نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذایی
جلد نهم، شماره اول، ۹۶
۱۳-۲۲
http://ejfpp.gau.ac.ir

تأثیر غلظت پراکسید هیدروژن تولید شده با پلاسمای سرد اتمسفری در نابود سازی باکتری *اشرشیا کلی* تلقیح شده به آب

حامد نیکمرام[۱]، محمد رضا کوشکی[۲*] و محمود قرآن نویس[۳]

[۱]دانشجوی دکتری میکروبیولوژی صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

[۲]عضو هیات‌علمی گروه تحقیقات صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

[۳]عضو هیات‌علمی مرکز تحقیقات فیزیک پلاسما، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۳/۱۳

چکیده

سابقه و هدف: غیرفعال کردن میکروارگانیسم‌ها با استفاده از پلاسما یکی از فناوری‌های نوظهور در حوزه غذا و زیست پزشکی است. پلاسمای سرد را می‌توان به‌منظور غیرفعالسازی میکروارگانیسم‌ها در آب استفاده نمود. از اصلی‌ترین عوامل نابودسازی میکروارگانیسم‌ها توسط پلاسمای سرد تولید یون‌ها و گونه‌های فعال هیدروکسیل، اکسیژن، اوزون و پراکسید هیدروژن در اثر یونیزاسیون گاز است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش جهت بررسی خاصیت میکروب‌کشی پلاسمای سرد، از دستگاه تخلیه الکتریکی اسپارک استفاده شد. باکتری *اشرشیا کلی* به نمونه‌های آب تلقیح گردید و پس از تیمار پلاسما در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری جهت بررسی بار میکروبی در محیط کشت پلیت کانت آگار انجام شد. علاوه بر آزمایشات میکروبی، غلظت پراکسید هیدروژن نیز اندازه‌گیری گردید.

یافته‌ها: نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که پلاسمای سرد قادر به غیرفعالسازی غلظت بالایی از باکتری *اشرشیاکلی* در آب می‌باشد؛ به‌طوری که پس از ۱۵ دقیقه تابش پلاسما روی سطح آب، بار میکروبی نمونه با حدود ۸ سیکل لگاریتمی کاهش به صفر رسید. با شروع تابش پلاسما روی سطح آب، مقدار پراکسید هیدروژن موجود در آب افزایش یافت؛ به‌طوری‌که در پایان آزمون غلظت پراکسید هیدروژن در مدت زمان ۱۵ دقیقه به حدود ۱۰۰میلی‌گرم بر لیتر افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: در این پژوهش با استفاده از پلاسمای سرد تخلیه الکتریکی اسپارک روی سطح آب تمامی بار میکروبی تلقیح شده به نمونه آب از بین رفت. با توجه به آزمایشات صورت گرفته، افزایش میزان غلظت پراکسید هیدروژن با افزایش مدت زمان تیمار می‌تواند به‌عنوان عامل اصلی نابودسازی میکروارگانیسم‌های آب با روش پلاسمای سرد باشد.

واژه‌های کلیدی: پلاسمای سرد، غیرفعالسازی، آب، *اشرشیا کلی*، پراکسید هیدروژن

[*]مسئول مکاتبه: mr_koushki@yahoo.com

مقدمه

کیفیت منابع آبی برای تأمین آب آشامیدنی، تولید مواد غذایی و صنایع وابسته مهم است. با ورود عوامل عفونی، مواد شیمیایی سمی و مواد رادیولوژیکی کیفیت منابع آبی کاهش می‌یابد؛ لذا مصرف درست و دفع بهداشتی فاضلاب‌های انسانی و شیمیایی، نکته‌ای کلیدی در جلوگیری از هدر رفتن و آلودگی منابع محدود آبی می‌باشد. از آنجایی‌که آب بیش از هر ماده غذایی دیگری مصرف می‌گردد، آلودگی میکروبی آب و سلامت آن از اهمیت خاصی برخوردار است. تکنولوژی پلاسمای سرد روش نوینی جهت نابودسازی میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. تاکنون پژوهش‌های متعددی در مورد تأثیر پلاسمای سرد بر نابودسازی باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌های مختلف در مواد غذایی مانند خشکبار، سبزیجات، میوه‌ها، انواع گوشت، فراورده‌های تازه، فراورده‌های شیری و ادویه‌جات انجام گرفته که نتایج آن بسیار قابل توجه بوده است (۱، ۲، ۴، ۷، ۸، ۱۳، ۱۵، ۱۸، ۲۰، ۲۳، ۲۴، ۲۶، ۲۷، ۲۹).

بر خلاف تصور گذشته مبنی بر تقسیم‌بندی ماده در سه حالت جامد، مایع و گاز، با در نظرگرفتن رفتارهای مختلف پلاسما، آن‌را حالت چهارم ماده در نظر می‌گیرند. هرگاه گازی گرم شود و یا در معرض میدان الکتریکی بالا قرار گیرد، هر الکترون با انرژی جنبشی بالا شتاب می‌گیرد و با اتم‌ها و مولکول‌های گاز برخورد می‌کند، الکترون‌های بیشتری آزاد و باعث یونیزاسیون جزئی می‌شود (۷). به بیان ساده پلاسما نوعی گاز یونیزه شده است و اجزای تشکیل دهنده آن تحت تأثیر یک منبع حاوی انرژی شتاب زیادی پیدا کرده و انرژی بسیار زیادی را در خود ذخیره می‌کنند. در نتیجه توانایی یونیزه کردن، تحریک کردن و شکافتن مولکول‌های گاز و اتم‌ها را در واکنش‌های شیمیایی به‌دست می‌آورند (۲۵). انواع مختلف پلاسما بر اساس فشار و دما تقسیم‌بندی می‌شوند. پلاسمای حرارتی شامل قوس تخلیه الکتریکی و مشعل پلاسما می‌باشد؛ درحالی‌که پلاسمای غیرحرارتی شامل تخلیه سد دی الکتریک، تخلیه کرونا، تخلیه اسپارک و پلاسما جت می‌باشد (۲، ۹).

تولید پلاسمای سرد در محیط آزمایشگاه به‌روش تخلیه گازی صورت می‌گیرد. تخلیه گازی را می‌توان به‌صورت دو الکترود قرار داده شده درون یک لوله شیشه‌ای و متصل شده به یک منبع انرژی در نظر گرفت که محفظه می‌تواند حاوی انواع مختلف گاز باشد. در چنین سامانه‌ای با افزایش اختلاف پتانسیل بین دو الکترود، جریان به‌طور ناگهانی و سریع افزایش یافته و در نهایت در ولتاژ خاصی با ریزش عظیم الکترونی، گاز موجود در درون لوله هادی جریان الکتریکی شده و تخلیه گازی شکل می‌گیرد. یون‌ها و گونه‌های فعال هیدروکسیل، اکسیژن، اوزون، پراکسید هیدروژن و همچنین نور فرابنفش در اثر یونیزاسیون گاز و ایجاد پلاسما به‌وجود می‌آیند و از اصلی ترین عوامل نابود سازی میکروارگانیسم‌ها توسط پلاسمای سرد به شمار می‌روند (۱۰، ۱۲).

تجمع ذرات باردار پلاسما بر سطح غشای سلولی میکروب باعث تخریب دیواره و از بین رفتن آنها می‌گردد. برهمکنش مستقیم سلول و ذرات باردار موجود در پلاسما موجب اکسیداسیون لیپیدها، اسیدهای آمینه و اسیدهای نوکلئیک در غشای سلولی و در نهایت آسیب و مرگ آن می‌شود (۲۰، ۵). اکسیداسیون توسط گونه‌های اکسید کننده ازت و اکسیدهای ازت صورت می‌گیرد. پروتئین‌ها به‌ویژه در محل‌هایی که اسید آمینه‌های گوگردی یافت می‌شود، نسبت به آسیب ناشی از اکسیداسیون حساس‌تر می‌باشند. فوتون‌های فرابنفش که حاصل بازگشت گونه‌های بر انگیخته به حالت پایه می‌باشد، با تخریب مستقیم مواد ژنتیکی میکروارگانیسم، منجر به ایجاد

تداخل در تقسیم سلولی و در نهایت سبب مرگ سلول می‌شود. آسیب اکسایشی وارد شده DNA[1] منجر به تجزیه بازها و در نهایت تجزیه رشته‌های DNA (تخریبی که ترمیم آن برای سلول بسیار مشکل است) می‌شود (۲۲). فوتون‌های فرابنفش و گونه‌های فعال با تأثیر سینرژیستی بر مرگ و میر میکروارگانیسم‌ها موجب از بین رفتن هر چه بیشتر آن‌ها می‌شود (۱۱). اکسیداسیون لیپیدها و پروتئین‌های موجود در دیواره سلولی و غشاء سیتوپلاسمی باکتری توسط پلاسما باعث اختلال در عملکرد باکتری‌ها شده، نابودی کامل دیواره و غشاء شده و در نهایت منجر به مرگ باکتری گردد (۴، ۸، ۱۳).

هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی اثر پلاسمای سرد تخلیه الکتریکی اسپارک ایجاد شده روی سطح آب در نابودسازی میکروارگانیسم‌های آب بود. همچنین جهت یافتن ارتباط بین میزان غلظت پراکسید هیدروژن تولید شده در اثر پلاسمای سرد در آب و میزان کاهش بار میکروبی، غلظت این ماده قبل و بعد از هر تیمار در مدت زمان‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تولید پلاسما: در این پژوهش از دستگاه تولیدکننده پلاسما از نوع تخلیه الکتریکی اسپارک (شرکت نیک فناوران پلاسما، مدل sp141) استفاده شد. دستگاه شامل دو الکترود میله‌ای نوک تیز متصل به یک منبع تغذیه با ولتاژ حداکثر ۱۵ کیلوولت و فرکانس بالا بود. فاصله الکترودها از یک‌دیگر و هم‌چنین تا سطح نمونه آب به ترتیب ۵۰ و۴ میلی‌متر بود. با برقرار نمودن اختلاف پتانسیل بین دو الکترود پلاسمای تخلیه الکتریکی اسپارک روی سطح آب تشکیل گردید.

بررسی اثر میکروب‌کشی پلاسمای ایجاد شده در نمونه‌های آب: باکتری *اشرشیا کلی* (PTCC 1330) جهت بررسی اثر میکروب‌کشی پلاسما در آب مورد بررسی قرار گرفت. باکتری مورد نظر به صورت ویال لیوفلیزه شده از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. پس از کشت اولیه و فعال‌سازی باکتری روی محیط کشت ائوزین متیلن بلو[2] آگار، کلونی‌های واحد رشد کرده جداسازی شدند. از کلنی‌های تازه، کشت ۲۴ ساعته این باکتری جهت ساخت غلظت نیم مک فارلند در آب مقطر استریل شده استفاده شد. حجم آب مورد مطالعه در حدود ۱۰ میلی‌لیتر با غلظت مشخص $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ باکتری در هر میلی‌لیتر بود که با کدورت استاندارد نیم مک فارلند مقایسه گردید. قبل از تیمار نمونه‌ها با پلاسما، نمونه‌برداری جهت شمارش تعداد باکتری‌های اولیه انجام شد. سپس در زمان‌های ۱، ۳، ۵، ۷، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ دقیقه، نمونه‌های آب آلوده به‌صورت جداگانه در پلیت‌های استریل تحت اثر تابش پلاسما قرار گرفتند. کشت نمونه‌ها بلافاصله در محیط کشت پلیت کانت آگار انجام شد. محیط‌های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری (ممرت، آلمان) شدند. شمارش تعداد کلنی باکتری‌ها قبل و بعد از تأثیر پلاسما با دستگاه کلنی کانتر (ژربر، آلمان) انجام شد.

تعیین غلظت پراکسید هیدروژن: جهت بررسی غلظت پراکسید هیدروژن تولید شده از کیت تشخیص پراکسید هیدروژن (مرک، آلمان) استفاده شد. اندازه‌گیری غلظت پراکسید هیدروژن قبل و بلافاصله بعد از تأثیر پلاسما در زمان های مشخص انجام گردید. این کیت به صورت تست نواری بوده که پس از تماس نوار با سطح نمونه در صورت وجود

1. Deoxyribonucleic acid

2. Eosin methylene blue (EMB)

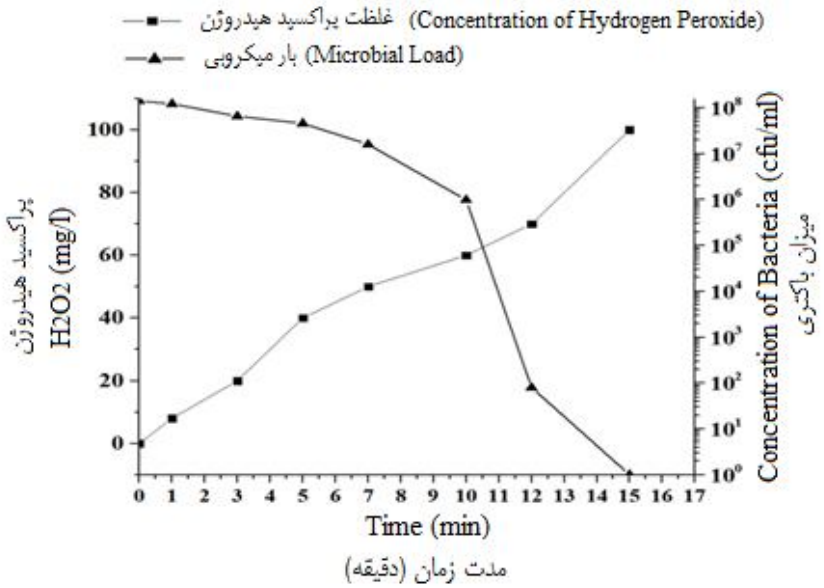
پراکسید هیدروژن، تغییر رنگ در نوار ایجاد می‌شود. با مقایسه تغییر رنگ مشاهده شده با شکل نوار استاندارد موجود بر روی کیت میزان غلظت پراکسید هیدروژن تعیین شد.

اندازه‌گیری pH: مقدار pH نمونه‌ها قبل و بعد از تأثیر پلاسما در زمان‌های مختلف و نیز پس از ۲۴ ساعت نگهداری نمونه‌ها در آزمایشگاه با دستگاه pH متر (متراهم، مدل ۷۴۴، سوئیس) اندازه‌گیری شد.

نتایج و بحث

بررسی اثر پلاسمای سرد بر بار میکروبی نمونه‌های آب، تغییرات غلظت پراکسید هیدروژن و pH:

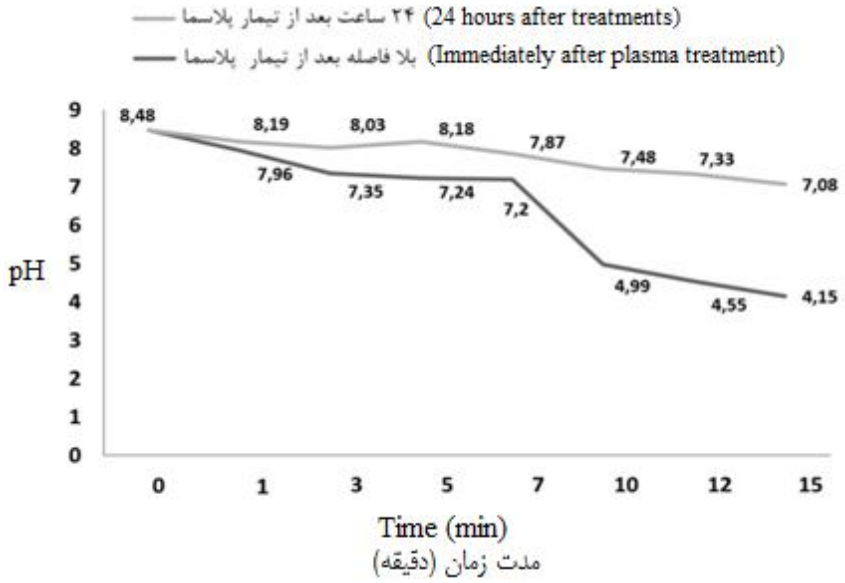
کاهش بار میکروبی نمونه‌ها بعد از تیمار پلاسما نشان داد، پلاسما حتی بعد از زمان کوتاهی به‌سرعت باعث غیرفعالسازی باکتری‌ها گردید. بعد از ۱۵ دقیقه تیمار پلاسما تعداد باکتری‌ها به مقدار ۸ سیکل لگاریتمی کاهش یافت و به صفر در هر میلی‌لیتر نمونه آب رسید (شکل ۱). نتایج حاصل از اندازه‌گیری غلظت پراکسید هیدروژن تولید شده نشان داد بعد از زمان کوتاهی از اثر پلاسما روی سطح آب (۵ دقیقه اول) پراکسید هیدروژن به سرعت تولید شد و با افزایش مدت زمان تیمار پلاسما، غلظت آن به صورت صعودی افزایش یافت (شکل ۱).



شکل ۱- میزان بار میکروبی باکتری *اشرشیا کلی* و میزان غلظت پراکسید هیدروژن تولید شده در مدت زمان تیمار با پلاسما

Figure 1- Microbial load (*E. coli*) and H_2O_2 concentration during plasma treatment

بلافاصله پس از تیمار نمونه‌ها توسط پلاسما، اقدام به اندازه‌گیری pH شد. همچنین جهت بررسی میزان پایداری تغییرات pH مشاهده شده، نمونه‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و میزان pH دوباره اندازه‌گیری شد (شکل ۲). بعد از اثر پلاسما pH آب به شدت کاهش یافت (شکل ۲)؛ به‌طوری که از مقدار اولیه ۸/۴۸ به ۴/۱۵ در پایان آزمایش رسید. اگرچه بعد از ۲۴ ساعت نگهداری نمونه‌ها در یخچال سطح pH در آب به محدوده استاندارد آب شرب بازگشت.



شکل ۲- میزان تغییرات pH در آب در اثر تابش پلاسما

Figure 2- Changes in pH value in water as influenced by plasma treatment

مکانیسم میکروب‌زدایی پلاسما در محیط‌های مختلف متفاوت است. در محیط‌های مایع، یون‌ها و گونه‌های فعال ایجاد شده توسط پلاسما می‌تواند سبب ایجاد مولکول‌های فعال (مانند ازنو آب‌اکسیژنه) با طول عمر بالاتری گردند (۳، ۱۰). براساس نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر، بار میکروبی نمونه‌های آب که دارای باکتری *اشرشیاکلی* تلقیح شده بودند، پس از ۱۵ دقیقه تیمار با پلاسما، از $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ باکتری در هر میلی‌لیتر به صفر رسید.

طبق نتایج بدست آمده تأثیر تیمار پلاسما بر کاهش بار میکروبی *اشرشیاکلی* در آب کاملاً مشهود است. این یافته با نتایج حاصل از پژوهش‌های پیشین پیرامون بررسی نابودسازی میکروارگانیسم‌ها در محیط آبی با پلاسما جت (۶) منطبق است. پلاسمای مورد استفاده در پژوهش حاضر از نوع تخلیه الکتریکی اسپارک می‌باشد و با توجه به نتایج حاصل و مقایسه نتایج پژوهش‌های پیشین، می‌توان بیان نمود در میزان توان یکسان، پلاسمای اسپارک اثر میکروب زدایی بهتری نسبت به سایر انواع پلاسمای استفاده شده در پژوهش‌های مختلف دارد (۱۹، ۱۵).

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد در شروع تابش پلاسما، پراکسید هیدروژن تولید شده و در ادامه با افزایش مدت زمان تأثیر پلاسما، میزان غلظت پراکسید هیدروژن به‌صورت صعودی افزایش یافت. همچنین با شروع تابش پلاسما بار میکروبی با روند نزولی همراه بود. بر اساس نتایج پارامترهای میکروبی و غلظت پراکسید هیدروژن، تولید و افزایش غلظت پراکسید هیدروژن رابطه مستقیمی با کاهش بار میکروبی دارد. بدین‌صورت با افزایش غلظت پراکسید هیدروژن، تعداد باکتری‌ها کاهش بیشتری می‌یابد.

تولید پراکسید هیدروژن در آب به‌طور مستقیم با تفکیک مولکول‌های آب توسط پلاسما صورت می‌گیرد و خاصیت میکروب‌کشی بسیار بالایی دارد (۱۴، ۱۵). براساس سایر پژوهش‌ها تغییرات غلظت پراکسید هیدروژن تولید شده طی نگهداری نمونه‌های تیمار شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴

ساعت مشهود نبوده است (۲۱، ۱۷). طول عمر پراکسید هیدروژن به دلیل پایداری مولکول آن نسبت به سایر گونه‌های فعال تولید شده در آب توسط پلاسما بالاتر است و بیشترین تأثیر را در کاهش بار میکروبی در نگهداری نمونه‌ها پس از تیمار پلاسما خواهد داشت (۱۴، ۲۸). بر اساس نتایج این پژوهش، کاهش بار میکروبی طی نگهداری را می‌توان به عوامل پایدار تولیدشده حین تابش پلاسما نسبت داد. در پژوهشی پیرامون بررسی میزان پایداری گونه‌های فعال اکسید ازت مشخص شده است که این عامل پس از تابش پلاسما از پایداری اندکی برخوردار است (۱۸)؛ بنابراین اغلب عوامل ایجاد شده توسط پلاسما که در ارتباط با رادیکال آزاد نیتروژن هستند (مانند اکسید ازت) به‌دلیل ناپایداری به‌سرعت از بین می‌روند و مقدار pH سریعاً به حالت اولیه خود بر می‌گردد. در نتیجه تنها عامل پایدار جهت فعالیت ضدمیکروبی پایدار در آب پراکسید هیدروژن می‌باشد.

به‌طورکلی پراکسید هیدروژن را می‌توان مهمترین عامل پایدار در نابودسازی میکروارگانیسم‌ها طی تیمار مایعات با پلاسمای سرد دانست. بسیاری از مولکول‌های فعال تولیدی حاصل از پلاسما نیمه عمر بسیار پایینی (در حد میکروثانیه) دارند. در بین مولکول‌های فعال تولید شده در اثر پلاسما، پراکسید هیدروژن به‌طور نسبی نیمه عمر طولانی‌تری دارد که از آن می‌توان در گندزدایی حجم‌های بیشتری از آب آلوده استفاده کرد (۵، ۱۶).

نتیجه‌گیری کلی

بررسی اثر پلاسمای سرد حاصل از تخلیه الکتریکی اسپارک روی سطح آب بر نابودسازی اشرشیاکلی تلقیح شده به آب نشان داد، پس از مدت زمان ۱۵ دقیقه تیمار پلاسما تمامی بار میکروبی تلقیح شده به نمونه‌های آب از بین رفتند. هم‌چنین با افزایش مدت زمان تیمار پلاسما، غلظت پراکسید هیدروژن تولید شده در آب به‌عنوان اصلی‌ترین عامل نابودسازی میکروارگانیسم‌ها در آب توسط پلاسمای سرد اتمسفری افزایش یافت. با توجه به اینکه تاکنون پژوهش‌های محدودی در زمینه پلاسمای سرد به‌عنوان روش نوین میکروب‌زدایی غیرحرارتی صورت گرفته، بهینه‌سازی پارامترهای مؤثر فرایندهای میکروب‌زدایی توسط پلاسمای تخلیه الکتریکی اسپارک در پژوهش‌های آینده الزامی است.

منابع

1. Baier, M., Ehlbeck, J., Knorr, D., Herppich, W.B., and Schlüter, O. 2015. Impact of plasma processed air (PPA) on quality parameters of fresh produce. Postharvest Biology and Technology. 100: 120-126.
2. Baier, M., Foerster, J., Schnabel, U., Knorr, D., Ehlbeck, J., Herppich, W.B., and Schlüter, O. 2013. Direct non-thermal plasma treatment for the sanitation of fresh corn salad leaves: Evaluation of physical and physiological effects and antimicrobial efficacy. Postharvest Biology and Technology. 84: 81-87.
3. Barbosa-Cánovas, G.V., and Rodriguez, J.J. 2002. Update on non-thermal food processing technologies: Pulsed electric field, high hydrostatic pressure, irradiation and ultrasound. Food Australia. 54: 513−520.
4. Basaran, P., Basaran-Akgul, N., and Oksuz, L. 2008. Elimination of *Aspergillus parasiticus* from nut surface with low pressure cold plasma (LPCP) treatment. Food Microbiology. 25: 4.626-632.
5. Becker, K.H, and Fang, J. 2012. Atmospheric-pressure cold plasma treatment of contaminated fresh fruit and vegetable slices: Inactivation and physiochemical properties evaluation. European Physical Journal D. 66: 276.

6. Ermolaeva, S.A., Varfolomeev, A.F., YuChernukha, M.Y., Yurov, D.S., Vasiliev, M.M., Kaminskaya, A.A., Moisenovich, M.M., Romanova, J.M., Murashev, A.N., Selezneva, I.I., Shimizu, T., Sysolyatina, E.V., Shaginyan, I.A., Petrov, O.F., Mayevsky, E.I., Fortov, V.E., Morfill, G.E., Naroditsky, B.S., and Gintsburg, A.L. 2011. Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and in the animal model of infected wounds. Journal of Medical Microbiology. 60: 75-83.
7. Fernández, A., Noriega, E., and Thompson, A. 2013. Inactivation of *Salmonella enteric* serovar *Typhimurium* on fresh produce by cold atmospheric gas plasma technology. Food Microbiology. 33: 24–29.
8. Fröhling, M., Baier, J., Ehlbeck, D., Knorr, D., and Schlüter, O. 2012. Atmospheric pressure plasma treatment of *Listeria innocua* and *Escherichia coli* at polysaccharide surfaces: Inactivation kinetics and flow cytometric characterization. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 13: 142-150.
9. Gurol, C., Ekinci, F.Y., Aslan, N., and Korachi, M. 2012. Low temperature plasma for decontamination of *E. coli* in milk. International Journal of Food Microbiology. 157: 1–5.
10. Hertwig, C., Reineke, K., Ehlbeck, J., Erdoğdu, B., Rauh, C., & Schlüter, O. 2015. Impact of remote plasma treatment on natural microbial load and quality parameters of selected herbs and spices. Journal of Food Engineering. 167: 12-17.
11. Jayasena, D. D., Kim, H. J., Yong, H. I., Park, S., Kim, K., Choe, W., and Jo, C. 2015. Flexible thin-layer dielectric barrier discharge plasma treatment of pork butt and beef loin: Effects on pathogen inactivation and meat-quality attributes. Food microbiology. 46: 51-57.
12. Kim, B., Yun, H., Jung, S., Jung, Y., Jung, H., Choe, W., and Jo., C. 2011. Effect of atmospheric pressure plasma on inactivation of pathogens inoculated onto bacon using two different gas compositions. Food Microbiology. 28: 9-13.
13. Kim, H. J., Yong, H. I., Park, S., Kim, K., Choe, W., and Jo, C. 2015. Microbial safety and quality attributes of milk following treatment with atmospheric pressure encapsulated dielectric barrier discharge plasma. Food Control. 47: 451-456.
14. Kim, J.E., Lee, D., and Min, .S.C. Microbial decontamination of red pepper powder by cold plasma. Food Microbiology. 38: 128-136.
15. Klampfl, G., Isbary, T., Shimizu, Y.F., Li, J.L., Zimmermann, W., Stolz, J., Schlegelc, G., Morfilla, E., and Schmidt, H.U. 2012. Cold atmospheric air plasma sterilization against spores and other microorganisms of clinical interest. Applied and Environmental. Microbiology. 78: 15.5077.
16. Korachi, M., Turan, K., Senturk, F., & Aslan, S.N. 2009. An investigation into the biocidal effect of high voltage AC/DC atmospheric corona discharges on bacteria, yeasts, fungi and algae. Journal of Electrostatics. 67: 678-685.
17. Korachi, M., and Aslan, N. 2011. The Effect of atmospheric pressure plasma corona discharge on pH, lipid content and DNA of bacterial cells. Plasma Science & Technology. 13: 1. 99-105.
18. Kostov, V., Rocha, C.Y., Koga-Ito, B.M., Matos, M.A., Algatti, R.Y., Honda, M., Kayama, E., and Mota, R.P. 2009. Bacterial sterilization by a dielectric barrier discharge (DBD) in air, Surface and Coatings Technology. 204: 2954-2959.
19. Lacombe, A., Niemira, B. A., Gurtler, J. B., Fan, X., Sites, J., Boyd, G., & Chen, H. 2015. Atmospheric cold plasma inactivation of aerobic microorganisms on blueberries and effects on quality attributes. Food microbiology. 46: 479-484.
20. Laroussi, M. 2002. Non-thermal decontamination of biological media by atmospheric pressure plasmas: Review, analysis, and prospects. IEEE Transactions on Plasma Science. 3:1409–1415.
21. Lee, H.J., Jung, H., Choe, W., Ham, J.SC., Lee, .J.H., and Jo, C. 2011. Inactivation of *Listeria monocytogenes* on agar and processed meat surfaces by atmospheric pressure plasma jets. Food Microbiology. 28: 1468-1471.
22. Mendis, D.A., Rosenberg, M., and Azam, F.A. 2000. Note on the possible electrostatic disruption of bacteria. IEEE Transactions on Plasma Science. 3: 1304–1306.

23. Misra, N.N., Tiwari, B.K., Raghavarao, K.S.M.S., and Cullen, P.J. 2011. Nonthermal plasma inactivation of food-borne pathogens. Food Engineering Reviews. 33: 3-4.159-170.
24. Montenegro, J., Ruan, R., Ma, H., & Chen, P. 2002. Inactivation of *E. coli* O157:H7 using a pulsed non thermal plasma system. Journal of Food Science. 67: 646–648.
25. Noriega, E., Shama, G., Laca, A., Díaz, M., and Kong, M.G. 2001. Cold atmospheric gas plasma disinfection of chicken meat and chicken skin contaminated with *Listeria innocua*. Food Microbiology. 28: 1293-1300.
26. Surowsky, B., Fröhling, A., Gottschalk, N., Schlüter, O., and Knorr, D. 2014. Impact of cold plasma on *Citrobacter freundii* in apple juice: Inactivation kinetics and mechanisms. International Journal of Food Microbiology.174: 63–71.
27. Wang, R.X., Nian, W.F., Wu, H.F., Feng, H.Q., Zhang, K., Zhang, J., Zhu, W.D., Yong, H.I., Kim, H.J., Park, S., Alahakoon, A.U., Kim, K., Choe, W., and Jo, C. 2015. Evaluation of pathogen inactivation on sliced cheese induced by encapsulated atmospheric pressure dielectric barrier discharge plasma. Food Microbiology. 46: 46-50.
28. Zhang, R.B., Wang, L., Wu, Y., Guan.Z, Jia, Z. 2006. IEEE Transactions on Plasma Science. 34: 1370.
29. Ziuzina, D., Patil, S., Cullen, P.J., Keener, K.M., and Bourke, P. 2014. Atmospheric cold plasma inactivation of *Escherichia coli*, *Salmonella enteric* serovar *Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* inoculated on fresh produce .Food Microbiology. 42: 109-116.

EJFPP, Vol. 9 (1): 13-22
http://ejfpp.gau.ac.ir

Effect of Concentration of Hydrogen Peroxide Produced by Cold Atmospheric Plasma on Inactivation of *Escherichia coli* inoculated to Water

H. Nikmaram[1], M.R. Koushki[2*] and M. Ghoranneviss[3]
[1]Ph.D student, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
[2]Assistant Prof., Department of Food Technology Research, National Nutrition & Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences & Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[3]Assistant Prof., Plasma physic Research Center, Science & Research Unit, Tehran, Iran
Received: 2016/01/27; Accepted: 2017/06/03

Abstract

Background and objectives: Inactivation of microorganisms by plasma is a new technique in food science and biomedical fields. This technique could be used to inactivate microorganisms in water. Reactive species such as UV, H_2O_2, O_3, O, and OH produced during plasma discharge, are known to be the main factors in the inactivation microorganisms.

Materials and methods: In this study, an electrical spark discharge system was used to evaluate the ability of cold plasma to inactivate microorganisms. *Escherichia coli* was inoculated into water samples and its inactivation within different times was monitored in plate count agar after plasma treatment. Beside microbiological tests, the concentration of hydrogen peroxide was analyzed.

Results: the results of this study showed that plasma can significantly inactivate high concentrations of bacteria in water; as 8 Log CFU/ml reduction in bacteria population was observed after plasma treatment of water samples for 15 min. The results showed that the concentration of hydrogen peroxide increased up to 100 mg/l after plasma treatment.

Conclusion: In this study, all the bacteria inoculated to water was inactivated by electrical spark discharge cold plasma on water surface. According to our observations, an increase in the concentration of hydrogen peroxide as the function of treatment time could be the main factor for microorganism inactivation in water by cold plasma treatment.

Keywords: Cold Plasma, Inactivation, Water, *E. coli*, Peroxide hydrogen

* Corresponding author: mr_koushki@yahoo.com