

低温等离子体技术灭活细菌芽孢的研究进展

成军虎^{1,2}, 张彦¹, 韩忠^{1,2}

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

(2. 华南理工大学现代食品工程研究中心, 广东广州 510006)

摘要: 芽孢是细菌的一类休眠结构, 经常存在于食品当中, 抗逆性强, 难以灭活, 给食品安全带来挑战。低温等离子体技术为近年来逐渐发展起来的一种新型非热物理杀菌技术, 通过激发气体产生多种活性成分对微生物进行灭活, 杀菌效率高、作用时间短、环保无污染。本文综述了低温等离子体的产生原理、等离子体对芽孢内外结构的影响及影响芽孢灭活的因素等方面的相关内容, 为处理食品中细菌芽孢提供了解决方案和技术支持, 有利于推动低温等离子体在食品微生物杀菌领域的工程化应用。

关键词: 低温等离子体; 芽孢; 产生原理; 内外结构

文章篇号: 1673-9078(2021)04-302-310

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.4.0342

Research Progress on Inactivation of Bacterial Spores by Cold Plasma Technology

CHENG Jun-hu^{1,2}, ZHANG Yan¹, HAN Zhong^{1,2}

(1.School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2.Academy of Contemporary Food Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Spores represent the dormant form of bacteria that are often found in foods, and usually resistant to stress and difficult to inactivate, which poses challenges to food safety. Cold plasma, as a new non-thermal physical sterilization technology, has been gradually developed in recent years. This technology inactivates microorganisms through stimulating gas to generate a variety of active species with high sterilization efficiency, short treatment time, environmental friendliness and minimal pollution. This review summarized the principle of cold plasma production, the influence of plasma on the internal and external structures of spores and the factors affecting the inactivation of spores, which provides solutions and technical support for the treatment of bacterial spores in food, and is conducive to promoting the industrial application of cold plasma in the field of food microbial sterilization.

Key words: cold plasma; spores; principle of production; internal and external structures

引文格式:

成军虎,张彦,韩忠.低温等离子体技术灭活细菌芽孢的研究进展[J].现代食品科技,2021,37(4):302-310

CHENG Jun-hu, ZHANG Yan, HAN Zhong. Research progress on inactivation of bacterial spores by cold plasma technology [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(4): 302-310

细菌芽孢的抗逆性强, 在高低温、强酸强碱、高压、紫外线辐射等恶劣的环境下依然能够存活, 比营养细胞更能抵抗外界不良环境因子。食物中残留的细菌芽孢萌发并大量繁殖之后, 会造成食物腐败变质, 甚至引发疾病, 给食品安全带来很大的风险。

常见的引起食品腐败变质和食源性疾病的芽孢杆菌有蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、酸土脂环酸芽

收稿日期: 2020-04-13

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFD0400404); 广东省级科技创新战略专项资金 (2018D1002); 广州市科学研究计划项目 (201804010469)

作者简介: 成军虎 (1983-) 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品质量与安全检测技术与新型物理加工调控技术

孢杆菌 (*Alicyclobacillus acidoterrestris*)、嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) 等。蜡样芽孢杆菌常残留于饭类、肉类及奶类食物中, 能够产生呕吐毒素和多种肠毒素, 引发呕吐和腹泻, 在常温下储存含有蜡样芽孢杆菌的奶粉, 一天之后能检测出呕吐毒素^[1]。脂环酸芽孢杆菌极耐酸、耐热, 能在 pH 2.0~6.0 和 25~60 °C 的温度下生长繁殖^[2], 常存在于水果和蔬菜表面, 是引起果汁腐败变质的主要菌种, 特别是巴氏消毒后的果汁^[3]。

一般而言, 细菌芽孢的形成是由外界营养物质的不足引起的, 其过程复杂, 主要经历的几个阶段如图 1 所示^[4]。芽孢形成的第一个标志为不对称隔膜的出

现, 在细胞中央或一端, 细胞膜内陷形成隔膜, 产生小细胞。其后, 小细胞被多层膜包裹逐步形成芽孢, 在这个过程中, 矿物质元素和多种化合物被运输进孢内, 芽孢内的 pH 值维持在较低的水平以减少代谢活动, 芽孢核内含水量处于 30%~40% (营养细胞一般能达到 70%~80%), 此为芽孢的抗逆性提供了一定基础^[5]。芽孢的这一特殊结构具有强稳定性, 可以忍受极端环境, 包括高温、辐射、化学抗性, 因此通常难以灭活, 给食品加工领域带来挑战。细菌芽孢的灭活已成为当前研究的热点, 而传统的灭菌方法如湿热杀菌、脉冲紫外线处理、辐射法等都存在不足之处, 热加工会引起食物质地、风味和营养的变化, 脉冲紫外线处理在光的穿透性、光子和微生物接触等方面有一定的限制性, 而 X、 γ 射线和电子束的杀菌方式则需要高成本的投入^[6]。

低温等离子体技术是近几年发展起来的新型非热杀菌技术。等离子体是指部分或全部电离的气体, 主要由自由电子、离子、紫外线 (UV) 光子以及由处于基态或激发态的原子组成的活性氧物质 (Reactive oxygen species)、活性氮物质 (Reactive nitrogen species), 通常被称为物质的第四态。在食品领域, 已有研究表明, 通过激发气体放电产生等离子体, 能够抑制食品中的酶, 对食品中存在的微生物进行灭活^[7,8], 并且对微生物芽孢的灭活有着明显的优势(表 1)。

表 1 不同等离子体对芽孢的灭活处理

Table 1 Different plasma treatments on the inactivation of bacterial spores

细菌芽孢类型	等离子体类型	处理条件	灭活效果	参考文献
淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	介质阻挡放电	空气, V= \sim 2.3 kV, f= \sim 29 kHz, t=6 min	未检测到存活的芽孢	[9]
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	低压双电感耦合等离子体	N ₂ 和 O ₂ (v=16 sccm:4 sccm), P=500 W, P=5 Pa, t=15 s	>log ₅ (cfu/mL)	[11]
艰难梭状芽孢杆菌 <i>Clostridium difficile</i>	半封闭式介质阻挡放电	He 和 O ₂ (0.5%), V= \sim 6 kV, f=20 kHz, t=5 min	\sim 3 log(cfu/100 μ L)	[12]
蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	微波氦气联合等离子体	He, P=250 W/cm ² , P=900 W, d=24 cm, t=40 min	2.1 log spores/cm ²	[10]
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	空气介质阻挡放电	空气, V=80 kV, d=10 mm, t=5 min	3.44 log ₁₀ (cfu/mL)	[13]
萎缩芽孢杆菌 <i>Bacillus atrophaeus</i>	沿面介质阻挡放电	N ₂ , V= \sim 20 kV, f=15 kHz, t=2 min, P=350 W	5.1 log ₁₀	[14]
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	射频等离子体	O ₂ (v=1sccm), B=14 T, f=13.56 MHz, t=120 min, P=100 W	4.3 log	[15]
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	介质阻挡放电	空气, V= \sim 14 kV, f=60 Hz, t=3 min	>5 logs	[16]
嗜热脂肪芽孢杆菌 <i>Bacillus stearothermophilus</i>	N ₂ /O ₂ 表面微波等离子体	N ₂ , f=2.45 GHz, P=800 W, t=2 min	6 log	[17]

目前, 较为常见的气体放电方式为介质阻挡放电和电晕放电。Huang^[9]等在空气介质阻挡放电 6 min 的条件下, 实现了对淀粉芽孢杆菌芽孢的全部灭活。同时, 低温等离子体也可与其他技术联合处理^[10], 微波联合氦气等离子处理洋葱粉末中蜡样芽孢杆菌 40 min, 芽孢的数量减少 2.10 log spores/cm²。

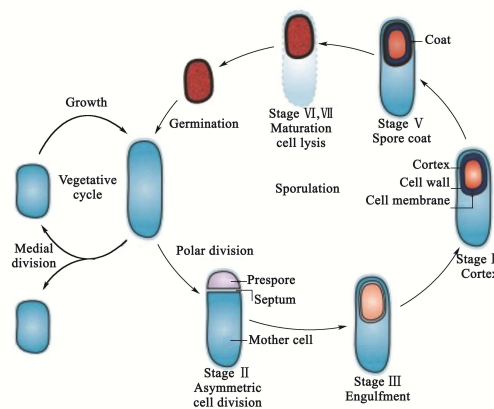


图 1 芽孢形成过程示意图^[4]

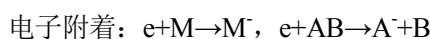
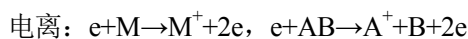
Fig.1 The process of sporulation

由于低温等离子体技术具有不需要提供高的压强、消耗能量少、实验操作较为简单及设备支出费用相对较低, 且在较温和的条件下, 能够较大程度保持了食品色泽、质构、营养成分, 可以应用于水果、蔬菜、肉类、海鲜等食品的杀菌, 在食品领域具有广阔的发展前景。

1 低温等离子体技术

等离子体分为热等离子体和非热等离子体，非热等离子体中又包括平衡（100~150℃）和非平衡（<60℃）等离子体。在非平衡体系中冷却离子和中性分子比通过转移电子的能量更有效，且气体能保持较低的温度。因此，非平衡等离子体也称为低温离子体，一般通过放电激发气体获得。

在放电过程中，高密度的电子通过气态介质在电场中被加速，使电子和气体中的原子及分子发生初次大量碰撞，这些碰撞会改变电子的方向和能量，但是由于质量差异，一些质量较大的粒子在碰撞过程中几乎没有动量传递，使得它们能保持接近外界环境的温度。当电子与原子或分子碰撞时，会发生一系列反应，反应的概率与电子的能量有关，包括^[6]：



式中，M，A，B为原子；AB为分子。

对于在大气压下空气等离子，氧气和氮气经过电离、离解等反应生成基态或激发态的粒子如 O(3P)、O(1D)、N(4S)等，它们具有比单分子之间碰撞具有更低的活化能，与电子发生二次碰撞，进一步生成大量的活性氧、活性氮物质。同时，伴随着电子跃迁，会产生大量的紫外线，在紫外线和这些活性成分的作用下，对芽孢进行灭活。

2 低温等离子体对芽孢内外部结构的影响

芽孢具有极强的抗逆性，但其抵御外界极端条件的机制仍然没有很明确的说法。近年来的实验研究发现，可能的原因主要有以几点^[18-21]：一是芽孢具有多层膜保护，芽孢衣、皮层、芽孢壁多层膜结构紧密复杂。二是芽孢形成时原生质体脱水和矿化导致内部含水量较低，产生吡啶二羧酸钙盐，内部 pH 在 6.30~6.40 范围内，可防止蛋白质解折叠，质子化和去质子化，从而稳定芽孢结构。三是芽孢内含有耐热小分子酶、酸溶蛋白等，耐热小分子酶在高温情况下仍具有一定活力抵御外界环境的影响，酸溶蛋白可以与双链 DNA 结合，从而起到保护 DNA 的作用，但不能与 RNA 或单链 DNA 结合。

通过低温等离子体处理，可以在一定程度上实现对芽孢外部膜结构、膜蛋白以及内部酶活性、DNA 双螺旋分子的改变，从而灭活芽孢（图 1）。目前已有文献表明^[22-25]，低温等离子体对芽孢灭活的机理主要有：

(1) 等离子体中的活性氧、活性氮物质对芽孢衣蛋白和肽聚糖皮质层有刻蚀作用，增加膜的透过性；(2) 激发气体所产生的紫外线（200~400 nm）对芽孢衣蛋白具有光子氧化作用，对芽孢内 DNA 分子双螺旋结构具有破坏作用；(3) 活性氧、活性氮物质通过扩散进入芽孢内，对细胞质膜、细胞质中的蛋白以及 DNA 产生不可逆的改变。以上三种方式联合作用于芽孢，最终使芽孢破裂，实现对芽孢的灭活。

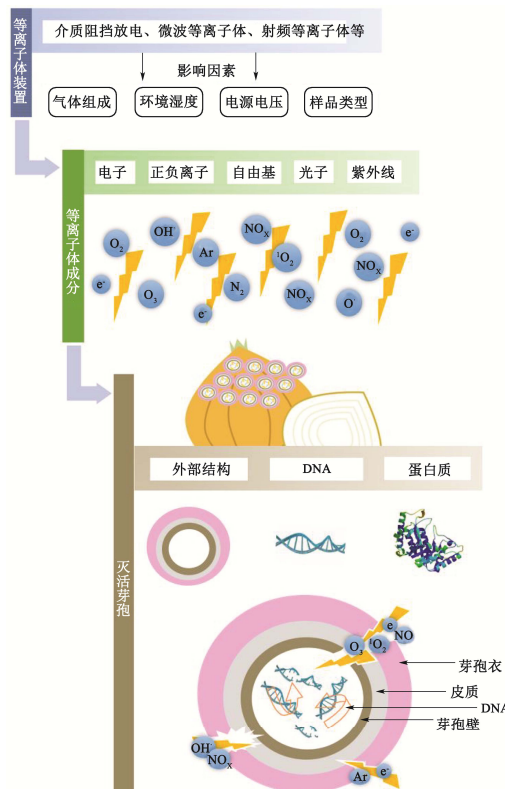


图2 低温等离子体灭活芽孢的机制

Fig.2 The mechanisms of cold plasma on inactivation of bacterial spores

在低温等离子体处理下，对芽孢外部结构影响主要表现为芽孢形态的改变、等离子体中的活性氧、活性氮物质对芽孢外层膜的刻蚀作用以及膜组成成分的改变。使用四组气体（Ar，Ar+N₂，Ar+O₂，N₂+O₂）处理枯草芽孢杆菌，通过扫描电镜可以观察到芽孢长度逐渐减小^[26]。Huang^[9]等在大气压下使用空气介质阻挡放电对解淀粉芽孢杆菌进行 1~5 min 的处理，与对照组相比，电镜照片中所有的芽孢外层结构均发生改变（图 3a），在干燥情况下处理 3 min 的芽孢外层膜都被等离子体产生的活性物质和紫外线光子蚀刻，并且可以观察到在表层有渗出物（图 3d 箭头所指），在干燥情况下处理 5 min 后的芽孢刻蚀程度更高，并且在皮层出现可见孔洞（图 3e 箭头所指）。而 1 min 湿润条件下处理，对芽孢外层膜的刻蚀程度比干燥情况下更严重（图 3f），这也印证了后文中环境湿度的增加

能提高芽孢灭活效率的结论。同时, 通过对比处理前后的芽孢进行傅里叶变换衰减全反射红外光谱分析发现, 芽孢膜中的蛋白质性质与空间结构均发生了显著变化, 低温等离子体处理后出现主要的三个峰值在波数为 1558 cm^{-1} 、 1656 cm^{-1} 及 1515 cm^{-1} 处, 1558 cm^{-1} 的峰对应于酰胺 I 带中碳氧双键的延伸, 1656 cm^{-1} 处的峰与酰胺 I 带中蛋白质 α 螺旋结构改变有关, 1515 cm^{-1} 峰值处的酪氨酸带向下移位, 表明蛋白质有可能发生聚集^[27,28]。同时, 为探究芽孢膜蛋白对等离子体的敏感性, 对四种芽孢杆菌突变体进行等离子体灭活处理, 四种突变体的芽孢膜上分别缺失四种特定的蛋白, 结果发现, 四种芽孢的存活率依赖于缺失的特定蛋白^[29]。且处理一定时间后芽孢能够几乎全部释放出细胞质中的吡啶二羧酸钙盐, 分析可能与芽孢膜中脂质物质的改变有关^[30,31]。

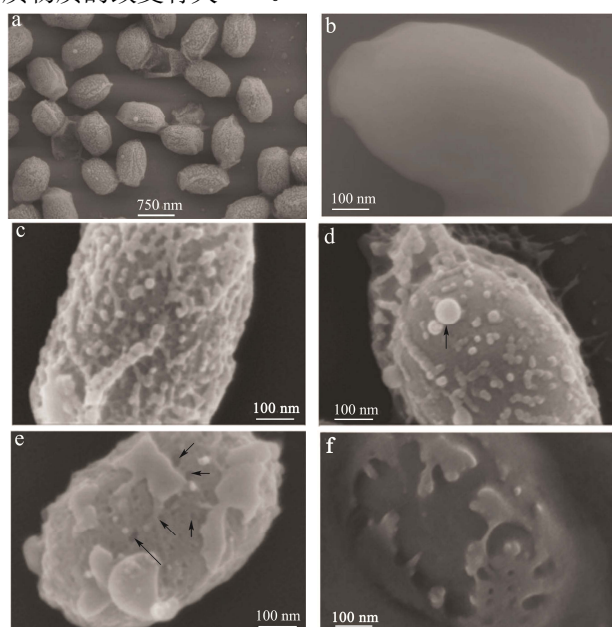


图3 低温等离子体对芽孢膜的刻蚀作用 (Huang 2019)

Fig.3 Etching effects of cold plasma on the spore membrane

(This figure is adapted by Huang 2019)

注: 图 a 为处理 1 min; 图 b 为对照组; 图 c 为干燥下处理 1 min; 图 d 为干燥下处理 3 min; 图 e 为干燥下处理 5 min; 图 f 为湿润环境下处理 1 min。

对芽孢内部结构影响主要表现为细胞质中吡啶二羧酸钙盐的含量降低、芽孢内酶活性改变以及对芽孢内 DNA 的损伤。研究表明, 在等离子体技术处理下, 细胞内吡啶二羧酸钙盐的量随着芽孢暴露时间的增加而降低, 大量吡啶二羧酸钙盐通过芽孢膜渗出, 其中部分也可能已经被等离子体中的活性物质降解^[14]。由于芽孢的抗逆性与其细胞内存有大量的吡啶二羧酸钙盐相关, 其含量的减少能够大幅度提高灭活率^[19,21]。对处理 5 min 的蜡样芽孢杆菌进行拉曼光谱分析^[16],

细胞质中吡啶二羧酸钙盐的含量减少了 21%。此外, Roth 等人发现缺乏能够合成吡啶二羧酸钙盐基因的芽孢杆菌在等离子体的处理下更容易被灭活^[8]。枯草芽孢杆菌内过氧化氢酶活性在等离子体处理下也发生了较大改变, 处理 30 s 后, 过氧化氢酶的活性随处理时间的增加呈线性减小, 且在 15 s 后降到检测线以下^[32]。芽孢内 DNA 携带着与芽孢内新陈代谢相关的信息, 一旦相关的 DNA 受损, 芽孢就很有可能死亡。研究表明, 低温等离子体造成芽孢内的 DNA 损伤, 且主要与激发气体产生的紫外线有关, 特别是激发氮气产生的活性氮物质时, 常常伴随着较高强度紫外线的激发, 产生对芽孢有害的光产物如胸腺嘧啶加合物^[33]。紫外线根据波长可分为 UV-C 区 ($220\sim 280\text{ nm}$)、UV-B 区 ($280\sim 315\text{ nm}$) 和 UV-A 区 ($320\sim 400\text{ nm}$), 不同波长的紫外线的产生受到多种因素的影响如激发气体类型以及等离子体发射源与处理样品之间的距离等, 对 DNA 的损伤和芽孢灭活的贡献率也不尽相同, 目前仍没有统一的结论。Hertwig^[34]使用三组气体 (Ar, Ar+0.14% O₂, Ar+0.14% O₂+0.20% N₂) 对枯草芽孢杆菌进行灭活, 并对灭活过程中芽孢灭活率和 DNA 损伤进行动力学分析, 发现不同气体条件下 DNA 损伤的动力学模型不同。使用不同截止波长的滤光器 (SiO₂, BG24A, MgF₂, WG305 等) 对枯草芽孢杆菌在低温等离子体下处理 10 s^[11], 提取芽孢内 DNA 进行 PCR 扩增。在用 WG305 滤光器 (50%截止波长为 280 nm) 处理时, 芽孢灭活效果最低, DNA 呈现中等损伤。但也有研究表明, 在发射源与样品之间的距离超过 1.5 mm 时, 大气压下激发的 UV-C 区的紫外线会被空气所吸收, 无法达到样品表面, 对于芽孢衣蛋白的氧化作用及 DNA 损伤并不明显^[35], Wang^[16]等处理的样品与等离子体发射源距离 6 mm 时, 没有检测到 UV-C 区紫外线的现象。同时 Pina^[36]等的实验中, 氮气激发的低温等离子体处理下, UV-A 区紫外线所占的比例更大, 在 337 nm, 357 nm, 380 nm 波长处出现三个峰值。此外, 芽孢衣含有与 DNA 修复有关的蛋白如 α/β 型酸可溶蛋白和 DNA 修复蛋白等, 其与修复核酸切除机理相关, 对突变体芽孢 (缺乏 α/β 型酸可溶蛋白) 进行低温等离子体处理的实验中发现, 突变体对于在处理下的环境敏感性增加, 在一定程度上间接表明低温等离子体会损伤芽孢内 DNA, 使芽孢灭活率降低^[35]。但目前对芽孢内外结构特别是 DNA 损伤机制的研究仍较少, 还需更多的实验阐述其分子机理。

3 低温等离子体对芽孢类微生物灭活条件

表 2 影响低温等离子体灭活芽孢的因素

Table 2 Factors that affect the inactivation of bacterial spores by cold plasma

细菌芽孢类型	等离子体类型	条件参数	灭活效果	参考文献
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	表面介质 等离子体	气体组成: 空气, N ₂ , O ₂ , CO ₂	N ₂ (减少 5.1 log(cfu/mL)) >CO ₂ >O ₂ >空气	[14]
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	射频等离子体	气体组成: Ar, Ar+0.14% O ₂ , Ar+0.14% O ₂ +0.20% N ₂	Ar>Ar+0.14% O ₂ +0.20% N ₂ >Ar+0.14% O ₂	[37]
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	微波联合 等离子体	气体组成: Ar, Ar+N ₂ , Ar+O ₂ , N ₂ +O ₂	N ₂ +O ₂ 灭活效果最强	[26]
萎缩芽孢杆菌 <i>Bacillus atrophaeus</i>	介质阻挡放电	气体组成: 空气, 90% N ₂ +10% O ₂ , 65% O ₂ +30% CO ₂ +5% N ₂	65% O ₂ +30% CO ₂ +5% N ₂ > 90% N ₂ +10% O ₂ >空气	[38]
嗜热脂肪芽孢杆菌 <i>Bacillus stearothermophilus</i>	N ₂ /O ₂ 表面微波 等离子体	功率: P=400, 600, 800 W	800 W (芽孢数量减少 6 log(cfu/mL), 长度减少 0.50 μm) >600 W>400 W	[17]
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	大气压-氦气 等离子体	电压 V=3.50, 4.50, 5.50, 6.50 kVt=10 min	6.5 kV (减少 4.00 log(cfu/mL)) > 5.50 kV>4.50 kV>3.50 kV	[39]
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	等离子体射流	电压 V=15, 30 kV t=3, 5 min	30 kV, 5 min (减少 1.63 log(cfu/mL)) >15 kV, 5 min	[40]
蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	电晕放电	电压: 脉冲电源和直流电源, t=10 min	脉冲电源 (减少 2.20 log(cfu/mL)) >直流电源	[23]
蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	微波联合 等离子体	能量密度: 2500, 1700 W/cm ² 水分活度: a _w =0.40, 0.50, 0.90 干燥方式: 远红外干燥, 真空干燥 颗粒大小: 1.50×1.50 cm, 0.50×0.50 cm	2500 W/cm ² >1700 W/cm ² 0.90>0.50>0.40 远红外干燥>真空干燥 0.50×0.50 cm>1.50×1.50 cm	[41]
萎缩芽孢杆菌 <i>Bacillus atrophaeus</i>	大气压下介质 阻挡放电	相对湿度: 3%, 10%, 30%, 50%, 70%	湿度 3%为~5 log(cfu/mL), 湿度 10%为~6 log(cfu/mL)	[38]
嗜热脂肪芽孢杆菌 <i>Bacillus stearothermophilus</i>	表面微放电 等离子体	绝对湿度: 5.50, 10.40, 17.90 g/m ³	17.90 g/m ³ (减少 3 log(cfu/mL)) > 10.40 g/m ³ (~2.50 log(cfu/mL)) > 5.50 g/m ³ (0.50 log(cfu/mL))	[14]
萎缩芽孢杆菌 <i>Bacillus atrophaeus</i>	大气压下介质 阻挡放电	样品接触表面: 亲水性生物膜, 疏水性生物膜	亲水性>疏水性	[13]
艰难梭状芽孢杆菌 <i>Clostridium difficile</i>	半封闭式介质 阻挡放电	细菌类型: TL178, CF5, CD305, CD305, M120	R20291 抗逆性最强	[12]
蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	介质阻挡放电	处理方式: 直接和间接, T=60 s	直接 (减少~6 log(cfu/mL)) >间接	[38]

本部分主要阐述对芽孢类微生物的灭活中, 在气体组成、装置功率、电压、环境湿度、接触样品和处理方式等条件不同对芽孢灭活程度的影响 (表 2)。

3.1 不同气体组成对芽孢类微生物灭活影响

被电离气体的组成成分和比例直接影响到等离子体活性氧、氮物质以及紫外线的产生。目前, 常用于电离的气体有空气、氮气、氧气、二氧化碳、稀有气体等, 其产生的活性氧物质如 O₂、O₃、O (¹D) 等对

芽孢衣、芽胞膜有蚀刻作用; 活性氮物质如 N₂、N⁺等能够通过激发紫外线产生光子造成芽孢内 DNA 的损伤^[42]。

在用干燥空气, 氮气, 氧气和二氧化碳灭活萎缩芽孢杆菌实验中, 用光学发射光谱法研究四种激发气体, 发现氮气等离子体具有最高的发射强度, 且产生紫外线的强度都高于其他三种气体, 可以使芽孢减少 5.10 log(cfu/mL)^[14]。使用 N₂/O₂ 混合的表面微波等离子体处理嗜热脂肪芽孢杆菌^[17], 当气体混合比例为

10% N₂+90% O₂ 时, 氧原子密度达到最大, 扫描电镜图下观察到芽孢膜蚀刻程度最高。在 100% N₂ 条件下, 等离子体所激发的紫外线强度达到最大, 但紫外线强度随着氧气比例的增加而减少。而当混合气体中氧气所占比例在 30%-80%之间时, 氧原子的蚀刻作用协同氮原子产生的紫外线对芽孢进行杀灭, 此时灭活效率最高。

使用四组气体 (Ar, Ar+N₂, Ar+O₂, N₂+O₂) 处理枯草芽孢杆菌, 通过扫描电镜可以观察到芽孢长度逐渐减小, 且在 N₂+O₂ 条件下, 芽孢的长度减小得最快, 速率可达到 3.25 nm/s。处理 240 s 后, Ar, Ar+N₂, Ar+O₂ 三组气体对芽孢的灭活速率几乎相同, 而 N₂+O₂ 对芽孢的灭活速率是其他三组的两倍^[26]。但 Reineke^[37] 等使用三组气体 (Ar, Ar+0.14% O₂, Ar+0.14% O₂+0.20% N₂) 对枯草芽孢杆菌进行灭活的实验中, 对整个过程进行了三个阶段的检测, 发现不同阶段气体灭活效率不同, 而纯氩气总体的灭活效果最强。虽然发射光谱显示在 Ar+0.13% O₂+0.20% N₂ 条件下, 激发的紫外线光子是纯氩气的四倍, 但此时灭活效果次于纯氩气。通常来说, 加氧的氩气会与电子发生碰撞, 从而有助于提供更高水平的与氧有关的自由基与芽孢发生反应, 并破坏芽孢的外部结构。但是, 氧气的负电性可能使氩气与氧气的混合气体易于吸收等离子体中产生的电子, 从而降低了电子能量和密度, 削弱了对芽孢灭活的效率^[43]。Hertwig^[34] 等使用同样三组气体测得结果也为氩气灭活芽孢效果最强。由此可见, 芽孢灭活的程度与气体组成成分和比例有着很大关系, 在使用低温等离子体处理芽孢类微生物时, 还需根据自身处理装置的条件和处理对象选择合适的气体进行实验。

3.2 装置功率和电压的不同对芽孢类微生物灭活影响

在一定条件下, 随着低温等离子体发生装置功率和电压的升高, 芽孢存活率越低^[17,39-41,44]。这是因为激发气体所产生的等离子体浓度特别是活性氮物质的浓度, 与装置的功率和电压呈正相关^[36]。在一定范围内, 所使用的功率或电压越大, 在单位时间内电子的密度和能量越强, 随之产生的等离子体浓度越高, 对芽孢内外结构的改变将会更显著, 从而达到灭活的效果。

Yang^[17] 等人发现, 在灭活处理中, 随着等离子体装置功率的增加, 芽孢长度减小得越显著。使用微波等离子体激发纯氮气处理嗜热脂肪芽孢杆菌, 在功率

为 400 W、600 W 和 800 W 时, 800 W 功率实现了芽孢数量减少的最大值 6 log(cfu/mL), 且在 6 min, 800 W 的处理下, 芽孢长度从 1.80 μm 减小到 1.30 μm。在不同电压下 (V=3.50、4.65、5.50、6.50 kV), 使用大气压-氩气氧气混合等离子体处理枯草芽孢杆菌 10 min, 随着电压的升高, 芽孢数量的减少量从 1.80 log(cfu/mL) 增加到 4 log(cfu/mL)^[39]。在大气压下使用等离子体射流对黑胡椒中的枯草芽孢杆菌在 30 kV 下处理 3 min 和 5 min, 对枯草芽孢杆菌的灭活率都高于在相同时间内 15 kV 的处理, 可以达到 1.63 log(cfu/mL)^[40]。此外, Kovalova^[44] 等研究表明, 电压的类型也会对灭活效果产生影响, 在用电晕放电处理蜡样芽孢杆菌时, 脉冲电源比直流电源效果更好, 但是由于需要考虑到能量的损耗, 目前很难直接比较两种电源处理下对芽孢灭活率的影响, 在这方面还需要更多的研究。

3.3 环境湿度、接触样品和处理方式的不同对芽孢类微生物灭活影响

在电离潮湿空气时, 能产生更多的活性物质如氢氧自由基及 NO、NO_x 等提高灭活效率, 其中占主导因素的为氢氧自由基。对带有萎缩芽孢杆菌样品的密封包装充入干燥空气和相对湿度为 3%、10%、30%、50%、70% 的潮湿空气, 进行介质阻挡放电灭菌, 在潮湿空气下的灭菌效果明显高于干燥空气, 相对湿度为 3% 可以使萎缩芽孢杆菌减少约 5 log(cfu/mL), 相对湿度 10% 达到 6 log(cfu/mL), 高于相对湿度 10% 可以使芽孢完全灭活^[38]。

Los^[13] 等同样使用介质阻挡放电对亲水性和疏水性生物膜上的萎缩芽孢杆菌进行处理, 发现亲水性的生物膜芽孢减少率最大, 达到 4.40 log(cfu/mL)。使用不同的样品接触表面对细菌芽孢的灭活作用效果也不同, 用射频等离子体处理枯草芽孢杆菌, 在玻璃皮氏培养皿中芽孢减少 2.40~2.80 log(cfu/mL), 使用玻璃微珠减少 3.90~4.60 log(cfu/mL), 而用胡椒子作为样品载体芽孢灭活率最高^[34]。若是直接处理含有芽孢类微生物的食品, 则灭活效果与样品的大小也有关。除了接触表面的性质以外, 接触样品的空间结构大小同样会对灭活率产生影响。Kim^[36] 等对不同颗粒大小的红辣椒上的蜡样芽孢杆菌进行处理, 颗粒小的样品有较大的三维空间, 能够使激发的等离子体与辣椒颗粒接触更充分, 处理后芽孢存活率较低, 更适合应用于对微生物灭活。

处理方式在一定程度上也影响着等离子体处理后

芽孢的存活率。激发气体产生的低温等离子体直接接触样品处理通常比间接接触效果好,使用三种不同气体(Air、90% N₂+10% O₂)直接或间接通过介质阻挡放电处理萎缩芽孢杆菌,使用空气间接处理薄膜包裹下的细菌芽孢样品 30 s 和 60 s 后,灭活效果较低且相差不大。而直接处理 60 s 芽孢存活率显著降低。同时,65% O₂+30% CO₂+5% N₂ 直接接触处理 60 s 后获得最高灭活率,芽孢至少减少 6 log(cfu/mL)^[38]。此外,研究发现,加入其他物质与样品细菌协同处理能提高芽孢的灭活率。金属氧化物二氧化钛具有微生物灭活和分解化学物质的能力,将二氧化钛与带有芽孢的细菌混合,联合射频等离子体进行灭活处理,能产生更多的活性氧,灭活效果相比于射频等离子体单独处理 D 值减少 40%^[45]。通过光谱分析发现,主要是由于二氧化钛内部氧缺陷能级能量较低,二氧化钛颗粒更容易被活化,所以能产生更多的活性氧自由基,从而增大了对芽孢膜的破坏能力,提高了芽孢灭活率。

4 结束语

由于低温等离子体技术能在低温下实现对微生物的灭活,在食品领域的应用越来越普遍。在关于低温等离子体灭活芽孢类微生物的研究上,已报道的等离子体对芽孢灭活的内在机制,仍存在争议,尚未有清晰的结论,需要更多科研工作者的进一步研究证实,对于影响灭活效果的内外界因素的研究较为明确,但由于使用装置和处理条件的不同,很难设立最适合灭活的条件和标准,对于比较不同装置对芽孢类微生物灭活的差异还有待研究。另外,低温等离子体协同其他技术如微波处理,能够提高芽孢灭活率,或加入一些具有灭菌效果的物质如二氧化钛,与芽孢一起在等离子体条件下处理也能显著提高灭活率。此外,在现实情况中,芽孢的生长速率往往不同,不同发育阶段的芽孢(嫩芽孢、老芽孢)对于低温等离子体的处理可能也会有不同的效果,目前仍未有相关的研究情况,未来在针对低温等离子体处理不同发育阶段下细菌芽孢的研究将会有广阔的发展空间。

参考文献

- [1] Bursova S, Necidova L, Harustiakova D. Growth and toxin production of *Bacillus cereus* strains in reconstituted infant milk formula [J]. Food Control, 2018, 93: 334-343
- [2] Wang Z L, Li X K, Zhao Y J, et al. Synthesis of multifunctional fluorescent magnetic nanoparticles for the detection of *Alicyclobacillus* spp. in apple juice [J]. Food Research International, 2018, 114: 104-113
- [3] 张宇霞,李儒.浓缩苹果汁中脂环酸芽孢杆菌(*Alicyclobacillus*)的研究进展[J].食品工业,2013,34(4): 170-176
ZHANG Yu-xia, LI Ru. Research progress of *Alicyclobacillus* in concentrated apple juice [J]. Food Industry, 2013, 34 (4): 170-176
- [4] Jeff, Errington. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis* [J]. Nature Reviews Microbiology, 2003, 1(2): 117-126
- [5] 徐茜茜.酸土脂环酸芽孢杆菌(*Alicyclobacillus acidoterrestris*)芽孢形成及低 pH 条件下芽孢萌发的蛋白组学研究[D].新乡:河南科技学院,2017
XU Xi-xi. Proteomic study on spore formation and germination of *Alicyclobacillus acidoterrestris* under low pH conditions [D]. Xinxiang: Henan University of Science and Technology, 2017
- [6] Misra N N, Schlüter O, Cullen P J. Cold Plasma in Food and Agriculture: Fundamentals and Applications [M]. Amsterdam: Boston: Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier, 2016: XII, 368
- [7] Misra N N, Jo C. Applications of cold plasma technology for microbiological safety in meat industry [J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 64: 74-86
- [8] 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, 2010, 108(2): 521-531
- [9] Huang Y H, Ye X F 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, 2019, 99(1): 368-378
- [10] Kim J E, Oh Y J, Won M Y, et al. Microbial decontamination of onion powder using microwave-powered cold plasma treatments [J]. Food Microbiology, 2017, 62: 112-123
- [11] Fiebrandt M, Hillebrand B, Lackmann J W, et al. Inactivation of *B. subtilis* spores by low pressure plasma-influence of optical filters and photon/particle fluxes on the inactivation efficiency [J]. Journal of Physics D-Applied Physics, 2018, 51(4): 53-65
- [12] Connor M, Flynn P B, Fairley D J, et al. Evolutionary clade affects resistance of *Clostridium difficile* spores to cold atmospheric plasma [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 110-121
- [13] Los A, Ziuzina D, Boehm D, et al. The potential of atmospheric air cold plasma for control of bacterial contaminants relevant to cereal grain production [J].

- Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2017, 44: 36-45
- [14] 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
- [15] Ben Belgacem Z, Carre G, Charpentier E, et al. Innovative non-thermal plasma disinfection process inside sealed bags: assessment of bactericidal and sporicidal effectiveness in regard to current sterilization norms [J]. Plos One, 2017, 12(6): 201-208
- [16] Wang S W, Doona C J, Setlow P, et al. Use of Raman spectroscopy and phase-contrast microscopy to characterize cold atmospheric plasma inactivation of individual bacterial spores [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(19): 5775-5784
- [17] Yang X L, Chang X J, Tei R T, et al. Effect of excited nitrogen atoms on inactivation of spore-forming microorganisms in low pressure N₂/O₂ surface-wave plasma [J]. Journal of Physics D-Applied Physics, 2016, 49(23): 54-63
- [18] Reineke K, Mathys A. Endospore inactivation by emerging technologies: a review of target structures and inactivation mechanisms [J]. Annu Rev Food Sci Technol, 2020, 11: 255-274
- [19] Driks A, Eichenberger P. The Bacterial Spore: From Molecules to Systems [M]. Wiley, 2016
- [20] Abhyankar W R, Wen J, Swarge B N, et al. Proteomics and microscopy tools for the study of antimicrobial resistance and germination mechanisms of bacterial spores [J]. Food Microbiology, 2019, 81: 89-96
- [21] Henkin T M. Classic spotlight: bacterial endospore resistance, structure, and genetics [J]. Journal of Bacteriology, 2016, 198(14): 1904-1904
- [22] Fiebrandt M, Lackmann J-W, Stapelmann K. From patent to product? 50 years of low-pressure plasma sterilization [J]. Plasma Processes and Polymers, 2018, 15(12): 1800139
- [23] 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): 3494-3507
- [24] Raguse M, Fiebrandt M, Denis B, et al. Understanding of the importance of the spore coat structure and pigmentation in the *Bacillus subtilis* spore resistance to low-pressure plasma sterilization [J]. Journal of Physics D-Applied Physics, 2016, 49(28): 76-87
- [25] Jeon J, Klaempfl T G, Zimmermann J L, et al. Sporicidal properties from surface micro-discharge plasma under different plasma conditions at different humidities [J]. New Journal of Physics, 2014, 16: 45-57
- [26] Fiebrandt M, Roggendorf J, Moeller R, et al. Influence of spore size distribution, gas mixture, and process time on the removal rate of *B-subtilis* spores in low-pressure plasmas [J]. Journal of Physics D-Applied Physics, 2019, 52(12): 80-89
- [27] Helm D, Naumann D. Identification of some bacterial cell components by FT-IR spectroscopy [J]. FEMS Microbiology Letters, 1995, 126(1): 75-79
- [28] Tremmel S, Beyermann M, Oschkinat H, et al. ¹³C-labeled tyrosine residues as local IR probes for monitoring conformational changes in peptides and proteins [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2005, 44(29): 4631-4635
- [29] Shintani H. Inactivation of bacterial spore, endotoxin, lipid a, normal prion and abnormal prion by exposures to several sorts of gases plasma [J]. Biocontrol Science, 2016, 21(1): 1-12
- [30] Slieman T A, Rebeil R, Nicholson W L. Spore photoproduct (SP) lyase from *Bacillus subtilis* specifically binds to and cleaves SP (5-thyminylyl-5,6-dihydrothymine) but not cyclobutane pyrimidine dimers in UV-irradiated DNA [J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(22): 6412-6417
- [31] Cowan A E, Olivastro E M, Koppel D E, et al. Lipids in the inner membrane of dormant spores of *Bacillus species* are largely immobile [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(20): 7733-7738
- [32] Laroussi M, Leipold F. Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure [J]. International Journal of Mass Spectrometry, 2004, 233(1-3): 81-86
- [33] Setlow, P. Dynamics of the assembly of a complex macromolecular structure - the coat of spores of the bacterium *Bacillus subtilis* [J]. Molecular Microbiology, 2012, 83(2): 241-244
- [34] 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: 102-110
- [35] Setlow P. Mechanisms for the prevention of damage to DNA

- in spores of *Bacillus species* [J]. *Annu Rev Microbiol*, 1995, 49: 29-54
- [36] Pina-Perez 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 Interantioanl*, 2020, 130: 108921
- [37] 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
- [38] Patil S, Moiseev T, Misra N N, et al. Influence of high voltage atmospheric cold plasma process parameters and role of relative humidity on inactivation of *Bacillus atrophaeus* spores inside a sealed package [J]. *Journal of Hospital Infection*, 2014, 88(3): 162-169
- [39] Deng X T, Shi J J, Kong M G. Physical mechanisms of inactivation of *Bacillus subtilis* spores using cold atmospheric plasmas [J]. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 2006, 34(4): 1310-1316
- [40] Charoux C M G, Free L, Hinds L M, et al. Effect of non-thermal plasma technology on microbial inactivation and total phenolic content of a model liquid food system and black pepper grains [J]. *LWT*, 2020, 118: 108716
- [41] Kim J E, Choi H S, Lee D U, et al. Effects of processing parameters on the inactivation of *Bacillus cereus* spores on red pepper (*Capsicum annum* L.) flakes by microwave-combined cold plasma treatment [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 263: 61-66
- [42] 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 and Emerging Technologies*, 2019, 52: 334-342
- [43] Liao X, Muhammad A I, Chen S, et al. Bacterial spore inactivation induced by cold plasma [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019, 59(16): 2562-2572
- [44] Kovalova Z, Tarabova K, Hensel K, et al. Decontamination of *Streptococci biofilms* and *Bacillus cereus* spores on plastic surfaces with DC and pulsed corona discharges [J]. *European Physical Journal-Applied Physics*, 2013, 61(2): 176-183
- [45] Jung H, Kim D B, Gweon B, et al. Enhanced inactivation of bacterial spores by atmospheric pressure plasma with catalyst TiO₂ [J]. *Applied Catalysis B-Environmental*, 2010, 93(3-4): 212-216

(上接第 274 页)

- [19] 马超.贮藏期内滩羊熟肉肌红蛋白含量变化的高光谱模型构建及空间分布[D].宁夏:宁夏大学,2019
MA Chao. Hyperspectral model construction and spatial distribution of changes of myoglobin content in cooked meat of tan sheep during storage period [D]. Ningxia: Ningxia University, 2019
- [20] Diniz P, Pistonesi M, Alvarez M B, et al. Simplified tea classification based on a reduced chemical composition profile via successive projections algorithm linear discriminant analysis (SPA-LDA) [J]. *Journal of Food Composition and Anaiysis*, 2015, 39(1): 103-110
- [21] 高明.冬小麦叶片叶绿素含量可见/近红外光谱检测研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2015
GAO Ming. Winter wheat leaf chlorophyll content visible/near-infrared spectroscopy detection research [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2015
- [22] Liu W, Li Q. An efficient elastic net with regression coefficients method for variable selection of spectrum data [J]. *Plos One*, 2017, 12(2): 21-26
- [23] 张筱蕾.基于高光谱成像技术的油菜养分及产量信息快速获取技术和方法研究[D].杭州:浙江大学,2013
ZHANG Xiao-lei. Rapid acquisition of nutrient and yield information of rapeseed based on hyperspectral imaging technique [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013
- [24] 王昕,康哲铭,刘龙,等.基于中值滤波和非均匀 B 样条的拉曼光谱基线校正算法[J].物理学报,2020,69(20): 201-208
WANG Xin, KANG Zhe-ming, LIU long, et al. Raman spectrum baseline correction algorithm based on median filtering and non-uniform B-spline [J]. *Acta Physica Sinica*, 2020, 69(20): 201-208
- [25] 占皓,吴宏伟,张东,等.近红外光谱法测定不同产地黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷和黄芪甲苷的含量[J].光谱学与光谱分析,2017,37(5):1392-1996
ZHAN Hao, WU Hong-wei, ZHANG Dong, et al. Determination of isoflavones glucoside and astragaloside IV in astragalus from different origins by near infrared spectroscopy [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2017, 37(5): 1392-1996