

مقایسه اثر باکتری کشی فلش لامپ پالسی و لامپ پیوسته استریل فرابنفش با جت پلاسمای سرد آرگون-هوا در محیط کشت جامد تلقیح شده با باکتری اشریشیا کلی

مژگان برزگر^۱، فرشاد صحبت زاده^{۱*}، الهام هاشمی نسب^۲، اباسلت حسین زاده کلاگر^۲، محسن معتمدی^۳

گروه فیزیک اتمی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر^۱

گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر کد پستی ۹۵۴۴۷-۴۷۴۱۶، ایران^۲
نویسنده رابط: فرشاد صحبت زاده، رایانامه: f.sohbat@umz.ac.ir

چکیده - اخیراً بحث استفاده از لامپ استریل فرابنفش پالسی و پلاسمای سرد فشار اتمسفری به عنوان تکنولوژی های جدیدی در زمینه ی استریلیزاسیون مطرح می باشند. از این رو در این تحقیق به مقایسه ی اثرات این دو تکنولوژی در استریلیزاسیون باکتری *اشریشیا کلی* پرداخته شد. نتایج نشان دادند که فلش لامپ پالسی زنون با پوشش پیرکس با حداقل ۸۰ پالس، توانایی استریل سطح باکتری زیر خود را دارد. همچنین نتایج حاصل از شارش پلاسمای روی سطح باکتری نشان داد که گونه های فعال موجود در جت پلاسمای باعث کاهش چشمگیر در تعداد کلونی ها شده است؛ به طوریکه پس از ۶ دقیقه تیمار با جت پلاسمای تعداد کلونی به صفر کاهش یافت. از طرف دیگر اثر لامپ پیوسته استریل فرابنفش تجاری نیز بکار گرفته شد و نتایج استریلیزاسیون توسط آن با لامپ پالسی و پلاسمای مقایسه گردید. در یک جمع بندی کلی می توان اشاره کرد که تکنولوژی نوین پالس های نوری با توجه به داشتن انرژی بالا و مدت زمان عمل کم، می تواند بطور موفقیت آمیز در از بین بردن باکتری *اشریشیا کلی* موثر واقع شود.

کلید واژه - استریلیزاسیون، *اشریشیا کلی*، پلاسمای سرد فشار اتمسفری، فلش لامپ پالسی، لامپ پیوسته اشعه فرابنفش

Comparing bactericidal effect of pulsed flash lamp and continuous sterilization UV lamps with a cold atmospheric pressure plasma jet on *E. coli* solid growth medium

Barzegar, Mojgan¹; Sohbatzadeh, Farshad^{1*}; Elham, Hashemi Nasab²; Hosseinzadeh Colagara, Abaslt²; Motamedi, mohsen³

¹Atomic and Molecular Physics Department, University of Mazandaran, Babolsar, Mazandaran

²Department of Molecular and Cell Biology, University of Mazandaran, Babolsar, Mazandaran

Abstract- Recently, the use of ultraviolet pulsed disinfection lamps and cold atmospheric pressure plasma are introduced in the field of sterilization as new technologies. Therefore, in this study we compare the effects of these two technologies in decontamination of *E. coli*. The Results of pulsed xenon flash lamp with Pyrex envelope showed that at least 80 pulses, has ability to sterilize the bacteria culture media. The results of plasma flow on treated surface showed that the active species in the plasma jet has caused a dramatic reduction in the number of colonies. So after 6 minutes of treatment with plasma jet number of colonies fell into zero. On the other hand the effects of continuous commercial UV light and pulsed xenon flash lamp were compared with that of plasma jet regarding two different initial bacteria colonies. In conclusion, it can be noted that modern technology of optical pulses due to high energy and low operation time, can successfully be effective in disinfection of solid surfaces.

Keywords: Sterilization, *Escherichia coli*, Cold atmospheric pressure plasma, arc flash lamp, continuous ultraviolet lamp

۱- مقدمه

پالس و تعداد پالسها بستگی دارد [6].

۲- مواد و روش ها

۲-۱- تولید جت پلاسما:

در این بررسی از پلاسمای اتمسفری غیرحرارتی (۹۹٪ آرگون و ۱٪ هوا با جریان گاز یک لیتر بر دقیقه حاوی جت منفرد توسط ولتاژ بالای سینوسی در فرکانس ۱۸,۵۶ kHz برای تیمار نمونه‌ها، که قبلاً در مرجع [5]، به کار برده شد، استفاده گردید. ساختار اصلی دستگاه از یک الکتروستات تشکیل شده که به منبع ولتاژ بالا متناوب متصل شده است.

۲-۲- توصیف دستگاه فرابنفش پالسی:

عملکرد لامپ و نحوه‌ی کارکرد آن در دستگاه مورد استفاده بدین گونه می‌باشد که پس از تریگر نمودن لامپ توسط ولتاژ ۲۰ کیلوولتی، ولتاژ اصلی ۷۰۰ ولتی بین آند و کاتد تخلیه می‌گردد و منجر به یونش گاز داخل تیوب می‌شود. پلاسمای تولید شده در این روش به پلاسمای قوس معروف می‌باشد و دارای بیناب تابشی بسیار گسترده‌ای از فرابنفش C تا مادون قرمز می‌باشد. برای شناسایی بیناب تابشی لامپ استرلایزاسیون و فلش لامپ پالسی از بیناب سنجی گسیل نوری استفاده شد. در این آزمایش از اسپکترومتر Solar 100 استفاده گردید. مشخصات بیناب گسیلی لامپ‌های فرابنفش استرلایزاسیون و فلش لامپ در مدت زمان نورگیری مختلف در شکل ۱ نشان داده شد. در شکل A بیناب تابشی لامپ استرلایزاسیون پیوسته نشان داده شده است و در شکل B بیناب تابشی فلش لامپ در مدت زمان نورگیری ۶۰۰ میلی ثانیه نشان داده شده است. هم چنین برای مشخص نمودن سایر بیناب‌های تابشی کم شدت، با افزایش زمان نورگیری از ۶۰۰ میلی ثانیه به ۱ ثانیه، نتایج ثبت شده در شکل C نشان داده شده است. در زمان ثبت بیناب حاصل از فلش لامپ در مدت زمان نورگیری ۱ ثانیه، دو عدد پلاریز را بصورت عمود بر هم قرار داده، همچنین فیبر نوری را جهت از بین بردن زاویه دید مستقیم کج گذاشته. اما در اندازه‌گیری بیناب گسیلی حاصل از فلش لامپ در مدت زمان ۰,۶ ثانیه (شکل B) از هیچ پلاریز استفاده نشد و فقط زاویه ی فیبر را تنظیم کردیم. نتایج بیناب نمایی بیان می‌کند که خط با علامت (*) در شکل A مرتبط به عنصر جیوه با طول موج 249.95 می‌باشد که بیشترین نقش را در استرلایزاسیون با لامپ استرلایزاسیون دارد [1].

کاربرد اشعه فرابنفش چیزی نزدیک به حدود یک قرن است که مورد توجه قرار گرفته است. از آنجاییکه تمامی گستره‌ی طیفی اشعه‌ی فرابنفش توانایی کشتن و یا غیرفعال سازی و جلوگیری از تکثیر بسیاری از گونه‌های میکروارگانیسم‌ها را دارند، در استرلایزاسیون از آن‌ها استفاده‌ی فراوانی می‌شود. همچنین در برخی از مکان‌ها همانند بیمارستان‌ها و مراکز بهداشتی به علت اهمیت زمانی در مدت زمان استرلایزاسیون، می‌توان استفاده از فلش لامپ‌های پالسی پرتوان را نسبت به سایر روش‌های سنتی توصیه کرد. امروزه فلش لامپ‌های پالسی و آرایه‌های جت پلاسمای سرد فشار اتمسفری افق جدیدی را در کاربردهای زیست فناوری و صنایع گشوده است. در کشورهای آمریکا و آلمان، روسیه، ژاپن، ایران، کانادا تحقیقاتی در زمینه‌ی استرلایزاسیون توسط تابش اشعه‌ی فرابنفش پیوسته و پالسی انجام شده است [1]. یکی دیگر از روش‌های نوین جهت رفع آلودگی، پردازش پلاسما است که یک روش جدید در زمینه‌ی حفظ مواد از اثرات مضر میکروارگانیسم می‌باشد. اولین آزمایش در این زمینه در سال ۱۹۹۶ در رابطه با تاثیر پلاسما در نابودی باکتری‌ها بود [2]. برخلاف اغلب ضدعفونی کننده‌ها، تابش اشعه ماورای بنفش میکروارگانیسم‌ها را به وسیله اثر متقابل شیمیایی غیر فعال نمی‌کند بلکه آنها را با جذب نور توسط خودشان غیرفعال می‌نماید که منجر به واکنش فتوشیمیایی می‌شود. اشعه مذکور در دیواره سلول میکروارگانیسم‌ها نفوذ می‌کند، اسیدهای نوکلئیک و دیگر مواد سلولی حیاتی به وسیله آن، تحت تاثیر قرار می‌گیرند. در نتیجه، سلول‌هایی که در معرض این اشعه بوده صدمه دیده و یا نابود می‌شوند، در واقع سلول خاصیت تکثیر خود را از دست می‌دهد. مقدار تخریب ایجاد شده توسط اشعه فرابنفش با شدت و مدت زمان مجاورت با تابش فرابنفش متناسب می‌باشد. در مراجع [3-4] تحقیقاتی بر روی تاثیر پالس‌های فرابنفش بر روی باکتری‌ها صورت گرفته است که همگی نشان از موثر بودن پالس‌های فرابنفش دارد. ولی در میان مقایسه‌ای بین لامپ پیوسته و پلاسما صورت نگرفته است. هدف از این تحقیق مقایسه‌ی کارایی لامپ استرلایزاسیون پیوسته فرابنفش بدون پوشش فلئورسانس (Germicidal lamp) ۳۰ وات ۲۲۰ ولت و فلش لامپ پالسی زنون ۴۰۰ ژول و جت پلاسمای غیرحرارتی [5] گاز آرگون در از بین بردن باکتری اشریشیا کلی از محیط جامد می‌باشد. بطور کلی میزان تاثیر پالس‌های نوری بر روی میکروارگانیسم‌ها به میزان انرژی که نمونه در هر ثانیه از لامپ دریافت می‌کند (W/M2)، میزان انرژی که نمونه در طی تیمار از لامپ دریافت می‌کند (J/M2)، فاصله زمانی هر

در انکوباتور در دمای 37°C قرار داده شد. بعد از تهیه کشت خالص و تازه از ذخیره باکتری، ۰.۵ میلی‌لیتر از این LB به محیط کشت LB جامد تلقیح شد سپس به مدت یک شبانه روز در دمای 37°C رشد داده شد. بعد از این مرحله یک لوپ باکتری به ۱۵ میلی‌لیتر LB مایع تازه تلقیح شد و به مدت ۱۲ ساعت در دمای 37°C در انکوباتور شیکردار قرار داده شد. پس از آن مجدداً یک میلی‌لیتر از محیط LB رشد یافته به ۱۵ میلی‌لیتر LB مایع تازه درون فالكون تلقیح گردید و در انکوباتور شیکردار در دمای 37°C قرار گرفت تا کدورت محیط LB به $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.25$ که برابر با $3 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$ است برسد.

۴-۲-۲ اثر باکتری کشی در محیط کشت جامد:

به این منظور ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون از باکتری *E. coli* متناظر با ۵۰۰۰ سلول، روی لام به ابعاد ۶.۲×۴.۲۵ که قبلاً در دمای 225°C آون به مدت دو ساعت استریل شدند، ریخته و گستره یکنواخت نازک تهیه شد. پس از خشک شدن گستره آن را تحت تیمار با UV قرار دادیم. پس از تابش نور UV اعم از پالسی (به تعداد ۷۰ و ۸۰ پالس در ۵ دقیقه) و یا UV پیوسته (در مدت ۲ و ۴ ساعت) و نیز شارش پلاسما (در زمان ۳ و ۶ دقیقه)، باکتری‌های موجود روی لام با ۵۰ میکرولیتر LB استریل با سوآپ جمع‌آوری شدند و سپس به صورت یکنواخت روی محیط کشت جامد LB به روش قبل تلقیح و کشت یکنواخت شدند. پلیت‌های تلقیح شده به روش فوق، به مدت ۱۶ ساعت در دمای 37°C انکوبه گردید.

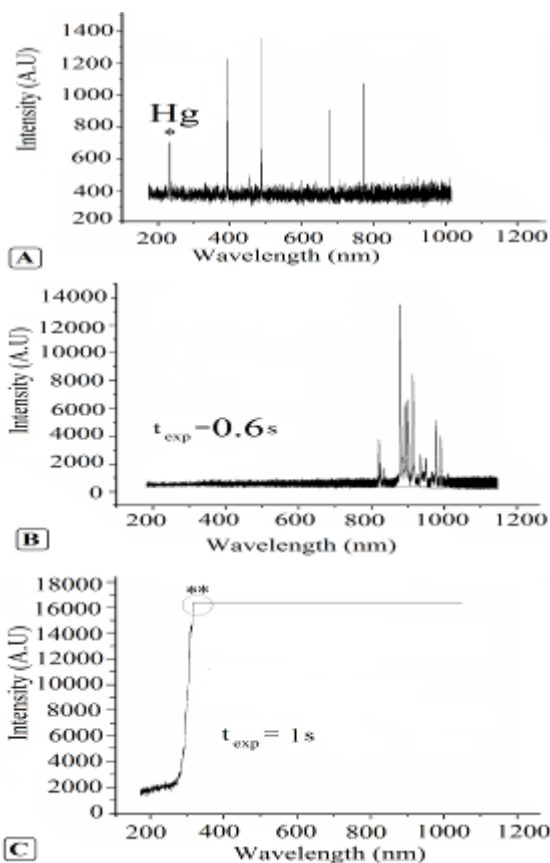
۳-نتیجه و بحث

۳-۱- مقایسه اثر باکتری کشی فلش لامپ زنون و پلاسمای

سرد اتمسفری بر روی $3 \times 10^8 \text{ CFU}$ باکتری/شریشیا کلی

تلقیح شده به محیط کشت جامد با ضخامت ۴ میلی‌متر:

نتایج ما نشان داد تیمار پتری دیش‌های حاوی باکتری اشیشیا کلی به تعداد $3 \times 10^8 \text{ CFU}$ تلقیح شده به محیط کشت جامد با ضخامت ۴ میلی‌متر توسط لامپ پیوسته تجاری فرابنفش مخصوص استریل، تاثیری در کاهش تعداد کولنی‌ها نداشت. همین آزمایش را بروی پتری دیش‌ها با تعداد باکتری $3 \times 10^8 \text{ CFU}$ توسط فلش لامپ پالسی با ۷۰ پالس در ۵ دقیقه انجام دادیم. نتایج نشان داد که تاثیر قابل ملاحظه‌ای در کاهش رشد باکتری‌ها دیده نمی‌شود. (شکل ۲: A1-A3). به منظور مقایسه اثر استریلیزاسیون لامپ‌های پالسی زنون و پیوسته فرابنفش با اثر جت پلاسمای سرد آرگون-هوا، فرایند تیمار را با همین تعداد اولیه تکرار نمودیم. نتایج نشان داد که شارش پلاسما در ۹۰ ثانیه تعداد باکتری رشد یافته نسبت به کنترل را، ۲۱.۶۵ درصد (شکل ۲: C2) و در ۳۰۰ ثانیه ۶۱.۱۵ درصد (شکل ۲: C3) کاهش می‌دهد. از شکل ۲ نتیجه‌گیری می‌شود که جت پلاسمای سرد آرگون-هوا جهت استریلیزاسیون سطوح جامد



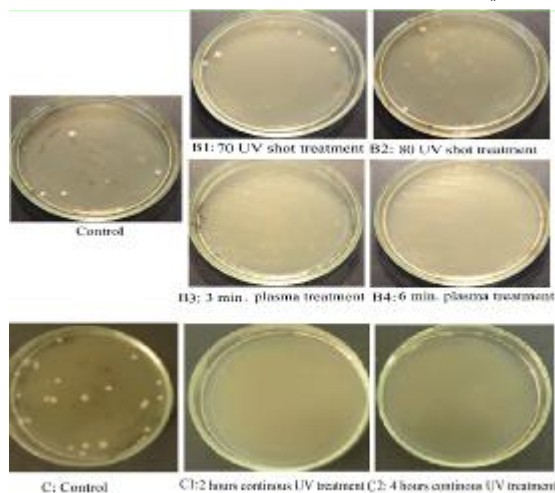
شکل ۱: A) بیناب سنجی لامپ استریل، B و C به ترتیب بیناب سنجی فلش لامپ در مدت زمان نورگیری 0.6 و ۱ ثانیه. (** طول موج قطع اشعه‌ی فرابنفش توسط پیرکس که جنس شیشه‌ی لامپ می‌باشد).

جهت اندازه‌گیری بیناب فلش لامپ، ابتدا مدت زمان نورگیری را به ۱ ثانیه رسانده که تمامی پیک‌ها به حالت اشباع رسیدند، که بیناب قابل قبولی نمی‌باشد. در نتیجه زمان نورگیری را به ۰.۶ ثانیه کاهش دادیم و بیناب مناسبی را ثبت کردیم، نتایج شکل C بیان می‌کند که تابش فلش لامپ در طول موج‌های پایین‌تر از ۳۰۰ نانومتر قابل ملاحظه است اگر چه توسط پوشش پیرکس از شدت آن بسیار کاسته می‌شود. بنابراین گستره‌ی تابشی فلش لامپ مورد استفاده در بازه ۲۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر می‌تواند در فرایند باکتری کشی موثر واقع شود جایکه پیوند های DNA باکتری در آن بیشترین جذب را دارند. با جذب تابش فرابنفش در این گستره DNA باکتری تخریب شده و باکتری قادر به ادامه زندگی نخواهد بود.

۳-۲- آماده سازی میکروآرگانیسم‌ها و محیط کشت:

در این پژوهش نمونه‌های لیوفیلیزه باکتری اشیشیا کلی (*Escherichia coli* ATCC 35218) از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. جهت کشت باکتری‌ها از محیط کشت عمومی Luria Bertani یا LB استفاده شد. به این منظور یک میلی‌لیتر از محیط LB مایع به استوک باکتری اضافه شد و ۱۶ ساعت

شکل ۲: مقایسه اثر فلش لامپ پالسی زنون، لامپ پیوسته فرابنفش بدون پوشش با جت پلاسمای اتمسفری: اثر باکتری کشی فلش لامپ پالسی زنون روی $10^8 \times 3$ باکتری، نمونه‌ی کنترل (A1)، تیمار شده با ۶۰ پالس (A2)، تیمار شده با ۷۰ پالس (A3)، اثر باکتری کشی پلاسمای روی $10^8 \times 3$ باکتری، نمونه‌ی کنترل (C1)، ۹۰ ثانیه (C2)، ۳۰۰ ثانیه (C3).



شکل ۳: مقایسه اثر فلش لامپ پالسی زنون با جت پلاسمای آرگون-هوا: اثر باکتری کشی فلش لامپ پالسی زنون روی $10^8 \times 1$ باکتری، تیمار شده با ۷۰ پالس (B1)، تیمار شده با ۸۰ پالس (B2)، اثر باکتری کشی جت پلاسمای آرگون-هوا روی $10^8 \times 1$ باکتری، تیمار شده با ۳ دقیقه شارش پلاسمای (C1)، تیمار شده با ۶ دقیقه شارش پلاسمای (C2)، اثر باکتری کشی لامپ پیوسته فرابنفش بدون پوشش روی $10^8 \times 1$ باکتری، نمونه‌ی کنترل (C)، تیمار شده با ۲ ساعت تابش (C1)، تیمار شده با ۴ ساعت تابش (C2).

مراجع

- [1] Vasilyak, L. M. (2009). Application of pulsed electrical discharge lamps for bactericidal treatment. *Surface Engineering and Applied Electrochemistry*, 45(1), 26-34.
- [2] Kong, P., & Myrtle. (2006, September). Atmospheric Pressure Plasma Process And Applications. In Sohn International Symposium; Advanced Processing of Metals and Materials Volume 6: New, Improved and Existing Technologies: Aqueous and Electrochemical Processing (Vol. 6, pp. 493-506).
- [3] Darghahi, MK Sharifi-Yazdi H. "Inactivation of pathogenic bacteria using pulsed UV-light and its application in water disinfection and quality control." *Acta Medica Iranica* 44.5 (2006): 305-309.
- [4] Wekhof, A., Trompeter, F. J., & Franken, O. (2001, June). Pulsed UV disintegration (PUVD): a new sterilisation mechanism for packaging and broad medical-hospital applications. In *The first international conference on ultraviolet technologies* (p. 15).
- [5] Mortazavi S M, Hosseinzadeh Colagara A, Sohbatazadeh F. Efficiency of the cold atmospheric Argon-Oxygen jet plasma for elimination of *E. coli* & *Streptococcus pyogenes* from solid and liquid ambient. *Iran J Med Microbiol*. 2016; 10 (3) :19-30
- [6] Gomez-Lopez, V. M., Ragaert, P., Debevere, J., & Devlieghere, F. (2007). Pulsed light for food decontamination: a review. *Trends in food science & technology*, 18(9), 464-473.

بسیار موثر تر در مقایسه با لامپ های پالسی زنون و پیوسته فرابنفش است.

۲-۳- مقایسه اثر باکتری کشی فلش لامپ زنون و لامپ استریل با پلاسمای سرد اتمسفری بر باکتری اشیریشیا کلی تلقیح شده به محیط کشت به تعداد $10^8 \times 1$ CFU:

در مطالعه دیگر برای بررسی تاثیر هر سه روش، تعداد کولنی های اولیه باکتری ها را به مقدار $10^8 \times 1$ CFU کاهش دادیم تا هر سه روش بتوانند باکتری را از محیط کشت جامد از بین ببرند. نتایج نشان داد که پلاسمای در شارش ۳ دقیقه ای تعداد باکتری رشد یافته نسبت به کنترل را ۸۷٫۵ درصد (شکل ۳: B3) و ۶ دقیقه ای ۱۰۰ درصد (شکل ۳: B4) کاهش می‌دهد، یعنی پلاسمای توانایی استریل سازی کامل در این غلظت اولیه باکتری ها دارد. این در حالی است که در شرایط مشابه تیمار و تعداد مشابه باکتری با لامپ پالسی زنون در ۵ دقیقه با ۷۰ پالس، تعداد کلنی ۳۷٫۵ درصد (شکل ۳: B1) و در ۶ دقیقه با ۸۰ پالس ۶۲٫۵ درصد کاهش می‌یابد (شکل ۳: B2) لذا می‌توان نتیجه گرفت، توان استریل‌سازی جت پلاسمای آرگون-هوا در مقایسه با لامپ پالسی زنون در مدت زمان مشابه بیش تر است. همچنین در تیمار با لامپ پیوسته فرابنفش بدون پوشش به مدت ۲ ساعت یا بیش تر تعداد باکتری رشد یافته به صفر می‌رسد که گفته می‌شود سطح استریل شد. (شکل ۳: C1 و C2).

تاثیر لامپ استریل و فلش لامپ پالسی و جت پلاسمای سرد آرگون در از بین بردن باکتری اشیریشیا کلی مورد بررسی قرار گرفت. با اعمال پالس هایی از فلش لامپ و شارش پلاسمای بر باکتری به این نتیجه رسیدیم که پس از جت پلاسمای، فلش لامپ-پالسی می‌تواند به عنوان تکنولوژی نوینی در عمل استریل‌سازی محسوب شود. لذا می‌توان بجای اینکه چند ساعت را صرف استریل با لامپ های پیوسته UV نماییم می‌توان در مدت زمان چند دقیقه توسط فلش لامپ به سطح استریل مشابه با لامپ پیوسته دست یافت و یا از تکنولوژی پلاسمای استفاده نمود.

