی فازهای تثبیت شده بر سطح فیلم در محیط مایع طی زمان

پس از ذخیره سازی فیلم‌های فعال (دارای فاژ تثبیت شده) و شاهد طی ۱۵ روز در ظرف نفوذناپذیر به هوا، در رطوبت نسبی ۸۶-۸۰ درصد در دمای اتاق، فیلم‌ها در فواصل زمانی ۵ روزه در سوسپانسیون حاوی 10^2 CFU/ml از باکتری میزبان (شرشیا) قرار گرفتند و پس از ۲۴-۱۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، جمعیت باکتری‌های /شرشیا باقی مانده در سوسپانسیون، در روزهای ۱، ۵، ۱۰ و ۱۵ شمارش شد که نتایج آن در جدول ۱ آورده شده است.

همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، نمونه‌های فیلم شاهد فاقد فاژ (اصلاح نشده و اصلاح شده با پلاسما) هیچ‌گونه اثر ضد میکروبی از خود نشان نداده‌اند. اثر ضد میکروبی فیلم فعال نیز با گذشت زمان کاهش یافته است؛ به طوری که در روز اول پس از آماده سازی فیلم و تثبیت فاژ، فیلم اثر ضد میکروبی قوی داشته و

جدول ۱. قابلیت ضد میکروبی فیلم زیست فعال در محیط مایع طی زمان

نمونه	تعداد باکتری (LOG CFU/ML)			
	آزمون اول (روز ۱)	آزمون دوم (روز ۵)	آزمون سوم (روز ۱۰)	آزمون چهارم (روز ۱۵)
فیلم زیست فعال استات سلولز دارای فاز تثبیت شده	≤۱	۱/۲	۳/۸	۵/۳
نمونه شاهد (فیلم استات سلولز اصلاح نشده)	۶/۵	۶/۳	۶	۶/۸
نمونه شاهد (فیلم استات سلولز اصلاح شده با پلاسما)	۵/۸	۶/۲	۵/۹	۶/۱

بحث و نتیجه گیری

الکترونیک هوا برای اصلاح سطح نانوفیبرهای کیتوسان و تثبیت آنزیم استیل کولین استراز استفاده کردند. نتایج آنها نشان داد که اعمال پلاسمای تخلیه سد دی الکترونیک سبب افزایش میزان فعالیت دسترسی، فعالیت سطح و تثبیت آنزیم بر آن شده است (۲۷). همچنین Wang و همکاران (۲۰۱۵) نیز از تکنیک پلاسما برای اصلاح سطح پلیمر پلی هیدروکسی آلکونات و تثبیت فاز لیتیک اختصاصی / شرشیا بر آن استفاده کردند. نتایج آنها نشان داد که استفاده از تیمار پلاسما به علت اصلاح گروه های عملکردی و تغییر در پیوندهای شیمیایی در سطح پلیمر، موجب افزایش اتصالات فازها به سطح پلیمر شده است که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت داشت (۱۷).

Gouvea و همکاران (۲۰۱۵)، کارایی ضد میکروبی فیلم زیست تخریب پذیر استات سلولز حاوی سوسپانسیون از فازهای PaDTA۱۰، PaDTA۹، PaDTA۱، BSFE۱۸، BFSE۱۶، PaDTA۱۱ را در مقابل باکتری سالمونلا تیفی موریوم بررسی کردند. طبق نتایج این محققان، فیلم حاوی فاز در محیط کشت حاوی سالمونلا تیفی موریوم، هاله بازدارندگی مناسبی تشکیل داد که با نتایج آزمون انتشار دیسک فیلم فعال حاوی فاز در این پژوهش مطابقت داشت (۲۱).

همچنین Anany و همکاران (۲۰۱۱)، از فازهای EcoM-HG۳، EcoM-HG۲، و EcoM-HG۱۰ (EcoM-HG) و (LinM-AG) و LmoM-AG۱۳ و LmoM-AG۲۰ در ساختار غشای سلولزی به ترتیب برای کنترل باکتری های لیستریا منوسیوتوز و شرشیا در گوشت استفاده کردند. نتایج این تحقیقات نشان داد که فازهای مورد آزمون، علیه باکتری های لیستریا منوسیوتوز در گوشت های آماده به مصرف و / شرشیا در گوشت خام اثر ضد میکروبی مؤثری داشتند (۱۰). در مطالعه ای دیگر Vonasek و

کنترل مؤثر پاتوژن های غذازاد و شناسایی سریع آنها در مواد غذایی، امری ضروری برای اطمینان از ایمنی غذایی مصرف کنندگان است. اساس برخی از بسته بندی های فعال، استفاده از فیلم ها به همراه مواد ضد میکروبی است که باعث محدود کردن یا کاهش رشد میکروارگانیسم ها در سطح مواد غذایی می شود. فازها به عنوان عوامل ضد میکروبی طبیعی کاندیدای مناسبی برای استفاده در مواد غذایی هستند (۱۰). Soltan Dallal و همکاران (۲۰۱۶)، اثر ضد میکروبی فاز لیتیک اختصاصی جداسازی شده از فاضلاب را بر باکتری / شرشیا بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که فازهای استخراج شده، به خوبی قادر به لیز کردن و از بین بردن باکتری / شرشیا بودند و پلاک های مؤثری در سطح محیط کشت تشکیل دادند (۲۳). همچنین Singh و همکاران (۲۰۱۶)، اثر ضد میکروبی فاز جداسازی شده از نمونه فاضلاب را بر کاهش باکتری / شرشیا به عنوان یک باکتری بیماری زای غذازاد بررسی کردند. در بررسی آنها نیز پلاک های شفافی در سطح محیط کشت ظاهر شد که نشان دهنده اثر ضد میکروبی فاز جداسازی شده علیه باکتری میزبان بود (۲۴). مشابه یافته های مطالعات ذکر شده، نتایج این پژوهش نیز نشان داد که فازهای لیتیک آزموده، اثر ضد میکروبی مؤثری بر باکتری / شرشیا داشتند و موجب تشکیل حفره هایی به نام پلاک در سطح محیط کشت شدند. یک استراتژی برای کاربرد فازها در بسته بندی مواد غذایی، تثبیت فازها روی یک ماده جاذب است (۲۵). اصلاح سطح پلیمر از طریق پلاسما، یکی از روش های فیزیکی است که برای اصلاح سطوح زیستی به منظور افزایش جذب پروتئین، تکثیر و چسبندگی سلول های بیولوژیکی و دارو بر زیر لایه های پلیمری به کار گرفته می شود (۲۶). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که استفاده از تکنیک پلاسما موجب تثبیت مؤثر فازها در سطح پلیمر شده است. Darki و همکاران (۱۳۹۳)، از روش پلاسمای تخلیه سد دی

میکروبی نیز نشان داد که فیلم فعال استات سلولز، اثر ضد میکروبی مناسبی علیه باکتری /شرشیا داشته و میزان اثر ضدباکتریایی آن از آنتی بیوتیک آمپی سیلین نیز بیشتر بوده است. لذا از فیلم فعال استات سلولز می توان برای کاهش باکتری های بیماری زا در بسته بندی مواد غذایی استفاده کرد.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از رساله دکتری دانشکده صنایع غذایی از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان است. نویسندگان این مقاله از گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی دانشکده صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و همچنین گروه زیست شناسی دانشگاه ملایر به خاطر کمک های علمی و اجرایی در انجام این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را به عمل می آورند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Siragusa GR, Dickson JS. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on beef tissue by application of organic acids immobilized in a calcium alginate gel. *Journal of Food Science*. 1992; 57(2): 293-6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb05479.x>
2. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int J Food Microbiol*. 2004; 94(3): 223-53. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
3. Labuza TP, Breene WM. Applications of Active Packaging for Improvement of Shelf-life and Nutritional Quality of Fresh and Extended Shelf-life Foods 1. *J Food Process Preserv*. 1989; 13(43): 9-252.
4. Doyle MP, Schoeni JL. Isolation *Escherichia coli* O157: H7 from retail fresh meats and poultry. *Appl Environ Microbiol*. 1987; 53(10): 2394-6.
5. Horrocks SM, Anderson RC, Nisbet DJ, Ricke SC. Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. *Anaerobe*. 2009; 15(1-2): 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2008.09.001>
6. Molla B, Mesfin A, Alemayehu D. Multiple antimicrobial-resistant *Salmonella* serotypes isolated from chicken carcass and giblets in Debre Zeit and Addis Ababa, Ethiopia. *Ethiop J Health Dev*. 2003; 17(2):131-49.

همکاران (۲۰۱۴)، اثر ضد میکروبی فاز T_۴ در فیلم ایزوله پروتئین آب پنیر (Whey Protein Isolate-WPI) را در برابر باکتری /شرشیا سنجیدند. نتایج آنها نشان داد که فیلم فعال توانست به طور مؤثری از رشد باکتری /شرشیا جلوگیری کند (۱۹). در این پژوهش نیز مشابه مطالعات قبلی، فیلم های فعال استات سلولز، توانایی ایجاد هاله رشد نیافتگی مؤثری در اطراف باکتری /شرشیا به عنوان باکتری میزبان را داشتند که البته میزان اثر ضد میکروبی آن از آنتی بیوتیک آمپی سیلین (نمونه کنترل مثبت) نیز بیشتر بود.

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، فیلم های اصلاح شده به وسیله تکنیک پلازما توانایی مناسبی برای تثبیت فازها از خود نشان دادند. به طوری که فازهای تثبیت شده طی دوره ۱۴ روزه، فقط به اندازه ۲ سیکل لگاریتمی از سطح فیلم جدا شدند که بیانگر تشکیل اتصالات قوی میان بسیاری از فازها با سطح فیلم توسط پلازما بوده است. بنابراین می توان چنین نتیجه گرفت که پلازما روش بسیار مناسبی برای تثبیت فاز بر سطح پلیمر بوده است. نتایج

7. Meshkani M, Mortazavi A, Pourfallah Z. Antimicrobial and physical properties of a chickpea protein isolate-based film containing essential oil of thyme using response surface methodology. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*. 2013; 8(1): 93-104.
8. Sharma M, Goodridge L. Bacteriophages: back to the future. *Food Technology*. 2013; 67(5): 46-55.
9. Hagens S, Loessner MJ. Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations. *Curr Pharm Biotechnol*. 2010; 11(1): 58-68. <https://doi.org/10.2174/138920110790725429>
10. Anany H, Chen W, Pelton R, Griffiths MW. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in meat by using phages immobilized on modified cellulose membranes. *Appl Environ Microbiol*. 2011; 77(18): 6379-87. <https://doi.org/10.1128/AEM.05493-11>
11. Goddard JM, Hotchkiss JH. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Prog Polym Sci*. 2007; 32(7): 698-725. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.04.002>
12. Fridman A, Friedman G. *Plasma Medicine*. First Edition. 2013: 448-82.
13. Sun W, Brovko L, Griffiths M. Use of bioluminescent *Salmonella* for assessing the efficiency of constructed phage-based biosorbent. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2001; 27(2): 126-8. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000198>
14. Cerqueira DA, Rodrigues Filho G, Carvalho RD, Valente AJ. 1H-NMR characterization of cellulose acetate obtained from sugarcane bagasse. *Polímeros*.

- 2010; 20(2): 85-91. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282010005000017>
15. Zare L, Shenagari M, Mirzaei MKH, Mojtahedi A. Isolation of lytic phages against pathogenic E.coli isolated from diabetic ulcers. Iran J Med Microbiol 2018; 11 (2): 34-41.
16. Aghaei Z, Emadzadeh B, Ghorani B, Kadkhodaei R. Investigation of the Hallucoremic behavior of cellulose acetate film containing a bromothymole blue. New food Technol. 2016; 4(14): 55-66. [In Persian]. http://jift.irost.ir/article_390_f6ecda9f4ee216eabf5b0c678bf19607.pdf.
17. Wang C, Sauvageau D, Elias AL. Immobilization of Active Bacteriophages on Polyhydroxyalkanoate Surfaces. ACS Appl Mater Interfaces. 2015; 1-42.
18. Ranjbar M, Sharifiyan A, Shabani Sh, Amin Afshar M. Antimicrobial effect of Garlic extract on Staphylococcus aureus and Escherichia coli bacteria in a cook ready chicken to meal model. Food Technology and Nutrition . 2014; 11 (4): 57-68.
19. Vonasek E, Le P, Nitin N. Encapsulation of bacteriophages in whey protein films for extended storage and release. Food Hydrocoll. 2014; 37: 7-13. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.09.017>
20. Tolba M, Minikh O, Brovko LY, Evoy S, Griffiths MW. Oriented immobilization of bacteriophages for biosensor applications. Appl Environ Microbiol. 2010; 76(2): 528-35. <https://doi.org/10.1128/AEM.02294-09>
21. Gouvêa DM, Mendonça RC, Soto ML, Cruz RS. Acetate cellulose film with bacteriophages for potential antimicrobial use in food packaging. LWT-Food Science and Technology. 2015; 63(1): 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.014>
22. Sohar J, Griffiths M. Immobilization of bacteriophages for the control and detection of food-borne pathogens. A Thesis presented to The University of Guelph. 2014; Guelph, Ontario, Canada.
23. Soltan Dallal MM, Imeni SM, Nikkhahi F, Rajabi Z, Salas SP. Isolation of E. Coli Bacteriophage from Raw Sewage and Comparing Its Antibacterial Effect with Ceftriaxone Antibiotic. Int J Adv Biotechnol Res. 2016; 7(3): 385-91.
24. Singh V, Jain P, Dahiya S. Isolation and characterization of bacteriophage from waste water against E.coli, a food born pathogen. Asian J Microbiol Biotechnol Environ Sci. 2016; (1): 163-70.
25. Griffiths MW. Phage-based methods for the detection of bacterial pathogens. In Bacteriophages in the control of food-and waterborne pathogens. American Society of Microbiology. 2010 : 31-59. <https://doi.org/10.1128/9781555816629.ch3>
26. Geyter ND, Morent R, Leys C. Surface modification of a polyester non-woven with a dielectric barrier discharge in air at medium pressure. Surface & Coatings Technology. 2006; 201 (6): 2460-6. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2006.04.004>
27. Darki N, Navab Safa N, Ranaei Siadat SO, Jahanfar M, Ghasemi S, Ghomi H. Modification of chitosan/PEO nanofiber surface by dielectric barrier discharge plasma for bio applications. 15th surface engineering national conference, Materials and Energy research center. 2014; October 22.