

滑动弧放电对金黄色葡萄球菌的杀菌工艺

靳程茗¹, 王晨航¹, 裴雪芸¹, 刘 铎², 孙运金¹

(1. 北京农学院食品科学与工程学院, 北京 102206; 2. 中国农业机械化科学研究院, 北京 100083)

摘要: 基于大气滑动弧放电技术搭建了一种大气等离子体放电装置, 研究了放电气体种类和放电功率对金黄色葡萄球菌杀菌效果的影响, 结果表明, 在放电功率较低且放电气体为氧气时, 该技术的杀菌效果最好。

关键词: 大气等离子体; 滑动弧放电; 杀菌工艺; 表面形貌分析; 金黄色葡萄球菌

中图分类号: TS205.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 2095-1795(2019)10-0076-05

Sterilization Process of Staphylococcus Aureus by Gliding Arc Discharge

JIN Chengming¹, WANG Chenhang¹, PEI Xueyun¹, LIU Duo², SUN Yunjin¹

(1. College of Food Science and Engineering, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China;

2. Chines Academy of Agricultural Mechanization Sciences, Beijing 100083, China)

Abstract: An atmospheric plasma discharge device was built by atmospheric sliding arc discharge technology. The effects of type and power of discharge gas on the bactericidal effect of Staphylococcus aureus were studied. The results showed that the technology has the best bactericidal effect when discharge power is low and discharge gas is oxygen.

Keywords: atmospheric plasma, gliding arc discharge, sterilization process, surface morphology analysis, Staphylococcus aureus

0 引言

金黄色葡萄球菌是一种常见的食源性致病菌,也是引起食品安全问题的重要污染源之一^[1,2]。如何在生产、加工和销售环节进行有效灭菌,一直受到广泛关注。灭杀金黄色葡萄球菌的常用方法是热杀菌,但其分泌的具有毒性的肠毒素较为稳定,很难进行热降解,需用次氯酸溶液、环氧乙烷等化学试剂进行降解和低温消毒,因此该方法存在较多的安全隐患,例如环氧乙烷具有致突变性和致癌性^[3]。此外,虽然紫外线和伽马射线产生的高能光子会严重破坏DNA的结构,产生较好的灭杀效果,但射线也会对人体产生一定的致癌作用^[4]。因此,常用的热灭菌方法很难适用于非热食品的杀菌处理方法,研发一种新型的绿色、无污染的冷杀菌技术成为当前杀菌领域的必然要求。

等离子体由正负离子、电子、自由基和各种活性基团构成,这些粒子作用于微生物表面后可明显改变微生物的生理生化特定,达到灭杀或清除的目的。等离子体技术还具有成本低、应用范围广的特点,克服

了传统的高温或辐照杀菌的缺陷,是一种绿色的无污染的物理冷杀菌技术^[5,6]。Kilonzo-nthenge A等人^[7]用大气等离子体对金冠苹果表面的沙门氏菌和大肠杆菌进行灭菌,发现灭菌效率与放电功率、处理时间密切相关,可以降低5.3对数值。Kim SY等人^[8]使用介质阻挡放电(DBD)对受沙门氏菌污染的蔬菜表面进行消毒,发现灭菌效率与放电气体类型、湿度以及其他环境因素有关。黄梅等人^[9]通过DBD排放研究了沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的灭活机制,从数学模型的角度分析了沙门氏菌和金黄色葡萄球菌生长曲线的变化,并预测了该灭菌技术的工业应用潜力。Karolina AL等^[10]人采用常压等离子体技术对火腿沙门氏菌和李斯特菌表面进行有效的剔除。由此可见,等离子体技术在食品杀菌领域具有良好的应用潜力,其杀菌机理和失活机理还需要进一步的深入研究。本文采用滑动弧放电等离子体技术对金黄色葡萄球菌的进行有效灭杀,研究处理条件对金黄色葡萄球菌的灭杀效果,同时通过分子生物学的方法探究杀菌机理,为在食品冷杀菌领域的应用提供指导和理论支持。

收稿日期: 2019-07-11 修回日期: 2019-09-23

基金项目: 北京农学院项目“内涵发展定额大学生科研训练项目”(基金编号: KX2019020)

作者简介: 靳程茗, 研究方向: 新型杀菌技术与装备。E-mail: 1026757387@qq.com

孙运金, 通信作者, 讲师, 研究方向: 新型杀菌技术与装备。E-mail: aosdf2@163.com

在线投稿
www.dlae.com

1 材料与方 法

1.1 金黄葡萄球菌的活化与保存

在超净工作台中对金黄菌进行活化处理，所有操作仪器及容器均需提前灭菌，活化温度为 37.4℃，摇床转速为 180r/min，活化时间为 12h。

1.2 大气等离子体处理

滑动弧放电设备^[11]主要由在陶瓷管中的两个平行铜电极和一个交流或直流高压电源组成。两电极间距约为 0~1 cm，电源工作频率为 50 Hz，施加在电极两端的电压为 3 kV。本次研究所用的参数为气体流量 40 L/min、火焰到平板间的距离 0.5~1.0 cm 以及杀菌功率 400 W。

1.3 扫描电镜

向待测金黄色葡萄球菌液中滴加戊二醛细胞固定液，离心后去掉上清液，换新戊二醛固定液进行二次固定，在 4℃ 温度下保存 12 h 后用 PBS 漂洗 3 次，每次 10min，在 8 000 r/min 的转速下离心 3 min 后弃上清液，PBS 洗涤两次，采用 10%、30%、50%、70%、90% 和 95% 浓度的乙醇各脱水 1 次，无水乙醇脱水 2 次，每次持续 2~3 min，用叔丁醇洗脱置换 3 次，每次 20 min，每步均以 8 000 rpm，3~5 min。

1.4 细胞凋亡

参照 Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒方法进行 检测，样品在 4000 r/min 转速下离心 3 min 后，用 PBS 缓冲溶液洗涤样品 3 次，弃上清液，加入 20 μl Binding buffer 缓冲液后，分别加入 5 ul Annexin V-FITC 与 10 μl PI，反应 15 min（避光）后，在激光共聚焦扫描显微镜或流式细胞测试仪下进行观察，激发波长为 488 nm，发射波长为 530 nm。

2 结果与分析

2.1 放电气体种类对金黄色葡萄球菌的杀菌效果

图 1 为滑动弧放电处理金黄色葡萄球菌的灭菌效果随处理时间的变化。不管放电介质是空气、氧气还是氮气，金黄色葡萄球菌的菌落总数均随放电时间的增加而降低，从对照时的 125 CFU/ml 降低至 0 CFU/ml，基本达到了无菌状态。相对于空气放电处理，氧气放电处理效果较好，在处理 5 s 时可降低 2 个 log 值，其次为氮气。随着时间的延长至 20s 以后，滑动弧放电处理可进一步降低至 4 个 log 值。该平板计数法虽然没有有效地表征出放电有效区域内的杀菌效率，但已证明该放电技术为一种高效的冷杀菌处理方法。该试验结果与 LIAO Xinyu 等人^[11]采用弱酸性电解水对金黄色葡萄球菌的杀菌效果随着处理时间增加从 0.4 提高至 4 个 log 的趋势一致。Young-Ouk Park

等人^[13]采用等离子体射流研究了不同气体配比对金黄色葡萄球菌灭杀效果的影响，发现了空气也可有效降低金黄色葡萄球菌的成活率，处理时间增加至 300 s 时，log 值约降低至 8。Xinyu Liao 等人^[14]采用介质阻挡放电技术对金黄色葡萄球菌进行有处理后发现，介质阻挡放电的杀菌效果存在时间依赖性。由此可看出，不管处理方式如何变化，大气环境下形成的等离子体放电均可对金黄色葡萄球菌进行有效灭杀，且杀菌效率随着时间的积累而提高，这与等离子体中的活性成分与金黄色葡萄球菌的相互作用有关。

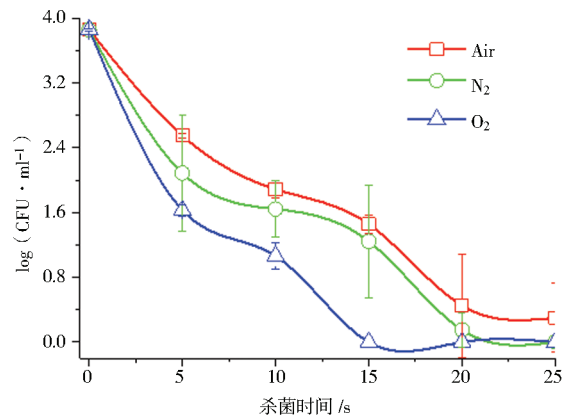


图 1 金黄色葡萄球菌在不同气体放电下随处理时间的变化
Fig. 1 Changes in the treatment time of *Staphylococcus aureus* under different gas discharges

2.2 氧气放电对金黄色葡萄球菌的杀菌效果

等离子体中的活性成分与杀菌效果紧密相关，其浓度的大小直接由放电功率决定。为此，对氧气做为放电介质的杀菌效果随功率的变化情况进行了研究，如图 2 所示。与对照相比，等离子体放电功率越低，杀菌效率越高，放电功率为 300 W 时可在 10 s 的时间内达到 3 个 log 值，较高的电子浓度会持续诱导、激活更高浓度的活性粒子、自由基，提高了对金黄色

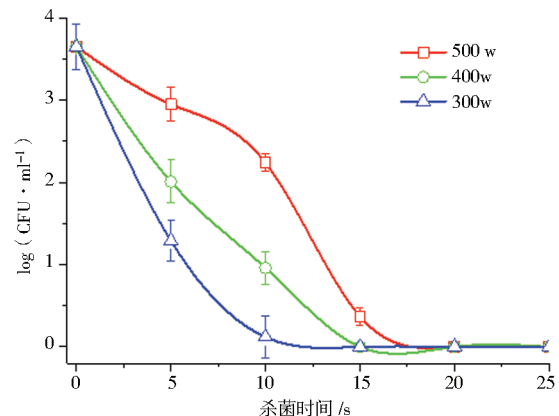


图 2 在氧气放电条件下菌落总数随功率的变化
Fig. 2 The total number of colonies with power under oxygen discharge conditions

葡萄球菌的处理强度,导致较高的杀菌率。如图1所示的杀菌效果是通过时间积累来达到较高的杀菌效率^[15],图2试验结果表明了较低功率产生较高的杀菌率,这可能是由于大气滑动弧放电对金黄色葡萄球菌的杀菌机理并不仅仅是通过时间累计效应达到杀菌效果,功率的增大将增强气体电离强度和电子密度,具有杀菌能力的活性粒子浓度较高,而高功率电离的活动成分更容易湮灭,导致杀菌效果不显著,反而增加了能耗,降低了杀菌效果。由此可推测,杀菌效率与等离子体中某些特殊的活性成分紧密相关,具体是哪一种活性成分以及其与放电工艺的关系将在以后进一步深入研究。

2.3 大气等离子体处理对表面形貌的影响

为了进一步探索大气滑动弧放电对金黄色葡萄球菌的失活机制,通过扫描电镜对处理和未处理样品的表面形貌进行表征,如图3所示。由图可看出,未处理样品的金黄色葡萄球菌呈现规则的圆形,菌体表面较为光滑,如图3a和3c所示,而处理组的金黄色葡萄球菌外形有凹陷或凹坑,菌体表面的几何形状不规则,菌体之间存在菌体的碎片,如图3b和3d所示。这可能是由于等离子体中活性物质的强氧化性以及高能粒子的轰击作用破坏了金黄色葡萄球菌的细胞膜,特别是细胞膜中的肽聚糖、蛋白质以及脂质等组分被活性物质氧化。根据菌体表面形态的变化推断出的可能存在的作用因素,与其他杀菌试验结果类似^[11-14],但对于大气等离子体的杀菌机理还需用更深层表征技术来进一步揭示。

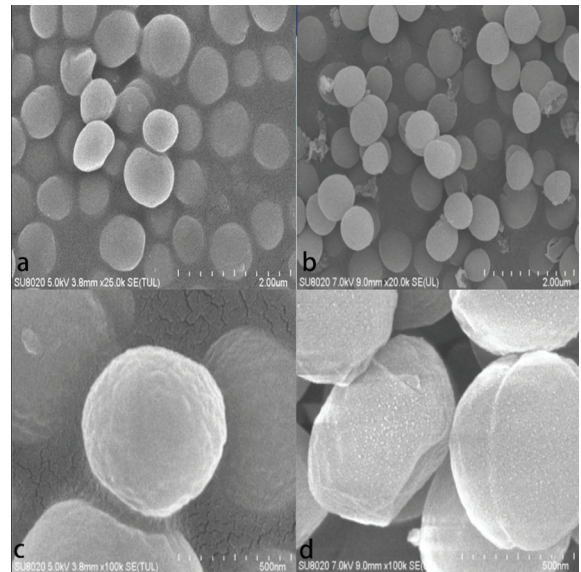


图3 大气等离子体处理金黄色葡萄球菌的表面形貌变化(a, c-未处理样品, b, d-处理5min的样品)

Fig. 3 Surface morphology changes of *Staphylococcus aureus* treated by atmospheric plasma (a, c-no treated samples, b, d-treated samples for 5min)

2.4 滑动弧放电对细胞内 ROS 的影响

图4为滑动弧放电处理前后细胞内绿色和红色荧光的图像,图4c和4f表明可见光下金黄色葡萄球菌的存在浓度较高,图4a和4d为细胞内DCFH-DA探针的发光图,表明了ROS的存在水平。由此可知,经滑动弧放电处理后细胞内的活性氧浓度大大提高。由图4b和4e可看出,经滑动弧放电处理的细菌内出现了较强的红色荧光,表明大气等离子体处理对细胞

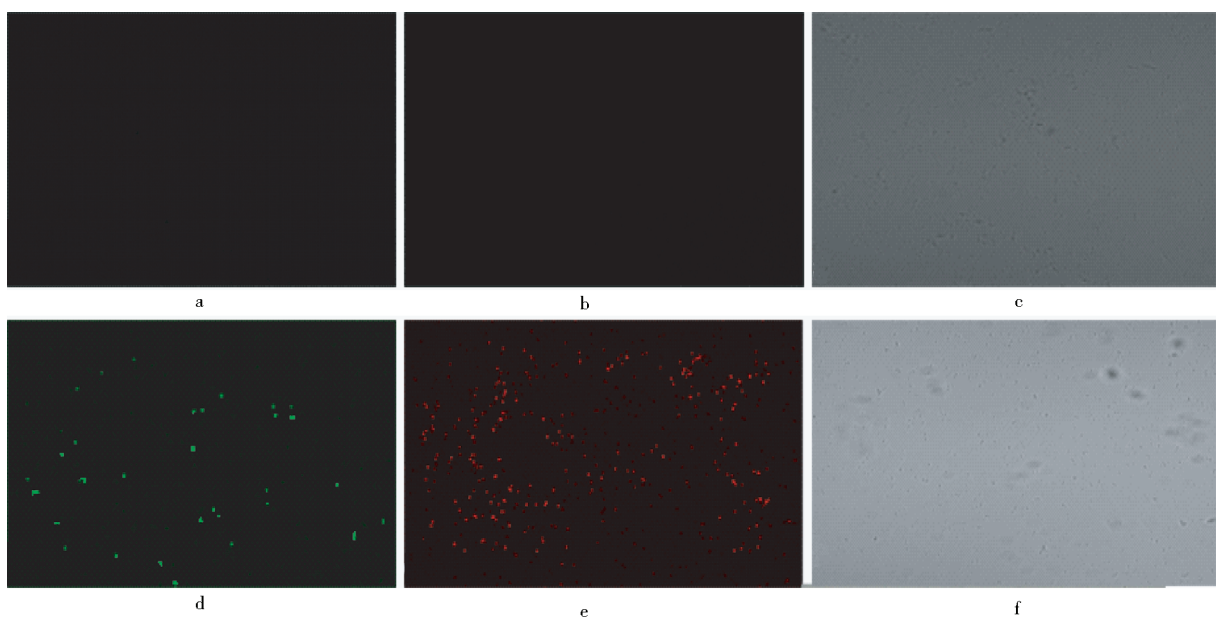


图4 滑动弧放电处理前后细胞内 ROS (a, b/d, e-未处理/处理的荧光图像, c/f-未处理/处理的光学图像)

Fig. 4 Intracellular ROS before and after gliding arc discharge treatment (a, b/d, e-no/treated samples for Fluorescence image, c/f-no/treated samples for Optical image)

膜有破坏作用。因此，可推断大气等离子体中的有效杀菌成分可通过破坏细胞膜的完整性导致细胞坏死，或通过增加细胞内 ROS 含量导致细胞内组织损伤，进而造成生理生化功能减弱或代谢停止。ROS 被认为是细胞内氧气消耗的副产物，可对细胞内 DNA、蛋白质和脂质造成氧化性损伤^[15]。XU Zimu 等人^[16]发现金黄色葡萄球菌内存在高浓度的 ROS，这些高浓度的 ROS 会氧化细胞膜，表明了大气等离子体射流会破坏细胞膜。金黄色葡萄球菌的失活机制主要是细胞内部高浓度 ROS 导致的破损，该结果与本研究结果类似。

2.5 滑动弧放电对细胞凋亡的影响

与对照相比，经过 FITC/PI 双染得到的金黄色葡萄球菌的流式分布如图 5 所示。放电处理 5 min 后，金黄色葡萄球菌坏死率达到了 66.92%，对应的活菌数量从 46.21% 降低至 20.44%，晚期和早期凋亡细胞数量没有明显的变化。该结果进一步证实了滑动弧放电对金黄色葡萄球菌的失活机制是通过细胞坏死的方式来进行，结合图 4 可推断，这种细胞坏死是通过破坏细胞膜的完整性来实现的。ZHANG Liangliang 等人^[17]通过细胞凋亡和表面形貌测试发现了抗菌机制主要是破坏金黄色葡萄菌的细胞膜。TIAN Ying 等人^[18]发现等离子体活化水对金黄色葡萄菌具有良好的杀菌效果，细胞凋亡测试表明主要灭菌机制是活性氧等活性物质对细胞膜完整性和膜电压的破坏。

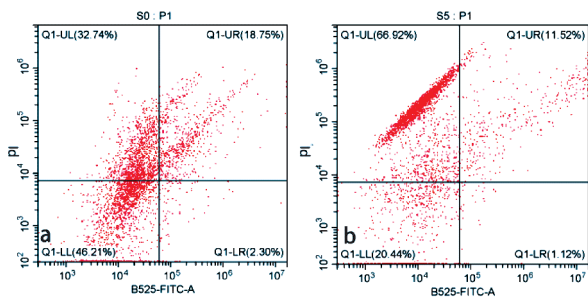


图 5 FITC/PI 双染色金黄色葡萄球菌的细胞凋亡图像 (a/b-未/处理样品)

Fig. 5 Apoptosis map of FITC/PI double stained *S. aureus* (a/b-no/treated samples)

3 结束语

本文采用大气滑动弧放电技术搭建了一种大气等离子体放电装置，研究了放电气体种类和功率对金黄色葡萄球菌的杀菌效果，发现不同气体放电形成的等离子体均会对金黄色葡萄球菌产生灭杀效果，在低功率条件下氧气产生的杀菌效果最高，达到 4 个 log 值。同时，还研究了该滑动弧放电对金黄色葡萄球菌的灭杀机制，通过表面形貌和 ROS 测试发现，金

黄色葡萄球菌表面出现部分破损的情况，细胞凋亡进一步揭示了该技术对金黄色葡萄球菌的杀菌效果是通过破坏细胞膜的完整性来实现的。

参考文献

- [1] 燕瑞英. 金黄色葡萄球菌致病毒素基因分布及与致病性的相关性分析[J]. 临床研究, 2019, 27(8): 156-157.
- [2] 钱卫东, 沈兰芳, 王婷, 等. 金黄色葡萄球菌耐药性及生物被膜形成能力研究[J]. 现代食品科技, 2019, 35(9): 1-9. QIAN Weidong, SHEN Lanfang, WANG Ting, et al. Drug resistance and biofilm-forming ability of *Staphylococcus aureus*[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2019, 35(9): 1-9.
- [3] Hoyle, B. D. & Costerton, J. W. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms[J]. *Progress in Drug Research* 1991, 37: 91-105.
- [4] Khan, M. S. I., Lee, E. J. & Kim, Y. J. Roles of individual radicals generated by a submerged dielectric barrier discharge plasma reactor during *Escherichia coli* O157: H7 inactivation[J]. 2015, 107(5): 111-119.
- [5] 韩格, 陈倩, 孔保华. 低温等离子体技术在肉品保藏及加工中的应用研究进展[J]. 食品科学, 2019, 40(3): 286-292. HAN Ge, CHEN Qian, KONG Baohua. Recent advances in Application of cold plasma technology in meat preservation and processing[J]. *Food Science*, 2019, 40(3): 286-292.
- [6] 周琛. 过氧化氢低温等离子体灭菌技术对腔镜器械的灭菌作用分析[J]. 中国社区医师, 2019, 35(26): 76-77.
- [7] Kilonzo-Nthenge A, Liu S, Yannam S and Patras A. Atmospheric Cold Plasma Inactivation of *Salmonella* and *Escherichia coli* on the Surface of Golden Delicious Apples [J]. *Frontiers in Nutrition*, 2018, 5: 120-128.
- [8] Kim SY, Bang H, Sea C, Effects of packaging parameters on the inactivation of *Salmonella* contaminating mixed vegetables in plastic packages using atmospheric dielectric barrier discharge cold plasma treatment[J]. *Journal of Food Engineering*, 2019, 242: 55-67.
- [9] HUANG Mingming, ZHUANG Hong, WANG Jiamei, et al. Inactivation Kinetics of *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in Different Media by Dielectric Barrier Discharge Non-Thermal Plasma[J]. *Applied Science*, 2018, 8(11): 2087.
- [10] Karolina A, Boulaaba A, Binder S, et al. Inactivation of *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* on ham with nonthermal atmospheric pressure plasma [J]. *PLOS one*, 2018, 24: 1-21.
- [11] 孙运金, 朱莉华, 马挺军, 等. 非热滑动弧放电电离气体对大肠杆菌的灭菌效果[J]. 中国食品学报, 2017, 17(9): 168-174. SUN Yunjin, ZHU Lihua, MA Tingjun, et al. Sterilization efficacy of non-thermal gliding arc discharge with different discharge gases on *Escherichia coli*, 2017, 17(9): 168-174.
- [12] LIAO Xinyu, XUAN Xiaoting, LI Jiao, et al. Bactericidal action of slightly acidic electrolyzed water against *Escherichia coli* and *staphylococcus aureus* via multiple cell targets[J]. *Food Control*, 2017, 79: 380-385.
- [13] Young-Ouk Park, Chang-Min Lee, Myung-Sun Kim, et al. In

- vitro bactericidal efficacy of atmospheric-pressure plasma jet on titanium-based implant infected with *Staphylococcus aureus*[J]. Japanese Journal of Applied Physics, 2017, 56: 1-5.
- [14] LIAO Xinyu , XIANG Qisen , LIU Donghong, et al. Lethal and sublethal effect of a dielectric barrier discharge atmospheric cold plasma on *staphylococcus aureus*[J]. Journal of Food Protection, 2017, 80(6): 928 - 932.
- [15] L. Han, a S. Patil, a D. Boehm, et al. Mechanisms of inactivation by high-voltage atmospheric cold plasma differ for *escherichia coli* and *staphylococcus aureus*[J]. January 2016 Volume Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(2): 450-458.
- XU Zimu, SHEN Jie, CHENG Cheng, et al. In vitro antimicrobial effects and mechanism of atmospheric-pressure He/O₂ plasma jet on *staphylococcus aureus* biofilm [J]. Journal of Physics D: Applied Physics, 2017, 50: 105-201.
- [16] ZHANG Liangliang, ZHANG Lifang, HU Qingping, et al. Chemical composition, antibacterial activity of *cyperus rotundus* rhizomes essential oil against *Staphylococcus aureus* via membrane disruption and apoptosis pathway[J]. Food Control, 2017, 80: 290-296.
- [17] TIAN Yiing, MA Ruonan, ZHANG Qian, et al. Assessment of the physicochemical properties and biological effects of water activated by non-thermal plasma above and beneath the water surface[J]. Plasma Processes and Polymers, 2015, 12, 5: 439-449.