



The Efficiency of the Cold Argon-oxygen Plasma jet to reduce *Escherichia coli* and *Streptococcus pyogenes* from solid and liquid ambient

Seyed Mohsen Mortazavi¹, Abasalt Hosseinzadeh Colagar^{1,3}, Farshad Sohbatzadeh^{2,3}

1. Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
2. Department of Atomic and Molecular Physics, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
3. Nano and Biotechnology Research Group, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2014/12/11
Accepted: 2016/05/4
Available online: 2016/07/16

Article Subject:

Nosocomial infections

IJMM 2016; 10(3): 19-30

Corresponding author at:

Dr. Abasalt Hosseinzadeh Colagar

Department of Molecular and
Cell Biology, Faculty of Basic
Sciences, University of
Mazandaran, Babolsar, Iran.

Tel: : +981125242161

Email:

acolagar@yahoo.com
ahcolagar@umz.ac.ir

Abstract

Background and Aim: Bacterial infections in hospitals can be considered as a damaging factor in laboratory environment (healthcare setting) since the rate of antibiotic-resistant bacteria is increasing overtime. Therefore, finding an effective and rapid method is essential for sterilization. The aim of this study was efficiency of cold argon-oxygen plasma used for sterilization of the *Escherichia coli* and *Streptococcus pyogenes* in liquid and solid media.

Materials and Methods: Non-thermal single argon-oxygen plasma jet was produced by high sinusoidal voltage (18.56 kHz). Then 3×10^8 CFU/ml of *E. coli* and 3×10^7 CFU/ml of *S. pyogenes* were inoculated in LB (Luria-Bertani) liquid and solid media, separately. These inoculated media were treated with plasma for different time periods. Results were measured by turbidity test in liquid media and measuring clear zone in solid media. Moreover pieces present in the plasma and concentration of zone were measured.

Results: The results suggested that cold argon/oxygen plasma jet including atomic and molecular species, has a high efficiency to destroy gram-positive and gram-negative bacteria at short time in a liquid medium (less than 15 minutes) and solid (less than 30 second). Also, results have shown that the influence factor of gram-negative bacteria (*E. coli*) was more than gram-positive bacteria (*S. pyogenes*).

Conclusions: Since many of sterilization procedures including chemical and physical methods or wet and dry heat sterilization in solid or liquid ambient have faced to functional limitations; according to the results of this study, this new technology is a powerful tool for disinfection of surfaces in hospitals and public places.

Key Words: Sterilization, Nosocomial infections, Cold plasma jet, Ozone

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Mortazavi S M, Hosseinzadeh A, Sohbatzadeh F. The Efficiency of the Cold Argon-oxygen Plasma jet to reduce *Escherichia coli* and *Streptococcus pyogenes* from solid and liquid ambient . Iran J Med Microbiol. 2016; 10 (3) :19-30

کارایی جت پلاسمای سرد آرگون-هوا در کاهش آلودگی‌های باکتریایی اشیریشیا کلی و استرپتوکوکوس پیوژنز از محیط‌های جامد و مایع

سید محسن مرتضوی^۱، اباصلت حسین‌زاده کلاگر^۱، فرشاد صحبت زاده^{۲،۳}

۱. گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

۲. گروه فیزیک اتمی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

۳. گروه پژوهشی نانو و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: عوامل باکتریایی موجود در محیط کار بیمارستان‌ها با توجه به افزایش باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک می‌توانند بعنوان یک عامل زیان آور شغلی عمل نمایند. بنابراین یافتن یک روش ضدعفونی‌سازی نوین، مؤثر و به ویژه سریع ضروری است. هدف این تحقیق، بررسی کارایی پلاسمای آرگون-هوا در پاکسازی آلودگی باکتریایی اشیریشیا کلی و استرپتوکوکوس پیوژنز از محیط‌های مایع و جامد است.

مواد و روش کار: جت منفرد پلاسمای اتمسفری غیرحرارتی آرگون-هوا، توسط ولتاژ بالای سینوسی (۱۷/۹۷ kHz) تولید گردید. سپس تعداد 3×10^8 CFU/ml و 3×10^7 CFU/ml از هر یک از باکتری‌های اشیریشیا کلی و استرپتوکوکوس پیوژنز بطور جداگانه در محیط‌های کشت مایع و جامد تلقیح شدند. این محیط‌های تلقیح شده در زمان‌های مختلف تحت تیمار با پلاسمای قرار گرفتند. از بین رفتن باکتری‌ها در محیط کشت مایع به روش کدورت سنجی و در محیط کشت جامد به روش اندازه گیری هاله عدم رشد و بررسی گردید. اثر پلاسمای در تخریب باکتری‌ها با اندازه گیری پروتئین‌های تام به روش برادفورد و آنالیز تغییر الگوی پروتئین‌ها نیز با SDS-PAGE بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان می‌دهد جت پلاسمای سرد فشار اتمسفری آرگون-هوا با داشتن گونه‌های فعال اتمی و مولکولی، از توان بالایی برای از بین بردن باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی فوق، در محیط مایع و در محیط جامد برخوردار است. از سوی دیگر نتایج نشان می‌دهند که ضریب تأثیر پذیری باکتری اشیریشیا کلی نسبت به باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز بیشتر است. مطالعه اثر پلاسمای روی تغییر سطح پروتئین‌ها در سوپرناتانت تیمارها نشان داد که این میزان با افزایش زمان تیمار نه تنها افزایش می‌یابد بلکه با تغییر جدی الگوی باندی در ژل الکتروفورز نیز همراه است.

نتیجه‌گیری: از آنجاییکه بسیاری از روش‌های ضدعفونی متداول برای ضدعفونی سطوح جامد، مایع و زیستی با محدودیت‌های کاربردی همراه می‌باشند، به همین منظور استفاده از جت پلاسمای سرد فشار اتمسفری آرگون-هوا می‌تواند به عنوان یک فن‌آوری نوین، مؤثر، کم‌خطر و سریع، برای ضدعفونی محیط‌های عمومی مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: ضدعفونی، عفونت بیمارستانی، پلاسمای سرد، ازون

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۲۰
پذیرش: ۱۳۹۵/۰۲/۲۵
انتشار آنلاین: ۱۳۹۵/۰۵/۳۱
موضوع:
عفونت بیمارستانی
IJMM 1395; 10(3): 19-30

نویسنده مسئول:

دکتر اباصلت حسین‌زاده کلاگر
گروه زیست شناسی سلولی و
مولکولی، دانشکده علوم پایه،
دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

تلفن: ۰۱۱۳۵۲۰۲۴۵۲

پست الکترونیک:

acolagar@yahoo.com
ahcolagar@umz.ac.ir

مقدمه

آمریکا به تنهایی حدود ۲۰۰ هزار بیمار سالانه به دنبال استفاده از کاتترها به عفونت‌های جریان خون مبتلا می‌شوند. سالانه حدود ۱۰۰ هزار مورد جدید از عفونت با سویه‌های باکتری‌های مقاوم به چند دارو یا MRSA گزارش شده است که ۱۸ هزار نفر از آن‌ها می‌میرند (۴-۲). با توجه به رشد روز افزون مقاومت به آنتی بیوتیک از یک سو (۷-۵) و ضعف در روش‌های ضدعفونی

عوامل باکتریایی موجود در محیط کار بیمارستان‌ها و مراکز درمانی می‌توانند بعنوان یک عامل زیان آور شغلی عمل نمایند و همچنین ضدعفونی کردن در بیمارستان‌ها و سایر مناطق عمومی، به علت رشد عفونت‌های بیمارستانی، افزایش باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها و انتقال این باکتری‌ها، از اهمیت زیادی برخوردار است (۱). بر اساس آمار منتشر شده در ایالات متحده

کنونی، این امر را با محدودیت‌های بسیاری مواجه ساخته است. به عنوان مثال، فرآیند ضد عفونی کردن پزشکان جراح شامل پاک کردن دست‌ها (۳ دقیقه) و ضد عفونی کردن دست‌ها برای اتاق عمل (۵ دقیقه) می‌بایست روزانه بارها تکرار می‌شود. این امر عوارض جانبی مضر از جمله سوزش مکانیکی، شیمیایی و استرس‌های آلرژیک در پوست به وجود می‌آورد (۸). از سوی دیگر بیماری‌های پوستی ایجاد شده توسط باکتری‌ها یکی از دلایل اصلی بستری شدن بیماران است که سالانه هزینه‌های سنگینی را به دنبال دارد. یکی از شایع‌ترین ناراحتی‌های پوستی بیماران، زخم‌های عفونی مزمن در قسمت‌های تحتانی پا است. با شیوع تقریباً ۱٪ جمعیت در کشورهای توسعه یافته، تخمین زده می‌شود که زخم‌های عفونی ۲-۱٪ بودجه‌های سالیانه مراقبت‌های بهداشتی را به خود اختصاص می‌دهند (۹). علاوه بر این، زخم‌های عفونی یک مخزن اصلی برای سوش‌های باکتریایی چند مقاومتی به دارو هستند و سبب انتشار باکتری‌های مقاوم می‌شوند. انجمن‌های مراقبت بهداشت جهانی، باکتری‌های مقاوم به چند دارو به ویژه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین را به عنوان یک تهدید جهانی در نظر می‌گیرند (۱۰،۷،۶). هم اکنون، درمان‌های استاندارد زخم‌های عفونی شامل دسته‌های آنتی بیوتیک سیستماتیک و موضعی می‌باشند (۱۱)، که این درمان‌ها اغلب بوسیله توسعه مقاومت باکتریایی به آنتی بیوتیک یا واکنش‌های پوستی آلرژیک محدود می‌شوند.

بنابراین یافتن یک روش ضد عفونی‌سازی نوین، مؤثر، بسیار کم خطر و به ویژه سریع، ضروری است (۱۲،۳). در سال‌های اخیر توجه محققین به استفاده از پلاسماهای سرد معطوف شده است. این شاخه جدید که تلفیقی از فیزیک پلاسما، پزشکی و مهندسی زیستی است قصد دارد تا پلاسما را برای مقاصد درمانی به کار برد. پلاسما در علوم فیزیکی به عنوان چهارمین حالت ماده علاوه بر گازها، مایعات و جامدات شناخته می‌شود (۱۳). واژه پلاسما در فیزیک، به حد واسطی کاملاً یا تقریباً یونیزه اشاره دارد. هنگامی که گاز در معرض تخلیه‌های الکتریکی قرار می‌گیرد، پلاسما تولید می‌شود (۱۴) درجه یونیزاسیون می‌تواند از ۱۰۰٪ (گاز کاملاً یونیزه) تا مقادیر بسیار کم متغیر باشد (۱۵)؛ لذا به نظر می‌رسد که پلاسماها برای ضد عفونی کردن مناسب باشند (۲).

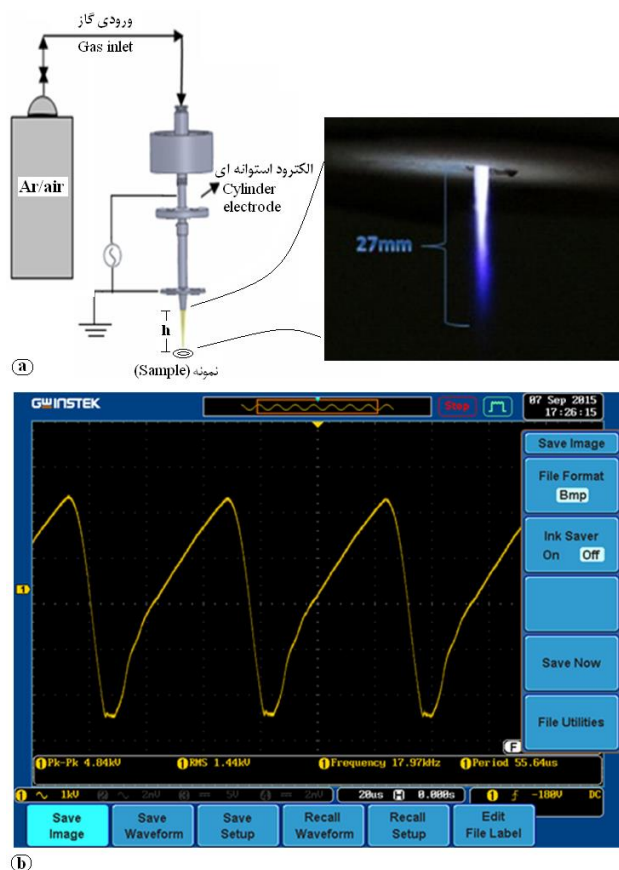
برای اولین بار Kong و همکاران در سال ۲۰۰۰ اعلام کردند که پلاسما سرد، عامل کشنده بسیار مؤثری علیه باکتری‌ها می‌باشد. همچنین پلاسماهای اتمسفری سرد توانایی

غیرفعال سازی عمومی میکروارگانیسم‌ها تحت شرایط آزمایشگاهی کنترل شده را دارند (۳). در سال‌های بعد تحقیقاتی روی اثر میکروبی کشی انواع پلاسمای سرد فشار اتمسفری صورت گرفت (۱۶-۱۹). اما از آنجایی که تحقیقات صورت گرفته در حوضه پلاسمای پزشکی در مراحل ابتدایی خود قرار دارد، نیاز است تا با بررسی‌های بیشتر و طراحی سیستم‌های کارآمدتر، زمینه گسترش، بهینه سازی و صنعتی سازی استفاده از پلاسما فراهم شود. شرایطی که تحت کمترین زمان نتیجه مطلوب بدست آید. در این تحقیق، ابتدا پلاسمای سرد آرگون-هوا تولید شده توسط جت تک شعله متمرکز گردید. سپس این پلاسما جهت پاکسازی دو باکتری *اشریشیا کلی* و *استرپتوکوکوس پیوژنز* به عنوان شاخص دو گروه باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت در محیط‌های جامد و مایع استفاده شد. از دلایل انتخاب این دو میکروارگانیسم نیز می‌توان گفت که *اشریشیا کلی* یکی از شاخص‌های باکتری‌های گرم منفی است. همچنین این باکتری می‌تواند به صورت فرصت طلب در کلیه، مثانه، زخم‌ها، ریه‌ها یا مننژها، عفونت ایجاد کند. علاوه بر این این باکتری به عنوان یک پاتوژن کلیدی در عفونت‌های بیمارستانی مطرح است (۲۰،۱۱). از سوی دیگر *استرپتوکوکوس پیوژنز* نیز یکی از شاخص‌های باکتری‌های گرم مثبت است و همچنین یک بیماری زای انسانی شاخص می‌باشد. با ورود *استرپتوکوکوس پیوژنز* به بدن، عفونت به سرعت و به طور وسیعی گسترش می‌یابد؛ به طوری که بافت‌ها را درگیر کرده و از طریق سیستم لنفاوی گسترش می‌یابد، در حالی که تنها اندکی ترشح چرکی موضعی وجود دارد (۲۰). در این آزمایش توان پلاسمای آرگون-هوا برای پاکسازی این دو میکروارگانیسم در محیط‌های مایع و جامد بررسی و سپس با یکدیگر مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

تولید جت پلاسما و اندازه گیری ازون

در این بررسی، پلاسمای اتمسفری غیرحرارتی ۹۹٪ آرگون و ۱٪ هوا با جریان گاز یک لیتر بر دقیقه حاوی جت منفرد توسط ولتاژ بالای شبه سینوسی با قابلیت تولید ولتاژ متغیر از صفر تا ۲۰ کیلو ولت پیک تا پیک در فرکانس ۱۷/۹۷ kHz برای تیمار نمونه‌ها به کار برده شد. ساختار اصلی دستگاه از یک الکتروستوانه‌ای (Cylindrical) تشکیل شده است که به منبع برق AC اتصال دارد. به دنبال ورود گاز آرگون از طریق کیپول و اعمال



شکل ۱: آرایش پلاسمای جت اتمسفری: (a) تصویر شماتیک از چیدمان دستگاه پلاسمای و ظرف (پلیت) حاوی نمونه و نیز نمایی از جت پلاسمای تک شعله تولید شده در این شکل h = طول جت پلاسمای تولیدی که ۲۷ میلی متر است اما فاصله موثر بین نمونه‌ها و نازل ۲۱ میلی متر است؛ (b) ولتاژ

پاکسازی محیط مایع

جهت پاکسازی محیط مایع، از روش Sohbatzadeh و همکاران استفاده شد (۲۳). بر این اساس ابتدا پلیت‌های شیشه‌ای ۷۰ میلی متری در درجه حرارت 200°C در اون به مدت ۲ ساعت قرار داده شدند تا به طور کامل استریل شوند. پس از سرد شدن آن‌ها، به منظور بررسی اثرات استریلیزه کنندگی پلاسمای در محیط مایع، تعداد 3×10^8 از سوسپانسیون جوان هر باکتری، به ۵ میلی لیتر LB ی تازه در درون پلیت‌ها اضافه گردید. در مجموع ۷ پلیت برای هر باکتری به این صورت در شرایط کاملاً یکسان، آماده گردید که یکی از آن‌ها به عنوان کنترل و شش مورد دیگر برای تیمار با پلاسمای به مدت ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۲/۵ و ۱۵ دقیقه بودند. لازم به ذکر است جهت جلوگیری از رشد باکتری در مدت تیمار با پلاسمای، پلیت‌ها روی

ولتاژ مناسب، حالت چهارم ماده یا پلاسمای تشکیل شد که به صورت جت از نازل خارج گردید. به علت ژئومتری دستگاه، پلاسمای تولید شده تقریباً در دمای اتاق و در فشار اتمسفر باقی می‌ماند. طول جت پلاسمای تولیدی ۲۷ میلی متر و فاصله میان نمونه‌ها و نازل ۲۱ میلی متر در چیدمان شکل ۱a، با ولتاژ خروجی شبه سینوسی که بصورت شکل ۱b بود، در نظر گرفته شد. تیمار کلیه نمونه‌ها در درجه حرارت اتاق 25°C و رطوبت ۷۰٪ صورت گرفت. میزان غلظت ازون تولید شده نیز با استفاده از ازون سنج مدل A-21ZX (Eco. Sensors) طبق روش Hosseinzadeh Colagar و همکاران اندازه گیری شد (۲۲، ۲۱، ۱۷). گونه‌های مهم پلاسمای با استفاده از بیناب نمایی گسیل نوری توسط دستگاه UV-Vis-HR2000+ (Ocean optics, دستگاه گسیل نوری توسط دستگاه Ocean optics, Inc.) مشخص شدند.

آماده سازی میکروارگانیسم‌ها

در این آزمایش نمونه‌های لیوفیلیزه باکتری *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli* ATCC 35218) و *استرپتوکوکوس پیوژنز* (*Streptococcus pyogenes* ATCC 1747) جهت انجام پژوهش از انسیتو پاستور ایران تهیه گردید. در این مطالعه، جهت کشت باکتری‌ها، از محیط کشت عمومی Luria Bertani یا LB (حاوی ۱۰ گرم بکتوتریپتون، ۵ گرم عصاره مخمر، ۱۰ گرم سدیم کلرید به ازای هر لیتر) استفاده شد.

برای انجام این آزمایش ابتدا از استوک هر یک از باکتری‌ها، کشت خالص و تازه تهیه گردید. بدین صورت که یک میلی لیتر از محیط LB مایع به استوک هر یک از باکتری‌ها اضافه شد و به مدت ۱۶ ساعت در دمای 37°C (در انکوباتور) رشد داده شد. سپس، ۰/۵ میلی لیتر از این LB، در محیط جامد تلقیح شد. پس از قرار دادن این محیط جامد در دمای 37°C به مدت یک شبانه روز، یک لوپ باکتری به درون ۱۵ میلی لیتر LB ی مایع تازه درون فالکون تلقیح گردید و در دمای 37°C برای ۱۲ ساعت در انکوباتور شیکردار قرار داده شد. بعد از این مرحله، یک میلی لیتر از محیط LB ی رشد یافته در ۱۵ میلی لیتر LB ی تازه در درون فالکون، دوباره تلقیح گردید و در انکوباتور شیکردار در دمای 37°C قرار داده شدند تا باکتری‌ها به فاز لگاریتمی رشد وارد شوند. به عبارت دیگر کدورت محیط LB حاوی باکتری $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0/25$ برسد که متناظر با 3×10^8 CFU/ml برای *اشریشیا کلی* و 3×10^9 برای *استرپتوکوکوس پیوژنز* است. از این کشت جوان باکتری، برای انجام آزمایشات استفاده گردید.

اندازه گیری مقدار پروتئین تام در مایع روئی، ناشی از تخریب باکتری /شریشیا کلی با پلاسما در زمان های مختلف، به روش برادفورد انجام شد (۲۴). برای این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از مایع روئی تهیه شده از هر تیمار، به لوله های آزمایش ۱۲×۱۰۰ میلی متری منتقل کرده و به آن یک میلی لیتر معرف برادفورد افزوده شدند. مخلوط حاصل به مدت ۲ دقیقه ورتکس شده و پس از گذشت ۱۵ دقیقه با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر میزان جذب نور در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه گیری گردید و با استفاده از نمودار استاندارد غلظت نمونه های مجهول محاسبه شد.

برای مطالعه تغییرات ایجاد شده در الگوی پروتئین های تام در مایع روئی، ناشی از تخریب باکتری /شریشیا کلی با پلاسما در زمان های مختلف، از الکتروفورز ۱۰ میکرولیتر از مایع روئی تهیه شده از هر تیمار در ژل الکتروفورز پلی آکریل آمید- سدیم دودسیل سولفات یا همان SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) به روش عمومی Green و Sambrook (۲۵)، و رنگ آمیزی ژل بوسیله کوماسی بلو R250 با استفاده از این همین روش عمومی استفاده گردید.

یافته ها

گونه های فعال موجود در پلاسما

نتایج حاصل از بیناب سنجی گسیل نوری تعداد ۹ گونه از گونه های فعال را در طول موج های مختلف در پلاسمای تولیدی را نشان داد (جدول ۱). از جمله گونه های فعال موجود در شعله پلاسمای Ar/air که در فرآیند ضد عفونی نقش مهمی دارند می توان به وجود عناصر اتمی ایجاد شده از گونه های مولکولی اشاره کرد. از جمله: گونه های O و OH از گونه های واکنش پذیر اکسیژنی یا همان ROS (Reactive oxygen species)، تولید شده دارای اثرات اکسیداسیون روی ساختار دیواره و غشاء سلول باکتری ها می باشند. رادیکال های Ar* و گونه های فعال NO،N که این گونه های نیز دارای اثر تخریبی روی ملکول های زیستی هستند (۱۹، ۲۰، ۲۶، ۱۶) و غلظت ازون اندازه گیری شده در این آزمایش نیز که برابر ۰/۳ ppm بود، تأیید کننده گونه های فعال در این آزمایش است.

یخ قرار داده شدند. پس از تیمار نمونه ها با پلاسما، ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون مایع همه پلیت ها در ۱۵ میلی لیتر LB ی استریل تلقیح و به مدت حدوداً ۲ ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه شدند. سپس اثرات باکتری کشی پلاسمای غیرحرارتی آرگون- هوا در محیط کشت مایع، با آزمایش کدورت سنجی در گستره ۹۰۰-۴۲۵ نانومتر توسط اسپکترومتر (UV-1600 UV/VIS Reyleigh) ارزیابی و مقایسه گردید (۲۳).

پاکسازی محیط جامد

برای تیمار باکتری در محیط جامد ۱۰ میکرولیتر از کشت تازه باکتری /استریپتوکوکوس پیوژنز به همراه ۹۰ میکرولیتر محیط کشت مایع استریل و ۱۰۰ میکرولیتر از کشت تازه باکتری /شریشیا کلی، که هر کدام شامل ۳×۱۰^۷ سلول می باشند، به طور جداگانه، توسط میله شیشه ای L شکل روی سطح LB جامد کشت یکنواخت شدند. سپس این محیط به مدت ۲۰ دقیقه در زیر هود در دمای ۲۵°C قرار داده شد تا خشک شود. در مجموع ۵ پلیت برای هر یک از باکتری ها در سه تکرار، به روش فوق برای ساختار تک شعله تهیه شد (یک عدد به عنوان کنترل و چهار مورد دیگر برای تیمار به مدت (۱۸۰ و ۳۰، ۶۰، ۱۲۰ ثانیه). پس از تیمار پلیت های محتوی باکتری توسط پلاسما، به مدت ۱۶ ساعت دمای ۳۷°C در انکوباتور قرار داده شدند. سپس مساحت ناحیه غیرفعال سازی برای هر نمونه اندازه گیری و مقایسه گردید.

اندازه گیری غلظت پروتئین در مایع روئی باکتری

تیمار شده

برای اندازه گیری تغییرات پروتئین ها در اثر شارش پلاسما، ابتدا آماده سازی نمونه ها طی مراحل زیر صورت گرفت. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از کشت باکتری ۱۲ ساعته /شریشیا کلی، به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰g در دمای ۴ درجه سانتیفریوژ شدند. مایع روئی خارج گردید و رسوب بوسیله بافر 100mM, PBS (بافر فسفات سدیمی با pH= ۷/۳) سه مرتبه شستشو داده شد. رسوب در ۱۰۰ میکرولیتر PBS حل شد و در زمان های صفر (شاهد)، ۳۰، ۶۰، ۱۲۰، ۱۸۰ و ۲۴۰ ثانیه تحت تیمار با پلاسما قرار گرفت. نمونه های تیمار شده به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰g در دمای ۴ درجه سانتیفریوژ شدند مایع روئی های حاصل برای استفاده های بعدی از جمله اندازه گیری مقدار پروتئین و آنالیز SDS-PAGE روی یخ نگهداری شدند.

جدول ۱: برخی از گونه‌های شناسایی شده در فاصله ۱ سانتی متری از نازل در شارش گاز معادل ۲ لیتر بر دقیقه*

طول موج انطباقی	گونه	طول موج انطباقی	گونه	طول موج انطباقی	گونه
۷۷۷	O	۳۵۷/۲۴	NO	۲۰۳/۶۷	N ₂
۷۹۴/۶۹	Ar*	۳۵۷/۵۴	N ₂ +	۳۰۷/۴۷	OH
۸۱۱/۲۸	Ar*	۶۹۶/۵۱	ArI	۳۳۶/۱۰	N ₂

* طول موج‌ها به نانو متر می‌باشد

نتایج پاکسازی در محیط مایع

منحنی‌های مربوط به کدورت سنجی محیط‌های LB مایع حاوی باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *استرپتوکوکوس پیوژنز*، پس از تیمار با پلاسمای جت اتمسفری غیرحرارتی آرگون-هوا، در محدوده طول موج‌های ۴۲۵ تا ۹۰۰ نانومتر توسط اسپکترومتر اندازه‌گیری شدند. بطوریکه از منحنی‌های کدورت سنجی نمونه تیمار نشده (کنترل یا صفر دقیقه) جهت مقایسه با نمونه‌های تیماری استفاده گردید. همچنان که به وضوح در شکل ۲ مشخص است، تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین نمونه‌های تیمار شده و نمونه کنترل برای هر دو باکتری موجود دارد. هر دو باکتری توسط جت پلاسمای سرد به خوبی از بین رفتند، اما بین نمودار کدورت سنجی این دو باکتری تفاوت‌هایی وجود دارد. از جمله اینکه در نمودار کدورت سنجی باکتری *اشریشیا کلی* در زمان ۲/۵ دقیقه سطح زیر نمودار کاهش قابل ملاحظه‌ای را داشت. این کاهش در نمودار باکتری *استرپتوکوکوس پیوژنز* به زمان ۷/۵ دقیقه انتقال پیدا کرد. همچنین با توجه به منحنی‌ها، می‌توان گفت در طی ۱۲/۵ دقیقه، برای باکتری *اشریشیا کلی* و ۱۵ دقیقه برای باکتری *استرپتوکوکوس پیوژنز* کاهش حدود ۱۰۰٪ اتفاق افتاد.

برای بررسی کمی و دقیق‌تر از مقایسه مساحت زیر نمودارها استفاده شد. جدول ۲ مساحت‌های موجود در زیر منحنی‌های کدورت سنجی، تفاوت میان مساحت منحنی کنترل و سایر منحنی‌ها و درصد تفاوت میان مساحت منحنی کنترل و سایر منحنی‌ها (درصد پاکسازی بر اساس روش کدورت سنجی) را نشان می‌دهند. همچنین درصد پاکسازی این دو باکتری توسط پلاسمای سرد آرگون-هوا با یکدیگر در شکل ۳a مقایسه شدند. نتایج نشان داد برای *اشریشیا کلی* در ۲/۵ دقیقه ابتدایی بیشترین میزان اثر باکتری کشی پلاسما مشهود است (تفاوت ۴۰/۷ درصدی با منحنی کنترل) و این امر برای باکتری *استرپتوکوکوس پیوژنز* به ۵ دقیقه (تفاوت ۴۵/۵ درصدی با منحنی کنترل) رسید. همچنین مساحت زیر نمودار کدورت سنجی باکتری *اشریشیا کلی* در زمان ۱۲/۵ دقیقه کاهش تقریباً ۱۰۰ درصدی را تجربه

می‌کند، اما این امر برای باکتری *استرپتوکوکوس پیوژنز* بعد از ۱۵ دقیقه تیمار با جت پلاسمایی اتفاق می‌افتد. نتایج حاصل از مجموعه این داده‌ها، نشان می‌دهد که جت پلاسمای سرد فشار اتمسفری آرگون-هوا، از توان بالایی برای از بین بردن باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در محیط مایع در زمان کوتاه برخوردار است. به طوری که طبق نمودار کدورت سنجی جت پلاسمای سرد فشار اتمسفری قادر به کاهش بیش از ۵۰ درصدی میزان باکتری در زمان کمتر از تنها ۵ دقیقه برای *اشریشیا کلی* و کمتر از ۷ دقیقه برای *استرپتوکوکوس پیوژنز* است. همچنین نتایج نشان می‌دهند که زمان لازم برای پاکسازی کامل محیط مایع از باکتری، بین دو گروه باکتری گرم مثبت و گرم منفی متفاوت است. به طوری که باکتری گرم منفی *اشریشیا کلی* به اثرات جت پلاسمایی سرد فشار اتمسفری نسبت به باکتری گرم مثبت *استرپتوکوکوس پیوژنز* حساس‌تر می‌باشد.

نتایج پاکسازی در محیط جامد

تیمار باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *استرپتوکوکوس پیوژنز* توسط جت پلاسمای سرد آرگون-هوا در محیط جامد، در زمان‌های مختلف، با اندازه‌گیری هاله عدم رشد بررسی شد، نتایج نشان داد اگرچه با افزایش زمان تیمار، هاله عدم رشد برای هر دو باکتری زیاد می‌شود، ولی هاله عدم رشد برای باکتری *اشریشیا کلی*، بیشتر از هاله عدم رشد برای *استرپتوکوکوس پیوژنز* در زمان‌های برابر است. که تأیید کننده اطلاعات حاصل از نمودار کدورت سنجی است. برای بررسی دقیق اثر پلاسما، ضریب اثر گذاری پلاسما برای هر یک از نمونه‌ها ضریب اثر گذاری = مساحت هاله عدم رشد تقسیم بر (مساحت سطح مقطع جت پلاسمای تک شعله که ثابت و برابر با ۰/۰۳ سانتی متر مربع است) [محاسبه و نمودار مقایسه‌ای آنها رسم گردید (شکل ۳b)].

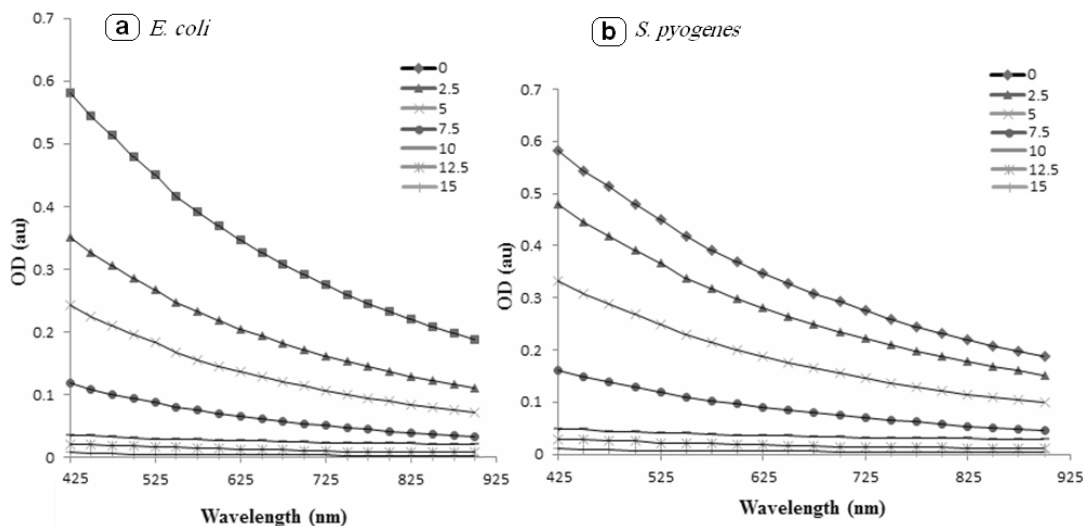
جدول ۲: مساحت‌های زیر منحنی کدورت سنجی اشریشیا کلی و استرپتوکوکوس پیوژنز پس از تیمار با پلاسما

	S	D	P
زمان (دقیقه)			
استرپتوکوکوس پیوژنز (<i>S. pyogenes</i>)	۰	۲۴۳/۹۱	۰
	۲/۵	۱۹۷/۷۹	۴۶/۱
	۵	۱۳۲/۸۳	۱۱۱/۵
	۷/۵	۶۳/۵۲	۱۸۰/۳
	۱۰	۲۵/۶۰	۲۱۸/۳
	۱۲/۵	۱۲/۷۲	۲۳۱/۱
۱۵	۱/۰۲	۲۴۲/۹	۹۹/۵
اشریشیا کلی (<i>E. coli</i>)	۰	۲۴۳/۹۱	۰
	۲/۵	۱۴۴/۴	۹۹/۵
	۵	۹۷/۹۶	۱۴۵/۹۵
	۷/۵	۴۶/۹۱	۱۹۷
	۱۰	۱۸/۶۸	۲۲۵/۲
	۱۲/۵	۲/۹	۲۴۱
۱۵	۱۵/۰۹	۲۴۳	۹۹/۶

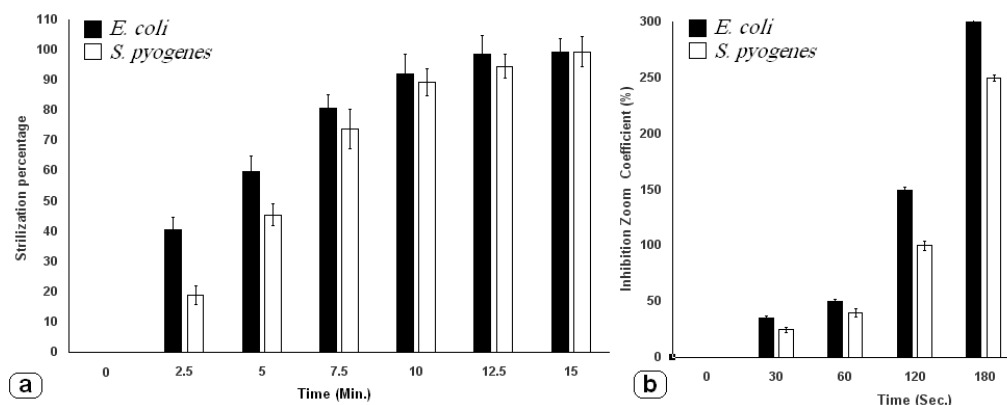
S= مساحت زیر منحنی کدورت سنجی؛ این مساحت نسبت به خطوط X و Y نمودار محاسبه شده است. واحد مساحت: a.u. است؛ D= تفاوت میان مساحت منحنی کنترل و سایر منحنی‌ها؛ P= درصد تفاوت میان مساحت منحنی کنترل و سایر منحنی‌ها

پلاسمای سرد فشار اتمسفری آرگون-هوا، همانند محیط مایع از توان بالایی برای از بین بردن باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در محیط جامد در زمان بسیار کوتاه برخوردار است. به طوری که جت پلاسمای سرد فشار اتمسفری آرگون-هوا در کمتر از ۳۰ ثانیه سطح زیر جت را پاکسازی می‌کند. همچنین با افزایش زمان تیمار تا ۱۸۰ ثانیه مساحت ناحیه غیر فعال سازی در مورد باکتری اشریشیا کلی به مساحت ۳۰۰ برابری سطح مقطع جت افزایش پیدا می‌کند. که این امر در مورد باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز ۲۵۰ برابر است. از سوی دیگر نتایج نشان می‌دهند که ضریب تأثیر در زمان‌های مختلف برای پاکسازی باکتری در محیط جامد، بین دو گروه باکتری گرم مثبت و گرم منفی متفاوت است. به طوریکه باکتری گرم منفی اشریشیا کلی با داشتن ضریب تأثیر پذیری بیشتر به اثرات جت پلاسمایی سرد فشار اتمسفری نسبت به باکتری گرم مثبت استرپتوکوکوس پیوژنز حساس‌تر می‌باشد. که اطلاعات حاصل از تیمار باکتری در محیط مایع را تأیید می‌کند.

مقایسه اثرگذاری پلاسما در محیط جامد روی دو باکتری اشریشیا کلی و استرپتوکوکوس پیوژنز، نشان می‌دهد که جت



شکل ۲: منحنی کدورت سنجی اثر پلاسمای اتمسفری در LB ی مایع تلقیح شده با باکتری: میزان چگالی نوری (OD) منحنی‌ها در گستره طول موج‌های ۹۰۰-۴۲۵ نانومتر مربوط به باکتری اشریشیا کلی (a) و باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز (b) پس از تیمار با پلاسما در زمان‌های مختلف صفر، ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۲/۵ و ۱۵ دقیقه شارش



شکل ۳: مقایسه اثر پلاسمای روی باکتری/شیرشیا کلی و استرپتوکوکوس پیوژنز: (a) مقایسه پاکسازی این دو باکتری از محیط مایع؛ (b) مقایسه ضریب اثر گذاری پلاسمای روی این دو باکتری از محیط کشت

بحث و نتیجه‌گیری

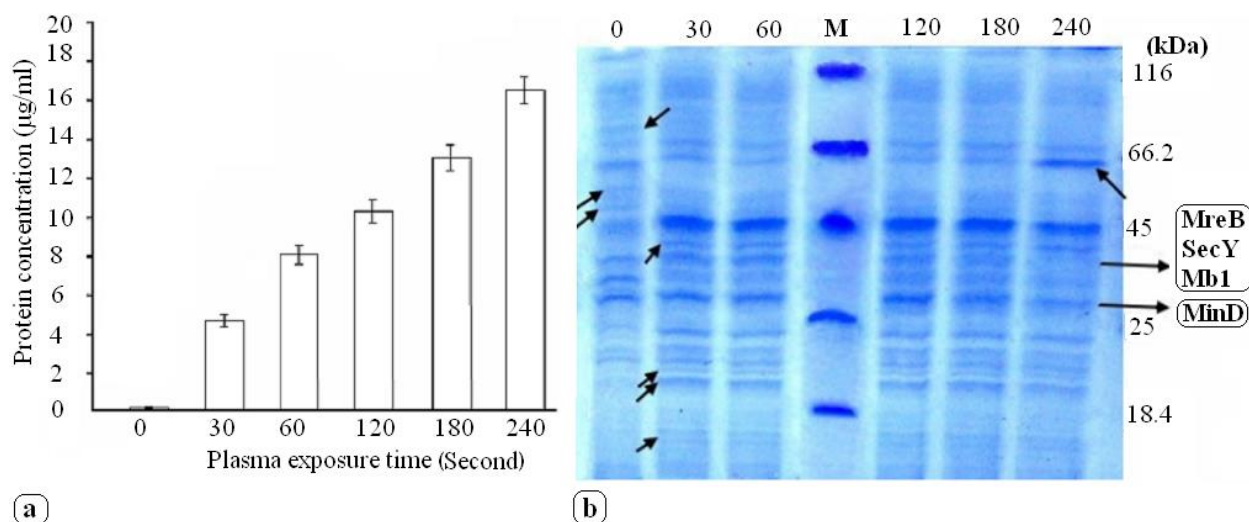
در مطالعات گذشته، Ramona و همکارانش با به کار گیری پلاسمای جت چهار شعله گاز هلیم روی *S. aureus* نشان دادند که در طی ۱۰۰ ثانیه، قطر ناحیه غیر فعال شده به ۱۶ میلی متر می‌رسد (۲۷). Alkawareek و همکاران نیز با به کار گیری پلاسمای هلیم (۹۹/۵ درصد هلیم، ۵ درصد اکسیژن) اعلام کردند که با افزایش زمان تیمار قطر ناحیه پاکسازی شده از باکتری *Pseudomonas aeruginosa* افزایش می‌یابد (۲۸). نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد این موضوع برای جت پلاسمایی آرگون-هوا نیز صادق است و پلاسمای سرد آرگون-هوا نیز به خوبی قادر است تا آلودگی‌های باکتری یابی را از سطوح جامد و مایع پاکسازی کند. از طرفی به دلیل به کار گیری گاز آرگون نسبت به گاز هلیم از صرفه اقتصادی بهتری برخوردار می‌باشد که این امر یک مزیت نسبت به ساختارهای گذشته به حساب می‌آید. از سویی دیگر تحقیقات گذشته بوسیله پلاسمای اکسیژن نشان داد که زمان پاکسازی برای باکتری/شیرشیا کلی در محیط مایع ۱۵ دقیقه است (۲۸). به کار گیری گاز آرگون و تمرکز پلاسمای بوسیله ساختار جت در این آزمایش زمان را ۳۳ درصد کاهش می‌دهد که این امر نیز یک مزیت دیگر برای پلاسمای آرگون-هوا به حساب می‌آید.

نکته قابل ملاحظه در از بین بردن باکتری‌ها در محیط‌های LB جامد و مایع این است که چنین محیط‌هایی، به عنوان منابع غنی از مواد غذایی (اعم اسیدهای آمینه، املاح و غیره) عمل می‌نمایند. از سوی دیگر، در این مطالعه، رشد باکتری‌ها در درجه حرارت اپتیمم صورت گرفت. در محیط‌های طبیعی، چنین شرایطی وجود نخواهد داشت. بنابراین انتظار بر این است که این دستگاه پلاسمای با اثر بخشی و بازده بالاتری، باکتری‌های مختلف را که روی سطوح جامد یا در محیط‌های مایع قرار گرفته‌اند، از بین ببرد.

نتایج اندازه گیری غلظت پروتئین در مایع روئی

باکتری تیمار شده

نتایج حاصل از اندازه گیری میزان پروتئین در سوپرناتانت باکتری تیمار شده با پلاسمای به روش برادفورد نشان می‌دهد که با افزایش زمان تیمار با پلاسمای، میزان پروتئین در مایع روئی باکتری تیمار شده افزایش می‌یابد (شکل ۴a). که این امر می‌تواند به دلیل آسیب دیدن و تخریب شدن غشا سلول‌ها در اثر تخریب پروتئین‌ها و اسیدهای چرب غیر اشباع موجود در آن بوسیله گونه‌های فعال موجود در پلاسمای سرد فشار اتمسفری باشد. در واقع این موضوع سبب می‌شود که محتویات دورن سلولی باکتری از جمله پروتئین‌های درون سلولی آن به بیرون نشت پیدا کند. مقایسه الگوی باندهای پروتئین‌های تام مایع روئی باکتری‌های/شیرشیا کلی در SDS-PAGE نشان داد (شکل ۴b)، که با افزایش زمان تیمار با پلاسمای الگوی باندهای پروتئینی تغییر کرد.



شکل ۴: میزان و تغییر سطح پروتئین های مایع روئی باکتری /شیرشیا کلی در زمان های مختلف تیمار با پلاسما: (a) میزان پروتئین های مایع روئی اندازه گیری شده به روش برادفورد؛ (b) اگلوئی پروتئین های مایع روئی در SDS-PAGE. اعداد روی ستون های ژل زمان های مختلف تیمار با پلاسما و kDa وزن باندهای ستون مارکر (M) به کیلو دالتون است، نواحی مشخص شده، نشان دهنده ی بعضی از تغییرات باندی است.

مولکولی، ذرات موجود در پلاسما باعث از بین رفتن بعضی از پروتئین ها می شوند. این مسئله می تواند به علت تغییر در شکل فضایی پروتئین ها و نوع پیوندهای موجود در برخی از پروتئین ها باشد که سبب می شود برخی از آن ها نسبت به سایرین در برابر اجزای پلاسما حساس تر باشند. نکته حائز اهمیت در الگوی SDS-PAGE پروتئین تام باکتری /شیرشیا کلی تغییر باندهای پروتئینی است، که مسئول اسکلت سلولی باکتری و تعیین کننده شکل باکتری می باشند. از جمله پروتئین های شبه اکتینی MerB و Mbl با وزن ملکولی ۳۶ کیلو دالتونی هستند که نقش آن ها ایجاد ساختار میله ای شکل باکتری و کمک به جایگیری پروتئین های سلول می باشد (۳۲، ۳۳). همچنین پروتئین های SecY و MinD با وزن مولکولی ۲۶ و ۳۶ کیلو دالتون، که پروتئین های منحصر به فرد اسکلت سلولی باکتری هستند در تعیین شکل باکتری و تنظیم تقسیم سلول نقش دارند (۳۳). بنابراین، تخریب شدن این پروتئین ها و یا کاهش بیان آن ها در اثر تیمار با پلاسما در سلول باکتری می تواند یکی از دلایل دیگر تغییر مورفولوژیکی باکتری و مرگ آن در اثر تیمار با پلاسمای سرد فشار اتمسفری باشد.

با توجه به نتایج این تحقیق و تحقیقات قبلی، می توان گفت که دلیل میزان اثر پذیری متفاوت دو باکتری /شیرشیا کلی

نتایج حاصل از این تحقیق نشان دادند که زمان پاکسازی و میزان اثرپذیری باکتری گرم منفی /شیرشیا کلی و گرم مثبت /استرپتوکوکوس پیوژنز با یکدیگر متفاوت است به نظر می رسد علت این تفاوت به دلیل تفاوت در ساختار زیستی این دو باکتری باشد. بدین صورت که پلاسمای سرد استفاده شده در این تحقیق گونه های فعالی را تولید می کند که این گونه ها روی سلول باکتری و ماکرومولکول های آن تأثیر گذارند. در واقع این گونه های فعال مانند ازون، رادیکال های N و NO، سینگلت اکسیژن نقش کلیدی را در پاکسازی با پلاسما دارند و عامل اصلی اثر گذاری پلاسما سرد هستند. زیرا این گونه ها می توانند باعث شکسته شدن بسیاری از پیوندهای مولکول های زیستی شوند و آغاز کننده بسیاری از واکنش های شیمیایی باشند (۲۹-۳۰) همچنین پروتئین ها، DNA و RNA از جمله مولکول های هدف گونه های فعال اکسیژن هستند (۲۹). همچنین Yang و همکاران در سال ۲۰۰۹ و Hosseinzadeh Colagar و همکاران در سال ۲۰۱۳ در تحقیقات خود اعلام کردند که پلاسما سبب تخریب در پروتئین ها و پراکسیده شدن لیپیدهای باکتری گرم منفی /شیرشیا کلی می شود و در نتیجه با تخریب غشا باکتری سبب مرگ میکروارگانیسم می گردد (۱۹، ۳۱). شکل ۴b نیز نشان می دهد الگوی باندی پروتئین های تام مایع روئی باکتری های /شیرشیا کلی با افزایش زمان تیمار با پلاسما تغییر می کند. از لحاظ

می‌توان پیشنهاد کرد که با توجه به مزیت بی خطر بودن پلاسمای برای سطوح بیولوژیک از این تکنولوژی در کاهش عفونت‌های باکتریایی زخم‌های مزمن و تسریع بهبودی این نوع جراحات استفاده کرد. از سوی دیگر تحقیق حاضر نشان داد جت پلاسمایی سرد فشار اتمسفری آرگون- هوا دارای اثر گذاری بیشتر روی باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد. که نتایج این قسمت از پژوهش می‌تواند در صنعتی سازی و بهینه سازی جت پلاسمایی در پژوهش‌های بعدی مفید واقع شود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از آقای دکتر سعید میرزانژاد، خانم مولود باقری، خانم سمانه مطلبی، خانم معصومه فرهادی، خانم آزاده ولی نتاج (همگی از اعضای تیم آزمایشگاه تحقیقاتی لیزر و پلاسمای، دانشگاه مازندران) و آقای حامد معماریانی، آقای امید علوی، و آقای وحید عرب یارمحمدی (همگی از اعضای تیم آزمایشگاه سلولی و مولکولی، دانشگاه مازندران) که در ارائه پیشنهادات و تجربیات در بهتر نمودن انجام این پژوهش نهایت همکاری را مبذول داشتند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع:

بین نویسندگان و مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

و استریپتوکوکوس پیوژنز در تیمار با پلاسمای به علت تفاوت ساختار غشاء این دو باکتری، به عنوان اولین صد، تعیین کننده آستانه آسیب پذیری در برابر پلاسمای است. چراکه غشاء باکتری گرم مثبت پیوژنز از دولایه پپتیدوگلیکان (مورئین) ضخیم و فاقد غشای خارجی است. در حالی که باکتری گرم منفی، /شریشیا کلی غشای خارجی نازک و یک لایه^{۲۰} مورئین دارد (۲۰). که در نتیجه باکتری گرم مثبت استریپتوکوکوس پیوژنز، با بهره مندی از غشای ضخیم‌تر در برابر اثر تخریبی گونه‌های فعال موجود در پلاسمای روی ساختارهای سلولی دارای مقاومت بیشتری می‌باشد.

در یک جمع بندی کلی می‌توان گفت از آنجایی که بسیاری از روش‌های ضد عفونی از جمله روش‌های شیمیایی، فیزیکی، حرارت خشک و یا مرطوب برای ضد عفونی سطوح جامد و یا مایعات و سطوح بیولوژیک مانند پوست با محدودیت‌های کاربردی همراه می‌باشند. استفاده از فن‌آوری پلاسمای غیرحرارتی در پاکسازی دارای مزایایی نسبت به روش‌های قبلی موجود دارد که از آن جمله، می‌توان به خاصیت باکتری کشی بالا در زمان شارش کوتاه، فقدان سمیت باقیمانده، مقرون به صرفه بودن با جایگزینی گاز آرگون به جای گاز هلیوم اشاره نمود. در نتیجه می‌توان با انجام پژوهش‌های بیشتر و عبور از مرحله آزمایشگاهی این فناوری، می‌توان از این فناوری نوین می‌تواند در مدیریت ضد عفونی سطوح در محیط‌های بیمارستانی و سایر مکان‌های عمومی مورد توجه محققین قرار گیرد. همچنین

References

1. Valipour F, Rezaee A, Salem M, Norian S, Motamed Pour L. Removal of *Pseudomonas aeruginosa* in hospital air using microwave radiation. Iran J Med Microbiol. 2013;7(2):8-13.
2. Mirnejad R, Fallahi S, Jeddi F, Kiani J, Taslimi R. Study of spontaneous bacterial peritonitis etiologic agents and determination of their antibiotic resistance pattern. Iran J Med Microbiol. 2007;1(2):43-8.
3. Kong MG, Kroesen G, Morfill G, Nosenko T, Shimizu T, Van Dijk J, et al. Plasma medicine: An introductory review. New J Phys. 2009; 11(11): 115012-46.
4. Waters A, Contente-Cuomo T, Buchhagen J, Liu CM, Watson L, Pearce K, et al. Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* in US Meat and Poultry. Clin Infect Dis. 2011;52(10):1227-30.
5. Rinsky J, Nadimpalli M, Wing S, Hall D, Baron D, Price L, et al. Livestock-Associated Methicillin and Multidrug Resistant *Staphylococcus aureus* Is Present among Industrial, Not Antibiotic-Free Livestock Operation Workers in North Carolina. PLoS ONE. 2013;8(7): e67641.
6. Mohammadimehr M, Feizabadi M, Bahadori O, Motshaker Arani M, Khosravi M. Study of prevalence of gram-negative bacteria caused nosocomial infections in ICU in besat hospital in Tehran and detection of their antibiotic resistance pattern-year. Iran J Med Microbiol. 2009;3(2&3):47-54.

7. Shirazi M, Akbari A, Sharifi Yazdi MK, Hosseini M, Fardsanei F, Bakhtiari R, et al. Antibiotic resistance patterns of enteropathogenic *E. coli* (EPEC) serogroups isolated from stool of under 5 years old children with diarrhea in Tehran:2007- 2008. Iran J Med Microbiol. 2009;2(3&4):59-65.
8. Lloyd G, Friedman G, Jafri S, Schultz G, Fridman A, Harding K. Gas Plasma: medical uses and developments in wound care. Plasma Proc Poly. 2010; 22;7 (3-4):194-211.
9. Etufugh CN, Phillips TJ. Venous ulcers. Clin Dermatol. 2007;25(1):121-30.
10. Vaez H, Ghazi Saeidi K, Moradi A, Tabaraei A, Khodabakhshi B, Bazouri M, et al. Antibiotic resistance pattern of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Health-educational centers of Gorgan, Iran, 2008-2009. Iran J Med Microbiol. 2010;3(4):31-6.
11. Dormanesh B, Mirnejad R, Khodaverdi Dariyan E, Momtaz H, Yahaghi E, Safarpour Dehkordi F, et al. Characterization and study the antibiotic resistance of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from pediatrics with pyelonephritis and cystitis in Iran. Iran J Med Microbiol. 2013;7(2):27-39.
12. Kampf G, Widmer AF. Compliance with application time for surgical hand disinfection. Infect Control Hosp Epidemiol. 2006;27(9):996-8.
13. Fridman G, Friedman G, Gutsol A, Shekhter AB, Vasilets VN, Fridman A. Applied plasma medicine. Plasma Process Polym. 2008;5(6):503-33.
14. Venezia R, Orrico M, Houston E, Yin S-M, Naumova YY. Lethal activity of nonthermal plasma sterilization against microorganisms. Infect Control Hosp Epidemiol. 2008;29(5):430-6.
15. Bogaerts A, Neyts E, Gijbels R, van der Mullen J. Gas discharge plasmas and their applications. Spectrochim Acta Part B At Spectrosc. 2002;57(4):609-58.
16. Xingmin S, Yukang Y, Yanzhou S, Wang Y, Fengling P, Yuchang Q. Experimental research of inactivation effect of low-temperature plasma on bacteria. Plasma Sci Technol. 2006;8(5):569.
17. Hosseinzadeh Colagar A, Sohbatzadeh F, Mirzanejhad S, Valinataj Omran A. Sterilization of *Streptococcus pyogenes* by afterglow dielectric barrier discharge using O₂ and CO₂ working gases. Biochem Engin J. 2010;51(3): 189-93.
18. Weng C-C, Wu Y-T, Liao J-D, Kao C-Y, Chao C-C, Chang J-E, Hsu BW. Inactivation of bacteria by a mixed argon and oxygen micro-plasma as a function of exposure time. Int J Radiat Biol. 2009;85(4):362-8.
19. Hosseinzadeh Colagar A, Memariani H, Sohbatzadeh F, Valinataj Omran A. Nonthermal atmospheric argon plasma jet effects on *Escherichia coli* biomacromolecules. Appl Biochem Biotechnol. 2013;171(7):1617-29.
20. Levinson W, Jawetz E. Medical microbiology and immunology: Examination and board review. Appleton & Lange, 1996.
21. Hosseinzadeh Colagar A, Alavi O, Motallebi S, Sohbatzadeh F. Decontamination of *Streptococcus pyogenes* and *Escherichia coli* from solid surfaces by singlet and triplet atmospheric pressure plasma jet arrays. Arab J Sci Eng. 2016;41(6):2139-2145
22. Sohbatzadeh F, Hosseinzadeh Colagar A, Mirzanejhad S, Motallebi S, Farhadi M, Bagheri M, et al. Design and construction of triplet atmospheric cold plasma jet for sterilization. Iran J Phys Res. 2014;13(4):363-374
23. Sohbatzadeh F, Hossienzadeh Colagar A, Mirzanejhad S, Mahmodi S. *E. coli*, *P. aeruginosa* and *B. cereus* bacteria sterilization using afterglow of non-thermal plasma at atmospheric pressure. Appl Biochem Biotechnol. 2010;160(7):1978-84
24. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72(1-2): 248-54
25. Green MR, Sambrook J. Molecular cloning a laboratory manual. 4th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press- New York; 2012.
26. Poiata A, Motrescu I, Nastuta A, Creanga DE, Popa G. Microorganism response to atmospheric pressure helium plasma DBD treatment. J Electrostat. 2010;68(2):128-31.
27. Ramona F, Antoniea P, Iuliana M, Andrei N, Dorina C, Gheorghe P. Bacteria response to non-thermal physical factors: A study on *Staphylococcus aureus*. Afr J Biotechnol. 2012;11(18):4234-40.
28. Alkawareek MY, Algwari QT, Laverty G., Gorman GP, Graham WG, O'Connell D, et al. Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by atmospheric pressure non-thermal plasma. PLoS ONE. 2012;7:e44289.
29. Kalghatgi S, Kelly C, Cerchar E, Torabi B, Alekseev O, Fridman A, et al. Effects of non-thermal plasma on mammalian cells. PLoS ONE. 2011;6(1):e16270.
30. Song HP, Kim B, Choe JH., Jung S, Moon SY, Choe W, et al. Evaluation of atmospheric pressure plasma to improve the safety of sliced cheese and ham inoculated by 3-strain cocktail *Listeria monocytogenes*. Food Microbiol. 2009;26(4):432-6.

31. Yang L, Chen J, Gao J. Low temperature argon plasma sterilization effect on *Pseudomonas aeruginosa* and its mechanisms. *J Electrostatics*. 2009;67(4):646-51.
32. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA.. Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology. 27th ed. Carroll KC, Butel J, Morse S: The McGraw-Hill Companies, Inc. New York; 2016
33. Joshi SG, Cooper M, Yost A, Paff M, Ercan UK, Fridman, G, et al. Nonthermal dielectric-barrier discharge plasma-induced inactivation involves oxidative DNA damage and membrane lipid peroxidation in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55(3):1053-62

