

[10.30495/JFH.2020.671488](https://doi.org/10.30495/JFH.2020.671488)

«مقاله پژوهشی»

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

فرهاد جهاننیده^۱، جلال شایق^{۲*}، سمیه حسین زاده^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 صنایع شیر است که قادر به تولید بیوفیلم می‌باشد. بیوفیلم تولید شده توسط این باکتری باعث مقاومت آن در برابر عوامل ضد میکروبی می‌گردد. غیرفعال کردن میکروارگانیسم‌ها با استفاده از پلاسمای سرد اتمسفری یکی از روش‌های جدید در صنایع غذایی می‌باشد. در این مطالعه جهت بررسی اثر ضدباکتریایی و ضدبیوفیلمی پلاسمای سرد اتمسفری، از دستگاه تخلیه سد دی‌الکترونیک استفاده شد. تعداد ۲۰ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس به‌دست‌آمده از شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی، در بازه‌های زمانی ۵ تا ۲۰ ثانیه در معرض پلاسمای قرار گرفت و اثر ضدباکتریایی آن با اندازه‌گیری قطر هاله مهار رشد محاسبه شد. برای ارزیابی اثرات ضدبیوفیلمی، جدایه‌ها به مدت ۵ ثانیه تحت تیمار با پلاسمای قرار گرفتند و پس از ۲۴ ساعت میزان تشکیل بیوفیلم بررسی شد. نتایج نشان داد که با افزایش زمان شارش پلاسمای بر جدایه‌ها، کاهش قابل توجهی در میزان رشد باکتری‌ها مشاهده می‌شود. همچنین آنالیز آماری نتایج حاصل از الایزا ریدر نشان داد که در معرض قرارگیری جدایه‌ها با پلاسمای به‌طور معنی‌داری ($p < 0/05$) باعث کاهش تولید بیوفیلم شده است. این نتایج حاکی از آن است که پلاسمای می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های آلودگی‌زدایی حرارتی باشد. با این حال، کاربرد آن مستلزم انجام مطالعات بیشتر با هدف تعیین شدت و مدت زمان مواجهه میکروارگانیسم‌ها با پلاسمای است.

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

مقدمه

مختلف است که در داخل نوعی ماتریکس خارج سلولی و بی شکل 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 این رو 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 ضد میکروبی توسعه یافته برای استریل کردن سطوح آلوده و مواد غذایی، استفاده از پلاسمای سرد اتمسفری است. این فناوری از سال ۱۹۹۰ میلادی مورد توجه قرار گرفته 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 تولید شده در دمای اتاق و در فشار اتمسفری می‌باشد (Noriega et al., 2012; Fernandez et al., 2011).

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

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 ۱۸-۴/۱ 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 (Gajdacs, 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 ضد میکروبی توانایی تشکیل بیوفیلم است (Langsrud, 2009). بیوفیلم انباشتی از سلول‌های میکروبی روی سطوح

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 این رو 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. بدین ترتیب که مقدار ۲۰۰ میکرو لیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی تهیه‌شده در محیط تریپتیکاز سوی براث (Ibresco, Italy) حاوی یک درصد گلوکز ($OD_{600} = 0.3, \sim 10^7$ CFU/ml) به سه چاهک اضافه شد. جهت جلوگیری از دهیدراتاسیون، میکروپلیت‌ها با پارافیلیم پوشانده شده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۴ 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

دی‌الکتریک مانع از عبور جریان شدید میان دو الکتروود و وقوع جرقه می‌گردد. یون‌ها و گونه‌های فعال هیدروکسیل، اکسیژن، اوزون، پراکسید هیدروژن و همچنین نور ماوراءبنفش در اثر یونیزاسیون گاز و ایجاد پلازما به‌وجود می‌آیند و از اصلی‌ترین عوامل نابودسازی میکروارگانیسم‌ها توسط پلاسمای سرد به‌شمار می‌روند. از این‌رو، در بسیاری از موارد از پلازما 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 ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی پلاسمای سرد اتمسفری روی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از ورم‌پستان گاوی است.

مواد و روش کار

- جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

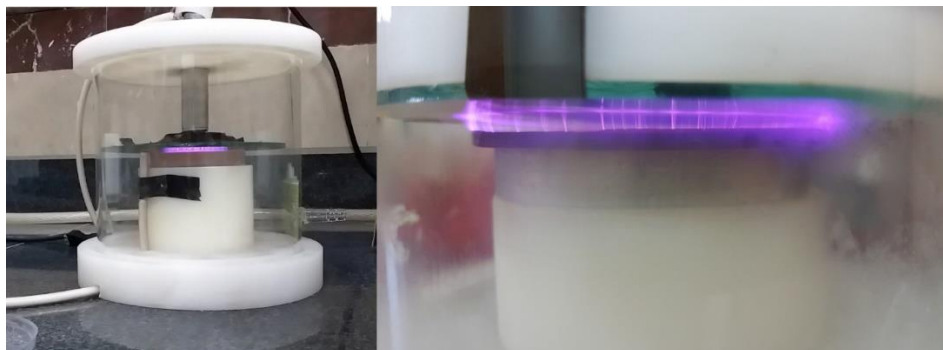
در کل تعداد ۲۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* در این تحقیق استفاده شد. این جدایه‌ها قبلاً از شیر گاوهای

دی الکتریک یا DBD است. این ساختار شامل دو الکترود تخت از جنس آلومینیوم با قطر ۸۰ میلی متر است. از شیشه با ضخامت ۳ میلی متر و با قطر ۱۳ سانتی متر به عنوان عایق استفاده گردید. از هوا به عنوان 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 تولید شده میان دو الکترود در هوا حین پردازش نمونه را نشان می دهد. در این شکل، استیمرهای ریز با نور آبی و بنفش که بیانگر جایگزینی یون ها و الکترون ها در آرایه هایی از خطوط جریان می باشد، دیده می شوند.

شست و شو و در شرایط محیطی خشک گردیدند. سپس میزان تشکیل بیوفیلم با افزودن ۱۵۰ میکرو لیتر اتانول ۹۵ درصد و اندازه گیری شدت رنگ ایجاد شده با دستگاه الایزا ریدر (Anthos 2020, Austria) در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری شد. از محیط کشت TSB تلقیح نشده به عنوان کنترل منفی و از اتانول ۹۵ درصد به عنوان 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 پلاسمای در این تحقیق، تخلیه سد



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

سوسپانسیون های باکتریایی در طول موج ۶۰۰ نانومتر تنظیم شد و به وسیله سواب بر روی چهار محیط کشت مولر هیتتون آگار (Ibresco, Italy) به صورت چمنی (Spread Plate Method) کشت داده شدند. پس از ۳ الی ۵ دقیقه که سطح آگار خشک شد، پلیت ها در معرض پلاسمای سرد اتمسفری قرار گرفتند. بدین

- اثر ضد باکتریایی پلاسمای سرد اتمسفری

فعالیت ضد باکتریایی پلاسمای با استفاده از روش پلیت انجام شد. جدایه های باکتریایی در لوله حاوی محیط مولر هیتتون برات (Ibresco, Italy) تلقیح شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گزمنخانه گذاری گردیدند. سپس کدورت هر کدام از

ریخته شده و پلیت به مدت ۵ ثانیه در معرض پلاسما قرار گرفت. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قبل و بعد از در معرض قرارگیری به داخل سه چاهک میکروپلیت ریخته شدند. در ادامه نمونه‌ها در دو گروه شاهد (کنترل) و گروه آزمایش یا تیمار (نمونه‌های تحت پلاسما) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گزمنخانه‌گذاری 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

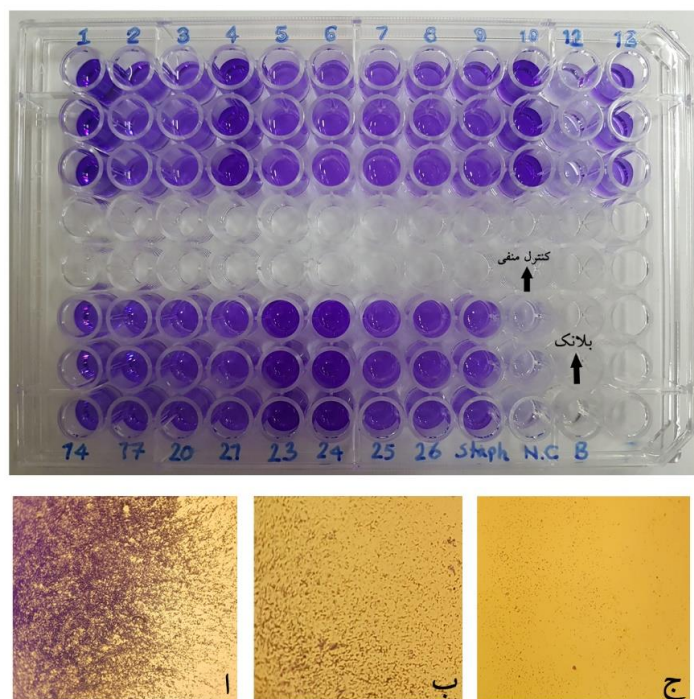
- قابلیت تولید بیوفیلم

داده‌های به دست آمده 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 از نظر آماری معنی‌دار بود (جدول ۱). شکل (۲) نتایج آزمون ماکروسکوپی و میکروسکوپی تشکیل بیوفیلم در جدایه‌ها را نشان می‌دهد.

ترتیب که فاصله سطح محیط کشت با الکتروود ۵ میلی‌متر، فرکانس اعمال شده 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 به مدت ۲۴ ساعت به صورت هوازی گزمنخانه‌گذاری 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 هر کدام از آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است در آزمایش‌های اولیه، به دنبال 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 کشت شده و پس از ۲۴ ساعت گزمنخانه‌گذاری 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 تهیه شده به داخل پلیت استریل



شکل (۲) - نتایج آزمون ماکروسکوپی و میکروسکوپی تشکیل بیوفیلم در جدایه‌ها؛ شکل بالا: میزان تشکیل بیوفیلم در میکروپلیت به روش رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله؛ شکل‌های پایین: تفاوت میکروسکوپی با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر میزان‌های مختلف بیوفیلم را نشان می‌دهد: الف) جدایه‌های ۱، ۴، ۱۰، ۲۳ و ۲۴، ب) بقیه جدایه‌ها، ج) جدایه ۱۲.

از ۲۴ 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 به ترتیب 7.0 ± 2 ، 6.1 ± 2 ، 5.0 ± 2 و 3.5 ± 2 میلی‌متر مربع بود.

- 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 پلاسمای به مدت ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ ثانیه روی جدایه‌ها، کاهش قابل توجهی در میزان رشد باکتری پس



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

قرارگیری جدایه‌ها با پلاسمای سرد اتمسفری در سطح احتمالی یک درصد به‌طور معنی‌داری ($p < 0/05$) باعث کاهش تولید بیوفیلم می‌گردد (جدول ۱).

اثر ضد بیوفیلمی پلاسمای سرد اتمسفری
میزان تشکیل بیوفیلم در جدایه‌ها پس از قرار گرفتن به مدت 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

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	میانگین OD بیوفیلم جدایه‌ها (بعد از تیمار)
۱	۰/۲۸۳	۰/۲۲۳
۲	۰/۱۱۲	۰/۰۹۴
۳	۰/۱۵۱	۰/۱۳۶
۴	۱/۰۱۴	۰/۹۱۳
۵	۰/۱۵۵	۰/۱۳۲
۶	۰/۱۲۴	۰/۱۱۹
۷	۰/۱۳۷	۰/۱۲۹
۸	۰/۱۴۲	۰/۱۳۸
۹	۰/۱۱۶	۰/۱۱۰
۱۰	۱/۰۰۷	۰/۹۰۰
۱۲	۰/۰۸۷	۰/۰۸۷
۱۳	۰/۱۲۶	۰/۱۲۱
۱۴	۰/۰۹۴	۰/۰۹۱

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

میانگین OD بیوفیلیم جدایه‌ها		شماره نمونه
قبل از تیمار	قبل از تیمار	
۰/۱۳۸	۰/۱۴۲	۱۷
۰/۱۲۹	۰/۱۴۲	۲۰
۰/۱۱۱	۰/۱۳۸	۲۱
۰/۹۲۰	۱/۰۲۹	۲۳
۰/۲۰۴	۰/۲۶۵	۲۴
۰/۱۰۱	۰/۱۱۰	۲۵
۰/۰۹۳	۰/۱۰۵	۲۶
۰/۱۰۸	۰/۱۱۰	نمونه استاندارد
۰/۰۴	۰/۰۴	کنترل منفی

بحث و نتیجه گیری

نمونه‌های بالینی بودند (Pereyra *et al.*, 2016). هم‌چنین در مطالعه حاضر مشخص شد با وجود این‌که همه جدایه‌های مورد مطالعه قادر به تولید بیوفیلیم بودند اما قدرت تولید بیوفیلیم در آن‌ها متفاوت بود که این امر می‌تواند ناشی از تنوع در سویه‌های این‌گونه باشد (Tasse *et al.*, 2018).

بیوفیلیم تولید شده توسط استافیلوکوکوس اورئوس باعث مقاومت باکتری نسبت به مواد پاک‌کننده و ضد عفونی‌کننده شیمیایی از جمله سدیم هیپوکلریت، هیدروژن پراکسید، 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 بیوفیلیم، پلاسمای سرد اتمسفری اثر قابل توجهی را در برابر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها، از جمله سویه‌های تشکیل-

توانایی تشکیل بیوفیلیم 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 بیوفیلیم است که ایمنی مواد غذایی را به خطر می‌اندازند (Marchand *et al.*, 2012).

در مطالعه حاضر، تمامی ۲۰ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از ورم‌پستان بالینی گاو قادر به تولید بیوفیلیم بودند. این نتیجه نشان می‌دهد که جدایه‌های تولید کننده بیوفیلیم می‌توانند با موارد ورم‌پستان بالینی گاو ارتباط داشته باشند. در مطالعه‌ای که روی ۴۰ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از شیر گاوهای مبتلا به ورم‌پستان بالینی و تحت‌بالینی انجام شده بود، میزان تشکیل بیوفیلیم قوی در ۷۰ درصد جدایه‌ها مربوط به

پلاسمای سرد اتمسفری استفاده کردند، نشان داده شد که این روش با توجه به زمان در معرض قرارگیری، اثر تخریبی زیادی روی این باکتری دارد (Hamed and Mahmood., 2003).

در مطالعه حاضر، میزان تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های تیمار شده با پلاسما در طی ۵ ثانیه به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) کاهش یافت. این نتیجه می‌تواند در راستای مطالعات انجام شده در این زمینه باشد. در مطالعه‌ای اثر ضد میکروبی پلاسمای سرد اتمسفری تولید شده توسط تخلیه سد دی‌الکتریک بر میزان تولید بیوفیلم در باکتری *انتروکوکوس فکالیس* بررسی شد و نشان دادند که قابلیت تولید بیوفیلم در جدایه‌ها به‌مقدار زیادی کاهش یافت (Jiang et al., 2012). در مطالعه دیگر نیز نشان دادند که فناوری پلاسمای سرد اتمسفری یک استراتژی مؤثر برای غیرفعال کردن تولید بیوفیلم می‌باشد (Ziuzina et al., 2015). هم‌چنین در مطالعه دیگری نشان داده شد که پلاسمای سرد اتمسفری تولید شده توسط تخلیه سد دی‌الکتریک توانایی قابل‌توجهی در کاهش تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها دارد (Razuqi et al., 2017). با این حال، نوع باکتری تولیدکننده بیوفیلم بر روی عملکرد پلاسمای سرد اتمسفری اثر می‌گذارد (Ziuzina et al., 2015). این تکنیک نسبت به سایر فناوری‌های موجود در مورد آلودگی‌زدایی در صنعت مواد غذایی، مزایایی دارد، از جمله: (۱) یک فرآیند خشک است؛ (۲) به انرژی بسیار کمی نیاز دارد؛ (۳) به راحتی با محیط تولید مواد غذایی سازگار می‌شود؛ (۴) گونه‌های واکنشی‌گازها در عرض چند دقیقه تا چند ساعت پس از تیمار به حالت گاز اولیه برمی‌گردند؛ (۵) به مدت‌زمان کوتاهی جهت آلودگی‌زدایی نیاز دارد؛ (۶)

دهنده بیوفیلم مقاوم به آنتی‌بیوتیک نشان داده است (Ziuzina et al., 2015).

در مطالعه حاضر، از تخلیه سد دی‌الکتریک برای تولید پلاسمای سرد اتمسفری با ولتاژ بالا استفاده شد و قدرت ضدباکتریایی و ضدبیوفیلمی آن در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های جدا شده از موارد ورم‌پستان بالینی گاو مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه ما، با افزایش زمان شارش پلاسمای سرد اتمسفری بر روی جدایه‌ها، کاهش قابل‌توجهی در میزان رشد باکتری‌ها مشاهده گردید. این نتیجه در توافق با نتایج به‌دست‌آمده از سایر مطالعات است که نشان دادند پلاسمای سرد اتمسفری باعث کاهش رشد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی شده است (Daeschlein et al., 2012; Mai-Prochnow et al., 2016). هم‌چنین در مطالعه‌ای، اثر ضد میکروبی پلاسما بر برخی باکتری‌های منتقله از غذا مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که پس از تیمار با پلاسما، میزان میکروارگانیسم‌ها به‌مقدار زیادی کاهش یافته است (Ulbin-Figlewicz et al., 2015). مطالعه دیگر نشان داد پلاسمای سرد یک روش غیر گرمایی و غیرمخرب بوده که قابلیت میکروب‌زدایی بالایی دارد. یافته‌های این تحقیق که در راستای مطالعه حاضر است، نشان داد افزایش زمان تابش باعث افزایش میزان قدرت میکروب‌زدایی پلاسمای سرد می‌گردد (Saba et al., 2013). در مطالعه دیگری نشان دادند که میزان باکتری‌کشی روش DBD بستگی به تراکم سلولی و زمان در معرض قرارگیری باکتری‌ها با پلاسمای سرد اتمسفری دارد (Joshi et al., 2010). در مطالعه‌ای که از *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌عنوان مدلی برای بررسی اثر

و میزان اثرگذاری پلاسمای سرد اتمسفری روی میکروارگانسیم‌های مختلف رابطه دقیقی به دست نیامده است، تحقیقات بیشتر در این زمینه لازم و ضروری به نظر می‌رسد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی برای اعلام ندارند.

سپاسگزاری

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

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 میکروارگانسیم‌ها 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

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 Environmental 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.Å. 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 atmospheric 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 foodborne 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](https://doi.org/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.¹

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