



# 大气压低温等离子体灭活表面微生物 综合实验设计

孙也<sup>1,2</sup>, 皮杨梦<sup>1,2</sup>, 杨毅<sup>1,2</sup>, 李想<sup>1,2</sup>, 申芳霞<sup>1,2\*</sup>

(1. 北京航空航天大学 能源与动力工程学院, 北京 102206; 2. 北京航空航天大学 北京市环境工程教学示范中心, 北京 102206)

**摘要:** 表面微生物灭活是一个长期的社会需求, 低温等离子体灭活表面微生物是表面微生物灭活研究热点。该文选用大气压低温等离子体灭活物体表面微生物进行综合实验设计。实验表明, 细菌灭活效率达到 99% 时的作用时间非常短, 低于 14 s。新冠假病毒灭活所需时间较长, 23 °C 和 4 °C 时灭活效率达 99% 以上的灭活时间均为 1 min; 低温 -20 °C 时, 灭活时间为 3 min。大气压低温等离子体技术适用于冷链行业食品外包装等表面微生物的灭活。该实验以社会热点和科学前沿问题为导入, 不仅提升了学生开展低温等离子体和微生物学的实验操作能力, 也体现了实验内容的“两性一度”, 激发了学生对实验科学的热情和兴趣。

**关键词:** 冷链食品外包装; 杀病毒剂; 表面微生物; 低温等离子; 综合实验

中图分类号: X172

文献标志码: A

DOI: 10.12179/1672-4550.20240384

## Comprehensive Experimental Design for Inactivating Surface Microorganisms by Atmospheric Pressure Low-Temperature Plasma

SUN Ye<sup>1,2</sup>, PI Yangmeng<sup>1,2</sup>, YANG Yi<sup>1,2</sup>, LI Xiang<sup>1,2</sup>, SHEN Fangxia<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Energy and Power Engineering, Beihang University, Beijing 102206, China; 2. Beijing Experimental Demonstration Center of Environmental Engineering Experimental Education, Beihang University, Beijing 102206, China)

**Abstract:** Surface microbial inactivation is a long-term social demand, and low-temperature plasma inactivation of surface microorganisms is a hot research topic in surface microbial inactivation. Aiming at the hot spot, the latest research results of a new type of low-temperature plasma disinfection and sterilization are introduced into the comprehensive experiment of environmental engineering. In our comprehensive experiment, SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Spike pseudo virus is selected as inactivated object, and the research on the inactivation of object surface microorganisms by atmospheric pressure low-temperature plasma is carried out. The main research conclusions show the disinfection and sterilization efficiency of bacteria can reach 99% within an action time of less than 14 s. While the action time for SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Spike pseudo virus with an inactivation efficiency of over 99% is relatively longer, which is 1 min at 23 °C and 4 °C, and 3 min at -20 °C. The results show that atmospheric pressure low temperature plasma technology is suitable for the inactivation of surface microorganisms such as food packaging in the cold chain industry. The introduced experiment can improve the students' ability to carry out experiments on low-temperature plasma and environmental engineering microbiology, and also stimulate their enthusiasm and interest in experimental science.

**Key words:** cold chain food packaging; virucidal; surface microorganisms; low-temperature plasma; comprehensive experiment

综合实验是培养学生解决复杂问题综合能力的有效手段。为了建设符合一流课程标准的教学实验, 必须加大符合“两性一度”的综合实验项

目的设计<sup>[1]</sup>。本设计结合冷链行业食品外包装等表面微生物的灭活社会需求, 融合低温等离子体技术与微生物接种、培养以及灭活评价等重要知识

收稿日期: 2024-07-18

基金项目: 北京航空航天大学教学改革重点项目(202230-1); 北京市科委疫情防控追溯、监测与灭活科技专项项目(Z2011000094200); 教育部产学合作协同育人项目(202002200008)。

作者简介: 孙也, 博士, 副教授, 主要从事实验教学和环实验方面的研究。E-mail: sunye021@163.com

\*通信作者: 申芳霞, 博士, 副教授, 主要从事环境空气微生物特征和人体健康方面的研究。E-mail: Fxshen@buaa.edu.cn

点,开展了创新性大气压低温等离子体灭活表面微生物综合性实验。实验不仅提高了本科生培养质量,也激发了学生的专业认可度和实验热情,可为其他院校综合性实验教学改革提供借鉴。

## 1 实验设计背景与教学思路

细菌和病毒可在低温物体表面长时间存活,进口冷链食品外包装便成为各种细菌和病毒跨境传播的主要载体,冷链食品外包装的有效杀毒是我国常态化防控面临的紧迫任务<sup>[2-3]</sup>。传统消毒方法包括高压蒸汽灭菌、紫外灯照射、化学药剂喷洒等,由于这些技术可能产生高温、二次污染或给食品本身带来安全风险等问题,并不适用于冷链食品外包装的消毒<sup>[4]</sup>,因此研发适用于冷链食品外包装表面微生物灭活的技术具有重要的实用价值。

低温等离子体又称为继气、固、液以外的“物质第四态”,由于其能够在相对温和的条件下,使热力学平衡条件下难发生的反应迅速进行而受到关注<sup>[5]</sup>。低温等离子体是气体在高压放电作用下,发生激发、电离和重组等复杂的化学过程,所产生的由活性氧、活性氮、激发态原子、亚稳态原子、臭氧、过氧化氢、紫外光子等活性

组分构成的流动性粒子群。低温等离子体可用于降解挥发性有机污染物、材料改性<sup>[6-7]</sup>、甲醇和甲烷活化利用<sup>[8]</sup>等方面,在医学领域治疗癌症<sup>[9]</sup>和微生物灭活方面<sup>[10]</sup>也表现优异。等离子体通过对微生物细胞进行静电干扰、大分子氧化、细胞膜穿孔及蚀刻等一系列复杂的物理化学作用,从而破坏微生物分子结构<sup>[11-13]</sup>。研究发现,低温等离子体对纯化的 SARS-CoV-2 RNA 生物气溶胶也有良好的灭活效果<sup>[14-15]</sup>。因此,针对冷链食品外包装低温条件和不可污染的特殊灭菌需求,大气压低温等离子体技术具有良好的适配性<sup>[16]</sup>。

基于上述设计背景,自行设计与研发出一套低温等离子体射流实验平台,设计思路如图 1 所示。利用该平台,学生自主设计参数,依据实验室生物安全和 WS/T683 的要求评价不同条件下微生物灭活的效率。此外,还可利用扫描电子显微镜、电泳、游离 DNA 分析、三维荧光光谱等手段,从分子层面分析大气压低温等离子体射流致使表面微生物失活的原因与机理,帮助学生学会利用仪器深入地分析实验现象,更深层次地理解低温等离子体发生原理和技术特点,提高学生的创新性思维能力。

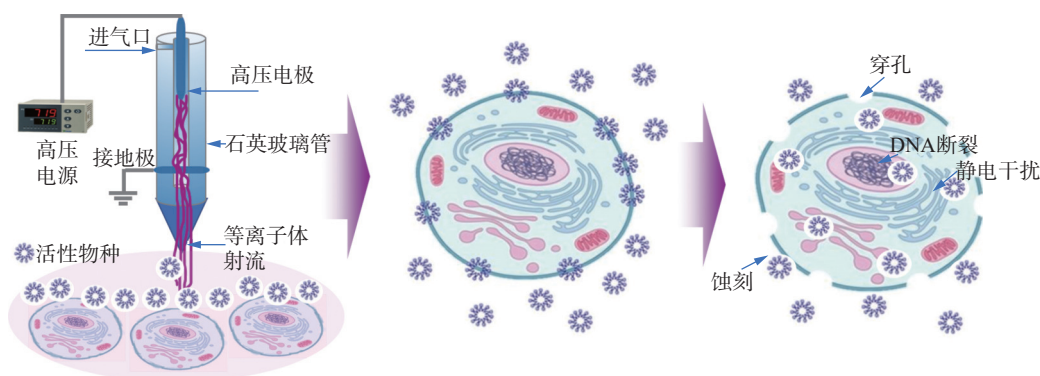


图 1 低温等离子体射流灭活微生物实验设计思路示意图

## 2 实验材料与系统

### 2.1 实验材料

仪器、设备:酶标仪,CTP-2000K 型高压直流电源、恒温水浴锅、扫描电子显微镜、三维荧光光谱、BIO-RAD 垂直电泳仪等。

试剂、耗材:大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Spike 假病毒溶液、SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Spike S1 蛋白、SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Spike ELISA 试剂

盒、磷酸盐缓冲溶液(PBS 缓冲液)、90 mm 无菌培养皿、离心管、移液枪头、微孔板、盖玻片、去离子水、高纯氩气、一次性采样棉拭子、硅片等。

### 2.2 实验系统

自行设计并搭建低温等离子体灭活表面微生物的实验平台,如图 2 所示。平台包括放电单元、载气单元、可控温的低温等离子体灭活单元、控制单元 4 个部分。

放电单元选用高压直流电源,电压范围为 0~200 kV,频率范围为 5~20 kHz。载气选用高纯

氩气,流量调节范围为0~15 L/min。实验时将大气压低温等离子体射流装置放置于温度控制系统中,确保精确控制-25℃~30℃内不同温度,温度精度为±1℃,选取模拟食品储存的3种代表性温度23℃、4℃和-20℃。可控温的低温等离子体灭活单元是实验系统的核心组件,采用针-环放电

的等离子体射流方式。单个射流头主体为石英玻璃材质,长度为80 mm,管内径为5 mm。灭活单元可包含一个或多个射流头,单个射流头包括进气口、高压电极、接地极、两电极之间的电介质和射流口构成。当组合多个射流头时,采取并联排布方式,相邻射流头的间距为(12±1) mm。

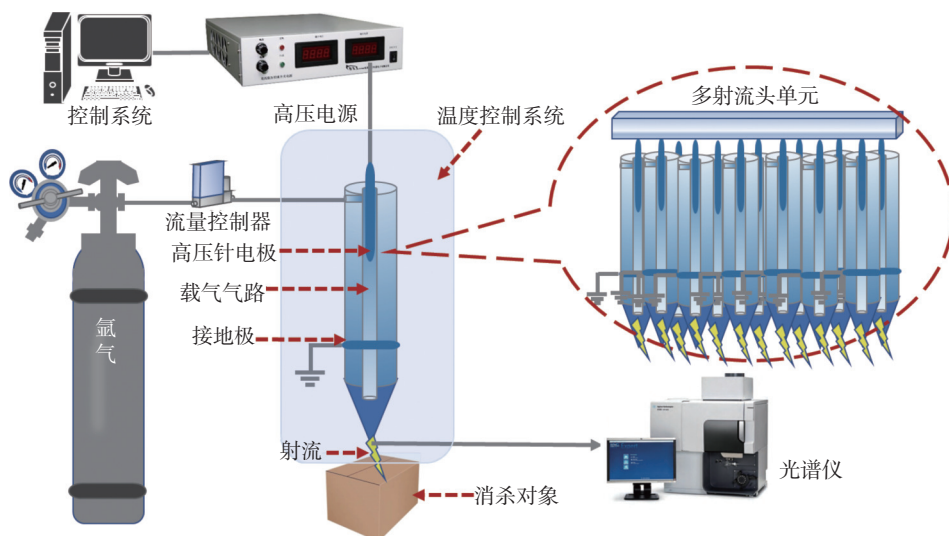


图2 大气压低温等离子体射流灭活实验系统示意图

### 3 实验方法

#### 3.1 细菌活性评价方法

实验教学所用细菌,必须符合《消毒产品卫生安全评价技术要求》(WS/T683)和实验室生物安全要求,同时具有易于培养的特性。实验选取大肠杆菌 ATCC 15597、大肠杆菌 CICC 8099 和金黄色葡萄球菌 CICC 6538 作为实验对象<sup>[17]</sup>。细菌活性评价方法有如下5个。

1) 灭活用菌液的制备。用无菌 PBS 溶解菌种冻干粉后,进行三代接种培养。灭活用菌液的制备时,首先对第三代菌种培养物刮板,用无菌 PBS 洗去多余培养液,得到灭活用菌液,用酶标仪测量菌液的 OD<sub>600</sub>,保证细菌初始浓度 OD<sub>600</sub>=1.5,临用现配,不能隔夜。

2) 低温等离子体射流灭活过程。将一定浓度、一定体积的灭活用菌液滴加在载体(2 cm×2 cm 盖玻片)上,盖玻片上的菌液经过 37℃ 恒温干燥 4 min,形成乳白色菌斑,将盖玻片固定在电动滑动轨道上进入灭活单元进行灭活处理。

3) 菌液洗脱回收过程。灭活实验完成后,取出盖玻片放入生物安全柜,用一次性采样棉拭子

沾湿无菌 PBS 溶液进行擦拭菌体,将擦拭完成的棉拭子放入装有 1 mL 无菌 PBS 溶液的离心管中,在 10000 r/min 下离心 1 min 进行洗脱回收,取出棉拭子,最后用涡旋仪将洗脱液混匀。

4) 菌落数的确定。将细菌洗脱液稀释不同梯度,分别进行 37℃ 条件下涂布培养 24 h,进行平板上的细菌菌落数的计数(CFU, 个)。设置相同组数的空白对照组,对比处理组与对照组的菌落数,对照组的菌落数应在 1×10<sup>6</sup>~5×10<sup>6</sup> 个/cm<sup>2</sup>,各组间菌落数误差率不超过 15%。

5) 低温等离子体射流对物体表面细菌的灭活效率的计算。灭活效率计算如下:

$$\text{灭活效率}(\%) = \frac{(\text{对照组菌落数} - \text{处理组菌落数})}{\text{对照组菌落数}} \times 100\% \quad (1)$$

#### 3.2 新冠假病毒活性评价方法

新冠假病毒 SARS-CoV-2 (2019-nCoV) 作为替代病毒的标准品,是使用 HIV-1(人类免疫缺陷 I 型病毒)为基础载体转染 293 细胞后,包装成 SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Spike 的假病毒。其表面表达 SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Spike 蛋白,并携带有荧光素酶报告基因,荧光素酶在细胞内表

达。其无自主复制能力，对 ACE2 受体细胞仅有一次侵染的机会，因此适合教学实验安全可靠的需求。新冠假病毒活性评价方法有如下 3 个。

1) 低温等离子体射流灭活过程。将 50 μL 新冠假病毒溶液滴加到 1.5 mL 离心管管盖上，离心管盖固定在电动滑动轨道上进入可控温的低温等离子体灭活单元进行灭活处理，设置相同组数的对照组进行实验。

2) 病毒溶液收集回收过程。将灭活后的病毒溶液收集到 1.5 mL 离心管中，并将离心管盖用 30 μL DMEM 病毒培养液清洗，将灭活后的病毒溶液与清洗液合并到一个离心管中，在 4 °C 条件下冷藏保存。

3) 低温等离子体射流对物体表面新冠假病毒灭活效率的计算。分别对灭活前后新冠假病毒溶液的侵染活性用式(1)进行定量计算，使用 S1 蛋白 ELISA 试剂盒评价病毒 S1 蛋白浓度变化，进而评价灭活效率。

## 4 实验结果与讨论

### 4.1 低温等离子体灭活表面细菌

在放电电压 15 kV，电源频率 20 kHz，氩气流量 4 L/min，接地电极与管口距离 13 mm，射流管底端距离菌片表面的距离 15 mm 条件下，进行灭活代表性细菌实验，分别考察灭活时间和环境温度对不同细菌灭活效率的影响，结果如图 3 和图 4 所示。

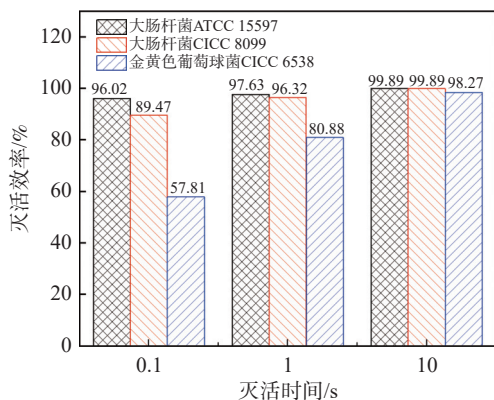


图 3 不同灭活时间对代表性细菌灭活影响的柱状图

环境温度为 23 °C 时，随着灭活时间的增加，低温等离子体射流对不同细菌的灭活效率呈上升趋势，如图 3 所示。当灭活时间为 10 s 时，大肠杆菌 ATCC 15597 和大肠杆菌 CICC 8099 的灭活效率均达到 99.89%，金黄色葡萄球菌 CICC 6538

的灭活效率为 98.27%。当灭活时间为 14 s 时，3 种代表性细菌的灭活效率均达到《消毒产品卫生安全评价技术要求》中“合格消毒产品的指示微生物≥99.9% 的灭活效率”的要求。

食品储存的 3 种代表性温度分别为 23 °C、4 °C 和 -20 °C，当灭活时间为 1 s 时，分别研究 3 种代表性环境温度对不同细菌灭活效率的影响。低温等离子体射流对两种大肠杆菌的灭活效率明显高于金黄色葡萄球菌，灭活效率均达到 96.24% 以上，如图 4 所示。温度的变化对两种大肠杆菌的灭活影响很小，灭活效率变化不大；而金黄色葡萄球菌在在 -20 °C 温度下的灭活效率为 77.96%，比大于 4 °C 温度下的灭活效率有所下降。这说明环境温度对物体表面细菌的灭活效率无显著影响，大气压低温等离子体技术适用于冷链行业的灭活食品外包装等表面细菌。

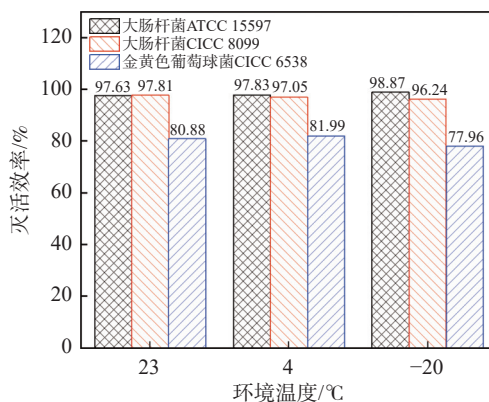


图 4 不同环境温度对代表性细菌灭活影响的柱状图

### 4.2 低温等离子体灭活表面病毒

与 4.1 节实验条件一致，进行灭活新冠假病毒及病毒 S1 蛋白实验，分别考察灭活时间和环境温度对病毒灭活效率的影响，结果如图 5 和图 6 所示。

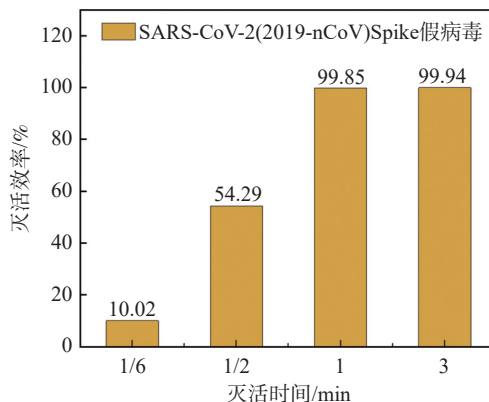


图 5 不同灭活时间对物体表面病毒灭活影响的柱状图

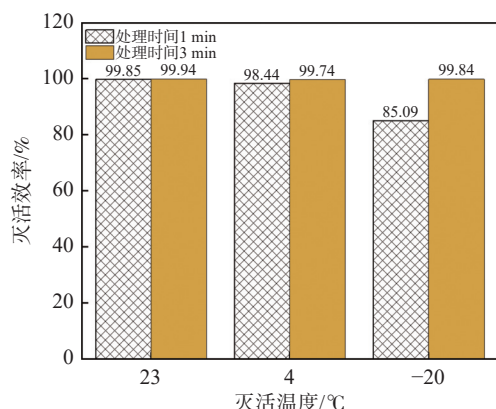


图6 等离子体处理时长对物体表面病毒灭活影响的柱状图

当环境温度为 23 °C 时,随着灭活时间增长,新冠假病毒的灭活效率逐渐增高,如图 5 所示。但与灭活细菌实验不同,当灭活时间为 10 s 时,灭活效率仅有 10 % 左右,灭活新冠假病毒需要更长的作用时间;灭活时间达到 1 min 时,灭活效率为 99.85%,病毒已基本完全失活;灭活时间为 3 min 时,灭活效率为 99.94%。

当环境温度为 23 °C 和 4 °C 时,温度对物体表面病毒溶液的灭活效率影响不大,灭活效率均在 98% 以上;当温度为 -20 °C,灭活 1 min 时的灭活效率显著下降,为 85.09%,这是由于低温下病毒溶液有结冰现象,大气压低温等离子体射流中的活性组分无法穿透冰阻力层进入与之发生作用,随着灭活时间增长,冰层渐融,灭活效率上升至 99.84%,此时病毒基本完全失活,如图 6 所示。尽管灭活病毒的时间稍长,但依旧能够保证灭活效率。

#### 4.3 灭活表面微生物机理分析

实验借助 SEM、电泳、游离 DNA 分析、三维荧光光谱等手段从分子层面,分析低温等离子体射流致表面微生物失活的原因与机理。大气压低温等离子体射流处理大肠杆菌 ATCC 15597 和金黄色葡萄球菌 CICC 6538 在 0(对照组)、0.1、1.0、10.0 s 时的 SEM 图片如图 7 所示,可以清晰地观察到随着灭活时间的变化,细胞表面发生明显的变化,空洞数量增加,细胞表面发生破碎。

结合图 7 的实验结果,根据游离 DNA 分析方法,采用 Tiamp Micro DNA Kit(Lot#U8923)试剂盒分别提取灭活后样品的上清游离 DNA、管壁的游离 DNA 和沉淀总菌 DNA,三部分之和是总菌 DNA(DNAT),结果如图 8 所示。随着灭活时间

的增加,所有细菌总菌 DNA 均呈现下降的趋势,且随着灭活时间增加,DNA 含量明显减少,10 s 时已经接近 0,说明细胞内 DNA 已发生明显损伤。进一步通过 qPCR 扩增和凝胶电泳分析,发现经过灭活后 DNA 的双链结构未发生明显变化,沉淀中 DNA 含量减少,DNA 条带亮度减弱,凝胶电泳迁移距离不变,DNA 双链长度未发生明显改变,说明 DNA 双链中的某些碱基对和核苷酸由于受到等离子体攻击发生脱落<sup>[18-19]</sup>。

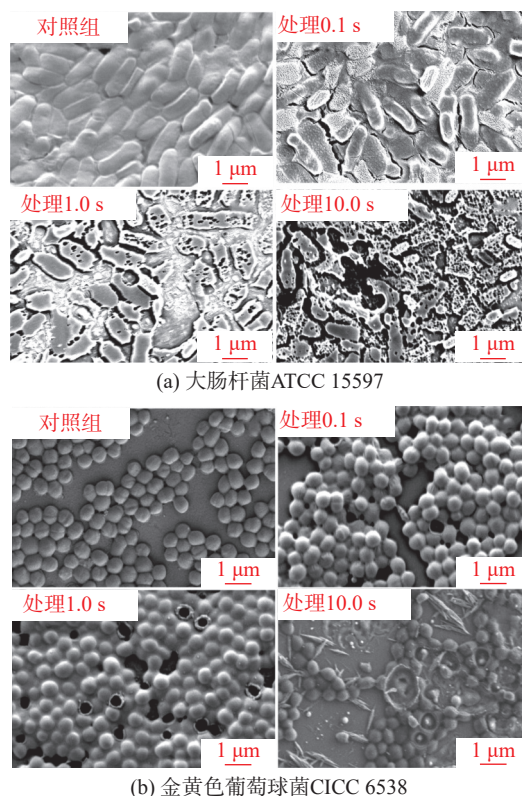


图7 大肠杆菌 ATCC 15597 和金黄色葡萄球菌 CICC 6538 在不同灭活时间下的 SEM 图

假病毒入侵受体细胞过程中,S1 蛋白负责受体识别功能,是入侵的“第一步”,通过研究灭活前后 S1 蛋白四级结构的变化,明确假病毒灭活处理后失活的原因。

处理后 S1 蛋白的三维荧光光谱图如图 9 所示。对照未灭活的 S1 蛋白,随着灭活时间的增长,最大荧光强度逐渐减弱,这是由于 S1 蛋白经过灭活变性聚集成更大的胶原分子导致能量传递减弱。此外,斯托克斯位移减小,最大激发波长从 315 nm 蓝移至 305 nm,SARS-CoV-2(2019-nCoV) Spike S1 蛋白的四级结构在空间结构上变得紧凑<sup>[20]</sup>,从而丧失与受体细胞结合的能力,从而失活。

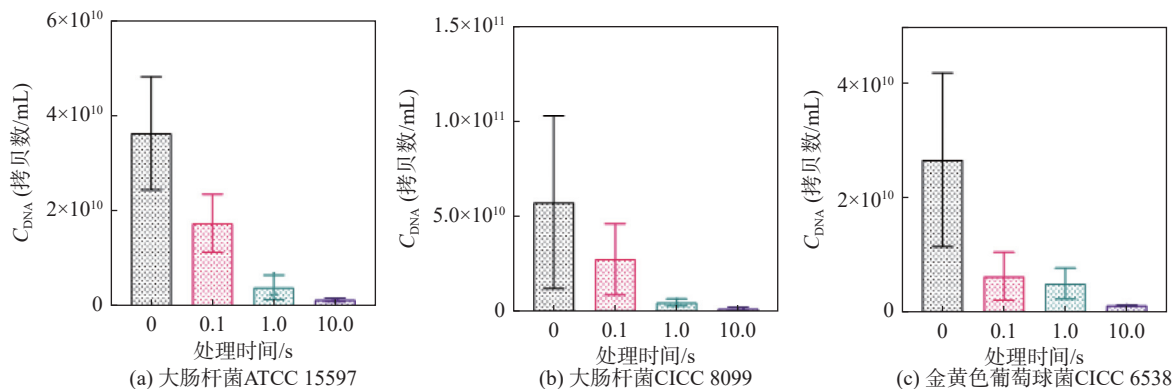


图 8 等离子体灭活细菌的总菌 DNA(DNAT)变化

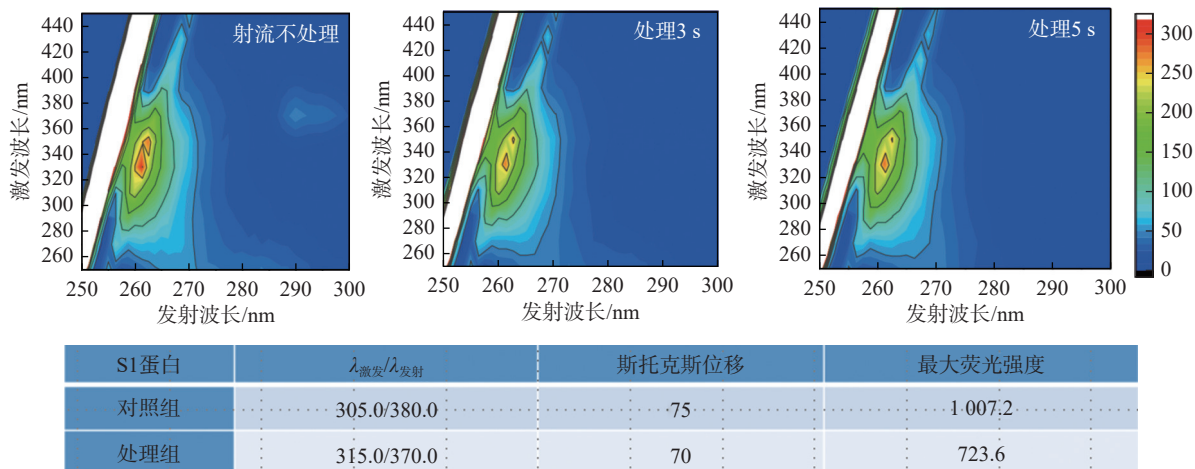


图 9 等离子体处理 S1 蛋白三维荧光光谱图

### 5 结束语

本实验基于表面微生物灭活的社会热点问题，融合前沿技术低温等离子体和细菌接种、培养以及微生物灭活评价等核心知识点，自行研制出一套新型大气压低温等离子体射流灭活微生物实验平台，设计了符合“两性一度”标准的大气压低温等离子体灭活表面微生物综合性实验，旨在将社会热点和科学前沿问题引入到实验教学中，提高实验教学人才培养水平。以直观生动的实验模式引导学生熟练运用核心知识点分析和解决复杂的实际问题。实验过程学生自主选择影响因素，多小组配合，培养学生团队协作精神，也激发了学生的实验兴趣和热情。

#### 参考文献

[1] 杜学领. 以“锚杆支护”综合性实验设计为例探讨“新工科”背景下综合性实验的设计方法[J]. 实验技术与管理, 2020, 37(9): 159-164.

[2] 吴双胜, 任振勇, 孙瑛, 等. 北京市一起冷链相关新型冠状病毒 Delta 变异株聚集性疫情的溯源调查[J]. 中华流行病学杂志, 2022, 43(8): 1230-1236.

[3] 王艺菲, 谢婧荷, 厉曙光, 等. 新型冠状病毒肺炎疫情下进口冷链食品的风险防控[J]. 上海预防医学, 2021, 33(5): 397-403.

[4] 郭涛涛, 张东荷雨, 张丽阳, 等. 新型冠状病毒等病原体空气消毒技术综述[J]. 清华大学学报(自然科学版), 2021, 61(12): 1438-1451.

[5] 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): 3697-3727.

[6] LI S J, DANG X Q, YU X, et al. The application of dielectric barrier discharge non-thermal plasma in VOCs abatement: A review[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2020, 388: 124275.

[7] 钱沐杨, 吕燕, 马鹏, 等. 基于大气压低温等离子射流处理的材料亲水性实验教学研究[J]. 实验技术与管理, 2015, 32(12): 57-59.

[8] 钱沐杨, 陈小昌, 李桂, 等. 大气压低温等离子体射流甲醇直接合成乙二醇新技术实验教学研究[J]. 实验技术与管理, 2017, 34(1): 44-47.

- [9] SEMMLER M L, BEKESCHUS S, SCHÄFER M, et al. Molecular mechanisms of the efficacy of cold atmospheric pressure plasma (CAP) in cancer treatment[J]. *Cancers*, 2020, 12(2): 269.
- [10] 王天雷,何一宁,郑英杰.低温等离子体与其在微生物中相关应用的研究进展[J].*上海预防医学*, 2020, 32(10): 872-877.
- [11] 于龙,李娜,靳爱军,等.低温等离子体空气消毒机对微生物气溶胶杀灭效果的评价[J].*中国消毒学杂志*, 2017, 34(10): 902-904.
- [12] 梅丹华,方志,邵涛.大气压低温等离子体特性与应用研究现状[J].*中国电机工程学报*, 2020, 40(4): 1339-1358.
- [13] 戴栋,宁文军,邵涛.大气压低温等离子体的研究现状与发展趋势[J].*电工技术学报*, 2017, 32(20): 1-9.
- [14] BISAG A, ISABELLI P, LAURITA R, et al. Cold atmospheric plasma inactivation of aerosolized microdroplets containing bacteria and purified SARS-CoV-2 RNA to contrast airborne indoor transmission[J]. *Plasma Processes and Polymers*, 2020, 17(10): 202000154.
- [15] CELE S, GAZY I, JACKSON L, et al. Escape of SARS-CoV-2 501Y. V2 from neutralization by convalescent plasma[J]. *Nature*, 2021, 593(7857): 142-146.
- [16] 章建浩,黄明明,王佳媚,等.低温等离子体冷杀菌关键技术装备研究进展[J].*食品科学技术学报*, 2018, 36(4): 8-16.
- [17] 国家市场监督管理总局,国家标准化管理委员会.消毒剂实验室杀菌效果检验方法:GB/T 38502—2020[S].北京:中国标准出版社,2020.
- [18] 蒲启康,刘思静,黄欢,等.大气压低温等离子体射流对白色念珠菌生物膜的杀灭效果[J].*四川大学学报(医学版)*, 2019, 50(3): 339-343.
- [19] 李海明,袁萌萌,邵新红,等.低温等离子体对扩展青霉杀菌作用及灭菌机理研究综述[J].*山东化工*, 2021, 50(14): 88-90.
- [20] CROFTON A, BALDWIN D, ALSYOUF M, et al. Evaluation of a chitosan hemostat in a porcine laparoscopic partial nephrectomy model: A pilot study[J]. *Journal of Endourology*, 2019, 33(11): 887-894.

编辑 葛晋

(上接第54页)

- [10] 邢卉,孙晓云,王明明,等.自动控制原理课程的混合式教学模式实践研究[J].*科技风*, 2022(6): 111-113.
- [11] 周振超,张岳.“自动控制原理”一流本科课程教学改革初探与实践[J].*辽宁科技学院学报*, 2022, 24(2): 73-75.
- [12] 王世明,贾红艳,薛薇.面向应用型专业的自动控制原理异步 SPOC 教学模式研究[J].*中国轻工教育*, 2021(5): 91-95.
- [13] 赵俊生,焦建军,任彤,等.以课程目标为导向的混合式教学研究与实践:以电气控制与 PLC 课程为例[J].*大学教育*, 2024(5): 58-62.
- [14] 彭斌,皮子坤,易灿南,等.新工科背景下工业通风课程线上线下混合式教学模式探讨[J].*高教学刊*, 2024(1): 119-122.
- [15] 张春晓,彭必雨,程海明.工科实验实践课程线上教学改革研究与实践[J].*皮革科学与工程*, 2023, 33(3): 104-108.
- [16] 李冬燕,任春梅,黄裕娥.线上线下混合式教学在《膜科学与技术》课程中的实践[J].*云南化工*, 2021, 48(11): 173-175.

编辑 钟晓