ANTIMICROBIAL EFFICACY OF COLD ATMOSPHERIC PRESSURE PLASMA JET AGAINST CLINICAL BACTERIAL ISOLATES

SARTHAK DAS

SCHOOL OF INTERDISCIPLINARY RESEARCH

INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI

FEBRUARY 2025

ANTIMICROBIAL EFFICACY OF COLD ATMOSPHERIC PRESSURE PLASMA JET AGAINST CLINICAL BACTERIAL ISOLATES

by

Sarthak Das

School of Interdisciplinary Research

Submitted

in fulfilment of the requirements of the degree of

DOCTOR OF PHILOSOPHY

to the

INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI

FEBRUARY 2025

Dedicated to

Budha Bapa

Undertaking

I hereby declare that the work presented here in the thesis has been carried out by me towards the partial fulfilment of the requirement for the award of the degree of **Doctor of Philosophy** at the Indian Institute of Technology Delhi. The content of this report, in full or in parts, have not been submitted to any other institute or university for the award of any degree.

Sarthak Das

Sarthak Das

Certificate

This is to certify that the thesis entitled**, "Antimicrobial efficacy of cold atmospheric pressure plasma jet against clinical bacterial isolates"**, submitted by **Mr. Sarthak Das**, to the Indian Institute of Technology Delhi for the award of the degree of **Doctor of Philosophy**, is a bonafide record of the research work done by him under our supervision.

In our opinion, the thesis has reached the standard of fulfilling the requirement of all the regulations regarding the degree. The results contained in this thesis have not been submitted, in part or in full, to any other university or institute to award any degree or diploma.

Satyananda Kar

Prof. Satyananda Kar
Department of Energy Science and Engineering
IIT Delhi, New Delhi, India

Prof. Sarita Mohapatra
Department of Microbiology
AIIMS New Delhi,
New Delhi, India

Acknowledgements

I am indebted to the Almighty for providing me with the necessary fortitude to finish my thesis. I truly appreciate everyone who helped me make my dream a reality.

Firstly, I express my deep admiration to my research supervisors, **Prof. Satyananda Kar** and **Prof. Sarita Mohapatra,** for providing me the opportunity to perform research under their guidance. Their humbleness, dynamism, vision, motivation, and patience have facilitated the completion of my thesis. Their unwavering faith in me is something I will be forever grateful for. It is an honour to be guided by them.

I would like to express my heartfelt thanks to **Mr. Satyendra Bhatt**, who has been paramount throughout my Ph.D. journey. By consistently being available for experiments, engaging in off-topic discussions, and supporting me during challenging circumstances, I was able to surmount high tides. The impact he had on my Ph.D. research is difficult to put into words.

My sincerest appreciation to **Dr. G. Veda Prakash** for his help during the early stages of my Ph.D. journey. He was a standalone support for the setting of experiments and research methodologies. He was consistently available to address my queries, and his wealth of research experience enabled me to overcome difficulties.

I am deeply grateful to **Mr. Narendra Nath Mohanta**, whose encouragement and passion inspired me to pursue Ph.D. His dynamic, visionary, and tireless personality motivates me greatly. The on- and off-topic conversations with him taught me how to make important decisions. He has been an inspirational figure in my life.

I am grateful to my research committee members: **Prof. Hitendra Kumar Malik**, **Prof. Ramesh Narayanan**, and **Prof. Shilpi Sharma**, for their continuous support and encouragement. A special thanks to **Prof. Bijay P. Tripathi** and **Prof. Shaikh Ziauddin Ahammad** for providing different facilities for my experiments. I would like to thank the **Central Research Facility, IIT Delhi**, for giving access to the numerous equipment required for thesis work. I am very thankful to the **University Grant Commission, Government of India**, for providing me Ph.D. fellowship.

I would like to extend my sincere thanks to **Mr. Aishik Basu Mallick**, **Ms. Radhika T P**, **Mr. Tejashwi Rana,** and **Mr. Suryasunil Rath**, for help during different experiments and fruitful discussions related to various subjects. Special thanks to seniors: **Dr. Mahreen** and **Dr.**

Shweta Sharma for their guidance and sharing their experiences in subject areas. A special acknowledgement goes out to **Ms. Bipasa De** and **Dr. Biswajit Mishra** for helping with one of the major parts of the thesis work. I am thankful to **Ms. Swati Pundir** and **Mr. Deepak Kocher** for addressing my queries in their field of expertise.

Special thanks to my fellow lab mates and friends: **Mr. Bibekananda Naik**, **Ms. Pragya Joshi**, **Ms. Anuravi Sharma**, **Mr. Gaurav**, **Ms. Neethu Balachandran**, **Mr. Pratyay Chattopadhyay**, **Mr. Shridhar Kanta Mohanty**, **Mr. Risabh Verma**, and **Mr. Priyanshu** of Plasma Physics Lab for being part of my Ph.D. journey. A special thanks to **Ms. Anjali Rawat**, **Mr. Sanjay Kumar**, and all other members of the Bacteriology lab, AIIMS New Delhi. I thank **Ms. Surabhi Mishra**, **Dr. Deepchandra Joshi**, **Mr. Partha Mondal**, and all other members of Waste Treatment Lab, IITD. A special thanks to my friends: **Mr. Binayak Mohanty**, **Mr. Kaibalya Prasad Rath**, **Mr. Sumit Sahoo**, **Mr. Dhananjay Sahoo**, **Mr. Suvam Choudhury**, **Mr. Ranjan Kumar Mohanty**, and many more for their constant support and encouragement during my Ph.D. work.

Last but not least, I am grateful to my family for their love, prayers, care, and sacrifices in educating and preparing me for the future. Words cannot express my profound thanks to my father, **Mr. Gyana Ranjan Das**, my mother, **Mrs. Rajashree Das**, my sister **Mrs. Jasmine Das**, and my brother-in-law **Mr. Soumya Ranjan Mohanty**. Lots of love to my niece: **Cookie**.

Sarthak Das

Abstract

The alarming rise of antimicrobial resistance (AMR) necessitates the development of novel antimicrobial strategies. In this aspect, cold atmospheric pressure plasma jet (CAPJ) has sparked research interest for its novel antimicrobial properties and has found its applicability in sterilization, disinfection, and decontamination. The CAPJ discharges are composed of reactive species such as reactive oxygen and nitrogen species (RONS), electrons, ions, and excited atoms and molecules, which incorporate an antimicrobial nature. Although CAPJ has proven highly efficient in bacterial load reduction, certain unresolved problems must be addressed systematically to establish CAPJ as a prominent antimicrobial technique. Firstly, CAPJ's efficacy against clinically isolated multidrug-resistant (MDR) bacteria has not been adequately studied. Secondly, to achieve optimal productivity, it is imperative to systematically characterize the developed CAPJ device based on operational parameters concerning antimicrobial activity against MDR isolates. Thirdly, it is important to assess the time-dependent bacterial inactivation process that CAPJ reactive species follow. Fourthly, there has been limited studies on CAPJ's efficacy in eliminating bacterial load from inanimate surfaces, along with any alteration in surface property. Lastly, there is a dearth of research comparing the antimicrobial activity of various CAPJ activated liquids (CAPJALs) and comprehending the specific parameters required for enhanced efficacy. The goals of the current study were to address the aforementioned problems.

In the thesis, CAPJ powered by a low-frequency AC source was designed and developed for antimicrobial applications. A thorough investigation of the CAPJ's operational parameters (intrinsic and extrinsic) and their influence on discharge characteristics, reactive species composition, and antimicrobial activity was carried out. Various reactive species such as excited atoms (Ar I, He I, O I, etc.), ions (Ar^+, N_2^+, N^+, etc.), radical RONS (OH•), and non-radical RONS (OH^+, NO^+, $N_2O_3^-$, NO_3^-, etc.) were observed to vary in the discharge depending on the intrinsic settings (voltage, frequency, gas flow rate, and operating gas). This variance in reactive species in relation to intrinsic settings was associated with varying bacterial inactivation area. Extrinsic parameters such as exposure distance, exposure time, bacterial concentration, and type of target bacteria also influenced the antimicrobial activity of CAPJ.

The study also examined the induced probable bacterial inactivation path by Ar CAPJ. A greater than 6 $\log_{10}$ reduction of *E. coli* and *S. aureus* within 60 and 120 s CAPJ exposure was noticed, respectively, along with low *D*- values. The correlation between the inactivation curve

and the time-dependent damage to bacterial cells revealed varying inactivation processes among isolates. The alteration of Fourier transform infrared spectra (FTIR) and Raman micro-spectra signals of post-CAPJ exposed bacteria demonstrated the degree of destruction at the molecular level, such as lipid peroxidation, protein oxidation, bond breakages, etc. Further, the transmission electron microscopy (TEM) images of exposed bacteria indicated incurred damages on cell morphology by CAPJ reactive species.

A greater than 5 $\log_{10}$ reduction of *E. coli* and ~ 3.4 – 4.6 $\log_{10}$ reduction of *S. aureus* along with *D*- value in the range 27 – 63 s was observed over the material test surfaces on Ar CAPJ exposure. In addition, the study examined the effect of repeated CAPJ exposure on surface property by replicating hospital surface decontamination. A non-linear variation in the surface properties, such as wettability, roughness, and elemental composition was noticed. Specifically, the CAPJ reactive species would play a significant role in bacterial load reduction and any surface property alteration occurring.

The Ar CAPJ was used to activate liquids such as deionized water (DI-W), drinking water (DW), tap water (TW), and normal saline (NS), and its antimicrobial property was evaluated against *E. coli* and *S. aureus*. The computed *D*- value followed the trend – DI-W ≈ NS > DW > TW. An optimal setting for liquid activation by CAPJ and CAPJAL – bacterial interaction time was noticed to achieve higher bactericidal efficacy. Further, the pace at which the physicochemical parameters (electrical conductivity (EC), total dissolved solids (TDS), pH, and reactive species concentration (H_2O_2, NO_3^-, and NO_2^-)) changed within the liquid differed. The interaction of CAPJ reactive species with the liquid would lead to the generation of liquid phase reactive species (NO_3^-, NO_2^-, H^+, H_2O_2, etc.), contributing to physicochemical properties variation and incorporation of antimicrobial nature.

An in-depth grasp of controlling CAPJ parameters involving antimicrobial activity and the emergence of unique pathways for bacterial inactivation could be advanced by this research. The study on CAPJ's efficiency in decontaminating inanimate surfaces and CAPJALs insights CAPJ to be used as a point-of-care antimicrobial technique. The findings of this thesis would be a great asset to multidisciplinary researchers.

सार

रोगाणुरोधी प्रतिरोध (AMR) की चिंताजनक वृद्धि के कारण नवीन रोगाणुरोधी रणनीतियों के विकास की आवश्यकता है। इस पहलू में, ठंडे वायुमंडलीय दबाव प्लाज्मा जेट (CAPJ) ने अपने उपन्यास रोगाणुरोधी गुणों के लिए अनुसंधान रुचि जगाई है और जीवाणु-नाशन, कीटाणुशोधन और शुद्धीकरण में इसकी प्रयोज्यता पाई है। CAPJ डिस्चार्ज प्रतिक्रियाशील प्रजातियों जैसे प्रतिक्रियाशील ऑक्सीजन और नाइट्रोजन प्रजातियों (RONS), इलेक्ट्रॉनों, आयनों और उत्तेजित परमाणुओं और अणुओं से बने होते हैं, जिनमें रोगाणुरोधी प्रकृति शामिल होती है। हालाँकि CAPJ बैक्टीरिया के भार को कम करने में अत्यधिक कुशल साबित हुआ है, CAPJ को एक प्रमुख रोगाणुरोधी प्रविधि के रूप में स्थापित करने के लिए कुछ अनसुलझे समस्याओं को व्यवस्थित रूप से संबोधित किया जाना चाहिए। सबसे पहले, चिकित्सकीय रूप से पृथक मल्टीड्रग-प्रतिरोधी (MDR) बैक्टीरिया के खिलाफ CAPJ की प्रभावकारिता का पर्याप्त अध्ययन नहीं किया गया है। दूसरे, इष्टतम उत्पादकता प्राप्त करने के लिए, MDR आइसोलेट्स के खिलाफ रोगाणुरोधी गतिविधि से संबंधित परिचालन मापदंडों के आधार पर विकसित CAPJ डिवाइस को व्यवस्थित रूप से चिह्नित करना अनिवार्य है। तीसरा, समय-निर्भर जीवाणु निष्क्रियता प्रक्रिया का आकलन करना महत्वपूर्ण है जिसका CAPJ प्रतिक्रियाशील प्रजातियां पालन करती हैं। चौथा, सतह की संपत्ति में किसी भी बदलाव के साथ-साथ निर्जीव सतहों से बैक्टीरिया भार को खत्म करने में CAPJ की प्रभावकारिता पर सीमित अध्ययन हुए हैं। अंत में, विभिन्न CAPJ सक्रिय तरल पदार्थों (CAPJAL) की रोगाणुरोधी गतिविधि की तुलना करने और बढ़ी हुई प्रभावकारिता के लिए आवश्यक विशिष्ट मापदंडों को समझने वाले शोध की कमी है। वर्तमान अध्ययन का लक्ष्य उपरोक्त समस्याओं का समाधान करना था।

थीसिस में, कम आवृत्ति वाले एसी स्रोत द्वारा संचालित CAPJ को रोगाणुरोधी अनुप्रयोगों के लिए डिजाइन और विकसित किया गया था। CAPJ के परिचालन मापदंडों (आंतरिक और बाहरी) और डिस्चार्ज विशेषताओं, प्रतिक्रियाशील प्रजातियों की संरचना और रोगाणुरोधी गतिविधि पर उनके प्रभाव की गहन जांच की गई। विभिन्न प्रतिक्रियाशील प्रजातियाँ जैसे उत्तेजित परमाणु (Ar I, He I, O I, आदि), आयन (Ar^+, N_2^+, N^+, आदि), रेडिकल RONS (OH•), और नॉनरेडिकल RONS (OH^+, NO^+, $N_2O_3^-$, NO_3^-, आदि) को आंतरिक सेटिंग्स (वोल्टेज, आवृत्ति, गैस प्रवाह दर और परिचालन गैस) के आधार पर डिस्चार्ज में भिन्न देखा गया। आंतरिक सेटिंग्स के संबंध में प्रतिक्रियाशील प्रजातियों में यह भिन्नता विभिन्न जीवाणु निष्क्रियता क्षेत्रों से जुड़ी थी। बाहरी पैरामीटर जैसे एक्सपोज़र दूरी, एक्सपोज़र समय, बैक्टीरिया एकाग्रता और लक्ष्य बैक्टीरिया के प्रकार ने भी CAPJ की रोगाणुरोधी गतिविधि को प्रभावित किया।

अध्ययन में Ar CAPJ द्वारा प्रेरित संभावित जीवाणु निष्क्रियता पथ की भी जांच की गई। क्रमशः 60 और 120 सेकेंड CAPJ एक्सपोज़र के भीतर *E. coli* और *S. aureus* में 6 log_{10} से अधिक की कमी देखी गई, साथ ही कम *D- value* भी। निष्क्रियता वक्र और जीवाणु कोशिकाओं को समय-निर्भर क्षति के बीच सहसंबंध से आइसोलेट्स के बीच अलग-अलग निष्क्रियता प्रक्रियाओं का पता चला। पोस्ट- CAPJ एक्सपोज़र बैक्टीरिया के फूरियर-ट्रांसफॉर्म इंफ्रारेड स्पेक्ट्रा (FTIR) और रमन माइक्रो-स्पेक्ट्रा संकेतों के परिवर्तन ने आणविक स्तर पर विनाश की परिमाण का प्रदर्शन किया, जैसे कि लिपिड पेरोक्सीडेशन, प्रोटीन ऑक्सीकरण, बंधन टूटना, आदि। इसके अलावा, संचरण उजागर बैक्टीरिया की इलेक्ट्रॉन माइक्रोस्कोपी (TEM) छवियां CAPJ प्रतिक्रियाशील प्रजातियों द्वारा कोशिका आकृति विज्ञान पर हुए नुकसान का संकेत देती हैं।

Ar CAPJ एक्सपोज़र पर सामग्री परीक्षण सतहों पर 27 - 63 s की सीमा में *D- value* के साथ-साथ *E. coli* की 5 log_{10} से अधिक कमी और *S. aureus* की ~ 3.4 - 4.6 log_{10} कमी देखी गई। इसके अलावा, अध्ययन ने अस्पताल की सतह के परिशोधन की नकल करके सतह की संपत्ति पर बार-बार CAPJ एक्सपोज़र के प्रभाव की जांच की। सतह के गुणों जैसे गीलापन, खुरदरापन और मौलिक संरचना में एक गैर-रैखिक भिन्नता देखी गई। विशेष रूप से, CAPJ प्रतिक्रियाशील प्रजातियां जीवाणु भार में कमी और किसी भी सतह संपत्ति परिवर्तन में महत्वपूर्ण भूमिका निभाएंगी।

Ar CAPJ का उपयोग विआयनीकृत पानी (DI-W), पीने के पानी (DW), नल का पानी (TW), और सामान्य खारा (NS) जैसे तरल पदार्थों को सक्रिय करने के लिए किया गया था, और इसकी रोगाणुरोधी संपत्ति का मूल्यांकन *E. coli* और *S. aureus* के खिलाफ किया गया था। परिकलित *D– value* प्रवृत्ति का अनुसरण करता है - DI-W ≈ NS > DW > TW। CAPJ और CAPJAL द्वारा तरल सक्रियण के लिए एक इष्टतम सेटिंग - उच्च जीवाणुनाशक प्रभावकारिता प्राप्त करने के लिए जीवाणु संपर्क समय देखा गया। इसके अलावा, जिस गति से तरल के भीतर भौतिक रसायन पैरामीटर (विद्युत चालकता (EC), कुल घुलनशील ठोस (TDS), pH, और प्रतिक्रियाशील प्रजातियों की एकाग्रता (H_2O_2, NO_3^-, और NO_2^-) में बदलाव आया, वह अलग-अलग था। तरल के साथ CAPJ प्रतिक्रियाशील प्रजातियों की परस्पर क्रिया से तरल चरण प्रतिक्रियाशील प्रजातियों (NO_3^-, NO_2^-, H^+, H_2O_2, आदि) की उत्पत्ति होगी, जो भौतिक रासायनिक गुणों में भिन्नता और रोगाणुरोधी प्रकृति के समावेश में योगदान करेगी।

इस शोध से रोगाणुरोधी गतिविधि से जुड़े CAPJ मापदंडों को नियंत्रित करने और जीवाणु निष्क्रियता के लिए अद्वितीय मार्गों के उद्भव की गहराई से समझ विकसित की जा सकती है। निर्जीव सतहों और CAPJALs को कीटाणुरहित करने में CAPJ की दक्षता पर अध्ययन से पता चलता है कि CAPJ को एक

बिंदु-देखभाल रोगाणुरोधी तकनीक के रूप में उपयोग किया जा सकता है। इस थीसिस के निष्कर्ष बहु-विषयक शोधकर्ताओं के लिए एक बड़ी संपत्ति होंगे।

Table of Content

List of Figures

List of tables

List of abbreviations

AMR: Antimicrobial resistance

WHO: World Health Organization

MDR: Multidrug-resistant

CAP: Cold atmospheric pressure plasma

RONS: Reactive oxygen and nitrogen species

DBD: Dielectric barrier discharge

CAPJ: Cold atmospheric pressure plasma jet

SMD: Surface microdischarge

RF: Radiofrequency

MW: Microwave

DC: Direct current

AC: Alternating current

CFU: Colony forming units

lpm: liters per minute

***D*- value:** Decimal reduction time

DNA: Deoxyribonucleic acid

CAPAL: Cold atmospheric pressure plasma activated liquid

DI-W: De-ionized water

OES: Optical emission spectroscopy

FTIR: Fourier transform infrared spectroscopy

TEM: Transmission electron microscopy

CAPJAL: Cold atmospheric pressure plasma jet activated liquid

AST: Antimicrobial susceptibility testing

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

MF: McFarland standards

MHA: Mueller-Hinton agar

IR: Infrared

GNB: Gram-negative bacillus

GPC: Gram-positive cocci

rpm: revolutions per minute

ANOVA: Analysis of variance

AFM: Atomic force microscopy

RMS: Root mean square

SEM: Scanning electron microscopy

EDX: Energy dispersive X-ray

MBMS: Molecular Beam Mass Spectrometer

PG: Peptidoglycan

SS: Stainless steel

Al: Aluminium

TW: Tap water

NS: Normal saline

TDS: Total dissolved solids

ISA: Ionic strength adjuster

List of Notations

T_e: Electron temperature

T_i: Ion temperature

T_g: Gas temperature

P_d: Average plasma discharge power

V: Voltage

Q: Charge

Y_i: Count intensity of specific ion

f: Frequency

t: CAPJ exposure time

d: CAPJ exposure distance

C: Bacterial concentration

T_t: Target temperature

T_p: Plume temperature

at. %: Atomic percentage

P_{app}: Average applied power

List of bacteria

E. faecium: *Enterococcus faecium*

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

K. pneumoniae: *Klebsiella pneumoniae*

A. baumannii: *Acinetobacter baumannii*

P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*

E. coli: *Escherichia coli*

B. stearothermophilus: *Bacillus stearothermophilus*

B. subtilis: *Bacillus subtilis*

M. luteus: *Micrococcus luteus*

S. typhimurium: *Salmonella typhimurium*

L. monocytogenes: *Listeria monocytogenes*

E. cloacae: *Enterobacter cloacae*

E. faecalis: *Enterococcus faecalis*

S. epidermidis: *Staphylococcus epidermidis*

B. atrophaeus: *Bacillus atrophaeus*

B. pumilus: *Bacillus pumilus*

S. heidelberg: *Salmonella heidelberg*

B. cereus: *Bacillus cereus*

L. innocua: *Listeria innocua*

A. hydrophila: *Aeromonas hydrophila*

S. putrefaciens: *Shewanella putrefaciens*

P. fluorescens: *Pseudomonas fluorescens*

V. cholerae: *Vibrio cholerae*