

非热滑动弧放电电离气体对大肠杆菌的灭菌效果

孙运金¹ 朱莉华¹ 马挺军² 仝其根^{1,2*}

(¹北京农学院食品科学与工程学院 食品质量与安全北京实验室 北京 102206

²北京农学院食品科学与工程学院 农产品有害微生物及农残安全检测与控制北京市重点实验室
北京 102206)

摘要 为了提高物流运输包装中食品质量和安全性,研发了一款新型的冷杀菌设备——滑动弧放电设备,对食品表面进行灭菌。与传统的杀菌技术相比,该技术具有成本低,杀菌效率高,便携性和绿色无污染等特点。以大肠杆菌为例,分别通过不同的放电介质——氮气、氦气、空气和氧气等来研究杀菌效果,结果发现氧气和氦气放电等离子体杀菌效果最好,同时通过表面形貌和胞外蛋白浓度分析不同种类的滑动弧放电气体的杀菌机理。光发射光谱测试表明,氧气放电含有较低浓度的原子氧,对大肠杆菌产生刻蚀作用,而氦气放电不会改变大肠杆菌的表面形貌,可能产生电击穿效应。由此推测氦气放电失活的机理主要是蛋白质变性,而氧气放电失活的机理是刻蚀作用。本试验结果有利于扩展低温常压等离子体放电技术的杀菌范围。

关键词 滑动弧放电; 气体种类; 大肠杆菌; 灭菌效果

文章编号 1009-7848(2017)09-0168-07 **doi:** 10.16429/j.1009-7848.2017.09.021

随着冷链物流运输业的不断发展,如果包装良好的话,新鲜食品货架期将进一步延长,从而间接的扩展了销售半径^[1]。虽然新鲜食品可通过降低温度来降低其呼吸强度,但其中含有的营养成分和风味将在环境中存在的各种食源性微生物的侵蚀下不可避免的发生变质和腐败。例如大肠杆菌和沙门氏菌可在长期存在土壤中并在农产品丰收后长期粘附在产品表面,对消费者的健康造成较大的危害^[2]。从另一个角度来说,新鲜的农产品从产地到消费者手中的每一个步骤都有可能造成微生物的污染。因此,如果不对这些新鲜的农产品进行消毒灭菌的话,这些产品将很快腐败变质并提高发生食源性疾病的概率。

对农产品杀菌具有挑战意义的是,新鲜的农产品对热杀菌极为敏感,如蒸汽杀菌、热杀菌等,高温下贮存一段时间往往造成产品内容挥发性物质、营养物质和风味流失。不难看出,新鲜农产品

的灭菌的关键因素就是在保持其风味和质量的情况下避免遭受热效应,即采用冷杀菌技术^[3]。与普通的冷杀菌技术相比,例如过氧化氢溶液、臭氧、环氧乙烷等,空气冷等离子体杀菌技术自从上世纪 90 年代出现以来,是有望代替热杀菌的技术^[4],可有效灭活产品表面的各种致病性微生物,广泛应用于物理化学,生物医药,伤口治疗,组织恢复,生物消毒等^[5-6]。本质上,大气放电等离子体产生活性粒子,带电颗粒和激发光子,是一种非平衡等离子体态,电子能量范围在 1~5 eV,具有良好的微生物失活效果^[7]。

目前为止,虽然等离子体杀菌技术主要研究热点在液体中杀菌失活机制^[8-9],主要是 NO 和 OH 的存在,但在空气的应用研究较少,目前仅把杀菌机制看作是一个各种颗粒共同参与的复杂的协同效应。本文主要研究室温下大气滑动弧放电对大肠杆菌的灭菌效果,研究在空气环境下大气放电对微生物的失活机制,并为工业化应用提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大肠杆菌 (*Escherichia coli* ATCC8099),中

收稿日期: 2017-06-24

基金项目: 北京市教育委员会重点学科建设项目
(pxm2014-014207-0000029)

作者简介: 孙运金,男,1982 年出生,博士,讲师

通讯作者: 仝其根 E-mail: tongqigen@163.com

国工业微生物菌种保藏管理中心;Oxoid 胰蛋白胨、Oxoid 酵母浸粉,中海威(北京)基因科技有限公司;氯化钠(分析纯),北京化工厂;琼脂粉,北京篮弋试剂有限公司; N_2 、 O_2 、Ar,北京安欣立业石油液化气销售有限公司;考马斯亮蓝法测蛋白含量测定试剂盒,苏州科铭生物技术有限公司;叔丁醇(分析纯)、戊二醛、无水乙醇(分析纯),国药集团化学试剂有限公司;磷酸氢二钠(分析纯)、磷酸二氢钠(分析纯),北京畅华试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

大气滑动弧放电设备,实验室自制;LDZM-80KCS 型立式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械有限公司;WS-01 型恒温箱,上海精密试验设备有限公司;DL-CJ-1N 型超级洁净工作台,北京东联哈尔仪器制造有限公司;MP5002 型分析天平、MP5002 型分析天平;VFD-21S 型冷冻干燥仪,上海育丰国际贸易有限公司;SU8010 型扫描电子显微镜,天美(中国)科学仪器有限公司;722N 可见分光光度计,上海圣科仪器设备有限公司;AvaSpec-2048-USB2 型光纤光谱仪,北京爱万提斯科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 大气滑动弧放电设备 大气弧光放电设备主要由在陶瓷管中的两个平行铜电极(长度 95 mm,直径 4 mm)和一个交流高压电源组成,试验设备搭建如图 1 所示。两电极间距为 1 cm,电源工作频率为 50 Hz,施加在电极两端的电压为 10 kV。一旦接通电源,由风扇使空气从陶瓷管顶部进

入两电极之间,形成弧光放电,放电面积为 $(100 \times 50) \text{ mm}^2$ 。样品放置在升降台上,可通过控制样品的移动速度和往复运行来调整处理时间。

1.3.2 菌悬液的制备 大肠杆菌(ATCC8099)冻干粉标准菌株在无菌条件下经菌株复溶、复壮、传代各步骤得到第三代培养物,用无菌甘油在 -80°C 保藏菌种。每次使用前,将此菌种以 1%~2% 的接种量接种至 LB 液体培养基(1 g 胰蛋白胨,0.5 g 酵母浸粉,1 g 氯化钠,100 mL 蒸馏水,5 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.4),于水浴恒温振荡器 37°C , 180 r/min 培养 12~16 h 至浓度为 cfu/mL^[10],此浓度可由平板计数法测定得出。该浓度下的菌液在固体培养基上长出的菌落数在 30~300 之间,菌落能够很好地分离开,同时也便于计数。

1.3.3 滑动弧放电杀菌处理 移取 100 μL 稀释度为 10^6 的上述大肠杆菌菌悬液至装有 20 mL LB 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、菌液浓度、杀菌时间及操作日期。每种处理条件做两个平行的平板。将上一步制备好的大肠杆菌样品放置在滑动弧放电设备下方 2 cm,分别将 4 种气体(空气、氩气、氮气、氧气)的流量调节为 40 L/min,接通等离子体高压电源开关,调整放电电压至 2 000 V,利用产生的等离子体分别对大肠杆菌进行不同时间(20, 40, 60, 120, 180, 240, 300 s)的灭菌。不做杀菌处理(0 s)的平板为空白对照组。

1.3.4 菌落总数的测定 将上述处理完的培养皿倒置于 37°C 恒温培养箱培养 24 h,观察结果。依据 GB 4789.2-2010^[11]菌落总数测定法中平板计数法对菌落总数进行计数。

1.3.5 扫描电镜和蛋白质泄漏量的分析 将滑动弧放电处理或未经处理的大肠杆菌样品用 2.5% 的戊二醛溶液在 -4°C 固定过夜^[12]。用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次后,在 1% 的锇酸和 0.1 mol/L PBS 混合液中固定 2 h。然后用相同的缓冲液洗涤 3 次后进行一系列的乙醇梯度脱水,乙醇的体积比例分别为 10%, 30%, 50%, 70%, 90%, 95%, 100%, 100%^[13]。脱水后的样品用叔丁醇置换 3 次,经 vfd-21s 冷冻干燥机干燥成粉末后电镀膜金,用于扫描电镜分析。

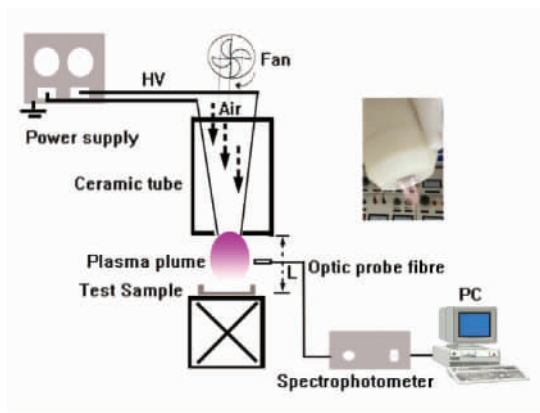


图 1 大气滑动弧放电设备图

Fig.1 Schematic diagram of atmospheric gliding arc discharge equipment

将上述 1.3.2 节制备的大肠杆菌悬浮液在 4 500 r/min 下离心 15 min, 沉淀涂于无菌载玻片后晾干, 置于大气弧光放电处理不同时间。用无菌生理盐水冲洗样品制成悬浮液后于 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液与考马斯亮蓝溶液结合后在 595 nm 波长下测定吸光度^[14-15], 即蛋白质泄漏值取决于吸光度的变化。

1.3.6 滑动弧放电发射光谱测试 发射光谱(OES)测量可以用来确定等离子体放电产生的物质成分及其发射强度, 通过计算分析获得激发态组分和气体温度等^[16], 进一步分析探究滑动弧放电的灭菌机理。按照 1.3.3 的参数设置空气、氮气、氧气、氩气 4 种气体等离子体放电条件, 调节气体流量为 40 L/min, 放电电压为 2 000 V, 将波长范围为 200~900 nm 的光纤光谱仪的光纤探头放置

在等离子体炬横向距离 2 cm 处, 采集滑动弧放电发射光谱。

2 结果与讨论

2.1 空气放电对大肠杆菌灭菌效果的影响

大气滑动弧放电是低温等离子体放电中的一种常见形式, 与等离子体射流、介质阻挡放电相比, 放电时产生的热量较多, 温度通常在 50~200 °C, 本研究采用的放电气体的流量在 40~100 L/min, 足以将等离子体放电中心区域的热量及时散发。为了保证数据更加精确, 我们对对照样品采用热吹风来模拟大气滑动弧放电的热气流, 试验结果表面大气滑动弧放电对大肠杆菌的杀菌效率较高, 如图 2 所示, 以空气做为放电介质, 放电 60 s 可完全灭杀所有的大肠杆菌。

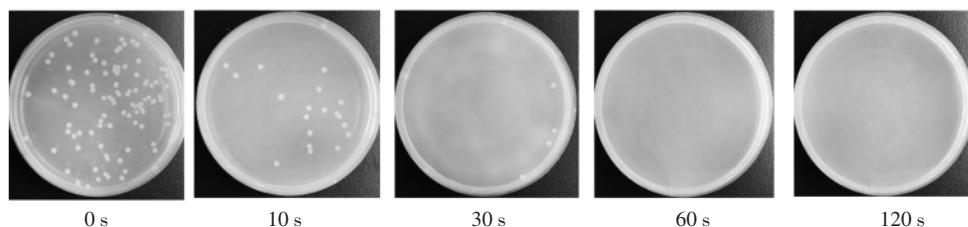


图 2 大肠杆菌菌落总数随大气滑动弧放电处理时间的变化

Fig.2 The change of the cfu of *Escherichia coli* with the atmosphere gliding arc discharge time

2.2 放电介质对大肠杆菌灭菌效果的影响

为了进一步分析不同的放电介质对大肠杆菌杀菌效果的影响, 除了空气之外, 分别通入氮气、氧气和氩气气体形成放电等离子体处理大肠杆菌的培养基, 结果如图 3 所示。由图可看出, 不同的放电介质对大肠杆菌的杀菌效果差别较大, 氮气放电的杀菌效果最差, 随着杀菌处理时间延长至 300 s 时, 菌落总数仅从 8.5 cfu/mL 降低至 7.7 cfu/mL, 空气的杀菌效果相对较好, 菌落总数最大可降至 7.4 cfu/mL, 氧气和氩气的杀菌效果最好, 菌落总数可降低至 5.5~6.0 cfu/mL, 降低了 4 个 lg 值, 远高于等离子体射流和介质阻挡放电杀菌技术^[17-18]。虽然氧气和氩气对大肠杆菌均具有良好的杀菌效果, 但二者放电模式差别较大。氧气做为一种电离电压较高的气体, 难以形成大气放电, 放电过程伴随较高的热量, 而氩气做为一种惰性气体,

电离电压较低, 比氧气低 300~500V, 相对比较容易形成滑动弧放电, 放电过程产生热量较小。同

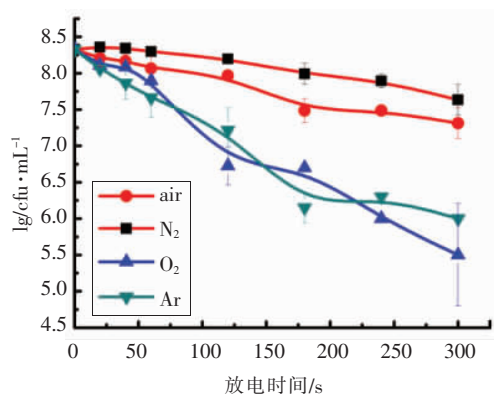


图 3 不同种类的放电介质对大肠杆菌的杀菌效果的影响

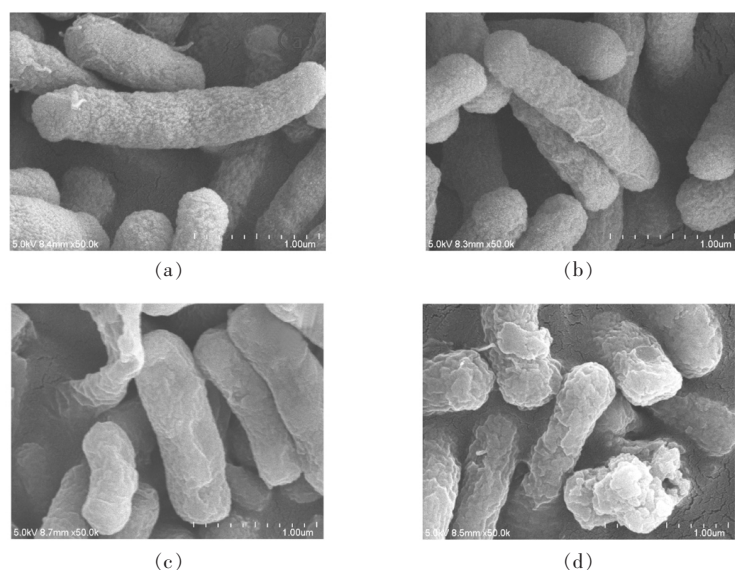
Fig.3 Effect of the different discharge media on Sterilization effect of *E.coli*

时,氮气的放电电压和空气的放电电压差别较小,介于氧气和氩气放电气压之间。结合以上的 4 种气体可推断,不同的放电气体对大肠杆菌的杀菌机制并不一样,这可通过对大肠杆菌的表面形貌和光谱测试进一步来分析。

2.3 大肠杆菌 SEM 分析

不同气体放电后的大肠杆菌的表面形貌如图 4 所示,对照样表面光滑,没有褶皱和缺陷,如图 4a 所示。氩气放电处理的样品表面与对照样相比没有较大的变化,氮气放电处理的样品表面有部

分脱落,而氧气处理的样品出现严重的分层脱落,导致大肠杆菌的尺寸变小,甚至部分区域只剩下碎片,氧气放电形成的等离子体对大肠杆菌的表面刻蚀作用较为严重。结合菌落总数的测量结果,氩气处理的杀菌效果与氧气的一致,但表面形貌却表现为较大的差异,这可能是由于两种气体放电形成的等离子体具有不同的致病机理,为此我们进一步通过胞外蛋白浓度和光发射光谱进一步来分析表征。



注:(a)对照样;(b)氩气;(c)氮气;(d)氧气,放电处理时间均为 30 s。

图 4 在不同放电气体形成的滑动弧放电等离子体下大肠杆菌的表面形貌的扫描电镜图

Fig.4 SEM image on the surface morphology of *E. coli* under gliding arc discharge plasma with different discharge gas

2.4 滑动弧放电对大肠杆菌蛋白质泄露量的影响

不同种类的放电气体形成的等离子体处理后,大肠杆菌的胞外蛋白浓度的变化如图 5 所示,氮气处理样品的胞外蛋白浓度随处理的时间的延长基本保持不变,空气放电处理后胞外蛋白浓度随处理时间的延长逐渐增加至一固定水平,氧气放电处理后胞外蛋白浓度不断升高并在处理时间为 150 s 后逐渐达到固定高度,约为空气处理的一倍。氩气处理后的胞外蛋白浓度接近空气的情况,与氧气相比存在较大的差异,这与表面形貌的结果类似。胞外蛋白浓度的升高主要是由于气体

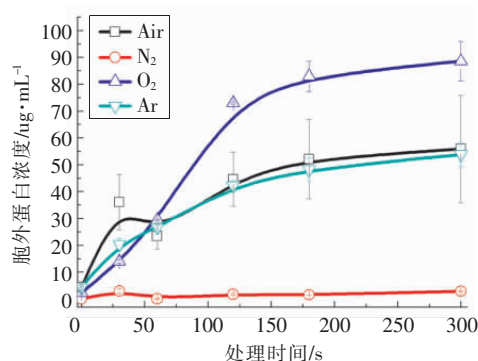


图 5 大肠杆菌胞外蛋白浓度随不同气体放电处理持续时间的变化

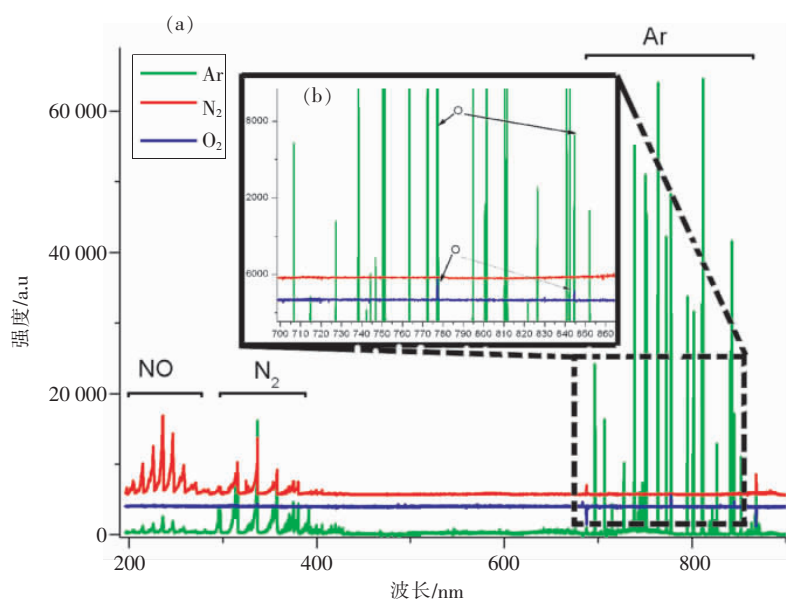
Fig.5 Change of the Extracellular Protein concentration with different gases discharge treatment durations

放电形成的等离子体对细胞膜的降解造成,不同的放电气体产生不同种类的活性基团和带电颗粒,从而对胞外蛋白产生不同的作用。

2.5 滑动弧放电发射光谱分析

气体电离形成的等离子体中的活性物质的种类可由光发射光谱进行检测,如图6所示。氮气放电等离子体中主要含有NO和 N_2^* 基团,这与液体放电形成的物质种类一致,但NO在空气中不能形成具有氧化杀菌作用的 HNO_2 根离子,而 N_2^* 仅具有发光效应,没有杀菌效果,由此可推断氮气放电等离子体在大气环境下基本没有杀菌效果,这与图2中菌落总数的测量结果一致。对于氧气放电等离子体来说,存在的粒子种类仅有位于777 nm、845 nm的一种基团—— O^* ,该种粒子具有非常强的氧化效应,可对细胞膜产生刻蚀作用并降

解胞外蛋白大分子,这与图4、图5的数据一致。同时,氩气放电形成的等离子体同样还有较高的 O^* 浓度,此浓度远远超过了氧气等离子体中的浓度,同时在对应在 N_2 放电图谱中出现的NO和 N_2^* 也出现在氩气等离子体图谱中,并且各种粒子的强度都要强于其它气体等离子体中的强度,特别是 O^* 为氧气放电的500倍,表明氩气电离时会强烈的激发周围空气分子,将空气中含有的氮气和氧气高度电离,从而产生较高的电子浓度和离子浓度的等离子体^[9]。较高离子和电子浓度的等离子体将会对大肠杆菌产生电击穿效应^[20],电子的渗透将进一步破坏胞内蛋白大分子的特殊功能基团,导致代谢停止,但具体的机理还需要进一步深入研究。



注:(b)图为(a)图的虚线框部分放大图。

图6 氮气、氧气和氩气放电形成的等离子体的光发射光谱图

Fig.6 Emission spectroscopy of discharge plasma formed by N_2 , O_2 and Ar

3 结论

本文设计并搭建了大气滑动弧放电设备,并将大气滑动弧放电技术应用于大肠杆菌的灭活试验并探究其灭菌机理。菌落计数结果表明该技术能够有效灭活大肠杆菌,以氧气和氩气作为放电介质效果最好,其次是空气,氮气最差。表面形态测试表明,上述4种气体均对大肠杆菌细胞表面

产生不同程度的损伤,结合蛋白质测试结果,发现除氮气放电外,其它3种气体均使大肠杆菌细胞内蛋白质发生不同程度的泄漏。此外,光谱分析结果表明氧气等离子体主要通过原子氧对细胞膜产生刻蚀作用,破坏细菌细胞壁和细胞膜使得蛋白质等内容物泄漏,进而导致细菌死亡,而氩气主要通过电击穿效果,使蛋白质变性,对细胞膜的损伤

较小,但具体导致细胞代谢停止的功能基团还需进一步研究。总之,大气滑动弧放电对大肠杆菌具有很好的杀灭作用,其灭菌机理还需进一步验证,还需进一步探究该技术对其它菌种的杀菌效果。

参 考 文 献

- [1] AMIN N O, RICHARD A H. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review[J]. Food Microbiology, 2012, 32(1): 1-9.
- [2] LILTVED H, HEKTOEN H, EFRAIMSEN H. Inactivation of bacterial and viral fish pathogens by ozonation or UV irradiation in water of different salinity[J]. Aquacultural Engineering, 1995, 14(2): 107-112.
- [3] GREGORY F, GARY F, ALEXANDER G, et al. Applied plasma medicine[J]. Plasma Processes and Polymers, 2008, 5: 503-533.
- [4] MOREAU M, ORANGE N, FEUILLOLEY M G J. Non-thermal plasma technologies: New tools for bio-decontamination[J]. Biotechnology Advances, 2008, 26: 610-617.
- [5] SARA B, WERNER B H, SUSANNE N, et al. Impact of cold atmospheric pressure plasma on physiology and flavonol glycoside profile of peas (*Pisum sativum* 'Salamanca')[J]. Food Research International, 2015, 76(1): 132-141.
- [6] CHRISTIAN H, KAI R, JG E, et al. Impact of remote plasma treatment on natural microbial load and quality parameters of selected herbs and spices[J]. Journal of Food Engineering, 2015, 167: 12-17.
- [7] SCHNEIDER S, LACKMANN J W, ELLERWEG D, et al. The role of VUV radiation in the inactivation of bacteria with an atmospheric pressure plasma jet[J]. Plasma Processes and Polymers, 2012, 9: 561-568.
- [8] ZHOU R W, ZHANG X H, ZONG Z C, et al. Reactive oxygen species in plasma against *E.coli* cells survival rate[J]. Chinese Physics B, 2015, 24(8): 085201.
- [9] HAO X L, AMBER M M, CHELSEA M E, et al. Nitric oxide generation with an air operated non-thermal plasma jet and associated microbial inactivation mechanisms[J]. Plasma Processes and Polymers, 2014, 11: 1044-1056.
- [10] XU Z M, SHEN J, ZHANG Z L, et al. Inactivation effects of non-thermal atmospheric-pressure Helium plasma jet on *Staphylococcus aureus* biofilms[J]. Plasma Processes and Polymers, 2015, 12: 827-835.
- [11] 卫生部. 食品微生物学检验 菌落总数测定: GB 4789.2-2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010: 1-4.
- [12] DANIELA B A, ERIK W, PATRICK P, et al. Effect of atmospheric pressure cold plasma (APCP) on the inactivation of *Escherichia coli* in fresh produce[J]. Food Control, 2013, 34 (1): 149-157.
- [13] DANA Z, LU H N, PATRICK J, et al. Cold plasma inactivation of internalised bacteria and biofilms for *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 210: 53-61.
- [14] MA Y, ZHANG G J, SHI X M, et al. Bacteria inactivation mechanisms by dielectric barrier discharge[J]. High Voltage Engineering, 2008, 34(2): 363-367.
- [15] DU C M, WANG J, ZHANG L, et al. The application of a non-thermal plasma generated by gas-liquid gliding arc discharge in sterilization[J]. New Journal of Physics, 2012, 14: 013010.
- [16] LU X, JIANG Z, XIONG Q, et al. A single electrode room-temperature plasma jet device for biomedical applications[J]. Applied Physics Letters, 2008, 92: 151504.
- [17] LUÍS F M, RICARDO N P, RUI C M, et al. Moderate electric fields can inactivate *Escherichia coli* at room temperature[J]. Journal of Food Engineering, 2010, 96: 520-527.
- [18] EISUKE T, SATOSHI I, KATSUHIKA K, et al. Molecular mechanism of plasma sterilization in solution with the reduced pH method: importance of permeation of HOO radicals into the cell membrane[J]. Journal of Physics D-Applied Physics, 2013, 46: 295402.
- [19] PETER B, CHRISTOPHE L. Non-thermal plasmas in and in contact with liquids[J]. Journal of Physics D-Applied Physics, 2009, 42: 053001.

- [20] MATTHIAS BAIER, MANDY GÖRGENA, JÖRG EHLBECK B, et al. Non-thermal atmospheric pressure plasma: Screening for gentle process conditions and antibacterial efficiency on perishable fresh produce[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2014, 22: 147-157.

Sterilization Efficacy of Non-thermal Gliding Arc Discharge with Different Discharge Gases on *Escherichia coli*

Sun Yunjin¹ Zhu Lihua¹ Ma Tingjun² Tong Qigen^{1,2*}

(¹Faculty of Food Science and Engineering, College of Food Science and Engineering, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206)

(²Beijing Key Laboratory of Agricultural Product Detection and Control for Spoilage Organisms and Pesticides, College of Food Science and Engineering, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206)

Abstract In order to ensure the food safety and quality of fresh produce during the logistics and transport systems, a novel inactivation equipment called atmospheric gliding arc discharge was developed under different discharge gases of N₂, Ar, Air and O₂. As comparison with traditional sterilization methods, this technology showed lower operational cost, higher sterilization efficacy, great convenience and green non-pollution. Take *Escherichia coli* as sample, sterilization effect was investigated from the view point of different discharge gas species, such as Ar, N₂, Air and O₂, and found that Ar and O₂ discharge plasma excellent sterilized effect. Meanwhile, the surface morphology and extracellular Protein concentration were analyzed to reveal the different inactivation mechanism incurred by different gas discharge plasma. Finally, optical microscopy measurement results indicated that O₂ plasma have a lower ionized degree of atomic oxygen while pose a positive injure to the *Escherichia coli* membrane by etching effect. In contrast, Ar plasma showed minor damage on the surface of *Escherichia coli* membrane, and result in electric breakdown. Thus, it can be deduced that the main factor contributed to the death of *Escherichia coli* may be due to the protein denaturation for Ar plasma and plasma etching effect for O₂ plasma, our results pose a positive favor to enlarge the commercial sterilization application of low temperature atmospheric discharge technology.

Keywords gliding arc discharge; gas species; *Escherichia coli*; sterilization effect

信息窗

日本 15 年的跟踪调查发现:多摄取富含镁食物可降低心肌梗塞风险

日本国立癌症研究中心和日本国立循环系统疾病研究中心发表消息称,对 8 万 5 千人进行了 15 年的跟踪调查,结果发现:多摄取富含镁的食物可降低心肌梗塞等虚血性心血管疾病风险。

具体研究方法是,以居住在岩手、冲绳等 8 个县的没有癌症或循环器疾病的 45~74 岁居民为调查对象,调查 138 种食物的每日摄取量来推算出镁的摄取量,并根据镁摄取量的多少将调查对象划分为 5 组,并进行心血管疾病发病率比较。其调查结果显示,随着镁摄取量的增加,男性和女性人员中都呈现了虚血性心血管疾病风险降低,比如男性中镁摄取量最高的组与最低的组相比心血管疾病风险降低了 34%。

镁富含于鱼、水果、蔬菜、豆类、海藻等食物中。如果缺乏镁,很容易引起血压上升,动脉硬化等。所以要多摄入富含镁的食物。

(消息来源:食品伙伴网)