

# اثرات ضد میکروبی پلاسمای سرد بر روی باکتری بیماری‌زای سالمونلا انتریتیدیس موجود بر روی پوسته تخم مرغ

پریسا بهلولی<sup>a</sup>، رضا جلالی راد<sup>b\*</sup>، داود درانیان<sup>c</sup>

<sup>a</sup> دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

<sup>b</sup> استادیار انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

<sup>c</sup> استاد مرکز تحقیقات فیزیک پلاسما، دانشکده علوم، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۴/۰۷

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۹/۲۹

۸۵

## چکیده

**مقدمه:** تکنولوژی پلاسمای سرد یا پلاسمای غیرحرارتی یکی از روش‌های فرآوری مواد غذایی می‌باشد که برای غیرفعال‌سازی میکروارگانیسم‌های پاتوژن و بهبود ایمنی مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. پلاسمای سرد می‌تواند بر غیرفعال‌سازی طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها مؤثر باشد، بدون اینکه میزبان و بافت‌های سالم آسیب ببیند. هدف از این پژوهش ارزیابی تأثیر روش پلاسمای سرد به صورت مستقیم برای کاهش باکتری سالمونلا انتریتیدیس موجود بر روی پوسته‌ی تخم‌مرغ، همچنین تعیین تأثیر زمان قرارگیری در معرض پلاسما و تعیین ترکیب گاز مؤثر تزریق شده می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این تحقیق تأثیر تابش پلاسمای سرد اتمسفری با شدت شارش ۳ لیتر بر دقیقه و گاز آرگون و آرگون حاوی ۵٪ اکسیژن در سه زمان مختلف بر غیرفعال‌سازی باکتری سالمونلا انتریتیدیس مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** اثر تابش گاز آرگون بر روی کاهش باکتری سالمونلا انتریتیدیس در زمان‌های ۱، ۳ و ۶ دقیقه به ترتیب ۴/۴۹۰، ۳/۹۴۸، ۰ cfu/ml در سطح احتمال ۱٪ تفاوت معنی‌داری را نشان دادند. همچنین اثر تابش گاز آرگون حاوی ۵٪ اکسیژن بر روی کاهش باکتری سالمونلا انتریتیدیس در زمان‌های ۱، ۳ و ۶ دقیقه به ترتیب ۴/۵۵۹، ۴/۲۲۶، ۰ cfu/ml بود که هر دو گروه تیمار سیر نزولی و معنی‌داری را در سطح آماری ۱٪ نسبت به نمونه شاهد داشتند.

**نتیجه‌گیری:** داده‌های بدست آمده بیانگر این امر بود که تاثیرات نوع گاز، زمان تابش و اثر متقابل آنها، بر باکتری مورد آزمون (در سطح آماری  $P < 0.01$ ) معنی‌دار بودند.

**واژه‌های کلیدی:** پلاسمای سرد، تخم‌مرغ، سالمونلا انتریتیدیس، میکروارگانیسم، ضد میکروبی

## مقدمه

آلودگی میکروبی مواد غذایی یک موضوع مهم و اساسی در صنعت غذا می‌باشد. یکی از روش‌های مرسوم غیرفعال نمودن یا از بین بردن پاتوژن‌ها در مواد غذایی، حرارت‌دهی می‌باشد که بر روی طعم و خواص اصلی مواد غذایی تأثیر می‌گذارد. افزایش تقاضا برای مواد غذایی تازه و کمتر فرآیند شده باعث گردیده تحقیقات زیادی در جهت گسترش روش‌های نوین غیرحرارتی از قبیل فشار هیدرواستاتیک بالا، میدان الکتریکی ضربه‌ای PEF، میدان مغناطیسی ارتعاشی، ماورا صوت بالا و غیره انجام پذیرد. روش پلاسمای سرد فشار اتمسفری به‌عنوان یک روش میکروبی‌زدایی غیرحرارتی در تحقیقات صنایع غذایی معرفی شده است. پلاسما ماده‌ای است که به روش الکتریکی در حالت گازی فعال شده و به روش تخلیه الکتریکی تولید می‌شود (Fernández and Thompson, 2012). پلاسما به حالتی از ماده بعد از حالت‌های جامد، مایع و گاز گفته می‌شود که برای تشکیل آن ابتدا باید دمای گاز افزایش یابد؛ که این امر موجب افزایش انرژی مولکولی و تغییر حالت ماده می‌شود، سپس گازی از اتم‌ها شکل می‌گیرد که ذرات باردار، الکترون‌ها، یونهای مثبت و ذرات خنثی آزادانه در آن حرکت می‌کنند. این حالت از ماده را حالت پلاسما می‌گویند (Cooper et al., 2009).

اولین بار در سال ۱۹۲۸ توسط ایروینگ لانگمیر کلمه پلاسما برای گازهای یونیزه شده به کار برده شد (Afshari and Hosseini, 2012). تا قبل از سال ۱۹۹۰، پلاسمای پایدار تهیه شده، تحت خلا و یا در محیط گازهایی همچون هلیوم و آرگون تولید می‌شد. تولید پلاسمای گازی در دمای محیط، فرایند سترون‌سازی جدیدی برای اطمینان از ایمنی میکروبی طیف وسیعی از محصولات مهیا کرده است.

پلاسما به لحاظ الکتریکی خنثی است اما به دلیل دارا بودن حمل‌کننده‌های باردار آزاد، هادی جریان الکتریکی بوده (Tendero et al., 2006) و هدایت الکتریکی آن حتی از فلزاتی همچون طلا و مس نیز بیشتر است (Fridman and Kennedy, 2004).

به طور کلی پلاسما را به دو دسته کلی پلاسمای غیرحرارتی و حرارتی تقسیم می‌کنند. پلاسمای گرم یا دمای بالا شامل یون‌ها، الکترون‌ها و اجزای خنثی که در فاز

حرارتی (Thermal equilibrium) هستند (Fridman et al., 2006).

پلاسمای سرد یا دمای پایین به دو دسته تقسیم می‌شود:

- non local thermodynamic equilibrium
- local thermodynamic equilibrium

پلاسمای گرم توسط شعله و جرقه و میکروویو تولید می‌شود اما در پلاسمای سرد از حرکت حرارتی یون‌ها و نیروی فشار و نیروی مغناطیسی صرف نظر کرده و دما در حد دمای اتاق باقی می‌ماند (Kim et al., 2011).

در تولید پلاسمای سرد بیشتر انرژی الکتریکی صرف اجزای الکترون شده و دما در حد دمای اتاق باقی می‌ماند و این باعث می‌شود این فرآیند برای مواد حساس به حرارت مناسب گردد، همچنین یک روش سریع می‌باشد و به خاطر عدم نفوذ آن می‌توان برای سترون‌سازی سطوح از آن استفاده کرد. هزینه اولیه آن کم می‌باشد، توانایی غیرفعال‌سازی میکروارگانیسم‌ها را دارد، از نظر ایمنی دوست‌دار محیط زیست می‌باشد و فرآیند را در دما و فشار محیط انجام می‌دهد که اثرات مخرب حرارتی را کاهش می‌دهد (Bárdos and Baránková, 2010).

سه مکانیسم عمده برای غیرفعال‌سازی سلول‌های میکروبی در شرایط اعمال فرآیند پلاسما وجود دارد عبارتند از:

- الف) تخریب DNA سلول توسط اشعه ماوراءبنفش
- ب) تبخیر ترکیبات سطح سلول توسط فوتون‌های ماوراءبنفش
- ج) ایجاد خراش در سطح سلول با جذب گونه‌های واکنشگر مانند رادیکال‌های آزاد (Colagar et al., 2013).

از میان تمامی مواد غذایی؛ سترون‌سازی پوسته تخم‌مرغ دارای حساسیت خاصی می‌باشد زیرا پروتئین تخم‌مرغ حساس به حرارت بوده و نمی‌توان از روش‌های سترون‌سازی حرارتی برای آلودگی‌زدایی سطح پوسته تخم‌مرغ استفاده نمود. از سوی دیگر استفاده از مواد شوینده شیمیایی مورد تأیید کامل سازمان‌های جهانی غذا نمی‌باشد (Pasquali et al., 2010).

در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد.

سپس، به منظور تهیه بانک میکروبی، ۲۰۰ میکرولیتر از محیط‌کشت نوترینت برات حاوی باکتری *سالمونلا* /نتریتیدیس برداشته و به ۱۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت نوترینت برات خالص اضافه شد. بعد از ۷ الی ۸ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد که محلول فوق کدورت گرفت، ۲/۴ میلی‌لیتر گلیسرول استریل به آن اضافه شد. در نهایت سوسپانسیون تهیه شده در میکروتیوب‌های استریل توزیع گردید و در دمای ۲۰- درجه نگهداری شدند.

برای کنترل کیفی بانک میکروبی، بعد از گذشت ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۲۰- درجه، ۱۰۰ میکرولیتر از محتویات یکی از ویال‌ها برداشته و روی محیط‌کشت نوترینت آگار کشت خطی داده شد. پلیت کشت داده شده، ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور تشخیص بار میکروبی روی پوسته تخم‌مرغ قبل از سترون‌سازی، یک سواب آغشته به سرم فیزیولوژی، روی پوسته‌ی تخم‌مرغ‌های خریداری شده کشیده شد؛ سپس در محیط‌کشت نوترینت آگار کشت خطی انجام گردید. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در مرحله بعد، سترون‌سازی سطح پوسته‌ی تخم‌مرغ‌ها به وسیله‌ی اتانل ۷۰٪ انجام گردید، بعد از خشک شدن اتانول، جهت اطمینان از سترون شدن پوسته تخم‌مرغ با سواب مرطوب روی پوسته کشیده شد و روی محیط‌کشت نوترینت آگار کشت خطی انجام گردید. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرارداد داده شد. برای نشانه‌گذاری تخم‌مرغ ناحیه یک سانتی‌متر مربعی روی پوسته تخم‌مرغ در نظر گرفته شد و با مایژیک علامت‌گذاری انجام گردید. به منظور تهیه‌ی سوسپانسیون میکروبی جهت تلقیح روی پوسته تخم‌مرغ، از ویال باکتری *سالمونلا* /نتریتیدیس روی محیط‌کشت XLD<sup>۱</sup> آگار کشت داده شد و پلیت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. از پلیت مذکور، زیر هود لامینار تعداد کلنی برداشته و به ۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل اضافه گردید. سوسپانسیون باکتری، با شیکر کاملاً مخلوط شد و کدورت آن مطابق استاندارد نیم مک‌فارلند

تخم‌مرغ به عنوان یک منبع پروتئینی ارزشمند نقش بسیار مهمی در تغذیه افراد جامعه، بخصوص گروه‌های در حال رشد دارد. همچنین بیشتر ویتامین‌های مورد نیاز بدن بجز ویتامین C را دارا می‌باشد (Shapoori et al., 1394). از طرفی این ماده غذایی به علت عوامل مختلف ممکن است حاوی میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا باشد. (Hajipour, 1391) باکتری *سالمونلا* از جمله مهم‌ترین باکتری‌های شاخص آلودگی موجود بر روی پوسته تخم‌مرغ است (Schutz et al., 1996).

باکتری *سالمونلا* یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه است که به صورت باسیل‌های گرم منفی هستند و اکثر سویه‌های آن توانایی حرکت دارند. این جنس به صورت هوازی یا بی‌هوازی اختیاری است و بهترین شرایط رشد آن دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. گونه‌های *سالمونلا* به عنوان یکی از مهم‌ترین آلوده‌کننده‌های مواد غذایی و از عوامل ایجادکننده گاستروانتریت (التهاب معده روده‌ای) در انسان به شمار می‌آیند (Yang et al., 2002).

هدف از این پژوهش ارزیابی تأثیر روش درمانی پلاسمای سرد در کوتاه مدت به صورت مستقیم برای کاهش باکتری *سالمونلا* /نتریتیدیس روی پوسته‌ی تخم‌مرغ بدون تأثیرگذاری بر روی کوتیکول‌ها و همچنین تعیین تأثیر زمان قرارگیری در معرض شرایط و ترکیب گاز تزریق شده می‌باشد.

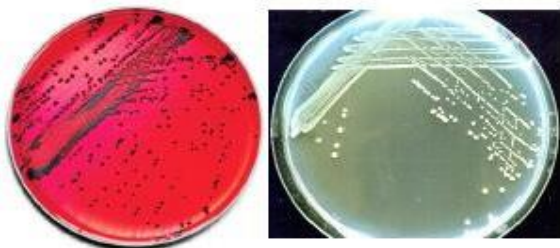
## مواد و روش‌ها

در این پژوهش، ابتدا ویال لیوفیلیزه باکتری *سالمونلا* /نتریتیدیس (ATCC 13076) را تحت شرایط سترون‌سازی کرده و ۱ میلی‌لیتر از محیط نوترینت برات تهیه شده برداشته و روی باکتری تزریق شد. یکصد میکرولیتر از سوسپانسیون فوق به هر کدام از پلیت‌های حاوی محیط‌کشت نوترینت آگار، XLD آگار و نوترینت برات اضافه شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، سپس برای تشکیل کلنی تک، از کلنی‌های محیط XLD آگار بر روی یک محیط XLD آگار دیگر و از کلنی‌های محیط نوترینت آگار بر روی یک محیط نوترینت آگار دیگر کشت خطی تهیه شد و

<sup>1</sup> Xylose Lysin Deoxycholate Agar



شکل ۱- ویال لیوفلیزه باکتری سالمونلا انتریتیدیس تهیه شده از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران



شکل ۲- کشت خطی از باکتری احیا شده از ویال لیوفلیزه روی دو محیط نوترینت آگار (راست) و آگار XLD (چپ) بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری جهت تشکیل تک کلنی

سوسپانسیون میکروبی تهیه شده قبل از تلقیح روی پوسته‌ی تخم مرغ، حاوی  $10^8 \times 1/5$  باکتری در میلی‌لیتر بود که بعد از تلقیح سوسپانسیون باکتری روی پوسته‌ی تخم مرغ با روش ذکر شده تعداد  $10^3 \times 152$  باکتری فعال و قابل شمارش بود.

در آزمایش‌های تابش پلاسما، همانگونه که در جدول ۱ مشخص است، با افزایش زمان تابش، میزان باکتری روی پوسته‌ی تخم مرغ کاهش یافت و با ۶ دقیقه تابش آرگون خالص و آرگون حاوی ۵٪ اکسیژن تعداد باکتری‌های فعال روی پوسته‌ی تخم مرغ به صفر رسید.

جدول ۱- درصد کاهش تعداد باکتری سالمونلا انتریتیدیس تحت تیمارهای مختلف نسبت به نمونه شاهد

تیمارها	درصد کاهش تعداد باکتری سالمونلا انتریتیدیس
پلاسما آرگون خالص (۱ دقیقه)	۸۰
پلاسما آرگون خالص (۳ دقیقه)	۹۴
پلاسما آرگون خالص (۶ دقیقه)	۱۰۰
پلاسما آرگون حاوی ۵٪ اکسیژن (۱ دقیقه)	۷۷
پلاسما آرگون حاوی ۵٪ اکسیژن (۳ دقیقه)	۸۹
پلاسما آرگون حاوی ۵٪ اکسیژن (۶ دقیقه)	۱۰۰

(معادل  $10^8 \times 1/5$  سلول باکتری در میلی لیتر) تنظیم گردید. در مرحله‌ی بعد ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون *S. enteritidis* بر روی پوسته تخم مرغ (نمونه شاهد) تلقیح شد. بعد از خشک شدن، یک سواپ مرطوب روی قسمت تلقیح شده کشیده و داخل ۱۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل گذاشته شد. محلول توسط شیکر خوب مخلوط گردید و ۱۰ بار رقیق سازی انجام شد. از این رقت، ۱۰۰ میکرولیتر روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شد و پلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. در مرحله تیمار با پلاسما، جهت انجام آزمایشات ابتدا خروجی منبع تغذیه برای گاز (آرگون و آرگون حاوی ۵٪ اکسیژن) روی ۱۰ کیلو ولت و ۲۵ کیلوهرتز (شرایط اپتیمم جهت ایجاد پلاسما پایدار و اثر گذار) تنظیم گردید. تخم مرغ‌های تلقیح شده با ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی، توسط دستگاه پلاسما سرد فشار اتمسفری با پروب سوزنی، طی زمان‌های مختلف (۱ دقیقه، ۳ دقیقه و ۶ دقیقه) در معرض تابش پلاسما گاز آرگون خالص و گاز آرگون حاوی ۵٪ اکسیژن قرار داده شدند و پس از گذشت ۱ ساعت، با سواپ مرطوب روی قسمت مشخص شده کشیده و تا  $10^3$  بار رقیق سازی انجام گردید، از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شد و بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری، نتایج بررسی گردید. برای بررسی نتایج تجربی بدست آمده از روش آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS-20، برای بیان متغیرهای کمی از آمار توصیفی به کمک میانگین و برای مقایسه میانگین نتایج از واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده گردید. برای انجام آنالیزهای آماری داده‌ها بصورت میانگین سه تکرار در نظر گرفته شد. سطح معنی داری برای تمام آزمون‌ها ( $p < 0.01$ ) در نظر گرفته شد. در بحث نتایج آماری برای مقایسه میانگین بین هر گروه با گروه کنترل از آزمون t استفاده شد.

۸۸

## یافته‌ها

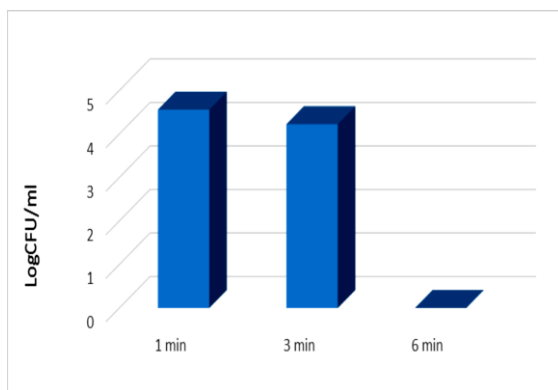
همانگونه که در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است، کلنی‌های تک باکتری سالمونلا انتریتیدیس از ویال لیوفلیزه روی محیط‌های کشت نوترینت آگار و XLD آگار بدست آمد. بعد از تهیه بانک باکتریایی از این پلیت‌های کشت، بانک مذکور قابل احیا و فاقد آلودگی به سایر میکروارگانیسم‌ها بود.

**- آنالیز تابش گاز آرگون حاوی ۵٪ اکسیژن بر روی باکتری سالمونلا انترتیدیس**

طبق نتایج آماری بدست آمده از جدول ۳ و شکل ۴، اثر تابش گاز آرگون/ اکسیژن بر باکتری سالمونلا انترتیدیس در زمان‌های پیش‌بینی شده بیانگر این بود که در سطح آماری ۱٪ نسبت به نمونه شاهد دارای تفاوت معنی داری بودند.

**جدول ۳- مقایسه میانگین کاهش بار میکروبی با تیمار پلاسما آرگون حاوی ۵٪ اکسیژن در زمان‌های تابش ۱، ۳، و ۶ دقیقه با استفاده از آزمون دانکن**

Plasma Argon / O <sub>2</sub>	Duncan Grouping	Mean	Std. Deviation	Std. Error of Mean
1 min	A	4.559	0.037	0.217
3 min	B	4.226	0.070	0.408
6 min	C	0.000	0.00	0.00



**شکل ۴- مقایسه میانگین کاهش بار میکروبی با تیمار پلاسما آرگون حاوی ۵٪ اکسیژن در زمان‌های تابش ۱، ۳، و ۶ دقیقه با استفاده از آزمون دانکن**

**- آنالیز اثر متقابل تیمارها**

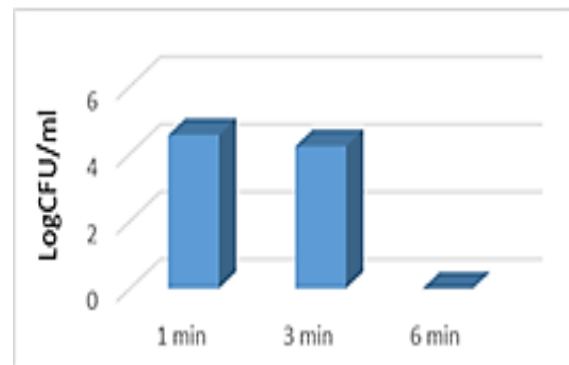
داده‌های بدست آمده بیانگر این امر بود که استفاده از پلاسما با گاز آرگون خالص به تنهایی یا به صورت ترکیب با اکسیژن در زمان‌های تابش مختلف تأثیرات متفاوتی بر روی کاهش باکتری مورد آزمون داشت (در سطح آماری ۱٪ نسبت به نمونه شاهد دارای تفاوت معنی داری بود).

**- آنالیز اثر تابش گاز آرگون بر روی باکتری سالمونلا انترتیدیس**

براساس نتایج حاصل از آنالیز واریانس ANOVA، جدول شماره ۲ و شکل ۳، می‌توان چنین نتیجه گرفت که در سطح اطمینان ۹۹ درصد، میانگین میزان بار میکروبی سالمونلا انترتیدیس با تغییر زمان پرتودهی، متغیر است. به عبارت دیگر، زمان پرتودهی بر میزان بار میکروبی سالمونلا انترتیدیس اثر دارد. زیرا مقدار معنی‌دار بدست آمده برابر  $\alpha = 0.01$  است.

**جدول ۲- مقایسه میانگین کاهش بار میکروبی با تیمار پلاسما آرگون خالص در زمان‌های تابش ۱، ۳، و ۶ دقیقه با استفاده از آزمون دانکن**

Plasma Argon	Duncan Grouping	Mean	Std. Deviation	Std. Error of Mean
1 min	A	4.490	0.028	0.016
3 min	B	3.948	0.089	0.051
6 min	C	0.000	0.00	0.00



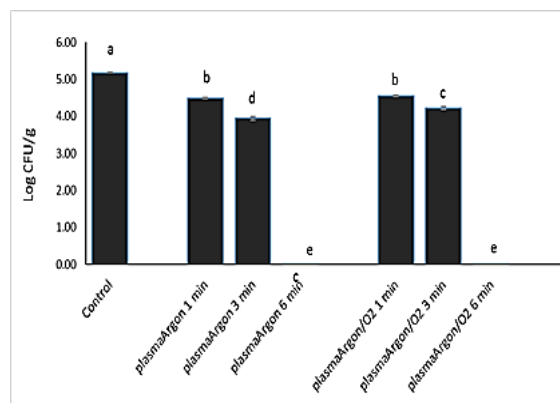
**شکل ۳- مقایسه میانگین کاهش بار میکروبی با تیمار پلاسما آرگون خالص در زمان‌های تابش ۱، ۳، و ۶ دقیقه با استفاده از آزمون دانکن**

با توجه به نتایج جدول ۲ و شکل ۳ اختلاف معنی داری میان مدت زمان‌های تابش گاز پلاسما آرگون وجود دارد به نحوی که مقایسه میانگین، نشان‌دهنده کمتر بودن مقدار CFU در زمان‌های ۳ و ۶ دقیقه نسبت به ۱ دقیقه دارد.

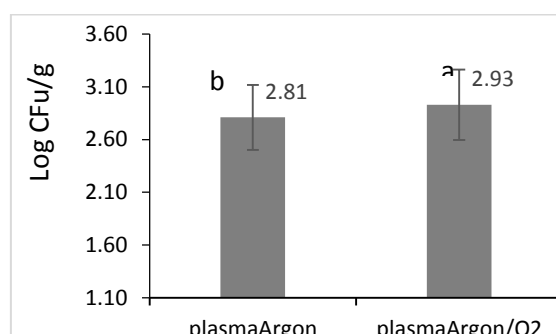
عدم اختلاف معنی‌دار و اختلاف در حروف، دلالت بر وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ دارد)

### بحث

در این تحقیق، از پلاسمای سرد اتمسفری با گاز آرگون خالص و گاز آرگون حاوی ۵ درصد اکسیژن به منظور کاهش بار میکروبی سالمونلا انتریتیدیس روی پوسته تخم‌مرغ استفاده شد. در تحقیق اخیر نوع گاز، میزان گاز، زمان تابش و فاصله نازل دستگاه پلازما جت تا نمونه مورد آزمون، با کارهای انجام شده توسط محققین دیگر متفاوت بود. در این پژوهش، درصد بالاتری از کاهش بار میکروبی، طی زمان کوتاهتر (۶ دقیقه) و فاصله بیشتر نازل دستگاه جت پلازما تا نمونه (۳ سانتیمتر) نسبت به تحقیقات محققین دیگر مشاهده شد، به طوری که در هر دو تیمار با تابش پلازما (گاز آرگون خالص و گاز آرگون حاوی ۵٪ اکسیژن) به مدت ۶ دقیقه، حذف کامل باکتری مشاهده شد. در صورتی که موریتز و همکاران در سال ۲۰۱۶، طی ۵ دقیقه تابش پلازما (آرگون خالص و آرگون حاوی ۰/۲، ۰/۵ و ۱٪ اکسیژن) و فاصله نازل جت پلازما ۱/۲ سانتیمتر، در تیمار آرگون خالص، مقدار کاهش بار میکروبی را  $2/27 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$  گزارش کردند (Moritz et al., 2017). همچنین راگنی و همکاران در سال ۲۰۱۴ ثابت کردند که یک تیمار ۹۰ دقیقه‌ای با پلاسمای سرد اتمسفری تحت گاز هوا می‌تواند *S. enteritidis* ها را تا  $4/5 \log \text{CFU}$  در هر پوسته‌ی تخم‌مرغ غیرفعال کند (Ragni et al., 2010). در مقایسه با این گزارش‌ها در پژوهش اخیر زمان قرارگیری در معرض تابش پلازما برای حذف قابل ملاحظه بار میکروبی بسیار کوتاه بوده است.



شکل ۵- مقایسه میانگین تیمارهای شاهد و ۶ تیمار حاوی گازهای پلازما آرگون و پلازما آرگون حاوی ۵٪ اکسیژن در زمان‌های تابش ۱، ۳ و ۶ دقیقه



شکل ۶- مقایسه میانگین کاهش باکتری در اثر استفاده از تابش پلازما آرگون خالص و پلازما آرگون حاوی ۵٪ اکسیژن

با توجه به شکل‌های ۵ و ۶، جدول ۴، مشاهده شد که بین دو تیمار (پلازما آرگون خالص و پلازما آرگون حاوی ۵٪ اکسیژن) در زمان تابش ۱ دقیقه اختلاف معنی‌داری وجود ندارد و میزان کاهش باکتری تقریباً در یک سطح قرار گرفته است. ولی در زمان تابش ۳ دقیقه، بین دو گروه تیمار اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود دارد. (در جداول مقایسه میانگین حروف مشترک دلالت بر

جدول ۴- آنالیز دو جمله ای برای تاثیر تابش پلازما آرگون خالص و پلازما آرگون حاوی ۵٪ اکسیژن بر مقدار CFU

Treatment	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		t	Df	Sig. (2-taile)
				Lower	Upper			
				Paired Differences				
Plasma Argon / Plasma Argon + O <sub>2</sub>	1.500	0.514	0.121	1.244	1.755	12.369	17	0.000

## نتیجه گیری

در این تحقیق، تکنولوژی پلاسمای سرد اتمسفری، جهت از بین بردن میکروارگانیسم تلقیح شده به پوسته‌ی تخم مرغ مورد آزمایش قرار گرفت. مدت زمان قرار گرفتن نمونه‌های تخم مرغ در مقابل پلاسمای با ترکیب گازهای مختلف مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج حاصل نشان دادند که سیستم پلاسمای با افزایش زمان تا ۳ دقیقه قادر به کاهش چشمگیر (۸۹ تا ۹۴ درصد) تعداد کلنی‌ها در نمونه‌های تخم مرغ می‌باشد. با افزایش زمان تابش به ۶ دقیقه، حذف کامل و صددرصدی آلودگی میکروبی انجام شد. بطور کلی، تیمار با پلاسمای آرگون خالص کاهش بیشتر بار میکروبی را نسبت به تیمار آرگون حاوی ۵٪ اکسیژن ایجاد کرد.

## سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از همکاری مسئولین محترم آزمایشگاه رازی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران و آزمایشگاه فیزیک و لیزر دانشگاه شهید بهشتی تقدیر و تشکر می‌نمایند.

## منابع

- Afshari, R. & Hosseini, H. (2012). Atmospheric Pressure Plasma Technology: A New Tool for Food Preservation. International Conference on Environment. Energy and Biotechnology IPCBEE vol. 33.
- Bárdos, L. & Baránková, H. (2010). Cold atmospheric plasma: Sources, processes, and applications. Elsevier Ltd. 6705–6713.
- Colagar, A. H., Memariani, H., Sohbatzadeh, F. & Omran, A. V. (2013). Nonthermal atmospheric argon plasma jet effects on Escherichia coli biomacromolecules. Applied Biochemistry and Biotechnology, 171(7), 1617–1629.
- Cooper, M., Fridman, G., Staack, D., Gutsol, A. F., Vasilets, V. N., Anandan, S., Cho, Y. I., Fridman, A. & Tsapin, A. (2009). Decontamination of surfaces from extremophile organisms using nonthermal atmospheric pressure plasmas. IEEE Transactions on Plasma Science, 37(6), 866–71.
- Fernández, A. & Thompson, A. (2012). The inactivation of Salmonella by cold atmospheric plasma treatment. Elsevier Ltd. 678–684.
- Fridman, G., Peddinghaus, M., Balasubramanian, M., Ayan, H., Fridman, A., Gutsol, A. & Brooks, A. (2006). Blood coagulation and living tissue sterilization by floating-electrode dielectric barrier discharge in air. Plasma Chemistry and Plasma Processing, 26(4), 425–42.
- Fridman, A. A. & Kenedy, L. A. (2004). Plasma Physics and Engineering. New York. Taylor & Francis Routledge, Great Britain.
- Hajipour, A. (1391). Health assessment of local eggs in Salmonella pollution in Khorramabad. Proceedings of the National Congress of Food Safety Researchers and Elites. Tehran [In Persian].
- Kim, B., Yun, H., Jung, S., Jung, Y., Jung, H., Choe, W. & Jo, C. (2011). Effect of atmospheric pressure plasma on inactivation of pathogens inoculated onto bacon using two different gas compositions. Food Microbiology, 28(1), 9–13.
- Moritz, M., Wiacek, C., Koethe, M. & Braun, P. G. (2017). Atmospheric pressure plasma jet treatment of Salmonella enteritidis inoculated egg shells. International Journal of Food Microbiology, 245, 22–28.
- Pasquali, F., Fabbri, A., Cevoli, C., Manfreda, G. & Franchini, A. (2010). Hot air treatment for surface decontamination of table eggs. Food Control, 21(4), 431–435.
- Ragni, L., Berardinelli, A., Vannini, L., Montanari, C., Sirri, F., Guerzoni, M. E. & Guarnieri, A. (2010). Non-thermal atmospheric gas plasma device for surface decontamination of shell eggs. Journal of Food Engineering, 100(1), 125–132.
- Schutz, G. E., Fawcett, H. A., Lewno, M. J., Flick E. L. & Kirby, R. S. (1996). Prevalence of Salmonella enteritidis in poultry shell eggs in Arkansas. Southern Medical Journal, 89(9), 889–891.
- Shapoori, R., Rahnama, M. & Iqbalzadeh, S. H. (1394). Investigation of the prevalence of Salmonella serotypes in chicken and eggs and determining their antibiotic sensitivity in Zanjan. Zanjan University Journal of Biological Sciences, 2(3), 37–42 [In Persian].
- Tendero, C., Tixier, C., Tristant, P., Desmason, J. & Leprince, P. (2006). Atmospheric pressure plasmas: A review.

Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 61(1), 2–30.

Yang ,Y. J., Huang, M. C., Wang, S. M., Wu, J. J., Cheng, C. P. & Liu, C. C. (2002). Analysis of risk factors for bacteremia in

children with nontyphoidal Salmonella gastroenteritis. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 21(4), 290–293.



# Antimicrobial Effects of Cold Plasma on the Pathogenic Bacterium *Salmonella enteritidis* Existed on the Egg Shell

P. Bohlouli<sup>a</sup>, R. Jalalirad<sup>b\*</sup>, D. Dorrani<sup>c</sup>

<sup>a</sup> M. Sc. Student of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

<sup>b</sup> Assistant Professor, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

<sup>c</sup> Professor of Plasma Physics Research Center, Faculty of Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received: 20 December 2019

Accepted: 27 June 2020

## Abstract

**Introduction:** Cold plasma or non-thermal plasma technology is one of the methods of food processing that is used to inactivate pathogen microorganisms and improve food safety. Cold plasma can affect the inactivation of a wide range of microorganisms, without harming the host and healthy tissues.

The aim of this study was to evaluate the effect of cold plasma directly on reducing the numbers of *Salmonella enteritidis* on egg shell and also to determine the effect of plasma exposure time and the composition of the injected gas.

**Materials and Methods:** In this study, the effect of cold atmospheric plasma radiation of argon and argon containing 5% oxygen gas, at the rate of 3 liters / min, and at three different times on inactivation of *Salmonella enteritidis* was investigated.

**Results:** The effect of argon gas radiation for 1, 3 and 6 minutes on the reduction of *salmonella enteritidis* numbers being 4.490, 3.948, 0 cfu /ml respectively, was significant at 1% probability level. Also, the radiation effect of argon containing 5% oxygen at 1, 3 and 6 minutes, on reduction of *Salmonella enteritidis* numbers was 4.559, 4.226 and 0 cfu /ml, respectively. Both groups of the treatments caused a significant decreasing trend at the statistical level of 1% as compared to the control sample.

**Conclusion:** The obtained data indicated that the effects of the gas type, as well as the irradiation time and their interaction on the tested bacterium were statistically significant at  $p < 0/01$  as compared to the control.

**Keywords:** Antimicrobial, Cold Plasma, Egg, Microorganism, *Salmonella enteritidis*.

\* Corresponding Author: r\_jalalirad@pasteur.ac.ir