

Inactivation of *Salmonella typhimurium* by cold plasma activated water application

Inactivación de *Salmonella typhimurium* por la aplicación de agua activada por plasma frío

M. Clemente-Carazo^{1*}, S. Borroug², P. Bourke²

¹Departamento de Ingeniería Agronómica, ETSIA, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena. Spain.

²Plasma Research Group, College of Science and Health, Dublin Institute of Technology, Dublin. Ireland.

*marta.clemente@edu.upct.es

Abstract

Cold plasma is defined as the fourth state of matter and is generated by a series of discharges called Spark and Glow, which originate chemical substances that can interact with microorganisms resulting in the inactivation of these. *S. typhimurium* has been the pathogen of choice for this work, since it is the second serovar of *Salmonella* spp. with more cases of Salmonellosis in 2018. The results provided in this study, showed a clear effect on the inactivation of *S. typhimurium* due to the reactive species generated during PAW treatments.

Keywords: Glow discharge; spark discharge; PAW; reactive species.

Resumen

El plasma frío es definido como el cuarto estado de la materia y es generado por una serie de descargas denominadas Spark y Glow, las cuales originan unas sustancias químicas que pueden interaccionar con microorganismos dando lugar a la inactivación de estos. *S. typhimurium* ha sido el patógeno elegido para este trabajo, ya que es el segundo serovar de *Salmonella* spp., con más casos de Salmonelosis en el año 2018. Los resultados aportados en este estudio mostraron un claro efecto sobre la inactivación de *S. typhimurium* debido a las especies reactivas generada durante los tratamientos PAW.

Palabras clave: Descarga brillo; Descarga chispa; PAW; especies reactivas.

1. INTRODUCCIÓN

El plasma es descrito como el cuarto estado de la materia, se trata de un gas ionizado que consiste en moléculas neutras, electrones e iones positivos y negativos (1). Para la generación del plasma se requiere de la administración de un fuerte campo eléctrico que da lugar a la ionización (2). En la actualidad existen dos tipos de descarga para generar plasma: Spark-cuyo “High Voltage” se encuentra debajo de la muestra que va a ser tratada- y Glow-en este caso “High Voltage”, se encuentra directamente en contacto con la muestra que va a ser tratada- (Imagen 1).

Por otro lado, cuando un producto esta siendo tratado con plasma, este esta generando una serie de especie químicas; H₂O₂ y NO₃⁻ con Spark y NO₃⁻ y NO₂⁻ con Glow (3). Estas especies químicas también llamadas “especies reactivas”, tienen capacidad antimicrobiana, por lo que el contacto de estas con algún microorganismo patógeno puede llegar a ser capaces de inactivarlo o reducir su concentración.

En este estudio hemos trabajado con *Salmonella typhimurium*, ya que fue el segundo serovar con más casos de Salmonelosis en el año 2018 con 10.395 en los 28 estados miembros de la UE (4).

El objetivo principal de este proyecto fue conseguir la mayor inactivación de *S. typhimurium* con las distintas aplicaciones de plasma frío.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Microorganismo

Este estudio se ha llevado a cabo, con *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* ATCC 14028, que fue proporcionada por American Type Culture Collection.

2.2 Preparación de las suspensiones

Del cultivo fresco de *S. typhimurium* en TSA (Tryptic Soy Agar), se suspendió una colonia en un tubo con 5 mL de TSB (Tryptic Soy Broth) y se dejó incubar a 37 °C durante 24 h.

Se introdujo 1 mL del cultivo en un tubo Eppendorf que fue centrifugado a 10.000 rpm durante 5 min. El pellet fue resuspendido en PBS (Phosphate Buffered Saline) y de nuevo se centrifugó con las mismas condiciones que anteriormente fueron programadas, este paso se repitió dos veces más.

Finalmente, 30 µL del cultivo fueron diluidos en 970 µL. Esta fue la solución con la que se trabajó en cada experimento con una concentración aproximada de 10⁶ UFC/mL.

2.3 Tratamientos “Plasma Activate Water” (PAW)

Se generó plasma en 10 mL agua destilada, a dos tiempos de tratamiento, 20 y 25 min tanto con Spark, Glow y la combinación de Spark+Glow, en esta última los tiempos fueron divididos para cada una de las descargas. PAW fue recuperada después de los tratamientos en tubos Falcon y estos se pusieron durante 30 min a 37 °C para estabilizar su temperatura.

Una alícuota de 720 µL de PAW (de cada tratamiento) fueron resuspendidos en 80 µL de la suspensión celular preparada anteriormente y se estipularon tiempos de contacto: 0; 2,5; 5; 6; 7,5; 8; 9; 10; 12,5 y 15 min. Posteriormente, 100 µL eran extraídos para cada tiempo y se introdujeron en una placa tipo, Honeywell de 96 pocillos, que contenían (cada pocillo) 30 µL de PBS a pH de 4,5. Finalmente, 20 µL de esta suspensión se mezcló con 180 µL de MRD (Maximun Recovery Diluent) para hacer diluciones seriadas, en este caso las muestras fueron sembradas en TSA de la 0 a la -3, dividiendo la placa en 4 partes y en cada una de ellas se sembraron 3 gotas de 10 µL por cada dilución. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 48 h. Este proceso fue repetido al día 1 de tratamiento para el análisis de PAW.

2.3 Determinación de las especies reactivas.

El análisis de las concentraciones de especies reactivas de plasma en agua se llevó a cabo de acuerdo con Lu et al. (3).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados en Spark 20 min, mostraron un leve efecto antimicrobiano mayor en el día 1 de análisis, pero sin diferencias significativas respecto al día 0. Aún así el límite de detección fue alcanzado antes en el día 1 a los 8 min de tiempo de contacto de PAW y *S. typhimurium* (Fig. 1A). Tal y como muestra la Fig. 1B, en Spark 25 min la inactivación en los primeros min de contacto es diferente a Spark 20 min, ya que en este tratamiento a 25 min la inactivación es ligeramente mayor

en el día 0. Este descenso de la concentración tendió a igualarse para día 0 y 1 en los tiempos de contacto 6, 7 y 7,5. El aumento del tiempo de tratamiento y por tanto la agresividad de este, fue más rápido en alcanzar el límite de detección de 8 min en ambos días. En el caso de Glow 20 min se obtuvo una mayor supervivencia de *S. typhimurium* en el día 1 de análisis, no llegando a obtener una aparente inactivación total de la población a los 5 min para el día 0, como se puede observar en la Fig. 1C. En la generación de plasma con la combinación de Spark y Glow, se consiguió una tendencia de inactivación del patógeno muy parecida, llegando al límite de detección en ambos casos a los 6 min en el día 0 de análisis (Fig. 1D).

Respecto al H₂O₂ (Fig. 2A), como era de esperar solo apareció en Spark, obteniendo un valor mayor en día 0 y en Spark 25 min. La Fig. 2B, representa el NO₃⁻. este también obtuvo un valor superior en el día 0 sin presentar diferencias significativas entre ambos tratamientos de 20 y 25 min, en cambio este se ve muy reducido en el día 1 tanto en Spark y Glow a 25 min. Con relación al NO₂⁻ (Fig. 2C), presenta valores más llevados al contrario que los otros en el día 1 y en Glow 20 min, sigue la misma tendencia en los tratamientos a 25 min de Glow y en la combinación de Spark y Glow.

CAP (Cold Atmospheric Plasma) dispone de distintos mecanismos de acción que causan daño en los microorganismos. En el caso de las especies reactivas respecto de los resultados obtenidos para Spark 20 min, no estarían muy claras las causas de la inactivación, ya que se generó más H₂O₂ y NO₃⁻ en el día 0 y la inactivación fue mayor en el día 1. Una de las explicaciones al respecto puede deberse a la agresividad del tratamiento, ya que a 20 min quizás no fue suficiente para debilitar la célula y poder esta protegerse ante la entrada de estas dos especies reactivas dando lugar a causar algún daño intracelular. Lo contrario pasaría con Spark 25 min (ya que presenta una mayor inactivación en el día 0) en este caso el tratamiento que se aplicó fue mayor, dejando a la célula microbiana más debil y, por tanto, causando algún tipo de daño a nivel de membrana y dando lugar a la formación de poros desprotegiendo a la célula de la entrada de cualquier agente externo, como puedo ser el H₂O₂ y NO₃⁻. Este mismo efecto fue observado también en Glow y la combinación de Spark y Glow 20 min con NO₃⁻. En cambio, en la combinación Spark y Glow 20 min su inactivación también podría verse relacionada con NO₂⁻ ya que no se aprecian diferencias significativas en los días 0 y 1.

4. CONCLUSIONES

Estos resultados microbiológicos y de determinación de las especies reactivas, muestran que, de alguna manera estas, son capaces de reducir o llegar a inactivar *S. typhimurium*, viendo su efecto más marcado en los tratamientos que han resultado más agresivos para este patógeno.

5. AGRADECIMIENTOS

Gracias al MINECO, AEI y FEDER, por la financiación del proyecto "Validación de nuevas herramientas y procesos para el análisis y la mejora de la seguridad alimentaria microbiológica", con cargo a la partida presupuestaria: 30.05.18.80.79 541A 642.10.

6. REFERENCIAS

1. Niemira BA. Cold Plasma Decontamination of Foods. Annu Rev Food Sci Technol. 2012;3(1):125-42.
2. Banu MS, Sasikala P, Dhanapal A, Kavitha V, Yazhini G, Rajamani L. Cold plasma as a novel food processing technology. Int J Emerg Trends Eng Dev. 2012;4(2):803-818.
3. Lu P, Boehm D, Bourke P, Cullen PJ. Achieving reactive species specificity within plasma-activated water through selective generation using air spark and glow discharges. Plasma Process Polym. 2017;14(8):1600207.

4. EFSA 2019. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. EFSA J. 2019;17(12): e05926.

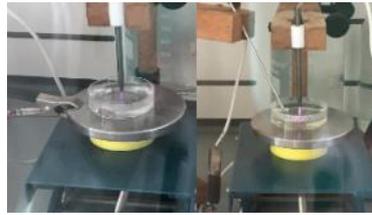


Imagen 1. Modos de descarga, izq. Spark, der. Glow

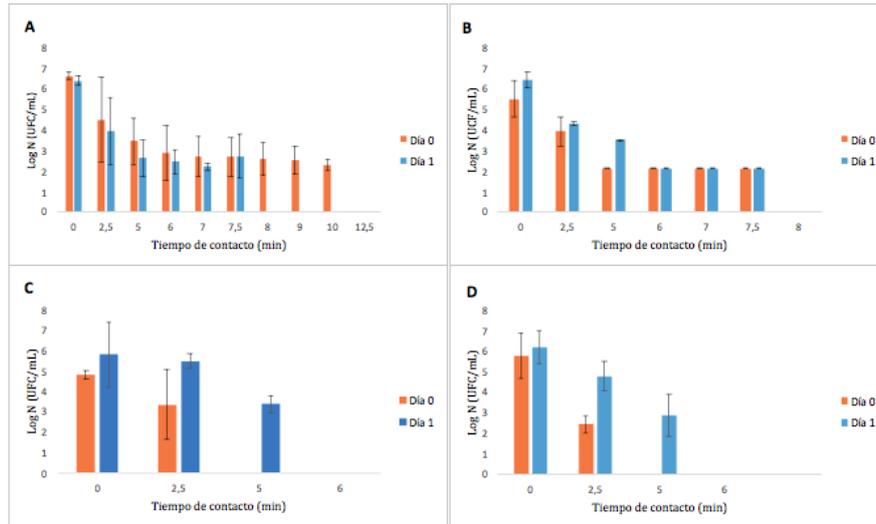


Figura 1. Resistencia de *S. typhimurium* en los tratamientos de PAW, (A) Spark 20 min, (B) Spark 25 min, (C) Glow 20 min, (D) Spark y Glow 20 min

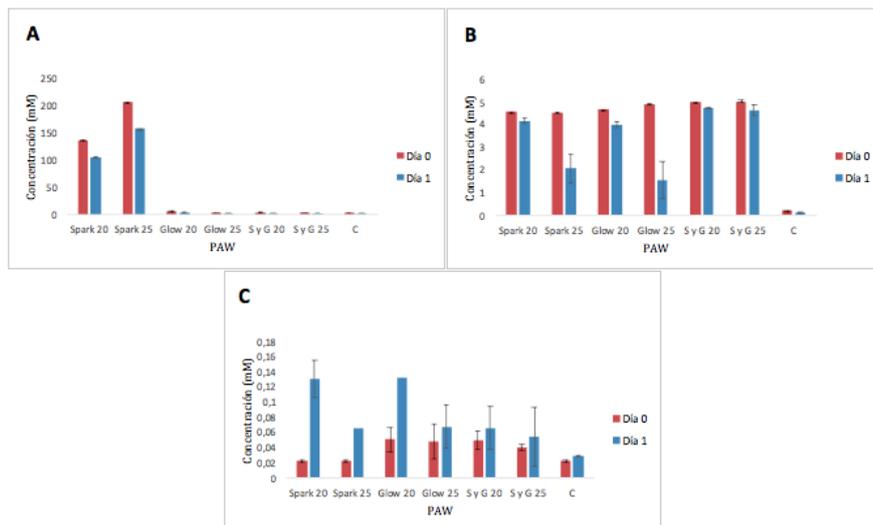


Figura 2. Concentraciones de las especies reactivas de PAW, (A) H_2O_2 , (B) NO_3^- , (C) NO_2^-