

滑动弧放电等离子体对枯草芽孢杆菌的灭菌机理

崔鲁彬¹, 孙运金^{1,2}, 王雪莹¹, 王艳³

(1. 北京农学院, 北京 102206; 2. 北京农学院首都农产品安全产业技术研究院等离子体工程中心, 北京 102206;
3. 中国农业机械化科学研究院, 北京 100083)

摘要: 滑动弧放电是在大气环境下产生的一种等离子体形式, 放电产生的活性粒子对环境中的各种食源性有害微生物具有较好的抑菌效果。以枯草芽孢杆菌为处理对象, 研究了放电处理时间对枯草芽孢杆菌的杀菌效果, 并通过表面形貌、电导率和共聚焦显微镜等测试方法揭示滑动弧放电等离子体的失活机制。结果表明, 氮气放电等离子体具有较好的杀菌效果, 主要抑菌机理是对细菌的细胞膜造成破坏, 导致细胞坏死。

关键词: 滑动弧放电等离子体; 表面形貌; 灭菌机理; 细胞坏死

中图分类号: TS201.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 2095-1795(2021)01-0062-07

Sterilization Mechanism of *Bacillus subtilis* by Gliding Arc Discharge Plasma

CUI Lubin¹, SUN Yunjin^{1,2}, WANG Xueying¹, WANG Yan³

(1. Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; 2. Plasma Engineering Center,
Capital Agricultural Product Safety Industrial Technology Institute, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China;
3. Chinese Academy of Agricultural Mechanization Sciences, Beijing 100083, China)

Abstract: Gliding arc discharge plasma is a kind of discharge phenomenon in atmospheric environment, during which active particles have good bacteriostatic effect on various foodborne harmful microorganisms in environment. Sterilization effect of discharge treatment time against bacillus subtilis was studied and inactivation mechanism of gliding arc discharge plasma was revealed by surface morphology, electrical conductivity and confocal microscopy by taking bacillus subtilis as treated samples. Results showed that nitrogen discharge plasma had better bactericidal effect, whose main bacteriostatic mechanism was to destroy cell membrane of bacteria, leading to cell necrosis.

Keywords: gliding arc discharge plasma, surface morphology, sterilization mechanism, cell death

0 引言

等离子体是由一种或几种电子、离子、光子及处于中性的粒子所构成的部分或全电离的离子化气体状物质^[1-2]。根据等离子产生条件, 等离子体可分为高温等离子体与低温等离子体两种, 高温等离子体的电子温度和离子温度相等, 可高达 10 000 K^[3-4]。相比之下, 低温等离子体的电子温度虽在 10 000 K 左右, 但离子温度接近环境温度, 整体上呈现为室温, 可直接应用于处理热敏物质^[5]。同时, 低温等离子体放电会产生大量活性氧、活性氮等活性成分, 这些活性成分对细菌、真菌和孢子均有一定灭活作用, 可应用于食品杀菌、农业育种和污染治理等领域^[6-11]。

低温等离子放电具有多种产生方式, 包括滑动弧

放电、介质阻挡放电 (DBD)、等离子体射流和电晕放电等^[12-17]。因激发方式不同, 等离子体产生的活性粒子种类和抑菌效果具有较大差异。目前大气等离子体放电模式主要有 DBD 放电、等离子体射流和滑动弧放电。MENDES-OLIVEIRA G 等^[18]采用 DBD 方式对枯草芽孢杆菌处理 120 s, 灭活效果超过了 6 个对数值, 并且通过试验发现导致孢子失活的主要活性气体为臭氧。HUANG Y H 等^[19]采用 DBD 方式对枯草芽孢杆菌灭活, 发现芽孢失活率取决于初始芽孢浓度和芽孢的处理时间, 但对等离子体中活性物质的组分缺乏深入研究。ROTH S 等^[20]采用 DBD 方式灭活枯草芽孢杆菌, 发现紫外线辐射在孢子失活过程中起主导作用, 并且枯草芽孢杆菌的孢子是通过蛋白质失活和 DNA 损伤的共同作用而被灭活的。由此可知,

收稿日期: 2020-11-06 修回日期: 2020-12-24

基金项目: 北京农学院学位与研究生教育改革与发展项目 (项目编号: 5076516017/026)

作者简介: 崔鲁彬, 研究方向: 新型杀菌技术与装备。E-mail: 573153305@qq.com

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

在线投稿
www.d1ae.com

介质阻挡放电的优势是放电面积较大, 杀菌的主要活性成分为臭氧离子, 而等离子体射流产生活性物质更加复杂。HERTWIG C 等^[21]采用射频等离子体射流设备对枯草芽孢杆菌进行灭活, 发现实现杀菌作用的活性物质为活性氧。REINEKE K 等^[22]采用纯氩气作为等离子体射流设备的气源, 通过放电处理 5 min 后能降低芽孢杆菌约 3 个对数值, 向纯氩气中通入一定比例的氧气与氮气能有效增强紫外光的发射强度。HONG Y F 等^[23]使用氩气与氧气的混合气体作为等离子体射流设备的气源, 在放电 40 s 时灭活大肠杆菌约 6 个对数值, 放电 120 s 后能减少枯草芽孢杆菌约 5 个对数值, 证明了氧自由基 (ROS) 对细菌具有较强灭活性。PINAPEREZ M C 等^[24]采用表面微放电装置对枯草芽孢杆菌进行了灭活, 在等离子体功率 5 mW/cm² 时需要放电处理 7 min 才能降低约 4 个对数值。

相较于 DBD 和等离子体射流放电等离子体, 滑动弧放电作为一种介于热等离子体和冷等离子体之间的温性等离子体, 兼具热等离子体和冷等离子体的特性, 具有装置成本低、结构简单、应用灵活和容易控制等特点, 具有较高离子电离率和抑菌效率^[25-28]。MOREAU M 等^[29-30]采用滑动弧放电方式进行杀菌工艺探索, 结果表明, 滑动弧放电杀菌具有多个阶段, 前期放电过程中活细菌数量较稳定, 在 30 s 内存活细菌数量会迅速减低 10 个对数值, 但对滑动弧放电的杀菌机制缺少系统研究。由此可见, 等离子体因激发模式的不同, 会导致杀菌效率存在差异, 对应的杀菌机制更加复杂。相对其他放电模式, 滑动弧放电在放电面积和杀菌效率方面具有一定优势, 现阶段对于滑动弧放电杀菌机理与活性有效成分的鉴别不够全面, 本研究采用滑动弧放电等离子体放电处理枯草芽孢杆菌, 通过改变输入气体的组分来探究滑动弧放电等离子体的杀菌效果与机理, 明确其主要杀菌成分, 为滑动弧等离子体的研究与应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* CCIC10275), 北京农学院食品学院微生物实验室; 胰蛋白胨、酵母浸粉, 华中海威 (北京) 基因科技有限公司; 平板计数琼脂 (PCA), 北京奥博星生物技术有限责任公司; 叔丁醇 (分析纯)、戊二醛, 国药集团化学试剂有限公司; Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒, 上海翊圣生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

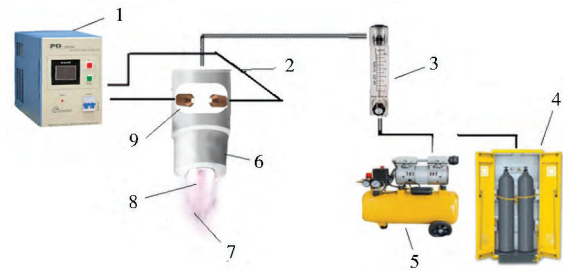
滑动弧放电等离子体装置, 实验室自制; PG-

1000ZF 型等离子体电源 (南京苏曼等离子科技有限公司); JEOL JSM-6700F 型冷场发射扫描电子显微镜 (日本电子株式会社, JEOL); HQ30d 型便携式数字化多参数分析仪 (美国哈希公司, HACH); FV1000MPE 型多光子激光扫描显微镜 (日本奥林巴斯, Olympus); FACS Aria III 型六激光十八色流式细胞分析分选系统 (美国碧迪公司, BD)。

1.3 试验方法

1.3.1 滑动弧放电设备

滑动弧放电等离子体装置主要由等离子体反应器 (两个长度 95 mm、直径 4 mm 的平行铜电极和外包陶瓷管) 和可调节功率交流高压电源组成, 搭建的试验设备如图 1 所示。电源输入工作频率 50 Hz, 两电极间距 1.0 cm, 接入电源后, 气体 (空气、氧气和氮气) 从陶瓷管顶部进入通电的两电极之间形成弧光放电羽状区 (放电面积 100 mm × 50 mm)。



1. 等离子体电源 2. 高压线 3. 气体流量计 4. 气瓶 5. 空气压缩机 6. 陶瓷管 7. 等离子体羽辉 8. 等离子体射流 9. 铜电极

图 1 滑动弧放电等离子体装置

Fig. 1 Gliding arc discharge plasma device

1.3.2 枯草芽孢杆菌菌悬液制备

枯草芽孢杆菌 (CCIC10275) 冻干粉标准菌株在无菌条件下经菌株复溶、复壮和传代各步骤得到第 3 代培养菌, 用无菌的甘油与去离子水 1:1 混合液在 -20 °C 保藏菌种。每次使用前, 将此菌种以 1% ~ 2% 的接种量接种至 PCA 液体培养基 (0.5 g 胰蛋白胨、0.25 g 酵母浸粉、0.1 g 葡萄糖和 100 mL 去离子水), 于水浴恒温振荡器 37 °C、180 r/min 培养 12 ~ 18 h 直至对数生长期, 此时采用无菌生理盐水梯度稀释至 10³ 后由平板计数法测定得出^[31-32]。

1.3.3 滑动弧放电处理

移取 100 μL 的枯草芽孢杆菌菌悬液至装有 20 mL PCA 固体培养基的培养皿中, 用无菌三角涂布棒均匀涂布至完全变干, 盖上培养皿盖, 用记号笔标记菌种名称、气体种类、处理时间及制备日期。同时使用 85% 生理盐水对原枯草芽孢杆菌菌悬液进行 10、10²、10³ 和 10⁴ 梯度稀释、计数。每组处理结果取 3 个平行的平板平均值。将上一步制备好的枯草芽孢杆

菌样品放置在距滑动弧放电装置放电下方 1 ~ 2 cm 处, 分别将 3 种气体 (空气、氮气和氧气) 的流量调节为 0.3 L/min, 调整放电功率 800 W, 对枯草芽孢杆菌进行不同时间 (0、5、10、15、20 和 25 s) 的灭菌处理。

1.3.4 菌落总数测定

将上述处理完的培养皿倒置于恒温 (37 ± 0.1 °C) 培养箱培养 16 h, 依据 GB 4789.2—2010 菌落总数测定法中平板计数法对菌落总数进行计数^[32]。

1.3.5 扫描电镜样品前处理

将枯草芽孢杆菌菌悬液进行多次 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗脱离心处理 (8 000 r/min 离心 3 min、温度 4 °C), 沉淀物涂于无菌载玻片上自然晾干, 置于不同气体的滑动弧放电中进行灭活处理, 处理后的枯草芽孢杆菌样品用 0.1 mol/L PBS 进行冲洗收集, 获得的收集液采用相同参数离心处理, 将离心所得沉淀物加入 400 μ L 戊二醛溶液在 -4 °C 条件下固定 12 ~ 16 h^[33]。固定后的样品使用 0.1 mol/L PBS 进行 3 次洗涤, 将 1% 的锇酸和 0.1 mol/L PBS 混合液与洗涤后样品混合染色固定 2 h, 重复 3 次 PBS 缓冲液洗涤, 进行多次乙醇梯度脱水 (乙醇的体积比例分别为 10%、30%、50%、70%、90%、95%、100% 和 100%)^[34]。脱水后样品采用叔丁醇 3 次置换处理, 通过冷冻干燥机干燥成粉后电镀喷金, 采用电子显微镜分析处理。

1.3.6 电导率测试样品前处理

将枯草芽孢杆菌菌悬液进行多次 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液洗脱离心处理 (10 000 r/min 离心 5 min、温度 4 °C), 沉淀物涂于无菌载玻片上自然晾干, 置于不同气体的滑动弧放电装置中进行处理, 将处理后枯草芽孢杆菌样品用 1 mL (0.1 mol/L) PBS 进行冲洗收集, 并用无菌水定容至 20 mL, 采用电导仪对定容后的菌液进行电导率测定。

1.3.7 激光共聚焦激光扫描显微镜样品前处理

将上述制备好的枯草芽孢杆菌菌悬液进行多次 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗脱离心处理 (5 000 r/min 离心 5 min、温度 4 °C), 沉淀物涂于无菌载玻片上自然晾干, 置于不同气体的滑动弧放电装置中进行灭活处理, 处理后的枯草芽孢杆菌样品用 0.1 mol/L PBS 进行冲洗收集, 获得的收集液采用相同参数离心处理 2 ~ 3 次, 将离心所得沉淀物分别加入 100 μ L Binding buffer、5 μ L V-FITC 探针和 10 μ L PI 探针, 混匀后避光反应静置 15 min 再加入 400 μ L Binding buffer, 滤膜过滤上机处理。

2 结果与讨论

2.1 灭菌效果

为分析不同的放电气体对枯草芽孢杆菌的杀菌效果, 采用 3 种不同气体 (空气、氧气和氮气) 来确定杀菌的有效性和差异性。通过改变放电时间形成放电等离子体处理枯草芽孢杆菌, 结果如图 2 所示。由图 2 可知, 不同放电气体对枯草芽孢杆菌的杀菌效果差异较大。空气放电的杀菌效果最差, 随着杀菌处理时间延长至 25 s 时, 菌落总数从 3.9 cfu/mL 降低至 0.3 cfu/mL。氧气的杀菌效果相对较好, 在杀菌处理时间至 25 s 时菌落总数最大可降至 0 cfu/mL。氮气的杀菌效果最好, 在杀菌处理时间至 20 s 时菌落总数可降低至 0 cfu/mL, 降低了约 4 个 log 值。结果表明, 处理时间越长, 杀菌率越高、杀菌效果越明显。

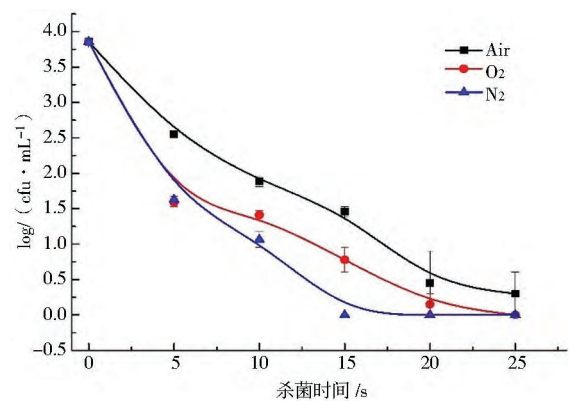


图 2 不同气体处理对枯草芽孢杆菌的杀菌效果随放电时间的变化

Fig. 2 Inactivation effects of *Bacillus subtilis* with discharge time under different gas treatment

2.2 表面形貌

不同气体放电处理后, 枯草芽孢杆菌的表面形貌如图 3 所示。未处理样品表面较为光滑, 没有褶皱和缺陷, 成完整杆状结构, 如图 3a、3d 和 3g 所示。与对照组相比, 经空气放电处理 10 s 后少数枯草芽孢杆菌出现皱缩现象, 如图 3b 所示。在空气放电处理 25 s 时, 绝大多数枯草芽孢杆菌出现孢子结构的破碎与缺陷, 杆状结构被破坏, 如图 3c 所示。当放电气体改为氧气或氮气时, 在放电处理 10 s 后多数枯草芽孢杆菌表面出现皱缩现象, 氮气处理组个别枯草芽孢杆菌甚至出现破碎现象, 如图 3e、3h 所示。当放电时间延长至 25 s 时, 枯草芽孢杆菌杆状结构被大量破坏, 原有结构被完全破碎, 如图 3f、3i 所示。不同气体所导致的枯草芽孢杆菌表面形貌存在一定差异, 这可能是由于不同气体放电形成的活性成分不同所致, 造成细胞膜结构的破裂可能是由于 \cdot OH 自由基对细胞膜脂类物质的强氧化性造成的^[30]。

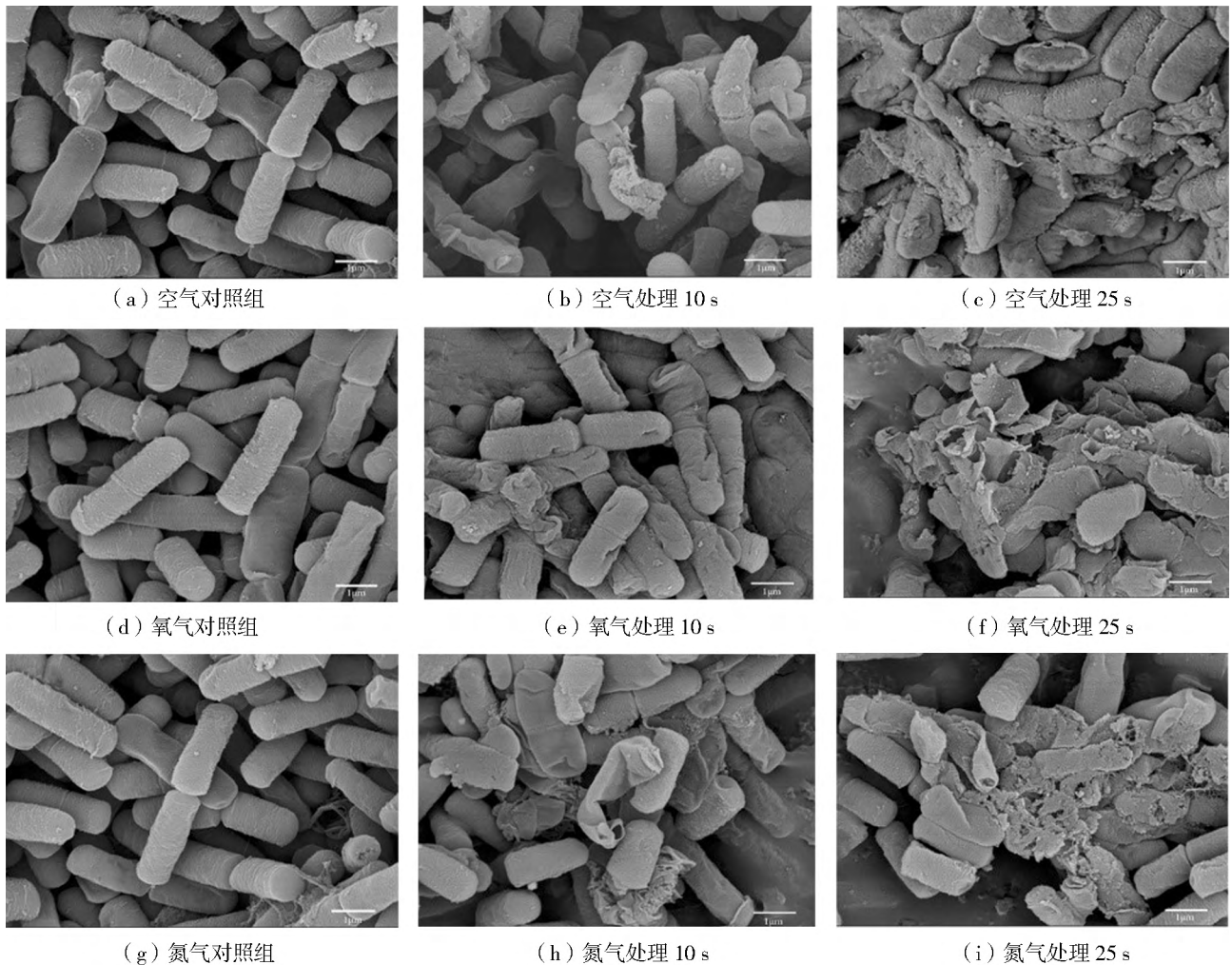


图3 等离子体处理前后枯草芽孢杆菌表面形貌

Fig. 3 Representative SEM images of *Bacillus subtilis* before and after plasma treatment

2.3 菌液电导率

不同种类放电气体形成的等离子体处理,对枯草芽孢杆菌菌液电导率的变化影响如图4所示。氧气和空气等离子体处理枯草芽孢杆菌菌液电导率的结果差别相对较小,但电导率都在处理10 s前有不同程度的增长,10~25 s内电导率出现连续下降,在25 s时达到最小值 $537.5 \mu\text{s}/\text{sm}$ 。对枯草芽孢杆菌菌液电导率影响最大的气体是氮气,在等离子体处理10 s后,枯草芽孢杆菌菌液电导率达到最大值 $820 \mu\text{s}/\text{sm}$,其电导率相较于初始时电导率增加了 $254.5 \mu\text{s}/\text{sm}$ 。

结合图3等离子体处理25 s时的扫描电镜图像可知,电导率的变化趋势在初始阶段呈现上升现象,可能原因是来自等离子体放电中的活性物质对细胞膜产生了一定氧化刻蚀作用,随处理时间增加而增强。当处理时间超过10 s后,滑动弧放电产生了热量积累效应,在破坏细胞膜的同时也导致胞内物质的过快蒸发而损失,从而降低了菌液电导率^[35]。

2.4 细胞凋亡

为深入了解等离子体放电对枯草芽孢杆菌的杀菌

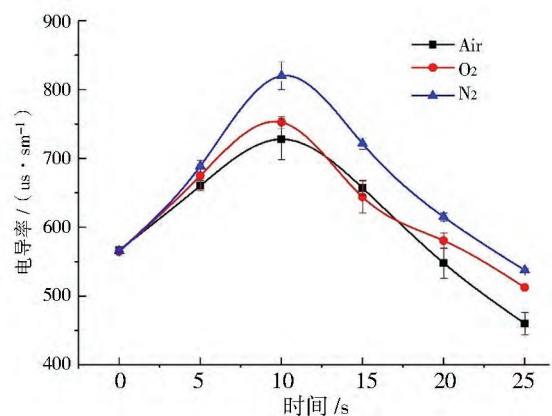


图4 不同气体的等离子体处理前后菌液电导率的变化
Fig. 4 Conductivity variation of bacterial solution before and after plasma treatment under different gas treatment

机理,对样品进行了激光共聚焦显微镜分析,检测结果如图5所示(a、b和c为对照组样品,d、e、f/g、h、i为处理组样品,处理时间分别为10 s和25 s)。当细胞处于活性阶段时,FITC和PI探针无法对其细胞膜内侧磷脂酰丝氨酸进行染色标记,因此在激光共

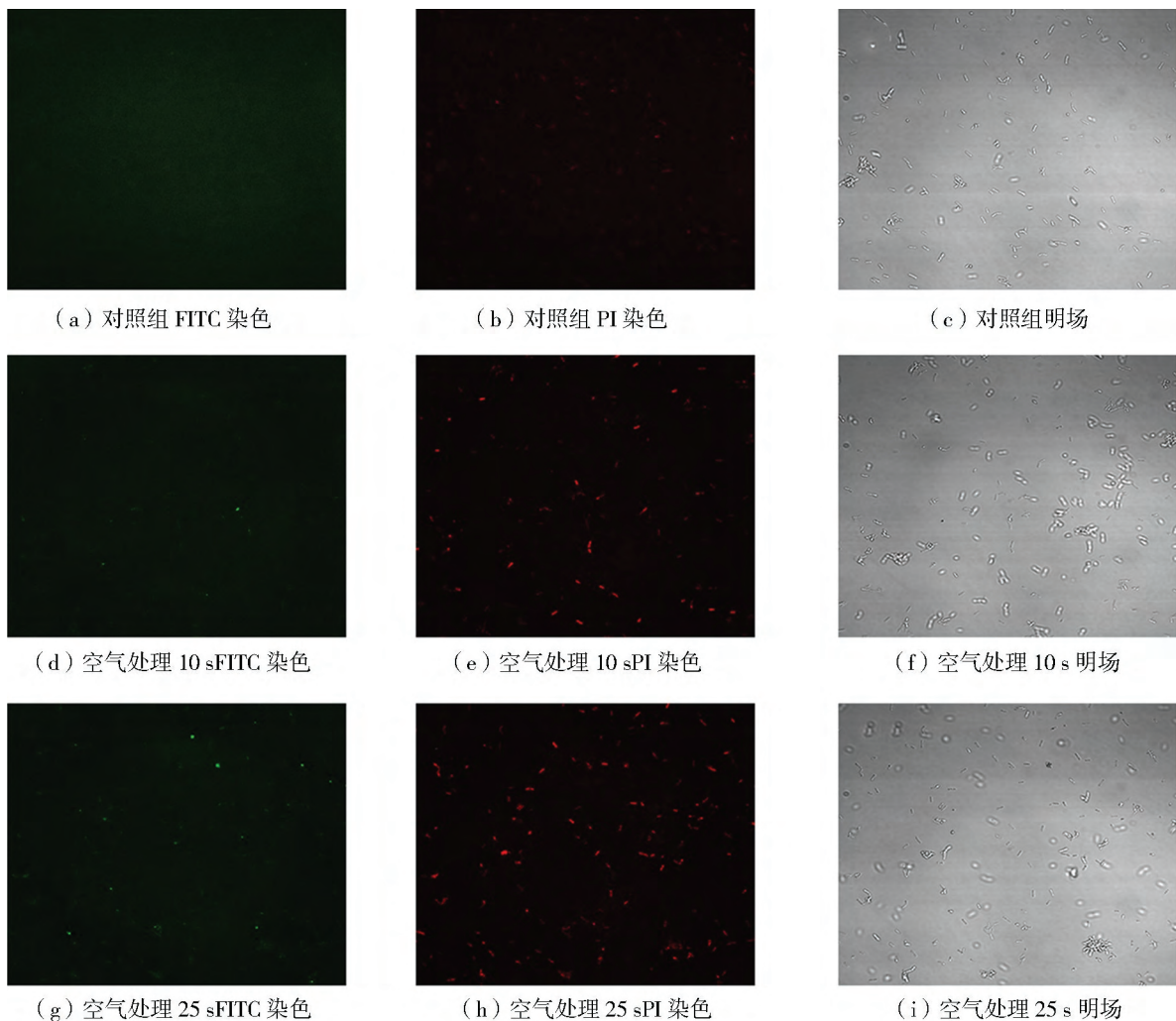


图5 空气放电等离子体处理枯草芽孢杆菌在荧光和明场下的 LSCM 图像

Fig. 5 LSCM images of bacillus subtilis treated with air discharge plasma under fluorescence and open field conditions

聚焦显微镜照射中无荧光反应。但在早期凋亡的细胞中的磷脂酰丝氨酸 (Phosphatidylserine, PS) 从细胞膜内侧翻转至细胞膜表面, 此时 PS 就会与 FITC 探针进行高亲和力结合, 在激光共聚焦显微镜照射中呈绿色荧光反应, 而凋亡晚期或坏死的细胞由于细胞膜的不完整性, 会被另一种探针 PI 探针染色, 在激光共聚焦显微镜照射中呈红色荧光反应。

未经过等离子体处理的枯草芽孢杆菌在 FITC 和 PI 探针双重染色后未出现绿色或红色的荧光反应, 证明其菌体活性强且细胞膜完整, 如图 5a 和 5b 所示。当等离子体处理 10 s 后, 通过激光共聚焦显微镜发现了少量由 FITC 探针染色的绿色荧光反应, 与较多的由 PI 探针染色的红色荧光反应, 证明了等离子体会导致细胞的凋亡、破坏细胞膜的完整性, 如图 5d 和 5e 所示。在等离子体处理 25 s 时, 呈红色荧光反应 (细胞凋亡) 的枯草芽孢杆菌数量明显增多, 如图 5g 和 5h 所示。通过对比 3 种气体放电处理后的红色荧光强度与数量可以发现经过氮气等离子体处理

后的样品凋亡率高于氧气与空气处理组。因此, 可以推断, 滑电弧放电会对膜的通透性和完整性造成积极破坏, 导致细胞坏死。

由上述研究结果发现, 滑动弧放电等离子体灭菌效果与滑动弧放电产生的活性成分紧密相关, 如 ROS/RNS 类活性物质积极参与并主导了枯草芽孢杆菌的灭活, 这与大多数研究结论相类似^[36-37]。根据杀菌效果来看, 活性氮类物质杀菌的重要性超过了活性氧物质, 并且滑动弧放电所产生的活性物质会随时间变化而增多, 且主要灭活枯草芽孢杆菌的机理是以 RNS 为主的活性物质对枯草芽孢杆菌膜结构造成了严重的蚀刻和侵蚀作用, 使其内部遗传物质暴露于等离子体物质照射下导致遗传物质被分解氧化^[38-39]。

3 结束语

本文研究了滑动弧放电等离子体处理对枯草芽孢杆菌的失活效果, 在氮气、空气和氧气放电条件下, 氮气的杀菌效果较好, 在 15 s 的处理时间内可降低 4

个对数值。通过表面形貌和电导率测试进一步分析了该技术的灭菌机理, 滑动弧放电等离子体处理对细胞壁造成了氧化性刻蚀作用, 导致细胞壁破损, 并通过细胞流式测试进一步验证了膜的完整性被破坏, 导致细胞坏死。该技术为新型杀菌技术提供了一种新的选择, 在杀菌消毒和食品储藏保鲜领域具有较好的应用前景。

参考文献

- [1] MISRA N N, TIWARI B K, RAGHAVARAO K S M S, et al. Nonthermal plasma inactivation of food-borne pathogens[J]. Food Engineering Reviews, 2011, 3(3/4): 159-170.
- [2] MOREAU M, ORANGE N, FEUILLOLEY M G J. Non-thermal plasma technologies: new tools for bio-decontamination[J]. Biotechnology Advances, 2008, 26(6): 610-617.
- [3] FRIDMAN A, GUTSOL A, CHO Y I. Non-thermal atmospheric pressure plasma[J]. Advances in Heat Transfer, 2007, 40: 1-142.
- [4] MOREAU S, MOISAN M, TABRIZIAN M, et al. Using the flowing afterglow of a plasma to inactivate *Bacillus subtilis* spores: influence of the operating conditions[J]. Journal of Applied Physics, 2000, 88(2): 1 166-1 174.
- [5] SCHLÜTER O, EHLBECK J, HERTEL C, et al. Opinion on the use of plasma processes for treatment of foods[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2013, 57(5): 920-927.
- [6] SUN Yan, ZHANG Zhiwei, WANG Shiqing. Study on the bactericidal mechanism of atmospheric-pressure low-temperature plasma against *Escherichia coli* and its application in fresh-cut cucumbers[J]. Molecules, 2018, 23(4): 975.
- [7] BRUN P, BERNABÈ G, MARCHIORI C, et al. Antibacterial efficacy and mechanisms of action of low power atmospheric pressure cold plasma: membrane permeability, biofilm penetration, and antimicrobial sensitization[J]. Journal of Applied Microbiology, 2018, 125(2): 398-408.
- [8] LAROUCI M, KONG M, MORFILL G, et al. Plasma medicine: applications of low-temperature gas plasmas in medicine and biology[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2012.
- [9] LACOMBE A, NIEMIRA B A, GURTLER J B, et al. Atmospheric cold plasma inactivation of aerobic microorganisms on blueberries and effects on quality attributes[J]. Food Microbiology, 2015, 46: 479-484.
- [10] PÉREZ-PIZÁ M C, PREVOSTO L, GRIJALBA P E, et al. Improvement of growth and yield of soybean plants through the application of non-thermal plasmas to seeds with different health status[J]. Heliyon, 2019, 5(4): e01495.
- [11] LI Shuran, HUANG Yifan, WANG Feifei, et al. Fundamentals and environmental applications of non-thermal plasmas: multi-pollutants emission control from coal-fired flue gas[J]. Plasma Chemistry and Plasma Processing, 2014, 34(3): 579-603.
- [12] KWON W T, LEE W S. A study on combined processes of sliding arc plasma and corona dielectric barrier discharge for improve the efficiency treatment of harmful substance[J]. Fire Science and Engineering, 2014, 28(6): 108-113.
- [13] 孙岩洲, 石兴民, 王辉, 等. 介质阻挡放电电灭枯草杆菌芽孢的电镜观察[J]. 高压电器, 2005, 41(1): 10-11, 15.
SUN Yanzhou, SHI Xingmin, WANG Hui, et al. Electronmicroscopic observation on sterilization effect with dielectric barrier discharge[J]. High Voltage Apparatus, 2005, 41(1): 10-11, 15.
- [14] 熊青. 大气压低温等离子体射流的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.
XIONG Qing. Investigations of atmospheric pressure low-temperature plasma jets[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2013.
- [15] 李成柳. 大气压辉光放电等离子体的产生及灭菌应用[D]. 北京: 北京交通大学, 2008.
LI Chengliu. Generation of atmospheric-pressure glow discharge and its application to sterilization[D]. Beijing: Beijing Jiaotong University, 2008.
- [16] 倪盈. 低温等离子体杀菌的实验研究[D]. 北京: 北京工业大学, 2009.
NI Ying. Experimental study of non-thermal plasma sterilization[D]. Beijing: Beijing University of Technology, 2009.
- [17] 邵涛, 章程, 王瑞雪, 等. 大气压脉冲气体放电与等离子体应用[J]. 高电压技术, 2016, 42(3): 685-705.
SHAO Tao, ZHANG Cheng, WANG Ruixue, et al. Atmospheric-pressure pulsed gas discharge and pulsed plasma application[J]. High Voltage Engineering, 2016, 42(3): 685-705.
- [18] MENDES-OLIVEIRA G, JENSEN J L, KEENER K M, et al. Modeling the inactivation of *Bacillus subtilis* spores during cold plasma sterilization[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2018, 52: 334-342.
- [19] HUANG Y H, YE X P, DOONA C J, et al. An investigation of inactivation mechanisms of *Bacillus amyloliquefaciens* spores in non-thermal plasma of ambient air[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018, 99(1): 368-378.
- [20] ROTH S, FEICHTINGER J, HERTEL C. Characterization of *Bacillus subtilis* spore inactivation in low-pressure, low-temperature gas plasma sterilization processes[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 108(2): 521-531.
- [21] HERTWIG C, STEINS V, REINEKE K, et al. Impact of surface structure and feed gas composition on *Bacillus subtilis* endospore inactivation during direct plasma treatment[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 774.
- [22] REINEKE K, LANGER K, HERTWIG C, et al. The impact of different process gas compositions on the inactivation effect of an atmospheric pressure plasma jet on *Bacillus spores*[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2015, 30: 112-118.
- [23] HONG Y F, KANG J G, LEE H J, et al. Sterilization effect of atmospheric plasma on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* endospores[J]. Letters in Applied Microbiology, 2009, 48(1): 33-37.
- [24] PINA-PÉREZ M C, MARTINET D, PALACIOS-GORBA C, et al. Low-energy short-term cold atmospheric plasma: controlling the inactivation efficacy of *Bacterial spores* in powders[J]. Food Research International, 2020, 130: 108921.
- [25] GONG Xiangjie, LIN Yanchun, LI Xiaodong, et al. Decomposition of volatile organic compounds using gliding arc discharge plasma[J]. Journal of the Air & Waste Management Association, 2019, 70(2): 138-157.

- [26] 李和平, 于达仁, 孙文廷, 等. 大气压放电等离子体研究进展综述[J]. 高电压技术, 2016, 42(12): 3 697-3 727.
LI Heping, YU Daren, SUN Wenting, et al. State-of-the-art of atmospheric discharge plasmas [J]. High Voltage Engineering, 2016, 42(12): 3 697-3 727.
- [27] 鲁娜, 孙丹凤, 王冰, 等. 交流旋转滑动弧的放电特性[J]. 高电压技术, 2018, 44(6): 1 930-1 937.
LU Na, SUN Danfeng, WANG Bing, et al. Discharge characteristic of AC rotating gliding arc [J]. High Voltage Engineering, 2018, 44(6): 1 930-1 937.
- [28] 李平, 穆海宝, 喻琳, 等. 低温等离子体辅助燃烧的研究进展、关键问题及展望[J]. 高电压技术, 2015, 41(6): 2 073-2 083.
LI Ping, MU Haibao, YU Lin, et al. Progress, key problems and prospect on low temperature plasma assisted combustion[J]. High Voltage Engineering, 2015, 41(6): 2 073-2 083.
- [29] MOEEAU M, ORANGE N, BRISSET J L. Application of electric discharges at atmospheric pressure and ambient temperature for biodecontamination[J]. Ozone Science and Engineering, 2005, 27(6): 469-473.
- [30] MOREAU M, FEUILLOLEY M G J, VERON W, et al. Gliding arc discharge in the potato pathogen *erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*: mechanism of lethal action and effect on membrane-associated molecules [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(18): 5 904-5 910.
- [31] SUN P, WU H, BAI N, et al. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores in water by a direct-current, cold atmospheric-pressure air plasma microjet [J]. Plasma Processes and Polymers, 2012, 9: 157-164.
- [32] GB 4789.2—2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定[S].
- [33] GRATÃO P L, MONTEIRO C C, ROSSI M L, et al. Differential ultrastructural changes in tomato hormonal mutants exposed to cadmium[J]. Environmental and Experimental Botany, 2009, 67(2): 387-394.
- [34] KIM S J, JOH H M, CHUNG T H. Production of intracellular reactive oxygen species and change of cell viability induced by atmospheric pressure plasma in normal and cancer cells [J]. Applied Physics Letters, 2013, 103(15): 153705.
- [35] 王小媛, 丁俊豪, 赵光远, 等. 高压微射流对铁棍山药汁中微生物的杀菌效果及机制初探[J]. 食品科技, 2018, 43(2): 70-76.
WANG Xiaoyuan, DING Junhao, ZHAO Guangyuan, et al. The effect of high pressure microfluidization on the sterilization efficacy in yam juice and preliminary study on the bactericidal mechanism[J]. Food Science and Technology, 2018, 43(2): 70-76.
- [36] HERTWIG C, REINEKE K, RAUH C, et al. Factors involved in *Bacillus* spore's resistance to cold atmospheric pressure plasma[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2017, 43: 173-181.
- [37] Surowsky B, Schlüter O, Knorr D. Interactions of non-thermal atmospheric pressure plasma with solid and liquid food systems: a review[J]. Food Engineering Reviews, 2014, 7(2): 82-108.
- [38] BOUDAM M K, MOISAN M, SAOUDI B, et al. *Bacterial spore* inactivation by atmospheric-pressure plasmas in the presence or absence of UV photons as obtained with the same gas mixture [J]. Journal of Physics D Applied Physics, 2006, 39(16): 3 494.
- [39] SINGH M K, OGINO A, NAGATSU M. Inactivation factors of spore-forming bacteria using low-pressure microwave plasmas in an N₂ and O₂ gas mixture [J]. New Journal of Physics, 2009, 11: 115027.