Archive of SID

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

پریسا بهلولی [a]، رضا جلالی راد [b*]، داود درانیان [c]

[a] *دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران*

[b] *استادیار انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران*

[c] *استاد مرکز تحقیقات فیزیک پلاسما، دانشکده علوم، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران*

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۹/۲۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۴/۰۷

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 روش ها: 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.

یافته ها: 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.

نتیجه گیری: داده های بدست آمده بیانگر این امر بود که تاثیرات نوع گاز، زمان تابش و اثر متقابل آنها، بر باکتری مورد آزمون (در سطح آماری $P<0/01$) معنی دار بودند.

واژه‌های کلیدی: *پلاسمای سرد، تخم مرغ، سالمونلا اینتریتیدیس، میکروارگانیسم، ضد میکروبی*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: r_jalalirad@pasteur.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

آلودگی میکروبی مواد غذایی یک موضوع مهم و اساسی در صنعت غذا می‌باشد. یکی از روش‌های مرسوم غیرفعال نمودن یا از بین‌بردن پاتوژن‌ها در مواد غذایی، حرارت‌دهی می‌باشد که بر روی طعم و خواص اصلی موادغذایی 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 میکروب‌زدایی 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 لانگمویر کلمه پلاسما برای گازهای یونیزه شده به کار برده شد (Afshari and Hosseini, 2012). تا قبل از سال ۱۹۹۰، پلاسمای پایدار تهییج 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 حمل کننده های 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 فوتون های ماوراءبنفش

ج) ایجاد خراش درسطح 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).

www.SID.ir

Archive of SID

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 میکروارگانیسم‌های 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 آلوده کننده‌های مواد غذایی و از عوامل ایجاد کننده 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 به‌صورت مستقیم برای کاهش باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* روی پوسته‌ی تخم‌مرغ بدون تأثیرگذاری بر روی کوتیکول‌ها و همچنین تعیین تأثیر زمان قرارگیری در معرض شرایط و ترکیب گاز تزریق شده می باشد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، ابتدا ویال لیوفیلیزه باکتری *سالمونلا انتریتیدیس (ATCC 13076)* را تحت شرایط سترون باز کرده و ۱ میلی لیتر از محیط نوترینت براث 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 براث اضافه شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد 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 یه محیط نوترینت آگار دیگر کشت خطی تهیه شد و در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد.

سپس، به منظور تهیه بانک میکروبی، ۲۰۰ میکرولیتر از محیط‌کشت نوترینت براث حاوی باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* برداشته و به ۱۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت نوترینت براث 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 سواپ 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، سترون سازی سطح پوسته‌ی تخم‌مرغ‌ها به وسیله‌ی اتانل ۷۰٪ انجام گردید، بعد از خشک شدن اتانول، جهت اطمینان از سترون شدن پوسته تخم مرغ با سواپ مرطوب روی پوسته کشیده شد و روی محیط‌کشت نوترینت آگار کشت خطی انجام گردید. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرارداده شد. برای نشانه‌گذاری تخم‌مرغ ناحیه یک سانتی‌متر مربعی روی پوسته تخم‌مرغ در نظر گرفته شد و با ماژیک علامت‌گذاری انجام گردید. به منظور تهیه‌ی سوسپانسیون میکروبی جهت تلقیح روی پوسته تخم‌مرغ، از ویال باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* روی محیط‌کشت XLD [1] آگار کشت داده شد و پلیت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. از پلیت مذکور، زیر هود لامینار تعداد کلنی برداشته و به ۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل اضافه گردید. سوسپانسیون باکتری، با شیکر کاملا مخلوط شد و کدورت آن مطابق استاندارد نیم مک‌فارلند

[1] Xylose Lysin Deoxycholate Agar

www.SID.ir

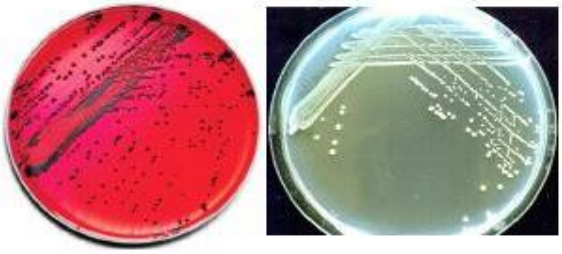
Archive of SID

(معادل $۱/۵\times۱۰^{۸}$ سلول باکتری در میلی لیتر) تنظیم‌گردید. در مرحله‌ی بعد ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون *S.enteritidis* بر روی پوسته تخم‌مرغ (نمونه شاهد) تلقیح شد. بعد از خشک شدن، یک سواپ مرطوب روی قسمت تلقیح‌شده کشیده و داخل ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل گذاشته شد. محلول توسط شیکر خوب مخلوط گردید و ۱۰ بار رقیق‌سازی انجام شد. از این رقت،۱۰۰ میکرولیتر روی محیط‌کشت نوترینت آگار کشت داده شد و پلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه‌گذاری 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 پلاسمای پایدار و اثر گذار) تنظیم گردید. تخم‌مرغ‌های تلقیح شده با ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی، توسط دستگاه پلاسمای سرد فشار اتمسفری با پروب سوزنی، طی زمان‌های مختلف (۱ دقیقه، ۳ دقیقه و ۶ دقیقه) در معرض تابش پلاسمای گاز آرگون خالص و گاز آرگون حاوی ۵٪ اکسیژن قرار داده شدند و پس از گذشت ۱ساعت، با سواپ مرطوب روی قسمت مشخص شده کشیده و تا $۱۰^{۳}$ بار رقیق سازی انجام گردید، از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر روی محیط‌کشت نوترینت آگار کشت داده شد و بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، نتایج بررسی گردید. برای بررسی نتایج تجربی بدست آمده از روش آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS-20 ، برای بیان متغیرهای کمی از آمار توصیفی به کمک میانگین و برای مقایسه میانگین نتایج از واریانس یک‌طرفه (ANOVA) استفاده گردید. برای انجام آنالیزهای آماری داده‌ها بصورت میانگین سه تکرار درنظر گرفته شد. سطح معنی‌داری 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.

یافته‌ها

همانگونه که در شکل‌های ۱ و۲ نشان داده شده است، کلنی‌های تک باکتری *سالمونلا اینتریتیدیس* 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.

شکل ۱- ویال لیوفیلیزه 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 XLD آگار (چپ) بعد از ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری جهت تشکیل تک کلنی

سوسپانسیون میکروبی تهیه شده قبل از تلقیح روی پوسته‌ی تخم مرغ، حاوی $۱/۵\times۱۰^{۸}$ باکتری در میلی‌لیتر بود که بعد از تلقیح سوسپانسیون باکتری روی پوسته‌ی تخم‌مرغ با روش ذکر شده تعداد ۱۵۲×۱۰^{۳} 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 تخم‌مرغ 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

تیمار ها	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

www.SID.ir

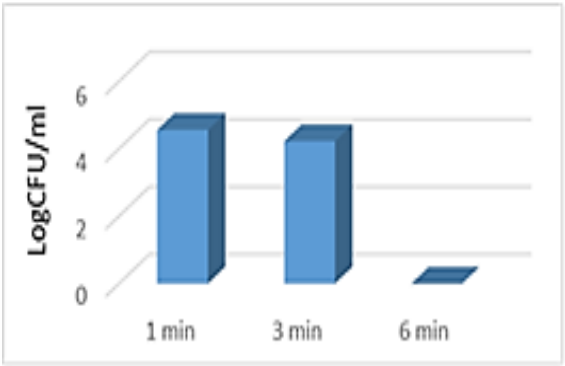
Archive of SID

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

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 انتریتیدیس* با تغییر زمان پرتودهی، متغییر است. به عبارت دیگر، زمان پرتودهی بر میزان بار میکروبی *سالمونلا انتریتیدیس* اثر دارد. زیرا مقدار معنی‌دار بدست آمده برابر ۰/ ۰۱ = α است.

جدول ۲- مقایسه میانگین کاهش بار میکروبی با تیمار پلاسما آرگون خالص در زمان‌های تابش ۱، ۳ و ٦ 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 ٦ دقیقه با استفاده از آزمون دانکن

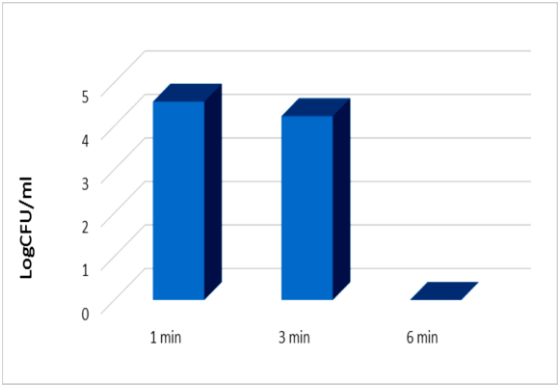
با توجه به نتایج جدول ۲ و شکل ۳ اختلاف معنی داری میان مدت زمان‌های تابش گاز پلاسما آرگون وجود دارد به نحوی که مقایسه میانگین ، نشان‌دهنده کمتر بودن مقدار CFU در زمان‌های ۳ و ۶ دقیقه نسبت به ۱ دقیقه دارد.

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

طبق نتایج آماری بدست آمده از جدول ۳ و شکل ۴، اثر تابش گاز آرگون/ اکسیژن بر باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* 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 ٦ دقیقه با استفاده از آزمون دانکن

Plasma Argon / O^2	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



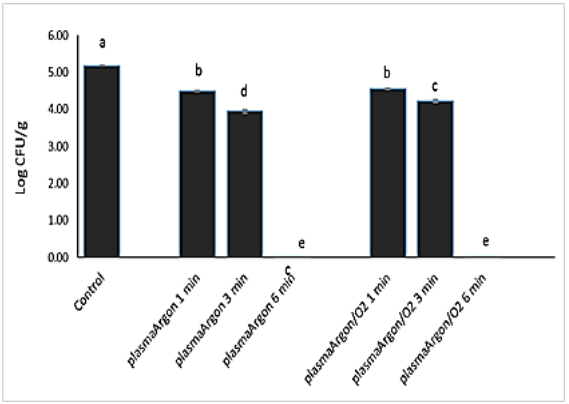
شکل ٤- مقایسه میانگین کاهش بار میکروبی با تیمار پلاسما آرگون حاوی ۵٪ اکسیژن در زمان‌های تابش ۱، ۳ و ٦ دقیقه با استفاده از آزمون دانکن

- آنالیز اثر متقابل تیمارها

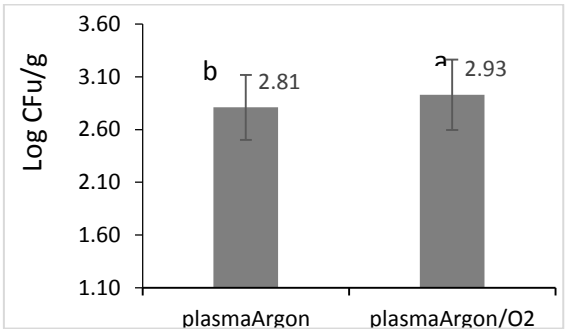
داده‌های بدست آمده بیانگر این امر بود که استفاده از پلاسما با گاز آرگون خالص به تنهایی یا به صورت ترکیب با اکسیژن در زمان‌های تابش مختلف تأثیرات متفاوتی بر روی کاهش باکتری مورد آزمون داشت (در سطح آماری ۱٪ نسبت به نمونه شاهد دارای تفاوت معنی داری بود).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٥- مقایسه میانگین تیمارهای شاهد و ٦ تیمار حاوی گازهای پلاسما آرگون و پلاسما آرگون حاوی ٥٪ اکسیژن در زمان‌های تابش ١، ٣ و ٦ دقیقه



شکل ٦- مقایسه میانگین کاهش باکتری در اثر استفاده از تابش پلاسما آرگون خالص و پلاسما آرگون حاوی ٥٪ اکسیژن

با توجه به شکل‌های ٥ و ٦، جدول ۴، مشاهده شد که بین دو گروه تیمار(پلاسما آرگون خالص و پلاسما آرگون حاوی ٥٪ اکسیژن) در زمان تابش ١ دقیقه اختلاف معنی داری وجود ندارد و میزان کاهش باکتری تقریبا در یک سطح قرار گرفته است. ولی در زمان تابش ٣ دقیقه، بین دو گروه تیمار اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ١٪ وجود دارد. (در جداول مقایسه میانگین حروف مشترک دلالت بر عدم اختلاف معنی‌دار و اختلاف در حروف، دلالت بر وجود اختلاف معنی دار در سطح احتمال ١٪ دارد)

بحث

در این تحقیق، از پلاسمای سرد اتمسفری با گاز آرگون خالص و گاز آرگون حاوی ٥ درصد اکسیژن به منظور کاهش بار میکروبی *سالمونلا انتریتیدیس* روی پوسته‌ی تخم‌مرغ استفاده شد. در تحقیق اخیر نوع گاز، میزان گاز، زمان تابش و فاصله نازل دستگاه پلاسما جت تا نمونه مورد آزمون، با کارهای انجام شده توسط محققین دیگر متفاوت بود. در این پژوهش، درصد بالاتری از کاهش بارمیکروبی، طی زمان کوتاهتر (۶ دقیقه) و فاصله بیشتر نازل دستگاه جت پلاسما تا نمونه (۳ سانتیمتر) نسبت به تحقیقات محققین دیگر مشاهده شد، به طوری که در هر دو تیمار با تابش پلاسما (گاز آرگون خالص و گاز آرگون حاوی ٥٪ اکسیژن) به مدت ۶ دقیقه ، حذف کامل باکتری مشاهده شد. در صورتی که موریتز و همکاران در سال ۲۰۱۶، طی ٥ دقیقه تابش پلاسما (آرگون خالص و آرگون حاوی ۰/۲، ۰/٥ و ١٪ اکسیژن) و فاصله نازل جت پلاسما ١/۲ سانتیمتر، در تیمار آرگون خالص، مقدار کاهش بار میکروبی را ۲/۲۷ $\log CFU/cm^2$ 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 ۴/٥ log CFU در هر پوسته‌ی تخم‌مرغ غیرفعال کند (Ragni *et al.*, 2010) . در مقایسه با این گزارش‌ها در پژوهش اخیر زمان قرارگیری درمعرض تابش پلاسما برای حذف قابل ملاحظه بار میکروبی بسیار کوتاه بوده است.

جدول ٤- آنالیز دو جمله ای برای تاثیر تابش پلاسما آرگون خالص و پلاسما آرگون حاوی ٥٪ اکسیژن بر مقدار CFU

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

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه‌گیری

در این تحقیق، تکنولوژی پلاسمای سرد اتمسفری، جهت از بین‌بردن میکروارگانیسم تلقیح شده به پوسته‌ی تخم‌مرغ مورد آزمایش قرار گرفت. مدت زمان قرار گرفتن نمونه‌های تخم‌مرغ در مقابل پلاسما با ترکیب گازهای مختلف مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج حاصل نشان دادند که سیستم پلاسما با افزایش زمان تا ۳ دقیقه قادر به کاهش چشمگیر (۸۹ تا ۹۴ درصد) تعداد کلنی‌ها در نمونه‌های تخم‌مرغ می‌باشد. با افزایش زمان تابش به ۶دقیقه، حذف کامل و صددرصدی آلودگی میکروبی انجام شد. بطور کلی، تیمار با پلاسمای آرگون خالص کاهش بیشتر بار میکروبی را نسبت به تیمارآرگون 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., Desmaison, J. & Leprince, P. (2006). Atmospheric pressure plasmas: A review.

www.SID.ir

Archive of SID

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.

www.SID.ir

Archive of SID

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

P. Bohlouli [a], R. Jalalirad [b*], D. Dorranian [c]

[a] M. Sc. Student of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[b] Assistant Professor, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

[c] 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

www.SID.ir