

# 低温等离子体对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的杀菌效果及动力学特性

刘雅夫, 符腾飞, 刘宸成, 陈姑, 王佳媚\*

(海南大学食品科学与工程学院, 海南海口 570000)

**摘要:** 为研究介质阻挡放电低温等离子体对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的杀菌作用, 以菌悬液 ( $1 \times 10^8$  CFU/mL) 为研究对象, 分析其杀菌效果, 通过 Linear、Weibull 和 Log-linear+Shoulder+Tail 三种数学模型, 分析低温等离子体杀菌动力学特性, 以均方根误差 (RMSE)、决定系数 ( $R^2$ )、准确度因素 ( $A_f$ ) 和偏移因素 ( $B_f$ ) 四个参数作为评价模型拟合度优劣的指标。实验结果表明, 当  $O_2:N_2=65:35$ , 介质厚度为 2 mm, 处理电压为 75 kV, 处理时间为 150 s, 处理后放置 0 h 时, 金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的杀菌率分别为 90.00% 和 98.99%; 当处理后放置时间延长至 2 h 时, 二者杀菌率提高至 90.27% 和 99.61%。拟合结果表明, Weibull 模型和 Log-linear+Shoulder+Tail 模型比 Linear 模型更符合低温等离子体处理对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的实际杀菌曲线, 而 Log-linear+Shoulder+Tail 模型适用面更广, 可以更好的描述不同处理后放置时间下的低温等离子体的杀菌过程。

**关键词:** 低温等离子体; 金黄色葡萄球菌; 铜绿假单胞菌; 杀菌效果; 动力学

文章编号: 1673-9078(2021)12-127-135

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.12.0302

## Bactericidal Efficacy and Kinetics of Cold Plasma against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*

LIU Yafu, FU Tengfei, LIU Chencheng, CHEN Gu, WANG Jiamei\*

(College of Food Science and Engineering, Hainan University, Haikou 570000, China)

**Abstract:** To study the bactericidal effects of dielectric barrier discharge cold plasma against *S. aureus* and *P. aeruginosa*, bacterial suspension ( $1 \times 10^8$  CFU/mL) was used as the research object to examine its bactericidal effect. Linear, Weibull and Log-linear+Shoulder+Tail models were used to examine the kinetic characteristics of cold plasma sterilization, and root mean square error (RMSE), determination coefficient ( $R^2$ ), accuracy factor ( $A_f$ ) and bias factor ( $B_f$ ) as the four indices were used to evaluate the fit of the model. The outcome of the sterilization in this experiment showed that under the conditions of  $O_2:N_2=65:35$ , the medium thickness was 2 mm, the treatment voltage was 75 kV and the treatment time was 150 s, the sterilization rates of *S. aureus* and *P. aeruginosa* were 90.00% and 98.99%, respectively, just after the treatment (without standing); After the standing for 2 h following the treatment, the sterilization rates for the two strains increased to 90.27% and 99.61%, respectively. The fitting results showed that the Weibull model and the Log-linear+Shoulder+Tail model were more in line with the actual sterilization curves of cold plasma-treated *S. aureus* and *P. aeruginosa* than the Linear model, whilst the Log-linear+Shoulder+Tail model has a wider range of applications and can better describe the sterilization process of cold plasma under different standing time periods.

**Key words:** cold plasma; *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*; bactericidal efficacy; kinetics

引文格式:

刘雅夫, 符腾飞, 刘宸成, 等. 低温等离子体对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的杀菌效果及动力学特性[J]. 现代食品科技, 2021, 37(12):127-135

LIU Yafu, FU Tengfei, LIU Chencheng, et al. Bactericidal efficacy and kinetics of cold plasma against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(12): 127-135

收稿日期: 2021-03-18

基金项目: 海南省自然科学基金项目 (219QN153); 国家自然科学基金项目 (31601565)

作者简介: 刘雅夫 (1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 非热加工技术、水产品加工与贮藏, Email: 842664754@qq.com

通讯作者: 王佳媚 (1984-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 非热加工技术、水产品加工与贮藏, Email: autumnjm@163.com

在过去几十年中,人们对健康生活方式的需求日益增加,这刺激了对生鲜类或低加工食品的市场需求<sup>[1]</sup>。然而,生鲜类食品受微生物污染存在安全隐患,传统热杀菌方法处理会降低其感官品质,因此,开发非热杀菌是解决生鲜食品杀菌技术的关键。近年来,低温等离子体作为一种新型的冷杀菌技术正受到越来越多的关注。低温等离子体设备运行成本低,能够产生多种高活性杀菌成分,杀菌效率高且反应后无残留,同时,处理过程中保持接近室温的温度,不会对产品造成热力损伤,可以很好的应用于生鲜食品<sup>[2-3]</sup>。

等离子体激发过程中的化学反应非常复杂,涉及上千个反应,它们的寿命从数纳秒到数小时不等<sup>[4]</sup>。通常认为在等离子体杀菌过程中起主要作用的成分,包括活性氧物质(如 $H_2O_2$ 、 $O_3$ 、 $O_2^-$ 、 $HO_2^-$ 、 $RO\cdot$ 、 $ROO\cdot$ 、 $^1O_2$ 、 $\cdot OH$ 和 $CO_3^{\cdot-}$ )和活性氮(如 $\cdot NO$ 、 $\cdot NO_2$ 、 $ONOO^-$ 、 $OONO\cdot$ 、 $ROONO$ )<sup>[5]</sup>、带电粒子、紫外线辐射和电场等<sup>[6]</sup>。这些活性物质形成的反应过程,包括电子碰撞过程(振动、激发、解离、附着和电离)、离子-离子中和、离子分子反应、潘宁电离、猝灭、三体中性复合和中性化学,光电发射、光吸收和光电离等<sup>[7]</sup>。形成的活性氧、活性氮以及各种反应会对微生物的DNA、细胞内成分(蛋白质、脂类、碳水化合物)以及细胞膜和细胞壁(孔隙形成、渗透和破坏)造成损伤,导致细胞内成分泄漏,最终引起细胞死亡<sup>[8-9]</sup>。低温等离子体中的活性物质及其含量受多种因素影响,如等离子体激发介质气体成分、等离子体激发装置的类型、输入功率、处理时间和湿度水平等<sup>[10]</sup>。目前,关于低温等离子体对微生物细胞的作用机制尚为完全统一。

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*,  $G^+$ ),是一种常见的人畜共患病病原菌,广泛分布于各种食品中,能产生肠毒素,可引起急性肠胃炎<sup>[11-12]</sup>。铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa*,  $G^-$ ),对化学药物的抵抗力比一般革兰氏阴性菌强,广泛存在于水、土壤、空气和动物机体中<sup>[13]</sup>,常会引起呼吸系统感染、肠道传染病感染和伤口形成绿色脓液等<sup>[14-15]</sup>症状。

介质阻挡放电(Dielectric Barrier Discharge, DBD)是最常用的大气压下产生低温等离子体技术,本研究中采用此技术处理菌悬液,研究不同处理条件因素影响,分析低温等离子体的杀菌效果,通过Linear、Weibull和Log-linear+Shoulder+Tail三种杀菌动力学模型,拟合低温等离子体对*S. aureus*和*P. aeruginosa*的杀菌动力学曲线,分析均方根误差(RMSE)、决定系数( $R^2$ )、精确因子( $A_f$ )和偏差因子( $B_f$ )评价三种模型的拟合效果,旨在筛选出最适合描述低温等离子体杀菌过

程的动力学模型,为食品杀菌技术提供理论指导<sup>[16]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

金黄色葡萄球菌(*S. aureus*, ATCC 6538)购自广东环凯微生物科技有限公司;铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*, CICC 21643)购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。

营养肉汤(NB)和平板计数琼脂(PCA),青岛海博生物技术有限公司;PBS缓冲液,北京白鲨易科技有限公司;氯化钠分析纯,广州化学试剂厂。

PL303电子分析天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;722G紫外可见光光度计,北京普析通用仪器有限公司;GHP-9160隔水式恒温培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;TGL-16MS型台式高速冷冻离心机,上海卢湘仪离心机仪器有限公司;BK130/36高压电转换器,美国PHENIX公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 培养基配制

液体培养基,称取营养肉汤(NB)1.8 g,溶于100 mL蒸馏水中,121 °C高压灭菌15 min。固体培养基,称取平板计数琼脂(PCA)23.5 g,溶于1000 mL蒸馏水中,121 °C高压灭菌15 min。

#### 1.2.2 菌悬液制备

用接种环挑取保存于斜面的菌株接种到液体培养基中,36 °C培养8.0 h,在4 °C下6000 r/min离心15 min后,收集菌体,用0.01 mol/L无菌PBS缓冲液洗3次,最后悬浮于0.01 mol/L无菌PBS缓冲液中,制成菌体悬液,使用分光光度计分别测量两种菌体悬液的OD<sub>600</sub>,用0.01 mol/L无菌PBS缓冲液调整菌液浓度至 $1 \times 10^8$  CFU/mL左右备用。

#### 1.2.3 低温等离子体处理

分别取3.0 mL菌悬液样品置于无菌培养皿(直径30 mm)中,置于包装盒中间,充气密封后进行低温等离子体处理,处理后取样测定菌落数量。

低温等离子体处理实验设计如下:

第一组处理时间分别为30、60、90、120、150 s,处理后静置0 h;

第二组处理后静置1 h,其它条件同第一组;

第三组处理后静置2 h,其它条件同第一组;

第四组 $N_2:O_2$ 分别为80:20、65:35、50:50、35:65、20:80,处理后静置2 h;

第五组介质阻挡板分别为1、2、4、6、8、10 mm,

处理后静置 2 h;

第六组处理电压分别为 45、55、65、75、85 kV，处理后静置 2 h。

### 1.2.4 微生物计数

参照 GB 4789.2-2016《食品安全国家标准食品微生物学检验菌落总数测定》操作。取 1 mL 样品，进行 10 倍系列梯度稀释，取 100  $\mu$ L 于平板计数培养基上涂布涂匀，于 36  $^{\circ}$ C 培养 72 h 后进行计数，菌落数量采用 CFU/mL 计数。

## 1.3 动力学模型拟合

### 1.3.1 Linear 模型

$$\lg N = (\lg N_0 - \lg N_{res}) \times \exp(-K_{max} \times t) \times \frac{\exp(K_{max} \times t_f)}{1 + [\exp(K_{max} \times t_f) - 1] \times \exp(-K_{max} \times t)} + \lg N_{res} \quad (1)$$

式中:

$N_{res}$ ——抗逆性更强的微生物亚群，CFU/mL;

$K_{max}$ ——最大杀菌速率，1/s;

$t_f$ ——肩部的时间长度，s。

### 1.4 统计分析

所有实验重复三次，以平均值 $\pm$ 标准误差汇报结果。采用 SPSS Statistics 23 和 Excel 2019 进行数据处理和方差分析 (ANOVA)，使用 Origin 2018 对实验数据进行模型拟合，通过比较均方根误差 (RMSE)、决定系数 ( $R^2$ )、准确度因素 ( $A_f$ ) 和偏移因素 ( $B_f$ ) 四个参数来筛选模型。RMSE 和  $R^2$  表示模型的拟合度， $R^2$  越接近 1，RMSE 越小，说明模型的拟合度越高。 $A_f$  表示实测值与预测值间的偏离度， $A_f$  越小模型拟合度越高； $B_f$  表示实测值与预测值间的大小关系， $B_f$  越接近 1 模型拟合度越高。RMSE、 $A_f$  和  $B_f$  计算公式如下：

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum(\alpha - \beta)^2}{n}} \quad (4)$$

$$A_f = 10^{-\frac{\sum|\alpha - \beta|}{n}} \quad (5)$$

$$B_f = 10^{-\frac{\sum(\alpha - \beta)}{n}} \quad (6)$$

式中:

$\alpha$ ——预测值;

$\beta$ ——实测值;

$n$ ——实验值个数。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同低温等离子体处理条件对杀菌效果影响

#### 2.1.1 处理后放置时间对杀菌效果影响

$$\lg N = \lg N_0 - t / D \quad (1)$$

式中:

$N$ ——处理后样品的菌落数，CFU/mL;

$N_0$ ——处理前样品的菌落数，CFU/mL;

$t$ ——处理时间，s;

$D$  为减少 90% 的活菌所需要的时间，s。

### 1.3.2 Weibull 模型

$$\lg N = \lg N_0 - b \times t^n \quad (2)$$

式中:

$b$ ——表示比例因子;

$n$ ——表示形状因子。

### 1.3.3 Log-linear+Shoulder+Tail 模型

$$\lg N = (\lg N_0 - \lg N_{res}) \times \exp(-K_{max} \times t) \times \frac{\exp(K_{max} \times t_f)}{1 + [\exp(K_{max} \times t_f) - 1] \times \exp(-K_{max} \times t)} + \lg N_{res} \quad (3)$$

由图 1 和图 2 可知，*S. aureus* 和 *P. aeruginosa* 菌落总数随处理时间延长而逐渐降低，处理后放置时间对菌落总数影响明显。处理后放置不同时间时，*S. aureus* 和 *P. aeruginosa* 菌落数随着放置时间的延长而降低。*S. aureus* 和 *P. aeruginosa* 的菌落数分别从  $1.02 \times 10^8$  CFU/mL 和  $1.12 \times 10^8$  CFU/mL 减少至  $1.00 \times 10^7$  CFU/mL 和  $1.12 \times 10^6$  CFU/mL，杀菌率分别为 90.00% 和 98.99%，当其他条件不变，处理后放置 2 h 时，*S. aureus* 和 *P. aeruginosa* 的菌落数分别从  $1.01 \times 10^8$  CFU/mL 和  $1.07 \times 10^8$  CFU/mL 减少至  $9.86 \times 10^6$  CFU/mL 和  $4.17 \times 10^5$  CFU/mL，杀菌率分别为 90.27% 和 99.61%。

在样品处理后放置 0 h 的情况下，*S. aureus* 和 *P. aeruginosa* 的菌落数量都随着处理时间延长而减少，呈现明显“肩部”，当处理时间超过 60 s，菌落数量都快速下降。当样品处理后放置时间延长至 1 h 时，*S. aureus* 和 *P. aeruginosa* 的菌落数量随处理时间延长成直线下降趋势，“肩部”消失。

当样品处理后放置时间延长至 2 h 时，*S. aureus* 和 *P. aeruginosa* 的菌落数量快速减少，经相同时间处理的 *S. aureus* 和 *P. aeruginosa*，其菌落减少量超过处理后放置 0 h 的组。但当处理时间大于 30 s 后，*S. aureus* 的菌落数量下降趋势减缓，和处理后放置 0 h 的组差距减小。

延长处理时间，能够增加低温等离子体中活性成分含量以及它们与菌体作用时间，从而增加对菌体的损伤，增强杀菌效果。由于低温等离子体中的活性成

分半衰期不同<sup>[17]</sup>, 与菌体作用会有一系列链式反应, 因此, 延长处理后的放置时间能够适度增强杀菌效果。随着处理后的放置时间延长, 包装内的活性成分与细菌细胞快速反应后浓度下降甚至消失, 此时再继续延长处理后的放置时间将难以继续降低细菌的数量。不同菌株之间对低温等离子体处理的敏感度不同, 其原因可能和革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌的细胞壁的差异有关<sup>[18]</sup>, 革兰氏阴性菌细胞壁较薄而疏松, 革兰氏阳性菌相比革兰氏阴性菌有更厚的细胞壁、更致密的肽聚糖层和大量磷壁酸, 使具有杀菌作用的活性成分很难穿透<sup>[19]</sup>, 因此 *S. aureus* 比 *P. aeruginosa* 更难被低温等离子体杀死。

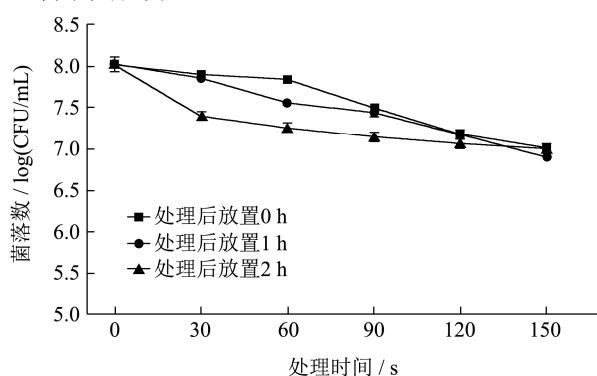


图1 低温等离子体处理时间对 *S. aureus* 的杀菌曲线

Fig.1 Bactericidal curve of *S. aureus* treated by cold plasma

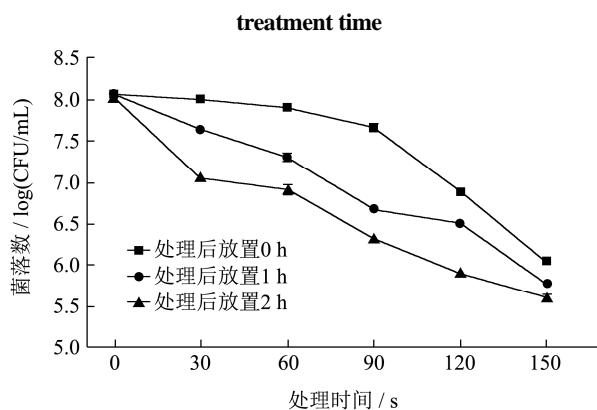


图2 低温等离子体处理时间对 *P. aeruginosa* 的杀菌曲线

Fig.2 Bactericidal curve of *P. aeruginosa* treated by cold plasma treatment time.

### 2.1.2 氧气浓度、处理电压和介质厚度对杀菌效果的影响

如图3所示, 随着包装内氧气浓度增加, 低温等离子体处理后 *S. aureus* 和 *P. aeruginosa* 的菌落数量逐渐降低, 当浓度超过 65% 时, 两种细菌的菌落数量降低缓慢。低温等离子体对 *S. aureus* 和 *P. aeruginosa* 的杀菌率随着氧气浓度增加而逐渐增加。相同处理条件下, *P. aeruginosa* 的杀菌率达到 99.99%, 而 *S. aureus* 的杀菌率低于 90.00%。两种细菌

对低温等离子体处理条件的敏感度有显著差异, *P. aeruginosa* 更容易被杀死。原子氧、单线态氧在等离子体杀菌中占有重要位置, 而工作气体中氧气浓度对其含量造成显著影响<sup>[17]</sup>, 但相同功率下, 当氧气浓度达到一定值时, 低温等离子体能够激发生成的含氧活性物质含量也是一定的, 继续提高氧气浓度并不会生成更多的含氧活性物质, 所以再提高氧气浓度时杀菌效果提高不明显<sup>[20]</sup>。

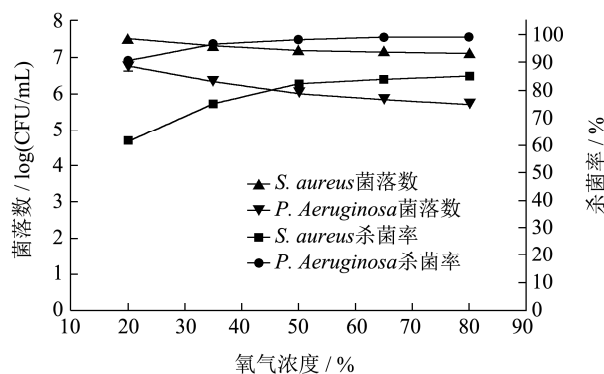


图3 氧气浓度对低温等离子体杀菌效果的影响

Fig.3 Effect of oxygen concentration on bactericidal efficacy of cold plasma

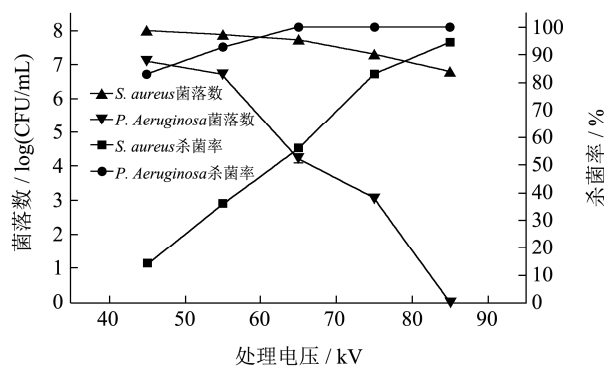


图4 处理电压对低温等离子体杀菌效果的影响

Fig.4 Effect of treatment voltage on bactericidal efficacy of cold plasma

处理电压对低温等离子体杀菌作用影响如图4所示, 随着处理电压升高, *S. aureus* 和 *P. aeruginosa* 的菌落数量逐渐下降。当处理电压升高至 85 kV 时, *P. aeruginosa* 被完全杀灭, 而 *S. aureus* 的菌落数量减少了 1.21 logCFU/mL。相似结果在其它菌株有报道, 当电压升高, 激发形成等离子体的能量增加, NO<sub>x</sub> 生成量增加, 而 NO<sub>x</sub> 浓度的增加有利于 HNO<sub>x</sub> (x=1, 4) 的生成, NO<sub>x</sub> 及其与水的反应产物 HNO<sub>x</sub> (x=1, 4) 具有重要的杀菌作用<sup>[21]</sup>, 也有研究表明随着电压的提高, 更多的高能电子可以直接与液体表面发生碰撞, 从而使具有杀菌作用的活性物质直接作用到液体中, 对细菌的损伤作用增强, 导致更多菌体死亡<sup>[17]</sup>。在本实验中, 当电压为 85 kV 时可获得最佳的处理效果, 但同时会

经常出现电弧击穿介质阻挡板的现象,这会导致电压电流剧烈波动,同时严重消耗介质阻挡板的使用寿命,因此在拟合分析中采用 75 kV 的数据进行分析。

本研究采用 DBD 系统,阻挡介质是此系统中的重要组成部分。如图 5 所示,阻挡介质厚度变化对低温等离子体杀菌效果影响明显。当阻挡介质的厚度逐渐增加,低温等离子体对 *S. aureus* 和 *P. aeruginosa* 的杀菌效果逐渐减弱。当阻挡介质的厚度从 1 mm 增加至 10 mm,低温等离子体处理后 *S. aureus* 和 *P. aeruginosa* 的杀菌率分别减少了 57.87% 和 8.56%。随着阻挡介质板厚度的增加,相同的电压下,电流变小,等离子体激发生成杀菌活性物质含量变小,杀菌效果也相应变弱。

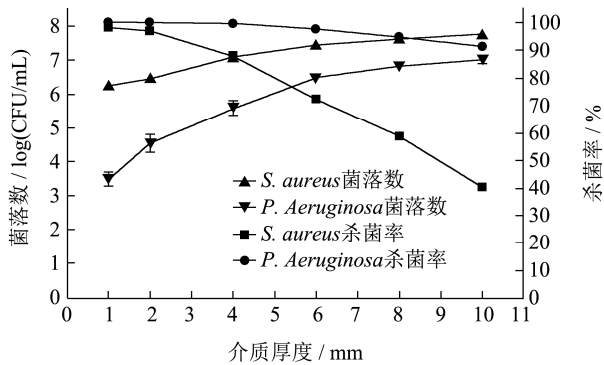


图 5 介质厚度对低温等离子体杀菌效果的影响

Fig.5 Effect of medium thickness on bactericidal efficacy of cold plasma

2.2 杀菌模型曲线拟合

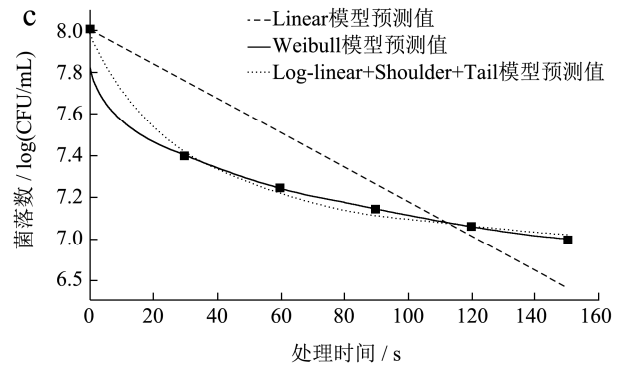
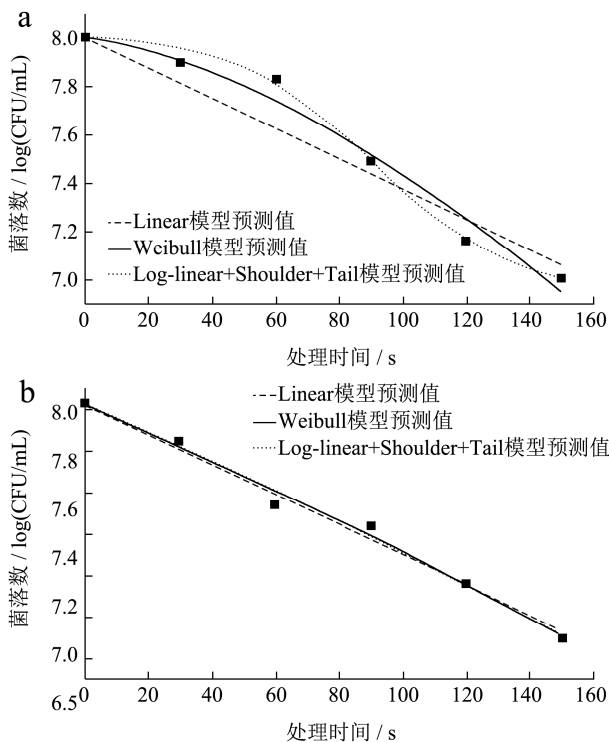


图 6 Linear、Weibull 和 Log-linear+Shoulder+Tail 模型对 *S. aureus* 的拟合曲线

Fig.6 Fitting curve of *S. aureus* by Linear, Weibull and Log-linear+Shoulder+Tail models

注: a: 0 h; b: 1 h; c: 2 h。下图同。

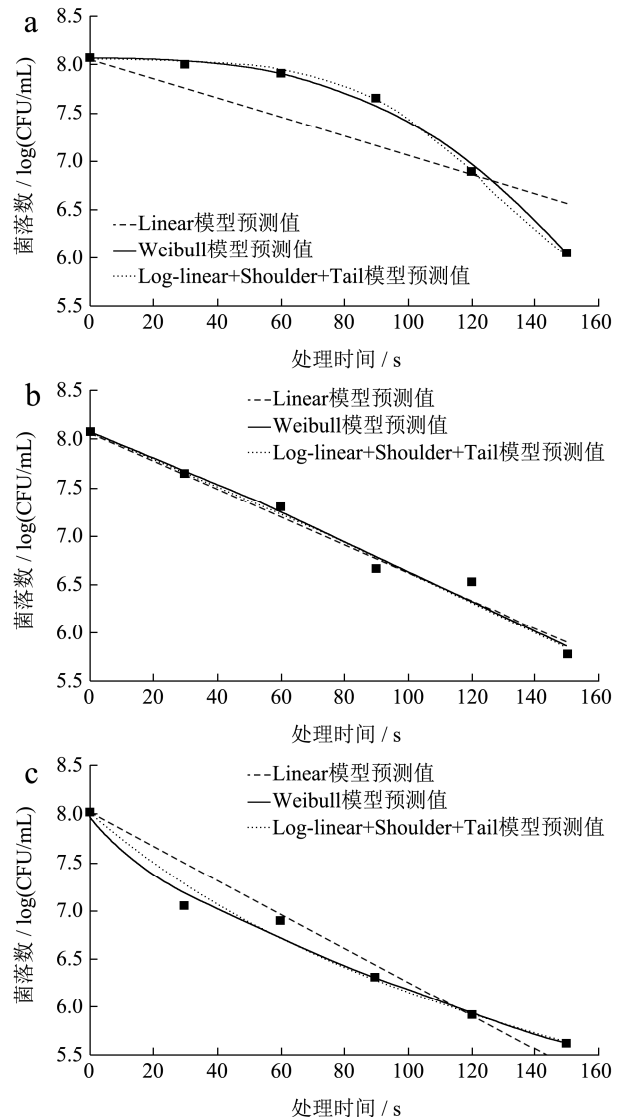


图 7 Linear、Weibull 和 Log-linear+Shoulder+Tail 模型对 *P. aeruginosa* 的拟合曲线

Fig.7 Fitting curve of *P. aeruginosa* by Linear, Weibull and Log-linear+Shoulder+Tail models

采用 Linear 模型、Weibull 模型和 Log-linear+Shoulder+Tail 模型针对低温等离子体处理后放置 0 h、1 h 和 2 h 的杀菌效果分别进行动力学曲线拟合, *S. aureus* 和 *P. aeruginosa* 的菌落拟合曲线分别见图 6 和图 7。

图 6 和图 7 所示, 处理后的放置时间从 0 h 增加到 2 h, *S. aureus* 和 *P. aeruginosa* 的杀菌曲线逐渐从向上凸(有明显“肩部”)变为向下凸, 这是处理后放置过程中包装内的低温等离子体与细菌菌体充分反应导致的。而随着处理时间延长, 包装盒内低温等离子体含量增多, 杀菌效果增强, 处理后放置与否对杀菌效果的影响减小。因此, 随着处理时间延长, 当处理时间超过 150 s 时, Weibull 模型拟合曲线和 Log-linear+Shoulder+Tail 模型拟合曲线的形状将逐渐趋于一致。

### 2.3 拟合模型评价

三种动力学模型对 *S. aureus* 和 *P. aeruginosa* 杀菌的拟合参数见表 1 和表 2, *S. aureus* 和 *P. aeruginosa* 经处理后放置 0 h、1 h、2 h 的拟合参数  $R^2$ 、RMSE、 $A_f$  和  $B_f$  如表 3 和表 4 所示。

如表 3 所示, *S. aureus* 经处理后放置 1 h, 进行

Linear、Weibull 和 Log-linear+Shoulder+Tail 模型拟合的  $R^2$  值分别为 0.989、0.991 和 0.991; 处理后放置 0 h、2 h 时, 三种模型的  $R^2$  值分别为 0.926、0.975、0.995 和 0.612、0.999、0.997。由此可见, 在处理时间为 0 s 到 150 s 的区间内, 处理后放置时间为 0 h 和 2 h 时, Weibull 和 Log-linear+Shoulder+Tail 模型都可以较好的描述低温等离子体灭菌曲线, 而当处理后放置时间为 1 h 时三种模型的  $R^2$ 、RMSE、 $A_f$  和  $B_f$  的值非常接近, 所以三种模型都可以较好地描述这一过程。对于 0 h 和 2 h 的情况, 在放置 0 h 时 Log-linear+Shoulder+Tail 模型略优于 Weibull 模型, 而放置 2 h 时则相反。由表 3 可知, Weibull 模型与 Log-linear+Shoulder+Tail 模型的拟合参数  $R^2$ 、RMSE、 $A_f$  和  $B_f$  整体上较为接近。但是在放置 0 h 时 Log-linear+Shoulder+Tail 模型相对于 Weibull 模型的 RMSE 和  $A_f$  更小, 说明 Log-linear+Shoulder+Tail 模型预测的平均精确度更高, 离散程度更低, 同时  $R^2$  更接近于 1。*P. aeruginosa* 的相关数据如表 4 所示, 其情况与上述对 *S. aureus* 的分析相似。因此, 在放置 0 h 时 Log-linear+Shoulder+Tail 模型可以更好的描述低温等离子体对 *S. aureus* 和 *P. aeruginosa* 的灭菌动力学过程。而放置 2 h 时则情况相反, Weibull 模型的拟合效果更好。

表 1 三种动力学模型对 *S. aureus* 的拟合参数

**Table 1 Kinetic parameters of three fitting models for inactivation of *S. aureus* by cold plasma**

放置时间/h	Linear	Weibull		Log-linear+Shoulder+Tail		
	D	b	n	$N_{res}$	$K_{max}$	$t_f$
0	158.866	0.001	1.496	6.930	0.045	91.669
1	136.849	0.005	1.067	-3467.336	0.002	4251.892
2	121.392	0.207	0.318	6.869	0.004	-557.109

表 2 三种动力学模型对 *P. aeruginosa* 的拟合参数

**Table 2 Kinetic parameters of three fitting models for inactivation of *P. aeruginosa* by cold plasma**

放置时间/h	Linear	Weibull		Log-linear+Shoulder+Tail		
	D	b	n	$N_{res}$	$K_{max}$	$t_f$
0	101.673	0.000	2.806	5.449	0.047	124.408
1	69.183	0.010	1.080	-7971.130	0.002	3674.682
2	57.169	0.086	0.664	3.476	0.002	-717.043

表 3 三种模型对 *S. aureus* 的杀菌曲线拟合参数

**Table 3 Fitting parameters of three fitting models for inactivation of *S. aureus* by cold plasma**

放置时间/h	Linear				Weibull				Log-linear+Shoulder+Tail			
	$R^2$	RMSE	$A_f$	$B_f$	$R^2$	RMSE	$A_f$	$B_f$	$R^2$	RMSE	$A_f$	$B_f$
0	0.926	0.103	1.206	0.929	0.975	0.060	1.113	0.992	0.995	0.026	1.038	1.014
1	0.989	0.040	1.077	0.989	0.991	0.037	1.066	1.001	0.991	0.036	1.062	0.998
2	0.612	0.211	1.474	1.206	0.999	0.003	1.005	0.999	0.997	0.020	1.038	0.999

表4 三种模型对 *P. aeruginosa* 的杀菌曲线拟合参数

Table 4 Fitting parameters of three fitting models for inactivation of *P. aeruginosa* by cold plasma

放置时间/h	Linear				Weibull				Log-linear+Shoulder+Tail			
	R <sup>2</sup>	RMSE	A <sub>f</sub>	B <sub>f</sub>	R <sup>2</sup>	RMSE	A <sub>f</sub>	B <sub>f</sub>	R <sup>2</sup>	RMSE	A <sub>f</sub>	B <sub>f</sub>
0	0.758	0.358	1.922	0.778	0.994	0.055	1.101	1.000	0.999	0.023	1.044	1.018
1	0.979	0.111	1.224	0.979	0.981	0.106	1.217	1.006	0.982	0.104	1.206	1.009
2	0.930	0.212	1.409	1.194	0.985	0.097	1.158	1.008	0.978	0.120	1.207	1.020

为了比较 Linear、Weibull 和 Log-linear+Shoulder+Tail 模型拟合方程的预测值和实测值之间的差异，以实测值和预测值分别为横坐标和纵坐标作相关性图。

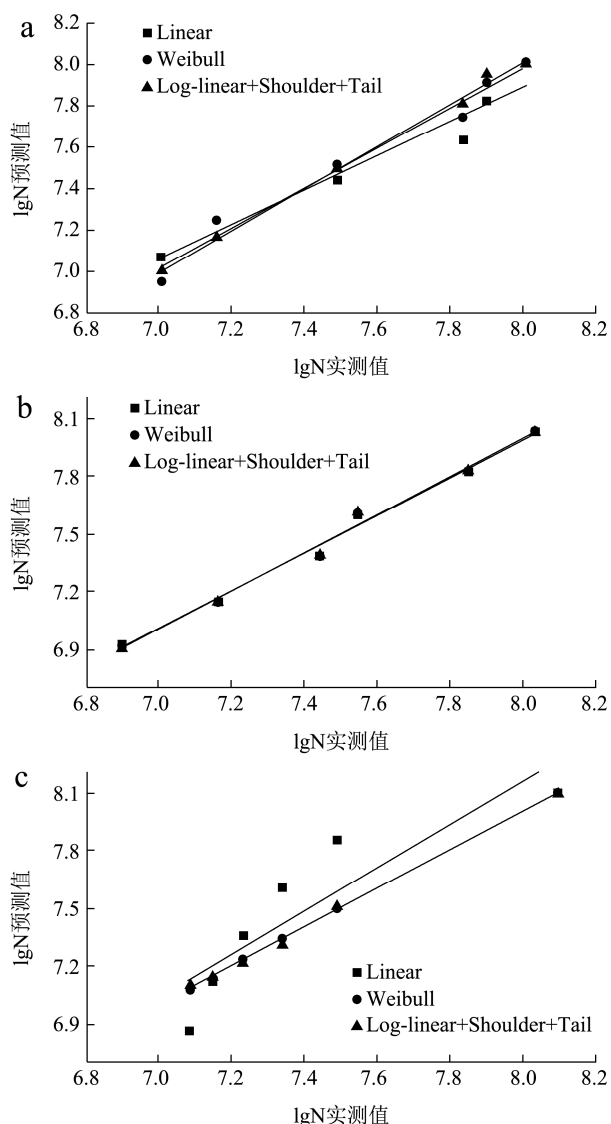
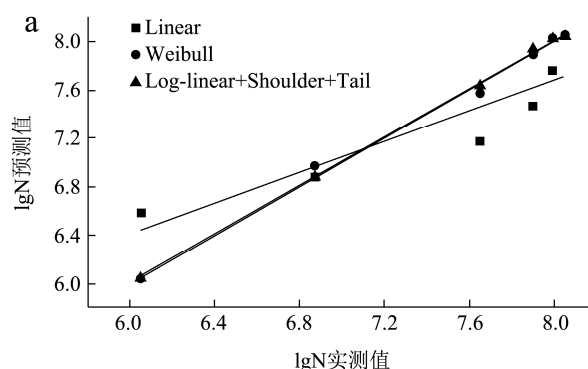


图8 *S. aureus* 在处理放置不同时间时 Linear、Weibull 和 Log-linear+Shoulder+Tail 模型的预测值和实测值相关性  
Fig.8 The correlation between predicted and measured values of Linear, Weibull and Log-linear+Shoulder+Tail models when *S. aureus* is placed at 0 h, 1 h and 2 h after treatment

当曲线斜率和相关性系数越接近 1，方程截距越

趋于 0，表明实测值和预测值的一致性越好。如图 8 所示，*S. aureus* 处理后放置 0 h 时，Weibull 模型的预测值与实测值线性回归方程为： $y=0.9634x+0.2737$  ( $R^2=0.975$ )，Log-linear+Shoulder+Tail 模型的预测值与实测值线性回归方程： $y=0.9945x+0.0413$  ( $R^2=0.994$ )。Log-linear+Shoulder+Tail 模型的回归方程斜率和相关系数都超过 0.990，截距为 0.0413，表明此模型比 Weibull 模型更符合实际杀菌过程。处理后放置 1 h 时，Linear、Weibull 和 Log-linear+Shoulder+Tail 模型预测值与实测值线性回归方程分别为： $y=0.9717x+0.2073$  ( $R^2=0.989$ )， $y=0.9924x+0.0576$  ( $R^2=0.991$ )， $y=0.9966x+0.0246$  ( $R^2=0.991$ )，三种模型的回归方程曲线斜率、相关性系数和方程截距都很接近，其中 Log-linear+Shoulder+Tail 模型在数值上略优。处理后放置 2 h 时，Weibull 模型的预测值与实测值线性回归方程： $y=1.0001x-0.0012$  ( $R^2=0.999$ )，Log-linear+Shoulder+Tail 模型预测值与实测值线性回归方程： $y=1.0005x-0.0038$  ( $R^2=0.997$ )，Weibull 模型预测值和实测值的回归方程斜率为 1.0001，相关性系数  $R^2$  为 0.999，均比 Log-linear+Shoulder+Tail 模型更趋于 1，截距为 -0.0012，也更趋于 0，这表明处理后放置 2 h 时，Weibull 模型比 Log-linear+Shoulder+Tail 模型更符合实际杀菌过程。

如图 9 所示，*P. aeruginosa* 的模型拟合情况与 *S. aureus* 相似。综上所述，对 *S. aureus* 和 *P. aeruginosa* 来说，在处理放置 0 h 和 1 h 时 Log-linear+Shoulder+Tail 模型最适合描述杀菌过程，在处理放置 2 h 时 Weibull 模型最适合描述杀菌过程。



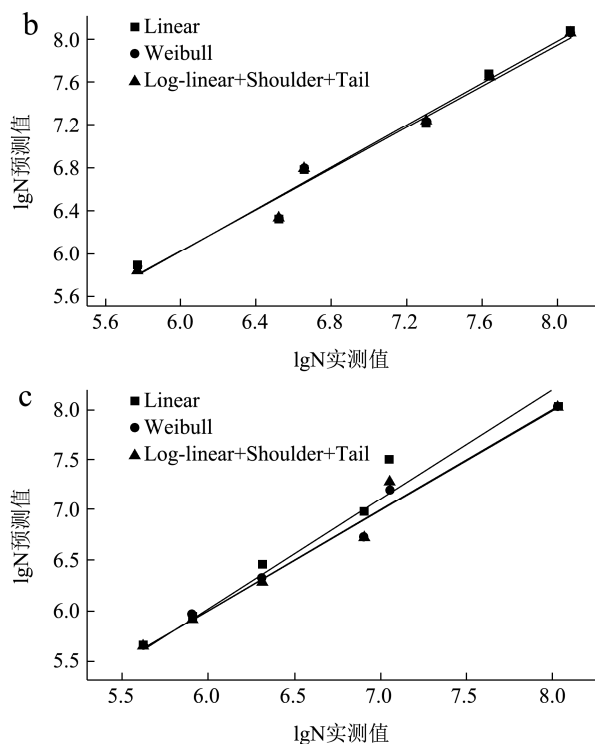


图9 *P. aeruginosa* 在处理放置不同时间时 Linear、Weibull 和 Log-linear+Shoulder+Tail 模型的预测值和实测值相关性  
**Fig.9 The correlation between predicted and measured values of Linear, Weibull and Log-linear+Shoulder+Tail models when *P. aeruginosa* is placed at 0 h, 1 h and 2 h after treatment**

### 3 结论

3.1 在  $O_2:N_2=65:35$ 、75 kV、2 mm 阻挡介质的情况下, 使用低温等离子体处理 30、60、90、120、150 s 时, 无论处理后放置 0 h、1 h 还是 2 h 均可显著降低初始浓度为  $1.00 \times 10^8$  CFU/mL 左右的 *S. aureus* 和 *P. aeruginosa* 的残存菌落数量 ( $p < 0.05$ )。处理时间越长, 杀菌效果越好。在处理 150 s, 处理后放置 0 h 的情况下, 对 *S. aureus* 和 *P. aeruginosa* 的杀菌率分别为 90.00% 和 98.99%, 当其他条件不变, 处理后放置 2 h 时, 对 *S. aureus* 和 *P. aeruginosa* 的杀菌率分别提高至 90.27% 和 99.61%。虽然阻挡介质厚度越小杀菌效果越好, 但同时介质的老化速度也会越快, 所以要根据实际需求选择。

3.2 低温等离子体对 *S. aureus* 和 *P. aeruginosa* 的杀菌效果受处理电压、处理时间、阻挡介质厚度、处理后放置时间等多种因素影响明显, 提高处理电压、延长处理时间和处理后放置时间能够显著 ( $p < 0.05$ ) 增强杀菌效果。当处理条件为  $O_2:N_2=65:35$ 、85 kV、150 s、2 mm 阻挡介质、处理后放置 2 h 时, 可获得最佳的处理效果, 可使浓度为  $1.16 \times 10^8$  CFU/mL 的 *S. aureus* 减少 94.61%, 并且能够完全杀死浓度为  $0.75 \times 10^8$

CFU/mL 的 *P. aeruginosa*。虽然当电压为 85 kV 时可获得最佳的处理效果, 但同时会经常出现电弧击穿介质阻挡板的现象, 这会导致电压电流剧烈波动, 同时严重消耗介质阻挡板的使用寿命, 因此本实验采用 75 kV 的数据进行拟合分析。

3.3 处理后放置时间从 0 h 增加到 2 h, 杀菌拟合曲线逐渐从向上凸转变为向下凸, 肩部逐渐消失。延长处理时间, Weibull 模型的拟合曲线可能会变得更接近 Log-linear+Shoulder+Tail 模型的拟合曲线, 因此, 具有 Shoulder+Log-linear、Log-linear+Tail、Log-linear+Shoulder+Tail 三种变形的 Log-linear+Shoulder+Tail 模型, 适用范围更广, 更符合低温等离子体杀菌过程菌的预测。

### 参考文献

- [1] Sillani, Sandro, Nassivera, et al. Consumer perceptions and motivations in choice of minimally processed vegetables a case study in Italy [J]. *British Food Journal*, 2015, 117(3): 970-986
- [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] Ragni L, Berardinelli A, Vannini L, et al. Non-thermal atmospheric gas plasma device for surface decontamination of shell eggs [J]. *Journal of Food Engineering*, 2010, 100(1): 125-132
- [4] Gaens W V, Bogaerts A. Kinetic modelling for an atmospheric pressure argon plasma jet in humid air [J]. *Journal of Physics D Applied Physics*, 2013, 46(27): 142-144
- [5] Arjunan K, Sharma V, Ptasińska S. Effects of atmospheric pressure plasmas on isolated and cellular DNA - a review [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(2): 2971-3016
- [6] Ritter A C, Bacciu D, Santi L, et al. Investigation of *rpoS* and *dps* genes in sodium hypochlorite resistance of *Salmonella enteritidis* SE86 isolated from foodborne illness outbreaks in southern Brazil [J]. *Journal of Food Protection*, 2012, 75(3): 437-442
- [7] Misra N N, Pankaj S K, Segat A, et al. Cold plasma interactions with enzymes in foods and model systems [J]. *Trends in Food Sciences & Technology*, 2016, 55: 39-47
- [8] Liao X, Liu D, Xiang Q, et al. Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: a review [J]. *Food Control*, 2017, 75(Complete): 83-91
- [9] Misra N N, Jo C. Applications of cold plasma technology for



- microbiological safety in meat industry [J]. Trends in Food Sciences & Technology, 2017, 64: 74-86
- [10] Fernandez A, Thompson A. The inactivation of *Salmonella* by cold atmospheric plasma treatment [J]. Food Research International, 2012, 45(2): 678-684
- [11] Han L, Patil S, Boehm D, et al. Mechanisms of inactivation by high-voltage atmospheric cold plasma differ for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2016, 82(2): 450
- [12] Huang M, Zhuang H, Wang J, et al. Inactivation kinetics of *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in different media by dielectric barrier discharge non-thermal plasma [J]. Applied Sciences, 2018, 8(11): 2087
- [13] Kora A J, Arunachalam J. Assessment of antibacterial activity of silver nanoparticles on *Pseudomonas aeruginosa* and its mechanism of action [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2011, 27(5): 1209-1216
- [14] Geethalakshmi R, Sundaramurthi J C, Sarada D V L. Antibacterial activity of flavonoid isolated from *Trianthema decandra* against *Pseudomonas aeruginosa* and molecular docking study of *FabZ* [J]. Microbial Pathogenesis, 2018, 121: 87-92
- [15] Morten Rybtke, Louise Dahl Hultqvist, Michael Givskov, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: community structure, antimicrobial tolerance and immune response [J]. Journal of Molecular Biology, 2015, 427(23): 3628-3645
- [16] Artíguez, Mari Luz, Martínez de Martínez, et al. Inactivation of spores and vegetative cells of *Bacillus subtilis* and *Geobacillus stearothermophilus* by pulsed light [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2015, 28: 52-58
- [17] Zhang Z, Xu Z, Cheng C, et al. Bactericidal effects of plasma induced reactive species in dielectric barrier gas - liquid discharge [J]. Plasma Chemistry and Plasma Processing, 2017, 37(2): 415-431
- [18] Gaunt L F, Beggs C B, Georgiou G E. Bactericidal action of the reactive species produced by gas-discharge nonthermal plasma at atmospheric pressure: a review [J]. IEEE Transactions on Plasma Science, 2006, 34(4): 1257-1269
- [19] Han L, Patil S, Boehm D, et al. Mechanisms of inactivation by high-voltage atmospheric cold plasma differ for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(2): 450-458
- [20] 马良军,王佳媚,黄明明,等.不同处理条件对介质阻挡放电低温等离子体杀菌效果及影响机理研究[J].微生物学报, 2019,59(8):1512-1521
- MA Liangjun, WANG Jiamei, HUANG Mingming, et al. Study on bactericidal efficacy and mechanism of dielectric barrier discharge low temperature plasma under different treatment conditions [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(8): 1512-1521
- [21] Moiseev T, Misra N N, Patil S, et al. Post-discharge gas composition of a large-gap DBD in humid air by UV-V is absorption spectroscopy [J]. Plasma Sources Science & Technology, 2014, 23(6): 065033

---

(上接第 126 页)

- [29] Gao H, Zhang Z K, Chai H K, et al. Melatonin treatment delays postharvest senescence and regulates reactive oxygen species metabolism in peach fruit [J]. Postharvest Biology and Technology, 2016, 118: 103-110
- Physiological and biochemical mechanisms regulating chilling tolerance in fruits and vegetables under postharvest salicylates and jasmonates treatments [J]. Scientia Horticulturae, 2013, 156: 73-85
- [30] Morteza Soleimani Aghdam, Samad Bodbodak.