

Journal Pre-proofs

Investigation of the effect factors of atmospheric cold plasma of dielectric barrier discharge on *Salmonella enterica serovar Enteritidis* inactivation

Bahareh Abdoli ¹, Mohammad Hadi Khoshtaghaza ^{1*}, Mohammad Amir Karimi Torshizi², Hamid Ghomi ³, Saman Abdanan Mehdizadeh ⁴

DOI: <https://doi.org/10.22104/ift.2024.6823.2170>

To appear in: Innovative Food Technologies (IFT)

Received Date: 15 April 2024

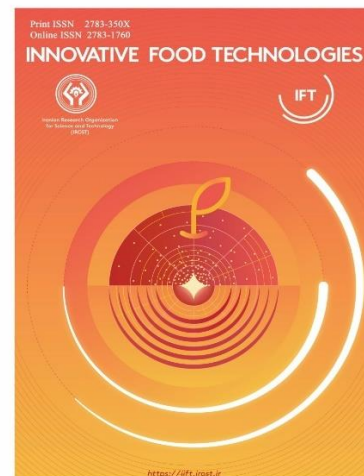
Revised Date: 18 May 2024

Accepted Date: 21 May 2024

Please cite this article as: Bahareh Abdoli ¹, Mohammad Hadi Khoshtaghaza ^{1*}, Mohammad Amir Karimi Torshizi², Hamid Ghomi³, Saman Abdanan Mehdizadeh⁴, Investigation of the effect factors of atmospheric cold plasma of dielectric barrier discharge on *Salmonella enterica serovar Enteritidis* inactivation, *Innovative Food Technologies* (2024), doi: <https://doi.org/10.22104/ift.2024.6823.2170>

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2024 The Author(s). Published by irost.org.



بررسی عوامل موثر پلاسمای سرد اتمسفری تخلیه سد دی الکتریک بر غیر فعال کردن *سالمونلا انتریکا سروتیپ انتریتیدیس*

بهاره عبدلی^۱، محمدهادی خوش تقاضا^{۱*}، محمدمیر کریمی ترشیزی^۲، حمیدرضا قمی مرزدشتی^۳، سامان آبدانان مهدی زاده^۴

^۱ گروه مهندسی مکانیک بیوسیستم، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

^۲ گروه علوم طیور، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

^۳ پژوهشکده لیزر و پلاسما، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

^۴ گروه مهندسی مکانیک بیوسیستم، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ایران

چکیده

بیش از ۵۰ درصد بیماری‌های ناشی از غذا توسط باکتری‌های بیماری‌زا ایجاد می‌شوند و این عوامل بیماری‌زا خطرات بهداشتی و اقتصادی قابل توجهی را نشان می‌دهند. *سالمونلا انتریکا سروتیپ انتریتیدیس (SESE)* یکی از شایع‌ترین پاتوژن‌های باکتریایی است که بیش از هر باکتری دیگری باعث بستری شدن و مرگ در بیمارستان می‌شود. پلاسمای غیر حرارتی، یک روش ابتکاری ضد عفونی‌کننده است که پتانسیل استفاده از یک استراتژی مداخله‌ای برای ایمنی مواد غذایی را نشان می‌دهد. این مطالعه با هدف بررسی امکان غیرفعال کردن *SESE* از طریق یک دستگاه پلاسمای سرد اتمسفری تخلیه سد دی الکتریک (DBD ACP) در فشار اتمسفر غیر حرارتی صنعتی انجام شد. برای ارزیابی کاهش *SESE*، هوا به عنوان گاز فرآیند، تحت شرایط تجربی مختلف، با ظروف پتری حاوی غلظت اولیه 10^7 CFU/ml استفاده شد. طیف‌سنجی انتشار برای نظارت بر عوامل کلیدی غیرفعال‌سازی پلاسما، یعنی پرتوهای فرابنفش و گونه‌های واکنش‌پذیر استفاده شد. استفاده از دستگاه DBD ACP منجر به کاهش غلظت *SESE* بیش از \log ۷ CFU/ml پس از تیمار ۶۰ s شد. علاوه بر این، میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد که تیمار با پلاسمای اتمسفر سرد باعث آسیب فیزیکی قابل توجهی به سلول‌ها می‌شود.

کلمات کلیدی

پلاسمای سرد، بار میکروبی، طیف‌سنجی، میکروسکوپ الکترونی روبشی

*نویسنده مسئول: khoshtag@modares.ac.ir

۱. مقدمه

میکروارگانسیم‌های منتقله از غذا یکی از بزرگترین نگرانی‌ها در صنایع غذایی هستند. میکروارگانسیم‌های منتقله از غذا مانند لیستریا مونوسیتوژنز، اشریشیا کلی، سالمونلا، ویبریو، کمپیلوباکتر ژژونی^۵ و هیاتیت A معمولاً در محصولات غذایی یافت می‌شوند و می‌توانند باعث بیماری‌های شدید در انسان شوند. از این رو، ضد عفونی مواد غذایی قبل از بسته بندی برای استریل کردن انجام می‌شود. روش‌های سنتی ضد عفونی میکروارگانسیم‌ها بر اساس اصول شیمیایی، حرارتی، رادیولوژیکی و فیزیکی است. این روش‌ها بسیار موفق هستند، اما پیچیده‌اند و برای انجام این روش‌ها به زمان و انرژی بیشتری نیاز دارند. پلاسماهای سرد یک تکنیک جدید در زمینه فرآوری مواد غذایی است و تیمار پلاسماهای سرد بر خواص فیزیکی، شیمیایی و تغذیه‌ای محصولات غذایی تأثیری ندارد یا بسیار ناچیز است [۱-۴].

پلاسماهای سرد اتمسفری^۶ (ACP) یک فناوری جدید و غیر حرارتی برای تیمار محصولات غذایی به منظور کاهش میکروارگانسیم‌های موجود در مواد غذایی بدون تأثیر بر کیفیت است. گونه‌های شیمیایی فعال در ACP می‌توانند میکروارگانسیم‌ها را بر روی سطوح غذا به دلیل خواص ضد میکروبی خود غیرفعال کنند [۵]. دو گونه اصلی موثر در فرآیند پلاسما هوا، گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و گونه‌های نیتروژن فعال (RNS) هستند. مولکول‌های برانگیخته N_2 و رادیکال اکسید نیتریک (NO) گونه‌های اصلی RNS هستند. ازن (O_3)، اکسیژن منفرد (O^- یا O)، سوپراکسید (O_2^-)، پراکسید (O_2^{2-} یا H_2O_2)، و رادیکال‌های هیدروکسیل (OH) گونه‌های فعال اکسیژن هستند که می‌توانند به طور موثر میکروارگانسیم‌ها را غیرفعال کنند. خاصیت ضد میکروبی این گونه‌های اکسیداتیو را می‌توان به پراکسیداسیون لیپیدی در غشای سلولی، اکسیداسیون پروتئین‌ها و DNA در سلول‌های میکروبی نسبت داد [۶].

تخلیه سد دی الکتریک^۷ (DBD) یکی از متداول‌ترین منابع تخلیه گاز اتمسفر غیر حرارتی است. پلاسماهای سرد اتمسفری تخلیه سد دی الکتریک (DBD ACP) اثر ضد عفونی سطحی را نشان می‌دهد و پتانسیل زیادی برای تیمار انواع محصولات غذایی دارد. منبع DBD ACP حاوی یک ماده دی الکتریک (عایق) در مسیر تخلیه بین الکترودها است. درحالی‌که DBD ها به طور گسترده برای مطالعه ضد عفونی مواد غذایی مورد استفاده قرار گرفته‌اند، عوامل موثر بر کارایی ضد عفونی آن‌ها همچنان باید به دقت مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرند [۷-۸]. به طور خاص تأثیر فرآیند و عوامل میکروبیولوژیکی مؤثر بر اثر ضد میکروبی DBD ACP در این پژوهش بررسی می‌شوند. پلاسماهای DBD ACP یک فناوری امیدوارکننده است که می‌تواند ایمنی مواد غذایی را با کمترین تأثیر بر کیفیت

^۱- *Listeria monocytogenes*

^۲- *Escherichia coli*

^۳- *Salmonella*

^۴- *Vibrio*

^۵- *Campylobacter jejuni*

^۶- Atmospheric pressure cold plasma

^۷- Reactive Oxygen Species

^۸- Reactive Nitrogen Species

^۹- Dielectric barrier discharge

^{۱۰}- Dielectric barrier discharge atmospheric pressure cold plasma

غذا در شرایط بهینه بهبود بخشید [۹-۱۰]. هنگامی که مسائل مربوط به افزایش مقیاس منابع پلاسما به طور مناسب مورد توجه قرار گیرد، فناوری DBD ACP سازگاری گسترده‌تری در صنایع غذایی پیدا خواهد کرد.

هدف از این مطالعه ارزیابی عملکرد دستگاه DBD ACP برای غیرفعال کردن SESE است. به منظور توجیه کاربرد موثر این دستگاه غیر حرارتی در کنترل مشکلات باکتریایی مرتبط با غذا، کاهش باکتری باید در کوتاه‌ترین زمان ممکن اتفاق بیفتد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. سویه های باکتریایی و کشت

سالمونلا انتریکا سروتیپ انتریتریدیس (RITCC 1695) از کلکسیون موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی تهیه شد. برای اطمینان از حفظ آن، کشت استوک به دقت در دمای سرد 8°C با گلیسرول ۱۵٪ نگهداری شد. کشت‌های کاری تازه با استفاده از ۲۰ ml برات سویا تریپتیک^۱ (Difco™, MD, USA) (TSB) با تلقیح کشت‌های منجمد و انکوبه کردن آنها به مدت ۲۴ h در دمای 37°C تهیه شد. به منظور کشت از آگار زایلوز لیزین دنوکسی کولات^۲ (Difco™, MD, USA) (XLD) استفاده شد. هنگامی که کلنی‌های روی آگار XLD به مدت ۲۴ h در دمای 37°C بالغ شدند، کلنی‌های سیاه جدا شده و متعاقباً به بطری‌های پلاستیکی حاوی ۱۰۰ ml TSB منتقل شدند. سپس کشت به آرامی با استفاده از تکان دهنده اوربیتال^۴ با سرعت ۱۰۰ RPM به مدت ۲۲ h ساعت در دمای 37°C تکان داده شد تا زمانی که باکتری‌ها شروع به رشد کنند [۷].

۲.۲. دستگاه پلاسما DBD ACP

دستگاه پلاسما DBD ACP با ترکیبی از الکترودهای بالایی با ولتاژهای بالای ۶ kHz و ۱۰ kV مجهز شده بود، در حالی که الکترودهای پایینی با ولتاژهای متغیر تقریباً ۲۵ kV و ۵۰ Hz بودند. علاوه بر این، DBD از دو الکتروود موازی تشکیل شده بود که قطر هر کدام ۲۲ × ۱۵ cm است. به منظور استفاده به عنوان یک مانع دی الکتریک، نمونه های SESE در ظروف پتری (BIPEE (polystyrene Petri dish 35 × 10 mm, sterile) در یک کاسه شیشه‌ای به ضخامت ۵ mm ساخته شده از کوارتز قرار گرفتند. در یک محفظه پلاسما (شکل ۱)، ولتاژ ۲۵ kV در فواصل مختلف به نمونه‌ها اعمال شد. سپس نمونه‌ها از زمان صفر تا ۶۰ s در هوا و در فشار اتمسفر تیمار شدند [۹، ۱۱-۱۴].

شکل ۱ تصویر شماتیک از تنظیمات آزمایشی تخلیه پلاسمای سرد اتمسفری سد دی الکتریک

Fig 1. A schematic illustration for the experimental setup of the DBD ACP

^۱ *Salmonella enterica* serovar Enteritidis

^۲ Tryptic Soy Broth

^۳ Xylose Lysine Deoxycholate

^۴ Orbital Shaker

۳,۲. آماده سازی نمونه

با استفاده از استاندارد لوله مک فارلند شماره ۱ سوسپانسیون باکتری *SESE* تا غلظت 10^8 CFU/ml آماده شد. کشت به مدت یک شب^۱ در دمای 37°C تحت انکوباسیون قرار گرفت و سپس در $7000 \times \text{g}$ به مدت 5 min در دمای 4°C سانتریفیوژ شد. پس از تهیه سوسپانسیون، 0.1 ml از این سوسپانسیون حاوی 10^7 CFU باکتری با دستگاه پخش کننده سلولی استریل در پتری دیش خالی توزیع شد و همین روش روی نوترینت آگار تکرار شد [۱۵].

۴,۲. آنالیز میکروبیولوژیکی

برای آنالیز میکروبیولوژیکی، کنترل‌های مناسب در طرح آزمایشی گنجانده شد. این کنترل‌ها شامل نمونه‌های تلقیح شده و همچنین نمونه‌های تیمار نشده بودند که به ترتیب برای تخمین جمعیت باکتریایی اولیه و ارزیابی تغییرات رشد میکروبی پس از یک دوره نگهداری 24 h استفاده شدند. علاوه بر این، کنترل‌هایی که تحت تیمار DBD ACP قرار گرفته بودند که یا تلقیح شدند یا بدون تلقیح رها شدند. نمونه‌های تیمار شده از ظرف پتری استخراج و در آب پپتون بافر (BPW) بدون مواد مغذی آگار جمع‌آوری شدند. متعاقباً، آنها به صورت سریالی در BPW رقیق شدند و مطابق با روش مایل و میسرا^۲ روی تریپتیک سوبا آگار^۳ (TSA) قرار گرفتند [۱۵]. حداقل حد تشخیص 10^1 log CFU/ml با استفاده از روش کشت سطحی تعیین شد. پس از یک دوره انکوباسیون 24 h در دمای 37°C ، شمارش کلنی‌ها انجام شد. برای هر تکرار از سه پلیت برای هر تیمار استفاده شد.

۵,۲. طیف سنجی انتشار نوری

برای شناسایی حالات برانگیخته در پلاسما و تعیین گونه مربوط به شعله ACP، از طیف سنجی انتشار نوری (Emerald COR10, Teksan Co, Iran) با وضوح 0.5 nm استفاده شد. محدوده طیفی بین 200 nm تا 1100 nm تنظیم شد و طیف‌های حاصل با استفاده از خط پایگاه داده طیف اتمی برای شناسایی گونه‌های مختلف آنالیز شدند. طیف انتشار گونه‌های فعال در فاصله 5 mm از ابتدا و 10 mm از محور جت پلاسما جمع‌آوری شد.

۶,۲. میکروسکوپ الکترونی روبشی

اسلایدهای شیشه‌ای استریل به قطعات $10 \times 10 \text{ mm}$ در یک ظرف پتری استریل برش داده شدند. تهیه و تیمار تلقیح *SESE* شامل انواع سیستم‌ها و فرآیندهای پلاسما بود. به طور خاص، 1 mm تلقیح *SESE* تیمار نشده و 1 mm تلقیح *SESE* تیمار شده با

^۱ Overnight

^۲ Buffered Peptone Water

^۳ Miles & Misra

^۴ Tryptic Soy Agar

DBD ACP مجاز به چسبیدن به اسلایدها در دمای اتاق به مدت ۶۰ min بودند. سپس اسلایدها در بافر فسفات سالین (PBS) شسته شده، در هوا خشک شدند و به مدت ۴۰ min با ۲/۵٪ گلوتارآلدئید ثابت شدند. نمونه‌ها متعاقباً در غلظت‌های مختلف اتانول (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ درصد ولتاژ / حجم اتانول در آب؛ ۲۰ min در هر غلظت) آب‌گیری شدند و در جریان آرام در هوا خشک شدند.

۷.۲. تحلیل آماری

تحقیق حاضر با استفاده از نرم افزار SAS (نسخه ۹/۰) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. جمعیت‌های *SESE* که تیمار DBD ACP را تحمل کردند تحت آنالیز واریانس قرار گرفتند، که متعاقباً توسط آزمون تفاوت معنی‌دار فیشر^۲ (LSD) در آستانه p-value کمتر از ۰/۰۵ برای تعیین معنی‌داری دنبال شد.

۳. نتایج و بحث

اثرات تخلیه در پلاسمای سرد هوای اتمسفر بر سویه‌های *SESE* مورد مطالعه قرار گرفت. تیمارهای مستقیم DBD ACP در شکل ۲ نشان داده شده است. دستگاه DBD ACP در غیرفعال کردن باکتری‌ها در چند ثانیه اول موثر بود. مناطق شفاف نشان دهنده مناطق رشد غیر فعال میکروارگانیسم‌ها است. اثر باکتری‌کشی مطلوب در فاصله ۲۰ mm تا ۳۰ mm از مرکز الکتروود رخ داده است. حداقل زمان غیرفعال‌سازی پلاسما برای سلول‌های *SESE* ۶۰s در فاصله ۲۰ mm از ساختار الکتروود بود. افزایش زمان تیمار پلاسما به طور قابل توجهی تعداد میکروارگانیسم‌های زنده مانده را کاهش داد (شکل ۳).

شکل ۲ غیر فعال سازی رشد *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* به روش تخلیه پلاسمای سرد اتمسفری سد دی الکتریک

Fig 2. Inactivation of the *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* growth by the DBD ACP method

اثر بخشی تیمار پلاسمای DBD ACP در غیرفعال کردن میکروارگانیسم‌ها توسط محققان مختلف نشان داده شده است. اثر ضد باکتریایی تیمار DBD ACP بسیار کارآمد است و عوامل فیزیکی و شیمیایی در مکانیسم غیرفعال‌سازی باکتری نقش دارند. دمای گاز تولید شده در طی تیمار DBD ACP باکتری را غیرفعال نمی‌کند و قرار گرفتن مناسب در معرض پلاسما و زمان از عوامل مهم غیرفعال شدن *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* است. ذرات باردار تولید شده توسط DBD ACP روی غشای سلولی تجمع می‌یابند که می‌تواند منجر به پارگی سلول میکروارگانیسم شود. در حالی که تماس مستقیم با باکتری‌ها برای این فرآیند ضروری است، تماس غیرمستقیم از طریق پلاسما هنوز تا حدی تأثیر دارد. علاوه بر این، اشعه ماوراء بنفش پلاسما می‌تواند به طور موثری

^۱- Glutaraldehyde

^۲- Fisher's

باکتری‌ها را با القای دیم‌های تیمین و آسیب رساندن به پروتئین‌ها غیرفعال کند و تیمار ترکیبی با ROS و UV^۱ می‌تواند سرعت غیرفعال سازی را افزایش دهد [۱۶,۹,۱۳].

شکل ۳ اثر زمان‌های مختلف پلاسمای سرد بر جمعیت *سالمونلا انتریکا* سروتیپ *انتریتیدیس*

Fig 3. The effect of different durations of cold plasma on the *Salmonella enterica* serovar Enteritidis

۱,۳. تجزیه و تحلیل طیف سنجی انتشار نوری

گونه‌های شیمیایی تولید شده در سیستم DBD ACP با استفاده از طیف سنجی انتشار نوری^۲ (OES) شناسایی شد. ترشحات پلاسما گونه‌های اتمی و مولکولی برانگیخته ای ایجاد می‌کند که دارای خواص ضد میکروبی هستند. واکنش‌های ACP با تخریب ساختارها و اجزای سلولی میکروبی و مرگ میکروارگانیسم‌ها، نقش مهمی در خواص ضد میکروبی DBD ACP ایفا می‌کنند. گونه‌های فعال عامل اصلی غیرفعال شدن باکتری‌ها هستند. برای شناسایی گازها می‌توان از OES استفاده کرد (شکل ۴). به خوبی نشان داده شده است که تخلیه‌های پلاسما مقادیر قابل توجهی از گونه‌های اتمی برانگیخته (مانند H، O و N)، و همچنین نوارهای مولکولی (مانند OH، O₂، NO، N₂، N₂⁺) تولید می‌کنند که قادر به تولید واکنش‌های برانگیختگی و تفکیک الکترون هستند و عموماً دارای خاصیت ضد میکروبی هستند.

شکل ۴ طیف سنجی انتشار نوری تخلیه پلاسما سرد اتمسفری سد دی الکتریک

Fig 4. The DBD ACP optical emission spectrometry

۲,۳. تجزیه و تحلیل میکروسکوپ الکترونی روبشی

تفاوت‌های مورفولوژیکی بین سلول‌های *سالمونلا انتریکا* سروتیپ *انتریتیدیس* تیمار شده با پلاسما و تیمار نشده، توسط تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی^۳ (SEM) مشهود بود (شکل ۵). گروه کنترل ساختار *SESE* دست نخورده را نشان دادند، در حالی که تیمار DBD ACP باعث تخریب ساختار *SESE*، فروپاشی سطح و بیرون راندن محتوای باکتری شد و در نتیجه سلول غیرفعال گردید [۹]. عوامل فعال اصلی که در غیرفعال کردن اهداف میکروبی به طور مستقل یا با هم افزایشی نقش دارند، شامل گونه‌های اکسیژن

^۱- Ultraviolet

^۲- Optical emission spectroscopy

^۳- Scanning electron microscopy

فعال (ROS) (اکسیژن منفرد، آنیون سوپراکسید، ازن^۱)، گونه‌های نیتروژن فعال (RNS) (نیتروژن اتمی^۴، نیتروژن برانگیخته^۵، اکسید نیتریک^۶)، ذرات باردار، ذرات خنثی و فوتون های UV است که ظرفیت ضد باکتریایی پلاسما برای غیر فعال کردن گونه های *SESE* را با موفقیت نشان داده شده است [۹، ۱۶-۲۰].

شکل ۵ تصاویر SEM از *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* سروتیپ *انتریتیدیس* تیمار شده با پلاسما (سمت راست) و کنترل (سمت چپ) در ۶۰ ثانیه

Fig 5. SEM images of *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* treated with plasma (right) and control (left) in 60 s

۳،۳. نتیجه‌گیری کلی

این تحقیق توانایی دستگاه‌های پلاسمایی فشار اتمسفر هوای صنعتی را برای جلوگیری از *SESE* نشان می‌دهد. راندمان دستگاه پلاسما بالا بود و DBD ACP با سرعت بیشتری به حداکثر کاهش باکتریایی دست یافت. استفاده از پلاسمای هوا در فشار اتمسفر ممکن است به زودی جایگزین روش‌های سنتی استریل‌سازی به دلیل ویژگی‌های غیر سمی و طراحی ساده شود و علی‌رغم نقش جزئی مورد انتظار تابش فرابنفش در فرآیند، مورد تقاضای صنعت برای ضدعفونی تضمینی با قیمت قابل قبول است.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

تقدیر و تشکر

این پژوهش با حمایت مالی بنیاد ملی علوم ایران (با شماره کمک هزینه : ۴۰۰۳۷۴۷) انجام شده است و نویسندگان مراتب تشکر خود را به جهت این حمایت عنوان می‌نمایند.

^۱ Singlet Oxygen

^۲ Superoxide Anion

^۳ Ozone

^۴ Atomic Nitrogen

^۵ Excited Nitrogen

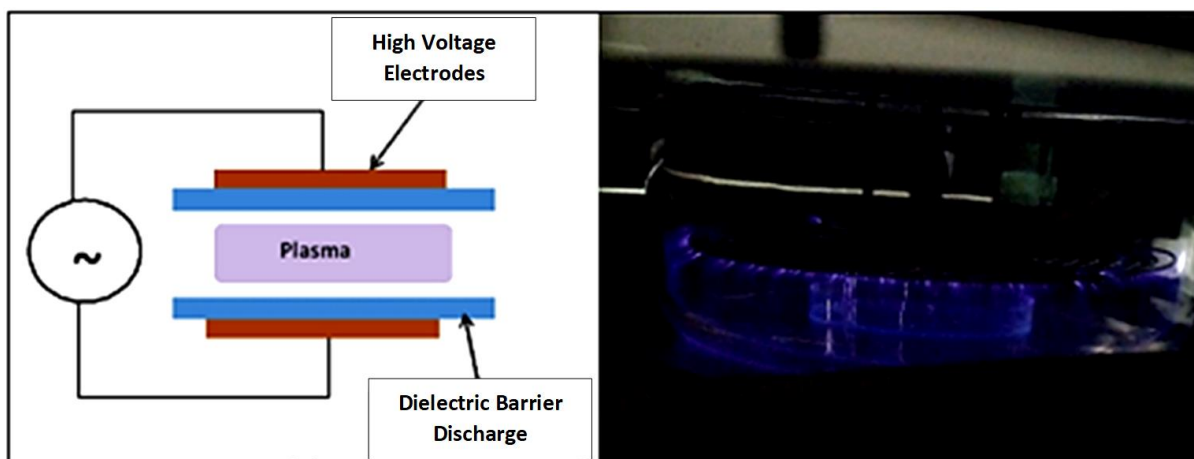
^۶ Nitric Oxide

- [1] Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2009). Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. *CRFSFS.*, 8(3), 157-180. doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00076.x.
- [2] Subramanian, A., Harper, W. J., & Rodriguez-Saona, L. E. (2009). Rapid prediction of composition and flavor quality of cheddar cheese using ATR–FTIR spectroscopy. *J. Food Sci.*, 74(3), C292-C297. doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01111.x.
- [3] Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., Jones, J.L, Griffin, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.*, 17(1), 7. doi.org/10.3201/eid1701.p11101.
- [4] Mandal, R., Singh, A., & Singh, A. P. (2018). Recent developments in cold plasma decontamination technology in the food industry. *Trends Food Sci.*, 80, 93-103. doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.014.
- [5] Turtoi, M. and Borda, D., (2014). Decontamination of egg shells using ultraviolet light treatment. *J. World's Poultry.*, 70(2), pp.265-278. doi.org/10.1017/S0043933914000282.
- [6] Baier, M., Görgen, M., Ehlbeck, J., Knorr, D., Herppich, W. B., & Schlüter, O. (2014). Non-thermal atmospheric pressure plasma: Screening for gentle process conditions and antibacterial efficiency on perishable fresh produce. *IFSET.*, 22, 147-157. doi.org/10.1016/J.IFSET.2014.01.011.
- [7] Wan, Z., Chen, Y., Pankaj, S. K., & Keener, K. M. (2017). High voltage atmospheric cold plasma treatment of refrigerated chicken eggs for control of *Salmonella* Enteritidis contamination on egg shell. *LWT - Food Sci. Technol.*, 76, 124-130. doi.org/10.1016/J.LWT.2016.10.051.
- [8] Hernández-Torres, C. J., Reyes-Acosta, Y. K., Chávez-González, M. L., Dávila-Medina, M. D., Kumar Verma, D., Martínez-Hernández, J. L., Narro-Céspedes, R. I., & Aguilar, C. N. (2022). Recent trends and technological development in plasma as an emerging and promising technology for food biosystems. *Saudi J. Biol. Sci.*, 29, 1957–1980. doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.12.023.
- [9] Abdoli, B., Khoshtaghaza, M. H., Ghomi, H., Torshizi, M. A. K., Mehdizadeh, S. A., Pishkar, G., & Dunn, I. C. (2024). Cold atmospheric pressure air plasma jet disinfection of table eggs: Inactivation of *Salmonella enterica*, cuticle integrity and egg quality. *Int. J. Food Microbiol.* 410. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110474.
- [10] Ragni, L., Berardinelli, A., Vannini, L., Montanari, C., Sirri, F., Guerzoni, M. E., & Guarneri, A. (2010). Non-thermal atmospheric gas plasma device for surface decontamination of shell eggs. *J. Food Eng.*, 100(1), 125–132. doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.03.036
- [11] Marzdashty, H. R. G., Safa, N. N., & Golghand, M. R. (2017). *U.S. Patent Application No. 15/409,457*. patents.google.com/patent/US20170127506A1/en (Accessed: 3 June 2022).
- [12] Tolouie, H., Mohammadifar, M. A., Ghomi, H., & Hashemi, M. (2021). Argon and nitrogen cold plasma effects on wheat germ lipolytic enzymes: Comparison to thermal treatment. *Food Chem.*, 346, 128974. doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128974.
- [13] Rezaei, S., Ebadi, M. T., Ghobadian, B., & Ghomi, H. (2021). Optimization of DBD-Plasma assisted hydro-distillation for essential oil extraction of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seed and spearmint (*Mentha spicata* L.) leaf. *JMAPS.*, 24, 100300. doi.org/10.1016/j.jarmap.2021.100300.
- [14] Dasan, B. G., Yildirim, T., & Boyaci, I. H. (2018). Surface decontamination of eggshells by using non-thermal atmospheric plasma. *Int. J. Food Microbiol.*, 266, 267-273. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.021.
- [15] Miles, A. A., Misra, S. S., & Irwin, J. O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *J Infectiology & Epidemiol.*, 38(6), 732-749. doi.org/10.1017/S002217240001158X.
- [16] Mattick, K. L., Jørgensen, F., Wang, P., Pound, J., Vandeven, M. H., Ward, L. R., Legan, J. D., Lappin-Scott, H.M & Humphrey, T. J. (2001). Effect of challenge temperature and solute type on heat tolerance of *Salmonella* serovars at low water activity. *AEM.*, 67(9), 4128-4136. doi.org/10.1128/AEM.67.9.4128-4136.2001.
- [17] Al-Rawaf, A. F., Fuliful, F. K., Khalaf, M. K., & Oudah, H. K. (2018). Studying the non-thermal plasma jet characteristics and application on bacterial decontamination. *J. Theor. Appl. Phys.*, 12(1), 45-51.

doi.org/10.1007/s40094-018-0279-y.

- [18] Smadi, H., Sargeant, J. M., Shannon, H. S., & Raina, P. (2012). Growth and inactivation of *Salmonella* at low refrigerated storage temperatures and thermal inactivation on raw chicken meat and laboratory media: mixed effect meta-analysis. *J. Epidemiol. Glob. Health.*, 2(4), 165-179. doi.org/10.1016/j.jegh.2012.12.001.
- [19] Scholtz, V., Pazlarova, J., Souskova, H., Khun, J., & Julak, J. (2015). Nonthermal plasma - A tool for decontamination and disinfection. *Biotechnol. Adv.*, 33(6), 1108–1119. doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.002.
- [20] Lin, C. M., Herianto, S., Syu, S. M., Song, C. H., Chen, H. L., & Hou, C. Y. (2021). Applying a large-scale device using non-thermal plasma for microbial decontamination on shell eggs and its effects on the sensory characteristics. *LWT*, 142, 111067. doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111067.

Journal Pre-proofs



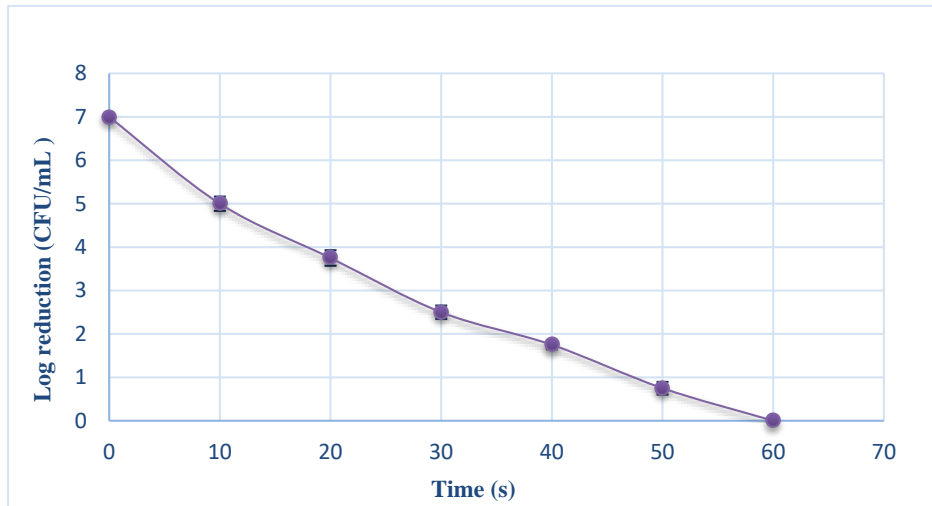
شکل ۱ تصویر شماتیک از تنظیمات آزمایشی تخلیه پلاسمای سرد اتمسفری سد دی الکتریک

Fig 1. A schematic illustration for the experimental setup of the DBD ACP



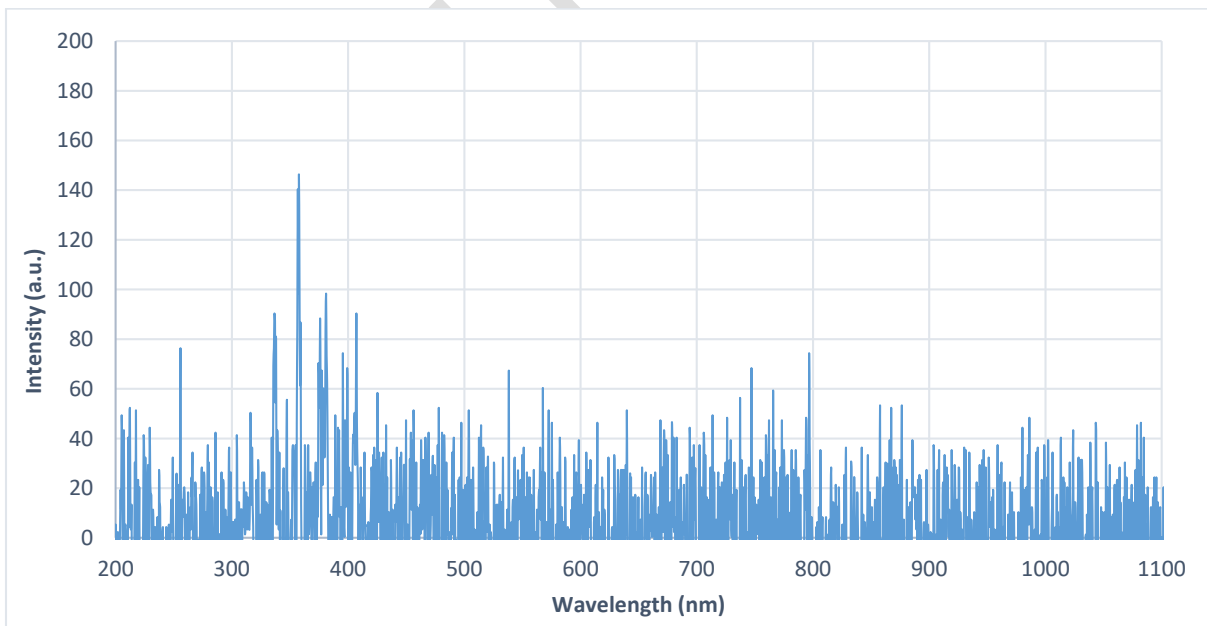
شکل ۲ غیر فعال سازی رشد سالمونلا انتریکا سروتیپ انتریتیدیس به روش تخلیه پلاسمای سرد اتمسفری سد دی الکتریک

Fig 2. Inactivation of the *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* growth by the DBD ACP method



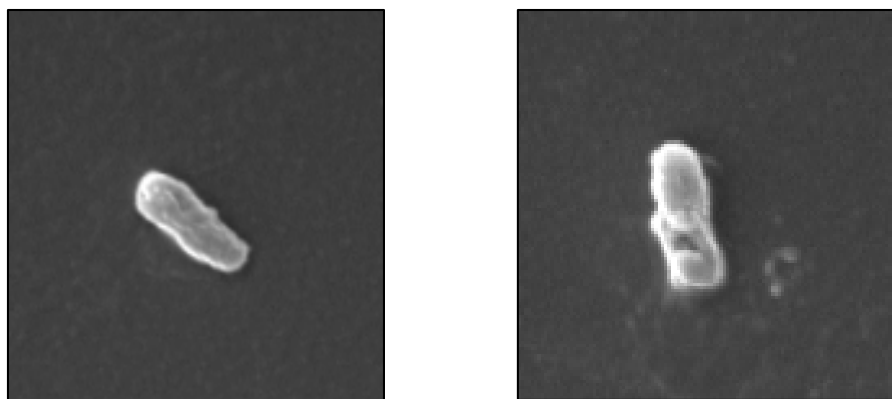
شکل ۳ اثر زمان‌های مختلف پلاسمای سرد بر جمعیت سالمونلا انتریکا سروتیپ انتریتیدیس

Fig 3. The effect of different durations of cold plasma on the *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* Count



شکل ۴ طیف سنجی انتشار نوری تخلیه پلاسمای سرد اتمسفری سد دی الکتریک

Fig 4. The DBD ACP optical emission spectrometry



شکل ۵ تصاویر SEM از *سالمونلا/انتریکا سروتیپ/انتریتیدیس* تیمار شده با پلاسما (سمت راست) و کنترل (سمت چپ) در ۶۰ ثانیه

Fig 5. SEM images of *Salmonella enterica serovar* Enteritidis treated with plasma (right) and control (left) in 60 s

Introduction: More than half of foodborne illnesses are attributed to pathogenic bacteria, posing considerable health and economic dangers. *Salmonella enterica serovar Enteritidis* (*SESE*) is a prevalent bacterial pathogen responsible for a higher number of hospitalizations and fatalities compared to other bacteria. Non-thermal plasma, an innovative decontamination technique, exhibits the potential to serve as an intervention strategy for food safety. The dielectric barrier discharge atmospheric pressure cold plasma (DBD ACP) is characterized by its surface disinfection capabilities and holds significant potential for the treatment of various food items. Contained within the DBD ACP source is a dielectric material (insulation) situated in the discharge path between the electrodes. Although DBDs have traditionally been employed in the examination of food disinfection, a thorough analysis of the factors impacting their disinfection efficacy is still required. This study specifically delves into the investigation of the process and microbiological factors that influence the antimicrobial properties of DBD ACP. Under optimal conditions, DBD ACP plasma emerges as a promising technology capable of enhancing food safety with minimal repercussions on food quality. Upon effectively addressing the challenges associated with scaling up plasma sources, the widespread adoption of DBD ACP technology within the food industry can be anticipated. The study aimed to explore the possibility of deactivating *SESE* through a brief industrial treatment utilizing non-thermal DBD ACP device.

Materials and method: *SESE* was acquired from the poultry science department at Tarbiat Modares University. The DBD ACP device is furnished with a set of upper electrodes carrying high voltages of 6 kHz and 10 kV, while the lower electrodes are provided with adjustable voltages of around 25 kV and 50 Hz. Within a plasma chamber, a 25 kV voltage is administered to the samples at various time intervals. Subsequently, the samples are exposed to treatment for 0 to 60 s in an air environment at standard atmospheric pressure. In order to conduct microbiological analysis, suitable controls were incorporated into the experimental setup. These controls encompassed inoculated samples and untreated samples, which were utilized to determine the initial bacterial population and assess alterations in microbial growth following a 24 h storage period. To assess the reduction of *SESE*, air was used as the process gas under different experimental circumstances, with Petri dishes containing an initial concentration of 10^7 CFU/ml. Optical emission spectroscopy (OES), featuring a 0.5 nm resolution, was employed to pinpoint the excited states within the plasma and ascertain the species associated with the ACP flame. The statistical analysis of the current research was carried out using SAS software (version 0.9). A scanning electron microscope method (SEM) to observe and analyze the physical damage of microorganisms.

Results and discussion: The application of the DBD ACP device resulted in a decrease in *SESE* concentration by over 7 log CFU/ml following a 60 s treatment. The DBD ACP device produces electrically charged particles that gather on the exterior membrane of cells. The electrical forces from these charges can compromise and break the cell membranes. This phenomenon occurs when DBD ACP directly interacts with bacteria. In cases where the plasma indirectly contacts bacteria (post-light plasma), the number of charged particles reduces as electrons and ions quickly recondense. Thus, the role of charged particles in deactivating bacteria is considered secondary. Chemical compounds generated in ACP systems were detected through OES. Moreover, SEM revealed that the DBD ACP treatment caused significant physical damage to the cells.

Conclusion: This study showcases how industrial DBD ACP device can effectively prevent *SESE*. The plasma device demonstrated high efficiency, with DBD ACP leading to the quickest reduction in bacteria. The adoption of air plasma at atmospheric pressure is anticipated to supplant conventional sterilization methods because of its safe attributes and uncomplicated design. Despite the anticipated limited impact of UV radiation, the industry still requires it for reliable sterilization at a reasonable cost.

Keywords: Cold Plasma, Microbial load, Optical emission spectroscopy, Scanning electron microscopy

*Corresponding author: khoshtag@modares.ac.ir