

The Effect of Plasma Activated Water on *Acanthamoeba castellanii*

Darvishi M¹, Bahrami S*¹, Zarei M², Sabaeian M³

1. Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

3. Department of Physics, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

* **Corresponding author.** Tel: +986133738636, Fax: +98613336080, E-mail: s.bahrami@scu.ac.ir

Received: May 26, 2022

Accepted: Jun 18, 2022

ABSTRACT

Background & Objectives: Cold Plasma is an emerging non-thermal, chemical-free, environmentally friendly disinfection technology. Plasma-activated water has received considerable attention from researchers in recent years. Despite extensive studies on the antibacterial effects of plasma-activated water, its anti-eukaryotic effects have not been identified. In humans, *Acanthamoeba* causes granulomatous encephalitis, skin ulcers, and *Acanthamoeba* keratitis. Considering the health importance of *Acanthamoeba*, this study investigated the anti-amoeba effect of plasma-activated water on trophozoites and cysts of *Acanthamoeba castellanii*.

Methods: In this study, plasma-activated water prepared by the cold atmospheric plasma method. Physicochemical properties of produced water were evaluated by measuring pH, hydrogen peroxide, nitrite, and nitrate. To assess the effect of plasma-activated water on *A. castellanii*, trophozoites and cysts were exposed to plasma-activated water for 0.5, 1, 2, 3, 4, and 5 hours. Three replicates were examined each time. At the mentioned times, cell viability was calculated by trypan-blue staining and counting on a hemocytometer, and the results were statistically analyzed.

Results: Based on the physicochemical results, the mean pH of plasma-activated water in this study was about 3.4, and the amount of hydrogen peroxide, nitrate, and nitrite were 102, 737, and 36.94 μ M, respectively. The present study showed that plasma-activated water killed *A. castellanii* trophozoites after three hours of exposure and *A. castellanii* cysts after four hours of exposure. On the other hand, some trophozoites gradually became cysts after exposure to plasma-activated water. These cysts became more resistant to plasma-activated water and inactivated after five hours of exposure.

Conclusion: In this study, for the first time, the effect of plasma-activated water on *A. castellanii* was investigated. The results of the present study showed that plasma-activated water is able to inactivate *A. castellanii* trophozoites and cysts. Therefore, plasma-activated water can be used to disinfect and inactivate *A. castellanii*.

Keywords: *Acanthamoeba castellanii*; Trophozoites; Cysts; Plasma; Water

تأثیر آب فعال شده با پلاسما بر آکانتاموبیا کستلانی

مجتبی درویشی^۱، سمیه بهرامی^{۱*}، مهدی زارعی^۲، محمد صبائیان^۳

۱. بخش انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳. گروه فیزیک، دانشکده علوم، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۶۱۳۳۷۳۸۶۳۶ فاکس: ۰۶۱۳۳۳۶۰۸۰ پست الکترونیک: s.bahrani@scu.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: پلاسمای سرد یک فناوری نوظهور جهت ضدعفونی غیرحرارتی، بدون مواد شیمیایی و سازگار با محیط زیست است. آب فعال شده با پلاسما در سال‌های اخیر مورد توجه بسیاری از محققان گرفته است. علی‌رغم مطالعات گسترده و بررسی اثرات ضدباکتریایی آب فعال شده با پلاسما، اثرات ضد یوکاریوتی آن مشخص نگردیده است. آمیب آکانتومبا عامل ایجادکننده انسفالیت گرانولوماتوز، زخم‌های پوستی و کراتیت آکانتاموبایی در انسان است. با توجه به اهمیت بهداشتی آکانتاموبا، در این مطالعه اثر ضدآمیبی آب فعال شده با پلاسما بر تروفوزوئیت و کیست‌های آکانتاموبا کستلانی بررسی گردید.

روش کار: جهت انجام این مطالعه از آب فعال شده با روش پلاسمای سرد در فشار اتمسفر استفاده گردید. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آب تولید شده با اندازه‌گیری pH، میزان پراکسید هیدروژن، یون نیتريت و نیترات ارزیابی گردید. برای ارزیابی اثر آب فعال شده با پلاسما بر آکانتاموبا کستلانی، تروفوزوئیت و کیست‌های آکانتاموبا به مدت ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ ساعت با آب فعال شده با پلاسما مواجه گردیدند. برای هر زمان سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. در زمان‌های مذکور میزان زنده‌مانی سلول‌ها با رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو و شمارش روی لام هموسیستمتر محاسبه گردید و نتایج مورد بررسی آماری قرار گرفت.

یافته‌ها: بر اساس نتایج فیزیکوشیمیایی، میانگین pH آب فعال شده با پلاسما در این مطالعه در حدود ۳/۴، میزان پراکسید هیدروژن ۱۰۲ میکرومولار، میزان نیترات ۷۳۷ میکرومولار و میزان نیتريت ۳۶/۹۴ میکرومولار حاصل شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که آب فعال شده با پلاسما تروفوزوئیت‌های آکانتاموبا کستلانی را پس از سه ساعت مواجهه و کیست‌های آکانتاموبا کستلانی را پس از ۴ ساعت مواجهه از بین برد. از طرف دیگر تعدادی از تروفوزوئیت‌ها پس از مواجهه با آب فعال شده با پلاسما به تدریج تبدیل به کیست شدند. این کیست‌ها مقاومت بیشتری را در مقابل آب فعال شده با پلاسما از خود نشان دادند و پس از پنج ساعت مواجهه از بین رفتند.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه برای اولین بار اثر آب فعال شده با پلاسما بر آکانتاموبا کستلانی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که آب فعال شده با پلاسما قادر به از بین بردن تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آکانتاموبا کستلانی می‌باشد. بنابراین از این نوع آب می‌توان جهت ضدعفونی کردن و از بین بردن آکانتاموبا کستلانی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: آکانتاموبا کستلانی، تروفوزوئیت‌ها، کیست‌ها، پلاسما، آب

دریافت: ۱۴۰۱/۳/۵ پذیرش: ۱۴۰۱/۳/۲۸

مقدمه

تک‌یاخته *آکانتامبا* یک آمیب تک‌سلولی فرصت‌طلب، دارای میتوکنندری، زندگی آزاد و به‌عنوان یک آمیب آمفیزوییک^۱ محسوب می‌شود که تقریباً از همه جای طبیعت جدا شده است و این مساله حکایت از مقاومت بالای آمیب مذکور در برابر محیط‌های نامناسب، از جمله اسمولاریته بالا، دما، فشار، ترکیبات ضد میکروبی و... است [۱،۲]. در چرخه زندگی *آکانتامبا* دو مرحله متمایز وجود دارد. تروفوزوئیت که شکل متحرک و فعال آمیب می‌باشد و مرحله کیست که مرحله مقاوم و خفته آمیب محسوب می‌شود [۳]. کیست‌ها پس از مواجهه ارگانیسم با شرایط نامطلوب مانند اسمولاریته بالا، دمای نامناسب، pH شدید ایجاد می‌گردند و می‌توانند برای چندین سال خفته بمانند تا زمانی که غذا در دسترس قرار گیرد [۴،۵]. آمیب *آکانتاموبا* قادر است در افرادی که دچار نقص سیستم ایمنی هستند مانند بیماران مبتلا به ایدز، کودکان، بیماران لوکمی و افرادی که پیوند دریافت کرده‌اند باعث ایجاد انسفالیت گرانولوماتوز آمیبی^۲ (GAE) و زخم‌های پوستی شود [۶]. گونه‌های *آکانتاموبا* از عوامل ایجاد کننده عفونت قرنیه هستند. کراتیت *آکانتاموبایی*^۳ (AK) به عنوان یک عفونت چشمی تهدید کننده در سراسر جهان شناخته شده است. لنزهای تماسی عامل اصلی ابتلا به کراتیت *آکانتاموبایی* هستند با این حال در افراد سالم و افراد با نقص سیستم ایمنی که در معرض آب آلوده قرار گرفته‌اند، نیز رخ می‌دهد، که با درد شدید، التهاب همراه با قرمزی و فتوفویا همراه است و اگر سریع تشخیص داده نشود اپیتلیوم قرنیه تحت نفوذ آمیب قرار می‌گیرد و زخم ایجاد می‌شود که در نهایت منجر به از دست دادن بینایی می‌شود [۷]. از دیگر نکات مهم در خصوص آمیب‌های جنس *آکانتامبا* این است که

آمیب در طبیعت به عنوان مخزنی برای انواع باکتری‌های پاتوژن نظیر گونه‌های *لژیونلا*، *هلیکوباکتر پیلوری*، *ویبریو کلرا*، *مایکوباکتریوم اوپوم*، *سالمونلا*، *لیستریا مونوسیژنوز* و *بورخلدیریا سودومالئی* شناخته شده‌اند و سبب حفظ، تکثیر و انتقال این عوامل باکتریایی می‌شوند [۸،۹]. مطالعات زیادی روی زنده‌مانی آمیب *آکانتامبا* در برابر مواد ضد عفونی کننده از جمله کلر، مونو کلرامین، ازون، اشعه ماوراء بنفش، مس و نقره، PHMB^۴، قارچ کش اکینوکاندین، سیکلو هگزیماید، کلرهگزیدین و... انجام شده است [۱۰-۱۲]. با این حال مطالعات زیادی همواره جهت یافت ترکیبات جدید با اثر بیشتر و عوارض جانبی کمتر در حال انجام است. یکی از این تکنیک‌های امیدوار کننده، ضد عفونی با استفاده از پلاسمای سرد است. پلاسما، چهارمین حالت ماده پس از جامد، مایع و گاز است. پلاسما یک ماده رسانای الکتریکی است که سرشار از یون‌های مثبت و منفی، رادیکال‌های واکنش پذیر متعدد مانند گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و نیتروژن (RNS)، تعداد زیادی از پرتوهای الکترومغناطیسی و میدان الکتریکی قوی می‌باشد. مهمترین ویژگی‌های شیمیایی آب فعال شده با پلاسمای سرد اتمسفریک که ارتباط مستقیمی با میزان فعالیت ضد میکروبی آن دارد، میزان پراکسید هیدروژن، نیتريت و نیترات تولید شده در آن متعاقب فرایند پلاسما است [۱۳،۱۴]. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر احتمالی آب فعال شده با پلاسما^۵ بر تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آمیب *آکانتاموبا کستلانی* بوده است.

^۴ Polyhexamethylene Biguanide^۵ Plasma-activated water (PAW)^۱ Amphizoic^۲ Granulomatous Amebic Encephalitis^۳ *Acanthamoeba keratitis*

روش کار

این مطالعه با کد EE/1401.2.24.85505/Scu.ac.ir در کمیته اخلاق به تصویب رسیده است.

تولید آب فعال شده با پلاسما

در این تحقیق از آب فعال شده با روش پلاسمای سرد در فشار اتمسفر با استفاده از دستگاه تهیه شده در مرکز تحقیقات لیزر و پلاسمای دانشگاه شهید چمران اهواز استفاده شد. دستگاه تولید پلاسمای سرد در فشار اتمسفر، شامل دو الکترود استوانه‌ای از جنس آلومینیوم به قطر حدود ۷ cm و ضخامت حدود ۳ cm است که در فاصله قابل تغییری در حدود ۱ cm و مقابل هم قرار می‌گیرند. این استوانه‌های مقابل هم، در یک جعبه از جنس پلکسی و کاملاً بسته قرار می‌گیرند که قابلیت تزریق هر گازی و از جمله اکسیژن را دارد. برای تولید آب فعال شده با پلاسما بدین منظور حجم مشخصی آب (۳۵ میلی لیتر) درون دستگاه پلاسما برای مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت تا ترکیبات شیمیایی فعال که دارای اثرات ضد میکروبی هستند در درون آن ایجاد شود. شکل ۱، دستگاه طراحی شده در مطالعه حاضر در مرکز تحقیقات لیزر و پلاسما را نشان می‌دهد. پس از تهیه آب فعال شده با پلاسما، اندازه‌گیری pH به وسیله دستگاه pH متر انجام گردید و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن اندازه‌گیری شد. ولتاژ مورد استفاده در این دستگاه ۲۰ کیلوولت، مدت زمان فرایند تولید آب فعال شده با پلاسما ۱۰ دقیقه و هوای معمولی بعنوان اتمسفر داخل محفظه استفاده شد. حجم آب اولیه این دستگاه ۳۵ میلی‌لیتر و حجم نهایی آب تولید شده ۲۱ میلی‌لیتر بود. جزئیات شرایط بهینه تولید آب فعال شده با پلاسما در جدول ۱ آمده است.

ارزیابی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آب فعال شده با پلاسما

- اندازه‌گیری میزان پراکسید هیدروژن در آب فعال شده با پلاسما

اساس کار در اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن یک واکنش رنگی است که در آن تیتانیوم‌اکسی‌سولفات (TiOSO_4) با پراکسید هیدروژن واکنش داده و کمپلکس زرد رنگ پرتیتانیک‌اسید $[\text{TiO}(\text{H}_2\text{O}_2)]^{+2}$ تشکیل می‌شود که شدت رنگ آن در طول موج ۴۰۷ نانومتر با اسپکتروفوتومتر قابل اندازه‌گیری می‌باشد. به دلیل اینکه در این واکنش وجود یون‌های نیتريت می‌تواند تداخل ایجاد کند، از محلول سدیم آزاید برای احیاء نیتريت به نیتروژن مولکولی استفاده می‌شود و در نتیجه غلظت پراکسید هیدروژن ثابت باقی می‌ماند [۱۵].



شکل ۱. دستگاه طراحی شده برای تولید آب فعال شده با پلاسما

جدول ۱. جزئیات شرایط بهینه تولید آب فعال شده با پلاسما

ولتاژ	۲۰ کیلوولت
مدت زمان فرایند	۱۰ دقیقه
اتمسفر داخل محفظه	هوای معمولی
حجم آب اولیه	۳۵ میلی‌لیتر
حجم آب تولید شده	21 ± 1 میلی‌لیتر

جهت تعیین غلظت پراکسید هیدروژن در آب فعال شده با پلاسما، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آب تهیه شده به درون چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه ریخته شد و سپس به ترتیب ۱۰ میکرولیتر محلول سدیم آزاید ۶۰ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر محلول

تیتانیوم اکسی سولفات ۲/۵ درصد حل شده در اسید سولفوریک دو مولار به آن افزوده شد. میزان جذب نوری رنگ زرد ایجاد شده در طول موج ۴۰۷ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا ریدر قرائت گردید. برای تهیه منحنی استاندارد پراکسید هیدروژن، ابتدا محلول استوک ۰/۱ مولار از پراکسید هیدروژن (10^{-5} میکرو مولار) تهیه شد. سپس محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف (۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار) از آن تهیه شد [۱۴]. از تمامی رقت‌ها طبق روش بالا، ۱۰۰ میکرولیتر برداشته شد و در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد و پس از افزودن سدیم آزاید و محلول تیتانیوم اکسی سولفات، جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۰۷ نانومتر تعیین گردید. منحنی استاندارد در نرم افزار اکسل و با قرار دادن مقادیر جذب در برابر غلظت‌های مختلف ترسیم گردید. غلظت پراکسید هیدروژن در نمونه‌های آب فعال شده با پلاسما با قرار دادن مقادیر جذب در معادله منحنی استاندارد $(R^2=0.9984, Y=0.0002X+0.0526)$ به دست آمد.

اندازه‌گیری میزان یون نیتريت (NO_2^-) در آب فعال شده با پلاسما

اساس کار در آزمون تعیین غلظت نیتريت، واکنش نیتريت با سولفانیل آمید^۱ در یک محیط اسیدی است که سبب شکل‌گیری ترکیبات با ماهیت دی‌آزونیوم می‌شود. سپس این ترکیب به N-(۱-نفتیل)-اتیلن‌دی‌آمین‌دی‌هیدروکلرید^۲ ملحق شده و یک رنگ آزو صورتی رنگ پایدار تشکیل می‌شود که جذب آن به روش اسپکتروفتومتری تعیین می‌شود.

روش انجام آزمون بدین صورت است که ۵ میلی لیتر از آب فعال شده با پلاسما به لوله‌های آزمایش تمیز منتقل شده و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سولفانیل آمید یک درصد به آن افزوده شد. محتویات لوله‌ها به

وسیله شیکر آزمایشگاهی مخلوط و به مدت ۸-۲ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر از معرف N-(۱-نفتیل)-اتیلن‌دی‌آمین-هیدروکلرید یک درصد به لوله‌ها اضافه و لوله‌ها هم زده شد. لوله‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید تا رنگ صورتی ارغوانی توسعه یابد. در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت گردید. جهت تهیه نمونه بلانک، به جای آب فعال شده با پلاسما از آب مقطر استفاده شد. برای تهیه منحنی استاندارد نیتريت ابتدا محلول ۵۰ میکرومولار نیتريت سدیم در آب دی‌یونیزه تهیه گردید. از این محلول غلظت‌های مختلف ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۵ و ۲۵ میکرومولار رقیق‌سازی و تهیه شد. در نهایت ۵ میلی‌لیتر از هر یک از رقت‌ها مطابق روش ذکر شده در لوله‌های آزمایش ریخته شد و پس از طی مراحل یاد شده، جذب آن‌ها قرائت گردید. منحنی استاندارد در نرم افزار اکسل و با قرار دادن مقادیر جذب در برابر غلظت‌های مختلف ترسیم گردید. غلظت نیتريت در نمونه‌های آب با قرار دادن مقادیر جذب در معادله منحنی استاندارد $(R^2=0.9914, Y=0.0331X+0.0506)$ به دست آمد.

اندازه‌گیری میزان نیترات در آب فعال شده با پلاسما

اساس کار در این آزمون، احیای نیترات به نیتريت در محیط اسیدی می‌باشد. جهت انجام آزمون، ۵ میلی‌لیتر از آب فعال شده با پلاسما به لوله‌های آزمایش تمیز منتقل شده و سپس به آن ۱۰۰ میکرولیتر اسید کلریدریک یک مولار و سپس ۱۰ میکرولیتر سولفامیک اسید (H_3NSO_3) ۰/۸ درصد افزوده شد. محلول حاصله توسط شیکر لوله مخلوط گردید و جذب آن در طول موج ۲۲۰ نانومتر قرائت گردید. جهت تهیه نمونه بلانک، به جای آب فعال شده با پلاسما از آب مقطر استفاده شد [۱۶]. جهت تهیه منحنی استاندارد نیترات از نمک نیترات پتاسیم

^۱ Diazotizing Agent

^۲ Coupling Agent

استفاده شد. برای این منظور محلول استوک ۰/۰۰۵ مولار از این نمک در آب تهیه شد و سپس غلظت‌های ۰/۲۵-۰/۰۵ میکرو مولار از محلول استوک با رقیق سازی تهیه گردید. از غلظت‌های مختلف ۵ میلی‌لیتر در لوله آزمایش ریخته شد و مطابق بالا اندازه‌گیری نیترا ت انجام شد. برای هر غلظت سه لوله آزمایش برداشته شد. منحنی استاندارد در نرم افزار اکسل و با قرار دادن مقادیر جذب در برابر غلظت‌های مختلف ترسیم گردید. غلظت نیترا ت در نمونه‌های آب با قرار دادن مقادیر جذب در معادله منحنی استاندارد ($Y=0.003X+0.0173$, $R^2=0.9986$) به دست آمد.

کشت تروفوزوئیت و کیست آمیب

در این مطالعه از سویه استاندارد ATCC30010 *آکانتامبا کستلانی* استفاده شد. برای کشت تروفوزوئیت‌های *آکانتامبا* از محیط PYG^۱ در فلاسک‌های ۲۵ cm^۲ استفاده شد. این محیط شامل پروتئوز پیتون ۲ درصد، عصاره مخمر ۰/۱ درصد، سولفات منیزیم ۷ آبه ۱/۶ میلی‌مولار، کلرید کلسیم ۰/۴ میلی‌مولار، سدیم سیترا ت دو آبه ۰/۱ میلی‌مولار، فسفات سدیم ۷ آبه ۲/۵ میلی‌مولار، فسفات دی هیدروژن پتاسیم ۲/۵ میلی‌مولار، سولفات آمونیوم آهن دو دکا هیدرات ۱۲ آبه ۰/۵ میلی‌مولار و گلوکز ۰/۱ مولار استفاده شد. آمیب‌ها در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد در محیط PYG انکوبه شدند و هر سه روز یک‌بار پاساژ جدیدی از آن تهیه می‌گردید. برای تبدیل تروفوزوئیت‌ها به کیست، تروفوزوئیت‌ها روی پلیت آگار بدون باکتری کشت داده شدند. پس از هفت روز کیست‌های ایجاد شده با محلول AS^۲ شست‌وشو داده شدند. محلول AS شامل دو محلول A و B می‌باشد. برای تهیه محلول A، ۱/۲ گرم کلرید سدیم، ۰/۰۴ گرم سولفات منیزیم ۷ آبه، ۱/۴۲ گرم فسفات سدیم، ۱/۳۶ گرم فسفات دی

هیدروژن پتاسیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل گردید. محلول B نیز متشکل از ۰/۰۴ گرم کلرید کلسیم دو آبه در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل بود. محلول نهایی AS متشکل از ۱۰ میلی‌لیتر محلول A و ۱۰ میلی‌لیتر محلول B و ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر است. pH محلول توسط KOH حدود ۶/۹۱ تنظیم گردید. پس از شست‌وشو با محلول AS، کیست‌ها با دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند و در نهایت در محیط PAS^۳ برای آزمایش‌های بعدی نگهداری شدند. محیط PAS نیز متشکل از کلرید کلسیم ۲/۵ میلی‌مولار، فسفات دی هیدروژن پتاسیم ۱ میلی‌مولار، فسفات دی سدیک ۰/۵ میلی‌مولار، کلرید کلسیم ۶ آبه ۴۰ میکرومولار، سولفات منیزیم ۷ آبه ۲۰ میکرومولار، عصاره جو و مخمر ۴ درصد وزن بر حجم می‌باشد. pH محلول توسط KOH حدود ۶/۹۱ تنظیم گردید.

مواجهه آمیب با آب فعال شده با پلاسما

در این مرحله در زیر هود، محیط PYG داخل فلاسک‌های حاوی تروفوزوئیت‌ها دور ریخته شد و PBS سرد استریل به فلاسک‌ها اضافه گردید، فلاسک‌ها به مدت ۱۰ دقیقه جهت جدا شدن تروفوزوئیت‌ها از دیواره روی یخ قرار گرفتند. پس از آن محتویات فلاسک به یک فاکون استریل منتقل شد و حجم دقیق محیط کشت یادداشت شد. سپس با استفاده از لام هموسیتمتر تعداد تروفوزوئیت‌ها در حجم کل محیط کشت محاسبه شدند. در نهایت با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. در نهایت ۱۰^۵ آمیب (تروفوزوئیت) برای هر یک از زمان‌های مورد مطالعه، درون یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شده و مقدار ۵۰۰ میکرون آب فعال‌شده با پلاسما به آن اضافه و بعد از یکنواخت کردن، زنده‌مانی انگل در زمان‌های ۳۰ دقیقه، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ ساعت و برای هر

^۱ Peptone Yeast Glucose: PYG

^۲ Amoeba Saline: AS

^۳ Page's Amoeba Saline Solution: PAS

زمان سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. به همین روش کیست‌های آمیب که پیش از آن به نحوه تهیه آن اشاره شد با آب فعال شده با پلاسما مواجه گردید و در زمان‌های مذکور میزان زنده‌مانی آن‌ها محاسبه گردید. برای بررسی زنده‌مانی از رنگ‌آمیزی تریپان بلو استفاده شد. در این رنگ‌آمیزی سلول‌های زنده رنگ نگرفته اما سلول‌های مرده به رنگ آبی در می‌آمدند.

مطالعه آماری

نتایج حاصل از آزمایش‌های مختلف به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شد. داده‌ها با استفاده از SPSS-16 و آزمون t غیروابسته مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. $p < 0.05$ سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج مربوط به ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آب

فعال‌شده با پلاسما

بر اساس نتایج میانگین pH آب فعال شده با پلاسما در حدود ۳/۴، میزان پراکسید هیدروژن ۱۰۲ میکرومولار، میزان نیترات ۷۳۷ میکرومولار و میزان نیتريت ۳۶/۹۴ میکرومولار حاصل شد. جدول ۲ جزئیات نتایج ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آب فعال شده با پلاسما در شرایط بهینه را نشان می‌دهد.

نتایج مربوط به مواجهه تروفوزوئیت و کیست

آکاتاموبا کستلانی با آب فعال شده با پلاسما

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نیم ساعت پس از مواجهه آب فعال شده با پلاسما با تروفوزوئیت‌های آمیب، تعداد تروفوزوئیت‌های زنده به شکل معنی داری کاهش یافتند. تروفوزوئیت‌ها ۳ ساعت پس از مواجهه به طور کامل از بین رفتند. مدت زمانی که ۵۰ درصد تروفوزوئیت‌ها از بین رفته بودند (IC50) در این مطالعه حدود یک ساعت و نیم تخمین زده شد. قابل ذکر می‌باشد که در مواجهه تروفوزوئیت‌های آمیب با آب فعال شده با پلاسما تعدادی از آن‌ها به

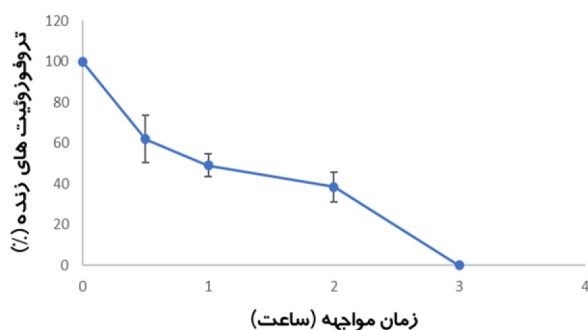
کیست تبدیل شدند. کیست‌های ایجاد شده در ساعت پنجم مواجهه به طور کامل از بین رفتند. نمودار ۱ میزان زنده‌مانی تروفوزوئیت‌های مواجهه شده با آب فعال شده با پلاسما و نمودار ۲ میزان تبدیل شدن تروفوزوئیت‌ها به کیست‌ها و درصد مرگ و میر آن کیست‌ها را در مواجهه با آب فعال شده با پلاسما نشان می‌دهد.

در مواجهه کیست‌های آمیب با آب فعال شده با پلاسما مشخص گردید که میزان زنده‌مانی کیست‌ها نیم ساعت پس از مواجهه با آب به شکل معنی‌داری کاهش یافت و کیست‌ها در ساعت چهارم مواجهه به طور کامل از بین رفتند. در این مطالعه IC50 برای کیست‌ها نیز در حدود یک ساعت و سی و پنج دقیقه محاسبه گردید. نمودار ۳ درصد مرگ و میر کیست‌ها پس از مواجهه با آب فعال شده با پلاسما در زمان‌های مختلف را نشان می‌دهد.

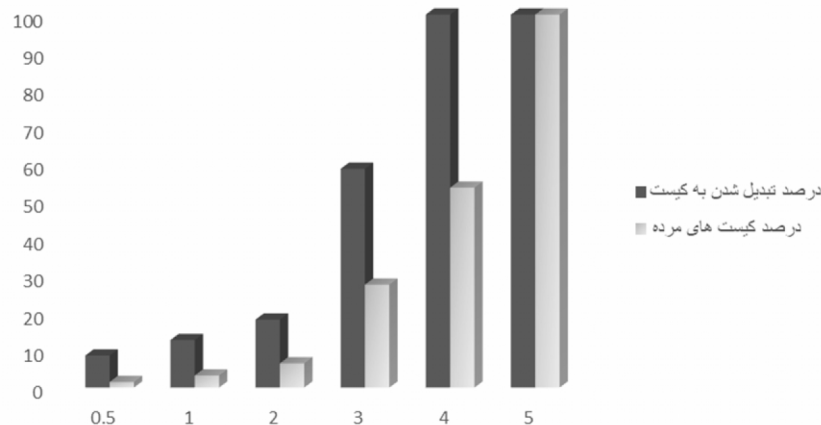
جدول ۲. نتایج ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آب فعال شده با پلاسما

در شرایط بهینه

ویژگی مورد نظر	حداقل	حداکثر	میانگین
pH	۳/۳	۳/۵	۳/۴
پراکسید هیدروژن (میکرومولار)	۶۷	۱۴۲	۱۰۲
نیترات (میکرومولار)	۷۲۲	۷۸۲	۷۳۷
نیتريت (میکرومولار)	۳۳/۲۷	۴۱/۰۴	۳۶/۹۴



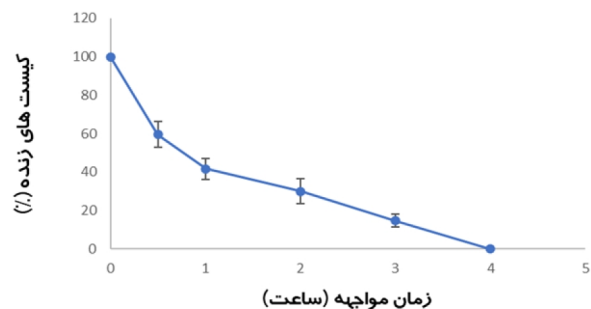
نمودار ۱. درصد زنده‌مانی تروفوزوئیت‌های مواجهه شده با آب فعال‌شده با پلاسما در طول زمان



نمودار ۲. درصد تبدیل شدن تروفوزوئیت‌ها به کیست‌ها و درصد مرگ و میر آن کیست‌ها در مواجهه با آب فعال شده با پلاسما

ضد عفونی غیرحرارتی، بدون مواد شیمیایی و سازگار با محیط زیست است. آب فعال شده با پلاسما در دهه گذشته مورد توجه قابل توجهی از سوی محققان قرار گرفته است [۱۳]. از مزایای آب فعال شده با پلاسما، ارزان بودن و سازگاری آن با محیط زیست بدلیل فقدان مواد شیمیایی است [۱۸]. برخی مطالعات بی‌خطر بودن آب فعال شده با پلاسما روی سلول‌های انسانی را به اثبات رسانده‌اند و باعث شده که آب فعال شده با پلاسما به یک عامل ضد میکروبی پرکاربرد تبدیل شود [۱۹]. در مطالعه‌ای نشان داده شد که در مواجهه طولانی مدت سلول‌ها و بافت‌های پستانداران (موش) با آب فعال شده با پلاسما هیچ گونه اثرات سیتوتوکسیکی یافت نمی‌شود [۲۰].

برخی مطالعات خواص ضد میکروبی آب فعال شده با پلاسما روی ارگانیسم‌های مختلف نظیر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نظیر *کلبسیلا پنومونیه*، *اسیتوباکتر بومانی* و *سودوموناس آئروژینوزا* و همچنین قارچ فرصت‌طلب *کاندیدا آلبیکنس* را نشان داده‌اند [۱۸، ۲۱، ۲۲]. مطالعه پمن و همکاران نشان داد که *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* پس از ۲۰ دقیقه قرار گرفتن در معرض آب فعال شده با پلاسما می‌تواند مهار شود [۲۳]. همچنین مطالعاتی تأثیر آب فعال شده با پلاسما برای ضد عفونی تجهیزات و



نمودار ۳. درصد زنده‌مانی کیست‌های مواجهه شده با آب فعال شده با پلاسما در طول زمان

بحث

در این مطالعه اثر آب فعال شده با پلاسما روی تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آمیب *آکانتاموبا کستلانی* مورد بررسی قرار گرفت. جهت انجام این مطالعه در مرکز تحقیقات لیزر و پلاسمای دانشگاه شهید چمران اهواز دستگاهی تهیه گردید که قادر بود آب فعال شده با پلاسما با روش پلاسمای سرد در فشار اتمسفر را تولید کند.

پلاسما به عنوان حالت چهارم ماده شناخته شده است. این گاز یونیزه است که معمولاً زمانی که مولکول‌های گاز در معرض میدان الکتریکی قرار می‌گیرند تولید می‌شود و گونه‌ها و یون‌های واکنش‌پذیر را تشکیل می‌دهند [۱۷]. پلاسمای سرد یک فناوری نوظهور

دستگاه‌های پزشکی بررسی نموده‌اند و نشان داده‌اند که باعث کاهش قابل توجهی در همه سویه‌های باکتریایی پس از ۳۰ دقیقه تماس با آب فعال شده با پلاسما می‌شود [۲۱]. در مطالعه‌ای که بر روی تاثیر آب فعال شده با پلاسما بر روی عوامل بیماری‌زا صورت گرفته، نشان داده شده است که آب فعال شده با پلاسما باکتری سالمونلای روی پوسته تخم مرغ را به طور موثری بدون به خطر انداختن کیفیت پوسته تخم مرغ‌ها غیرفعال می‌کند که این نتایج نشان می‌دهد که سلول‌های باکتریایی کنترل نفوذپذیری سلول را پس از درمان آب فعال شده با پلاسما از دست دادند. این مطالعه نشان داد که آب فعال شده با پلاسما در برابر *استافیلوکوکوس انتریتیدیس* روی پوسته تخم‌های موجود در مقدار زیادی آب مؤثر است و ازن، نیترات و ROS را از دلایل اصلی غیرفعال شدن سلول‌های باکتریایی دانستند [۲۴].

علی‌رغم مطالعات گسترده و بررسی اثرات ضدباکتریایی آب فعال شده با پلاسما، اثرات ضد یوکاریوتی آن مشخص نگردیده‌است. با توجه به اهمیت بهداشتی *آکانتاموبا کستلانی* در این مطالعه سعی گردید که اثر ضد آمیبی آب فعال شده با پلاسما روی تروفوزوئیت و کیست آمیب ارزیابی شود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که آب فعال شده با پلاسما تروفوزوئیت‌های *آکانتاموبا کستلانی* را پس از سه ساعت مواجهه و کیست‌های *آکانتاموبا کستلانی* را پس از ۴ ساعت مواجهه از بین برد. از طرف دیگر تعدادی از تروفوزوئیت‌ها پس از مواجهه با آب فعال شده با پلاسما به تدریج تبدیل به کیست شدند. این کیست‌ها مقاومت بیشتری را در مقابل آب فعال شده با پلاسما از خود نشان دادند و پس از پنج ساعت مواجهه از بین رفتند. این یافته فرضیه‌ای را در ذهن ما ایجاد کرد مبنی بر اینکه کیست ایجاد شده در اثر مواجهه تروفوزوئیت با آب فعال شده با پلاسما کیست مقاوم‌تری می‌باشد. اگرچه که تایید این یافته نیازمند انجام آزمایشات بیشتری است.

در خصوص مکانیسم اثر آب فعال شده با پلاسما می‌توان به گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن (RONS) وجود آمده در این نوع آب اشاره کرد. از آنجایی که RONS روی قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها بسیار موثر است، آب فعال شده با پلاسما می‌تواند به‌عنوان یک گزینه مناسب بعنوان ضد عفونی‌کننده مطرح باشد. RONS تولید شده در آب فعال شده با پلاسما می‌تواند شامل ازن (O_3)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، نیترات‌ها (NO_3^-) و نیتريت‌ها (NO_2^-)، پراکسی‌نیتريت ($OONO_2$)، سوپراکسید (O_2^-)، اکسید نیتريك (NO^+) و رادیکال‌های هیدروکسیل ($OH^\bullet$) باشد [۲۵، ۲۶]. در میان RONS‌های تولید شده در آب فعال شده با پلاسما، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) نقش مهمی در خواص ضد میکروبی آن دارد [۲۷]. RONS می‌تواند موجب تغییر در فعالیت آنزیم‌ها، تغییر بیان ژن و اثر بر ساختمان غشاهای و همچنین آسیب به DNA و پروتئین‌های سلول شود [۲۸]. رادیکال‌های آزاد با پراکسیداسیون لیپیدها در غشا، باعث تغییر نفوذپذیری آن و از دست دادن استحکام غشا می‌گردند.

عامل دیگری که اغلب با اثر ضد میکروبی آب فعال شده با پلاسما مرتبط است اسیدی بودن آب فعال شده است. مطالعات نشان داده‌اند که اسیدی شدن آب و حضور گونه‌های فعال (مانند $OH^\bullet$ ، NO_2^- ، OH^-) به صورت هم افزایی عمل می‌کنند [۲۰]. از ویژگی‌های آب فعال شده با پلاسما این‌است که می‌تواند خواص ضد باکتری و ضد قارچی خود را برای چند روز حفظ کند که می‌توان از این ویژگی آب فعال شده با پلاسما برای استفاده در مناطق دورتر از محل تولید آب فعال شده با پلاسما بهره برد [۲۱، ۲۶]. با این حال استفاده از آب فعال شده با پلاسما می‌تواند دارای محدودیت‌های باشد، از جمله حجم محدود آب فعال تولید شده، نیازمند بودن به دستگاه تولیدکننده

ولتاژ بالا و همچنین استفاده از گازهای خالص مانند اکسیژن، آرگون، و یا هلیوم می‌باشد [۲۶].

که آب فعال شده با پلاسما می‌تواند کاندید مناسبی برای ضدعفونی و از بین بردن این آمیب آزادری باشد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه برای اولین بار اثر ضد آمیبی آب فعال شده با پلاسما مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه نشان داد که آب فعال شده با پلاسما قادر به از بین بردن تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آمیب *آکانتاموبا کستلانی* می‌باشد. تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیترژن‌دار و pH اسیدی مکانیسم‌هایی است که در عملکرد مثبت این نوع آب نقش دارند. بنظر می‌رسد

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و امتنان خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز که هزینه این تحقیق را در قالب پژوهانه از طریق هزینه‌کرد پایان‌نامه‌های دانشجویان (پایان نامه دکتری تخصصی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز) فراهم نموده‌اند، اعلام می‌دارند.

References

- 1- Khan NA. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. FEMS Microbiol Rev. 2006 Jul; 30(4): 564-595.
- 2- Martine AJ, Visvesvara GS. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. Brain Pathol. 1997 Jan; 7(1): 583-598.
- 3- Kilvington S, Heaselgrave W, Lally JM, Ambrus K, Powell H. Encystment of *Acanthamoeba* during incubation in multipurpose contact lens disinfectant solutions and experimental formulations. Eye Contact Lens. 2008 May; 34(3): 133-9.
- 4- Heaselgrave W, Kilvington S. The characterization of an adrenergic signalling system involved in the encystment of the ocular pathogen *Acanthamoeba* spp. J Eukaryot Microbiol. 2016 Sep; 63(5): 629-34.
- 5- Neff RJ, Ray SA, Benton WF, Wilborn M. Chapter 4 Induction of Synchronous Encystment (Differentiation) in *Acanthamoeba* sp. Editor(s): David M. Prescott. Methods in Cell Biology. Academic Press. 1964;1: 55-83.
- 6- Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic freeliving amoeba: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2007 Jun; 11(1): 1-26.
- 7- Martinez AJ. Free-living amebas and the immune deficient host. IX International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-living Amoebae Proceedings. 2001; pp: 1-12.
- 8- Thom S, Warhurst D, Drasar BS. Association of *Vibrio cholerae* with fresh water amoebae. J Med Microbiol. 1992 May; 36: 303-6.
- 9- Constable PD; Hinchcliff KW; Done SH; Grünberg W. Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs, and Goats. 11th ed. Elsevier Ltd Co. St. Louis, Missouri. 2017: 2030.
- 10- Thomas V, Bouchez T, Nicolas V, Robert S, Loret JF, Levi Y. Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. J Appl Microbiol. 2004 Nov; 97(5): 950-963.
- 11- Loret JF, Jousset M, Robert S, Saucedo G, Ribas F, Thomas V, et al. Amoebae-resisting bacteria in drinking water: risk assessment and management. Water Sci Technol. 2008 Aug; 58(3): 571-7.
- 12- Bouyer S, Imbert C, Daniault G, Cateau E, Rodier MH. Effect of caspofungin on trophozoites and cysts of three species of *Acanthamoeba*. J Antimicrob Chemother. 2007 Jan; 59(1): 122-4.
- 13- Thirumdas R, Kothakota A, Annapure U, Siliveru K, Blundell R, Gatt R, et al. Plasma activated water (PAW): Chemistry, physico-chemical properties, applications in food and agriculture. Trends Food Sci Tech. 2018 Jul; 77: 21-31.

- 14- Smet C, Govaert M, Kyrylenko A, Easani M, Walsh JL, Van Impe JF. Inactivation of single strains of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* planktonic cells and biofilms with plasma activated liquids. 2019 Jul; Front Microbiol. 10: 1539.
- 15- Lukes P, Dolezalova E, Sisrova I, Clupek M. Aqueous-phase chemistry and bactericidal effects from an air discharge plasma in contact with water: evidence for the formation of peroxyxynitrite through a pseudo-second-order post-discharge reaction of H_2O_2 and HNO_2 . Plasma Sources Science Technol. 2014 Feb; 23(1): 015019.
- 16- Zheng K, Sun Y, Gong S, Jiang G, Zheng X, Yu Z. Degradation of sulfamethoxazole in aqueous solution by dielectric barrier discharge plasma combined with Bi_2WO_6 - $rMoS_2$ nanocomposite: mechanism and degradation pathway. Chemosphere. 2019 May; 222: 872-83.
- 17- Soni A, Choi J, Brightwell G. Plasma-activated water (PAW) as a disinfection technology for bacterial inactivation with a focus on fruit and vegetables. Foods. 2021 Jan; 15;10(1):166.
- 18- Chiappim W, Sampaio AD, Miranda F, Fraga M, Petraconi G, da Silva Sobrinho A, et al. Antimicrobial effect of plasma-activated tap water on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Candida albicans*. Water. 2021 Jan; 13(11): 1480.
- 19- Schmidt M, Hahn V, Altrock B, Gerling T, Gerber IC, Weltmann KD, et al. Plasma-activation of larger liquid volumes by an inductively limited discharge for antimicrobial purposes. Appl Sci. 2019 Jan; 9(10): 2150.
- 20- Nastasa V, Pasca AS, Malancus RN, Bostanaru AC, Ailincăi LI, Ursu EL, et al. Toxicity assessment of long-term exposure to non-thermal plasma activated water in mice. Int J Mol Sci. 2021 Oct; 22(21): 11534.
- 21- Balan GG, Roșca I, Ursu EL, Doroftei F, Bostănară AC, Hnatiuc E, et al. Plasma-activated water: A new and effective alternative for duodenoscope reprocessing. Infect Drug Resist. 2018 May; 11: 727-33.
- 22- Traylor MJ, Pavlovich MJ, Karim S, Hait P, Sakiyama Y, Clark DS, et al. Long-term antibacterial efficacy of air plasma-activated water. J Phys D Appl Phys. 2011 Nov; 44(47): 472001.
- 23- Pemen AJ, Van Ooij PP, Beckers FJ, Hoebe WF, Koonen-Reemst AM, Huiskamp T, et al. Power modulator for high-yield production of plasma-activated water. IEEE Trans Plasma Sci. 2017 Aug; 45(10): 2725-33.
- 24- Lin CM, Hsiao CP, Lin HS, Liou JS, Hsieh CW, Wu JS, et al. The antibacterial efficacy and mechanism of plasma-activated water against *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) on shell eggs. Foods. 2020 Oct; 9(10): 1491.
- 25- Joshi SG, Cooper M, Yost A, Paff M, Ercan U.K, 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 Mar; 55(3): 1053-62.
- 26- Oehmigen K, Winter J, Hähnel M, Wilke C, Brandenburg R, Weltmann KD, et al. Estimation of possible mechanisms of *Escherichia coli* inactivation by plasma treated sodium chloride solution. Plasma Processes Polym. 2011 Oct; 8(10): 904-13.
- 27- Chen TP, Liang J, Su TL. Plasma-activated water: antibacterial activity and artifacts?. Environ Sci Pollut Res. 2018 Sep; 25(27): 26699-706.
- 28- Yusupov M, Bogaerts A, Huygh S, Snoeckx R, Van Duin AC, Neyts EC. Plasma-induced destruction of bacterial cell wall components: a reactive molecular dynamics simulation. J Phys Chem C. 2013 Mar; 117(11): 5993-8.