

等离子体活化水对三文鱼源腐败菌的抑制作用

檀茜倩¹, 裴建博¹, 张德福¹, 崔方超¹, 孟玉琼², 马睿², 李学鹏¹, 励建荣^{1*}

(¹渤海大学食品科学与工程学院/海洋研究院 辽宁锦州 121013

²省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室 青海大学 西宁 810016)

摘要 采用大气压等离子体射流技术,以 0.15 MPa 压缩空气为工作气体,在 380 W 功率下分别活化 30,60,90 s,制备等离子体活化水(PAW),分析其理化性质,研究不同等离子体活化水对从腐败三文鱼分离的多种腐败菌(哈夫尼菌、副哈夫尼菌、格氏沙雷氏菌)以及大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用。采用 GlnaFIT Tool 插件对 PAW 的杀菌动力学模型进行分析,测定杀菌后细胞膜完整性及细胞内核酸的变化,并研究 PAW 对哈夫尼菌、副哈夫尼菌、格氏沙雷氏菌生物被膜的抑制和清除效果。结果表明:随着放电时间的延长,等离子体活化水 pH 值逐渐降低,其氧化还原电位、电导率以及 H₂O₂、O₃、NO₂⁻、NO₃⁻ 的含量发生上升。60 s 放电制备的等离子体活化水处理 6 min,能够完全杀死上述病原菌。PAW60、PAW90 对蜂房哈夫尼亚菌 A2、副蜂房哈夫尼亚菌 A3、格氏沙雷氏菌 A5 处理 6 min 时,对数线性模型拟合更好。PAW 处理后细胞完整性受到破坏,DNA 发生泄露。PAW 处理 2 min,可以抑制上述病原菌生物被膜的形成,而对已形成生物被膜的清除时间较长,需 20~30 min。研究结果为利用等离子体活化水抑制水产品病原菌提供一定的理论参考。

关键词 等离子体活化水; 腐败; 三文鱼; 抑菌; 生物被膜

文章编号 1009-7848(2024)12-0277-11 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.12.025

水产品非常容易腐败,导致食用安全风险和经济损失。其腐败过程主要由酶、氧化反应以及特定腐败菌(Specific Spoilage Organisms, SSO)作用引起,其中 SSO 的代谢活动是造成水产品品质劣化的主要原因^[1]。这些 SSO 主要包括荧光假单胞菌、腐败希瓦氏菌、粘质沙雷氏菌、蜂房哈夫尼菌等^[2-5]。同时一些病原菌,如大肠杆菌及金黄色葡萄球菌的污染也容易给生鱼片、寿司等生食水产品的食用安全带来隐患^[6]。很多 SSO 都具有生物被膜形成的能力^[7],生物被膜的形成与其毒力因子产生和致腐能力发挥相关,也增加了其耐受不利环境、抗杀菌剂的能力以及将其从产品表面清除的难度^[8]。

常见细菌以及生物被膜控制方法包括物理法、化学法和生物法。其中化学和生物法中主要的抑制剂有次氯酸溶液、活化水^[9]、噬菌体^[10]、酶制剂^[11]、益生菌^[12]、植物提取物^[13]、纳米制剂^[14]等,在生

产应用或抑制效果上各具优势。等离子体是一种电离气体,包含一系列活性物质,包括电子、自由基如活性氧(ROS)、活性氮(RNS)、活化和亚稳态物质和离子等。冷等离子体处理温度较低,对食品质量没有影响或影响很小,更适合用于不耐受高温的水产品杀菌^[15],其可通过介质阻挡放电、电晕放电、微空心阴极放电或其它放电方法获得^[16]。冷等离子体处理可以净化一系列主要的食源性病原微生物,包括细菌、酵母、真菌或病毒,其杀菌机制主要是由于紫外线辐射、臭氧、带电粒子、氧自由基等活性物质的存在,会导致细胞膜、细胞内部成分或 DNA 损伤,最终细胞死亡^[17-19]。杀菌效果受杀菌参数(输入电压和频率、处理时间、气体类型和暴露时间)、环境因素(pH 值、食物基质和相对湿度)和微生物种类的影响。已有将等离子体活化水应用于水产品的保鲜的报道,利用等离子体杀菌在 70 kV、4 °C 下对已包装的新鲜鲭鱼和鲱鱼片处理 5 min,可清除总需氧嗜温菌、总需氧嗜冷菌、假单胞菌、乳酸菌和肠杆菌科等细菌^[20-21]。也有将等离子体活化水应用于鸡蛋的清洗,降低沙门氏菌存在的风险^[22]。总体来说,等离子体活化水适用于生鲜食品的杀菌^[23]。目前关于等离子体活化水对三文鱼中 SSO 的杀灭效果还鲜见研究报道。

收稿日期: 2023-12-06

基金项目: “十三五”国家重点研发计划蓝色粮仓科技创新重点专项(2019YFD0901702);辽宁省教育厅青年项目(LQ2020007)

第一作者: 檀茜倩,女,博士,讲师

通信作者: 励建荣 E-mail: lijr6491@163.com

本研究采用大气压等离子体射流技术(Atmospheric pressure plasma jet, APPJ)制备低温等离子体活化水(Plasma activated water, PAW),研究其对前期从腐败三文鱼中分离的3种SSO,包括蜂房哈夫尼亚菌(*Hafnia alvei* A2)、副蜂房哈夫尼亚菌(*Hafnia paralvei* A3)以及格氏沙雷氏菌(*Serratia grimesii* A5)浮游态、生物被膜态细菌的影响,以及对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的杀灭情况,为PAW在控制三文鱼源腐败菌上的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

LB肉汤、LB营养琼脂、平板计数琼脂(PCA),北京奥博星生物技术有限责任公司;氯化钠、95%乙醇,福晨(天津)化学试剂有限公司;结晶紫,麦克林生化科技有限公司;细菌基因组DNA快速抽提试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司;过氧化氢(H_2O_2)含量检测试剂盒,上海纪宁实业有限公司;总一氧化氮(NO)检测试剂盒,碧云天生物技术有限公司;DPD臭氧水浓度快速测定试剂盒,广州奥联环保科技有限公司。

1.2 仪器与设备

BSA2245型精密电子天平,德国Sartorius公司;PHSJ-3F型实验室pH计,上海雷磁仪器厂;UV-2550型紫外可见分光光度计,日本Shimadzu公司;S-4800型场发射扫描电镜,日本Hitachi公司;PE多功能酶标仪,上海帕金埃尔默企业管理有限公司;LDZX-75KBS型立式高压蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械有限公司;HZQ-X300C型恒温振荡器、BPS-100CA型恒温恒湿培养箱,上海一恒科技有限公司;洁净工作台,德国Airtech公司。

1.3 试验方法

1.3.1 菌株的复苏和培养 本试验所使用的试验菌株为蜂房哈夫尼亚菌(*Hafnia alvei* A2)、副蜂房哈夫尼亚菌(*Hafnia paralvei* A3)以及格氏沙雷氏菌(*Serratia grimesii* A5),均保藏于渤海大学,其中副蜂房哈夫尼亚菌A3和格氏沙雷氏菌A5分别对克拉霉素和四环素具有一定耐药性,另外选择革兰氏阴性菌大肠杆菌(*Escherichia coli*)和革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus*

aureus)作为测试菌株。菌株于10 mL LB肉汤培养基中,在180 r/min、28℃条件下活化18 h后,于LB营养琼脂培养基中纯化并挑取单菌落于10 mL LB肉汤中在180 r/min、28℃培养18 h后调整 $OD_{595\text{ nm}}$ 为0.15~0.2以使得菌液浓度大约为108 CFU/mL,取1 mL菌液于7 000 r/min、4℃离心10 min后重悬于1 mL 0.85%无菌生理盐水以制成标准菌悬液。

1.3.2 PAW的制备 使用APPJ以0.15 MPa压缩空气为工作气体在距离150 mL的无菌水面上5~10 mm采用功率380 W进行等离子体放电处理(图1),将处理时间分别为30、60、90 s的等离子体活化水分别命名为PAW30、PAW60、PAW90,活化后的PAW立即使用,部分待使用PAW于4℃暂存。

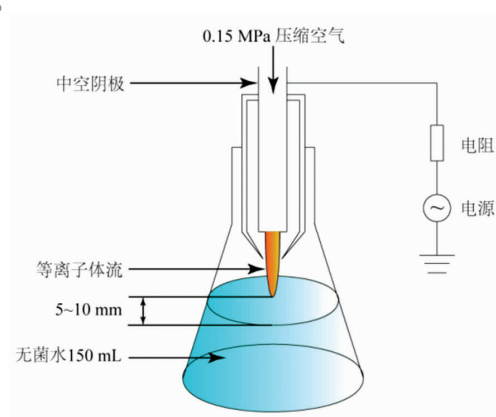


图1 大气压等离子体射流(APPJ)制备PAW示意图
Fig.1 Schematic diagram of PAW preparation by atmospheric pressure plasma jet (APPJ)

1.3.3 PAW的理化性质 测定不同条件下制备PAW的pH值、电导率、氧化还原电位(oxidation reduction potential, ORP)。使用臭氧水浓度快速测定试剂盒、过氧化氢(H_2O_2)含量检测试剂盒、总一氧化氮(NO)检测试剂盒测定PAW中的 O_3 、 H_2O_2 、NO含量。

1.3.4 PAW抑菌能力测定 将100 μ L上述处理获得的菌悬液与900 μ L活化好的PAW加入到1.5 mL微量离心管中混匀后处理0、2、4、6、8、10 min,吸取100 μ L菌悬液以10倍稀释涂布于PCA培养基中在28℃培养24 h后,计算培养基中菌落数并以lg(CFU/mL)表示,以无菌0.85%生理盐水为空白对照且试验为每组3个平行。

1.3.5 PAW 杀菌过程的动力学分析 使用 GInaFIT Tool 插件对本研究所采用 5 株试验菌株进行对数线性模型和威布尔杀菌动力学模型拟合,如果菌落数低于检测限则选取 $\lg(\text{CFU/mL})=1$,且如果 2 种模型的性能相似,则选取参数较少的模型确定最佳拟合模型^[24]。

1.3.6 PAW 处理后细菌细胞膜完整性的测定 参考文献方法稍作修改^[25],以 DNA 和蛋白质的泄漏情况来评价细胞膜完整性。吸取调整 $\text{OD}_{595 \text{ nm}}$ 为 0.15~0.2 左右的菌液 1 mL 与 9 mL 的 PAW 于 10 mL 离心管中混匀,分别放置 0,2,4,6,8,10 min 后,于 12 000 r/min、4 °C 离心 15 min,取上清液过 0.22 μm 滤膜后用紫外可见分光光度计测定 $\text{OD}_{260 \text{ nm}}$ 和 $\text{OD}_{280 \text{ nm}}$ 值,以计算泄露的 DNA 和蛋白质浓度,以 0.85% 生理盐水作空白对照且试验为每组 3 个平行,DNA 浓度和蛋白质浓度如式(1)、(2)。

DNA 质量浓度($\mu\text{g/mL}$)= $50 \mu\text{g/mL} \times \text{OD}_{260 \text{ nm}} \times$ 稀释倍数 (1)

蛋白质质量浓度(mg/L)= $1.45 \times \text{OD}_{280 \text{ nm}} - 0.74 \times \text{OD}_{260 \text{ nm}}$ (2)

1.3.7 细菌细胞内核酸变化情况 将 500 μL 过夜培养菌液与 1 mL 活化好的 PAW 加入到 1.5 mL 微量离心管中混匀后处理 10 min,于 8 000 r/min 离心 2 min 得菌体后,使用细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取总 DNA,取 1.5 μL 总 DNA 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。

1.3.8 PAW 对菌株生物被膜形成的抑制作用 参考 Li 等^[26]方法稍作修改,以测定 PAW 对蜂房哈夫尼亚菌 A2、副蜂房哈夫尼亚菌 A3、格氏沙雷氏菌 A5 生物被膜形成的抑制作用。将 100 μL 经 PAW30、PAW60、PAW90 处理 2 min 的菌悬液接种于含有 100 μL LB 肉汤的 96 孔板中培养 24 h 后,去除 LB 肉汤并用无菌 PBS 洗涤 3 次以除去浮游细菌后置于 50 °C 烘干 15 min,用 200 μL 结晶紫溶液染色 20 min 后吸出并用无菌水冲洗 3 次,置于 50 °C 烘干 15 min 后用 95% 乙醇溶解 20 min 并测定 $\text{OD}_{595 \text{ nm}}$ 的吸光度值,以 100 μL 的标准菌悬液做空白对照且试验为每组 4 个平行。

1.3.9 PAW 对菌株生物被膜的清除作用 参考 Charoux 等^[27]的方法测定 PAW 对蜂房哈夫尼亚菌

A2、副蜂房哈夫尼亚菌 A3、格氏沙雷氏菌 A5 成熟生物被膜的分散作用,吸取 $\text{OD}_{595 \text{ nm}}$ 为 0.15~0.2 后的菌液 200 μL 注入 96 孔板中于 28 °C 培养 24 h,使其形成成熟的生物被膜,培养结束后吸出菌液并用无菌 PBS 洗涤 3 次以除去浮游细菌,将 96 孔板置于 50 °C 烘干 15 min 后注入 200 μL PAW30、PAW60、PAW90 于 4 °C 浸泡 10,20,30 min,后吸出于 50 °C 烘干 15 min,采用结晶紫染色法测定 $\text{OD}_{595 \text{ nm}}$ 的吸光度值以验证 PAW 对蜂房哈夫尼亚菌生物被膜的分散能力,以无菌 0.85% 生理盐水为空白对照。

1.3.10 统计学分析 试验独立重复 3 次,结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 26 进行数据统计分析,Origin 2018 作图。

2 结果与分析

2.1 PAW 理化性质分析

本研究测定了放电时间 0,30,60,90 s 的 PAW 的 pH 值、氧化还原电位 (ORP)、电导率、 H_2O_2 、 O_3 、NO 含量如表 1 所示。不同 PAW 在 0~90 s 内随着放电时间的延长 pH 值发生下降,从初始值为 7.92 ± 0.12 下降至 2.68 ± 0.04 ,且 3 种不同放电时间的 pH 值之间均有显著性差异;ORP、电导率、 H_2O_2 、 O_3 、NO 的数值则呈现上升趋势,均存在显著性差异 ($P < 0.05$),PAW90 达到最高。

2.2 PAW 对细菌的灭活效果

本研究所使用的蜂房哈夫尼亚菌 A2 (*H. alvei* A2)、副蜂房哈夫尼亚菌 A3 (*H. paralvei* A3)、格氏沙雷氏菌 A5 (*S. grimesii* A5)、大肠杆菌 (*E. coli*)、金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 的初始菌落数分别为 (8.55 ± 0.02), (8.47 ± 0.01), (8.16 ± 0.02), (8.14 ± 0.03), (8.09 ± 0.01) $\lg(\text{CFU/mL})$ 。表 2 显示了 5 种细菌在不同 PAW 处理不同时间后的活菌数,可以发现较长放电时间制备的 PAW 杀菌效果更好。对于同一放电时间制备的 PAW 来说,杀菌效果随时间延长增加,对于 PAW30,除蜂房哈夫尼亚菌 A2 外其余菌株在处理 2,4 min 并没有显著性差异 ($P > 0.05$),直到处理 6 min 后菌落数才发生显著下降 ($P < 0.05$)。在 PAW60、PAW90 处理 6 min 后蜂房哈夫尼亚菌 A2 (*Hafnia alvei* A2)、副蜂

表1 不同PAW的理化性质

Table 1 The physicochemical property of different PAW

理化指标	放电时间/s			
	0	30	60	90
pH	7.92 ± 0.12 ^a	3.13 ± 0.09 ^b	2.88 ± 0.04 ^c	2.68 ± 0.04 ^d
ORP/mV	428 ± 9.17 ^c	548 ± 9.61 ^b	562.00 ± 5.57 ^b	597.00 ± 10.50 ^a
电导率/(μ S/cm)	288.34 ± 9.50 ^d	404.67 ± 7.77 ^c	1 066.34 ± 11.59 ^b	1 516.00 ± 7.21 ^a
H ₂ O ₂ /(μ mol/mL)	0 ^c	8.86 ± 0.14 ^b	9.10 ± 0.14 ^b	9.75 ± 0.25 ^a
O ₃ /(mg/L)	0 ^c	0.07 ± 0.03 ^c	0.47 ± 0.06 ^b	0.80 ± 0.17 ^a
NO ₂ ⁻ /(μ mol/L)	0 ^d	343.72 ± 16.23 ^c	402.81 ± 15.74 ^b	458.09 ± 29.92 ^a
NO ₃ ⁻ /(μ mol/L)	0 ^c	25.46 ± 0.40 ^b	26.17 ± 0.41 ^b	28.04 ± 0.71 ^a

注:小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

表2 使用PAW处理不同时间后的细菌种类活菌计数

Table 2 Viable count of bacterial treated by PAW

菌株名称	处理时间/min	PAW30 /lg(CFU/mL)	PAW60 /lg(CFU/mL)	PAW90 /lg(CFU/mL)
蜂房哈夫尼亚菌 A2	0	8.55 ± 0.02 ^{a,A}	8.55 ± 0.02 ^{a,A}	8.55 ± 0.02 ^{a,A}
	2	6.90 ± 0.07 ^{b,A}	3.95 ± 0.19 ^{b,B}	3.59 ± 0.13 ^{b,C}
	4	6.07 ± 0.12 ^{c,A}	3.37 ± 0.07 ^{c,B}	3.22 ± 0.07 ^{c,B}
	6	6.06 ± 0.15 ^{c,A}	ND ^{d,B}	ND ^{d,B}
	8	4.41 ± 0.21 ^{d,A}	ND ^{d,B}	ND ^{d,B}
	10	3.73 ± 0.26 ^{e,A}	ND ^{d,B}	ND ^{d,B}
副蜂房哈夫尼亚菌 A3	0	8.47 ± 0.01 ^{a,A}	8.47 ± 0.01 ^{a,A}	8.47 ± 0.01 ^{a,A}
	2	6.35 ± 0.13 ^{b,A}	4.07 ± 0.10 ^{b,B}	4.02 ± 0.10 ^{b,B}
	4	6.22 ± 0.16 ^{b,A}	3.97 ± 0.12 ^{b,B}	ND ^{c,C}
	6	5.59 ± 0.05 ^{c,A}	ND ^{c,B}	ND ^{c,B}
	8	4.84 ± 0.02 ^{d,A}	ND ^{c,B}	ND ^{c,B}
	10	4.22 ± 0.12 ^{e,A}	ND ^{c,B}	ND ^{c,B}
格氏沙雷氏菌 A5	0	8.16 ± 0.02 ^{a,A}	8.16 ± 0.02 ^{a,A}	8.16 ± 0.02 ^{a,A}
	2	7.51 ± 0.09 ^{b,A}	4.15 ± 0.05 ^{b,B}	3.96 ± 0.05 ^{b,C}
	4	7.41 ± 0.02 ^{b,A}	ND ^{c,B}	ND ^{c,B}
	6	5.46 ± 0.06 ^{c,A}	ND ^{c,B}	ND ^{c,B}
	8	5.22 ± 0.20 ^{c,A}	ND ^{c,B}	ND ^{c,B}
	10	3.93 ± 0.37 ^{d,A}	ND ^{c,B}	ND ^{c,B}
大肠杆菌	0	8.14 ± 0.03 ^{a,A}	8.14 ± 0.03 ^{a,A}	8.14 ± 0.03 ^{a,A}
	2	7.61 ± 0.01 ^{b,A}	5.36 ± 0.03 ^{b,B}	5.29 ± 0.01 ^{b,C}
	4	7.53 ± 0.12 ^{b,A}	ND ^{c,B}	ND ^{c,B}
	6	7.19 ± 0.34 ^{c,A}	ND ^{c,B}	ND ^{c,B}
	8	6.18 ± 0.22 ^{d,A}	ND ^{c,B}	ND ^{c,B}
	10	5.39 ± 0.13 ^{e,A}	ND ^{c,B}	ND ^{c,B}
金黄色葡萄球菌	0	8.09 ± 0.01 ^{a,A}	8.09 ± 0.01 ^{a,A}	8.09 ± 0.01 ^{a,A}
	2	7.48 ± 0.02 ^{b,A}	7.08 ± 0.10 ^{b,B}	4.34 ± 0.06 ^{b,C}
	4	7.20 ± 0.26 ^{b,A}	6.15 ± 0.03 ^{c,B}	3.77 ± 0.08 ^{c,C}
	6	5.63 ± 0.11 ^{c,A}	5.61 ± 0.02 ^{d,A}	3.64 ± 0.03 ^{d,B}
	8	5.58 ± 0.18 ^{c,A}	5.50 ± 0.08 ^{d,A}	3.33 ± 0.06 ^{e,B}
	10	5.46 ± 0.10 ^{c,A}	5.20 ± 0.12 ^{e,B}	ND ^{f,C}

注:ND表示低于检测限 $< 1 \lg(\text{CFU/mL})$;小写字母表示同种细菌在相同PAW下处理不同时间后活菌数的显著差异($P < 0.05$);大写字母表示同种细菌在不同PAW下处理相同时间后活菌数的差异显著($P < 0.05$)。

房哈夫尼菌 A3(*Hafnia paralvei* A3)、格氏沙雷氏菌 A5(*Serratia grimesii* A5)均无法检出,对金黄色葡萄球菌的杀菌时间相对较长,这表明了G⁺菌的细胞壁尤其是肽聚糖层比G⁻菌的更加致密,可能会对G⁺菌提供保护作用增强其对PAW的抵抗

能力,此外球菌因与PAW接触的相对表面积小于杆菌,这也影响了PAW对其的杀灭效果^[28-29]。

2.3 PAW对细菌灭活的动力学模型

用GInaFIT Tool插件对5种菌株的杀菌动力学进行了对数线性模型和威布尔分布模型拟合

表 3 使用 GInaFIT 拟合的对数线性和威布尔杀菌动力学模型的统计参数值

Table 3 Statistical parameter values of Log-linear and Weibull inactivation dynamics models fitted by GInaFIT

模型			PAW30	PAW60	PAW90
对数线性模型 (Log-linear model): $\lg(N/N_0) = -(t \times K_{\max})/LN$ (10)	蜂房哈夫尼亚菌 A2	$\lg(N_0)$	8.21 ± 0.31	6.64 ± 1.11	6.47 ± 1.18
		K_{\max}	1.04 ± 0.12	1.61 ± 0.42	1.57 ± 0.45
		RMSE	0.4316	1.5377	1.6301
		R^2	0.9504	0.7837	0.7541
	副蜂房哈夫尼亚菌 A3	$\lg(N_0)$	7.83 ± 0.36	6.79 ± 1.06	6.06 ± 1.44
		K_{\max}	0.87 ± 0.14	1.63 ± 0.40	1.53 ± 0.55
		RMSE	0.4945	1.4645	1.9886
		R^2	0.9105	0.8034	0.6605
	格氏沙雷氏菌 A5	$\lg(N_0)$	8.43 ± 0.33	5.95 ± 1.36	5.88 ± 1.38
		K_{\max}	0.99 ± 0.12	1.49 ± 0.52	1.47 ± 0.52
		RMSE	0.4538	1.8859	1.9005
		R^2	0.9397	0.6729	0.6638
	大肠杆菌	$\lg(N_0)$	8.32 ± 0.24	6.40 ± 1.35	6.37 ± 1.35
		K_{\max}	0.60 ± 0.09	1.60 ± 0.51	1.60 ± 0.51
		RMSE	0.3253	1.8678	1.8647
		R^2	0.9193	0.7090	0.7079
金黄色葡萄球菌	$\lg(N_0)$	8.03 ± 0.30	7.68 ± 0.28	6.78 ± 0.82	
	K_{\max}	0.67 ± 0.11	0.65 ± 0.11	1.27 ± 0.31	
	RMSE	0.4093	0.3846	1.1378	
	R^2	0.8988	0.9038	0.8044	
威布尔模型 (Weibull model): $\lg_{10}(N/N_0) = -(t/\delta)^p$	蜂房哈夫尼亚菌 A2	$\lg(N_0)$	8.47 ± 0.45	8.23 ± 2.41	8.22 ± 2.55
		δ	1.43 ± 0.81	1.21 ± 1.84	1.21 ± 1.95
		RMSE	0.4524	2.5323	2.6816
		R^2	0.9591	0.5605	0.5010
	副蜂房哈夫尼亚菌 A3	$\lg(N_0)$	8.43 ± 0.31	8.15 ± 2.26	8.13 ± 2.96
		δ	0.71 ± 0.45	1.22 ± 1.77	1.22 ± 2.30
		RMSE	0.3112	2.3737	3.1058
		R^2	0.9734	0.6127	0.3789
	格氏沙雷氏菌 A5	$\lg(N_0)$	8.17 ± 0.42	7.81 ± 2.75	7.81 ± 2.80
		δ	3.37 ± 1.21	1.28 ± 2.32	1.28 ± 2.35
		RMSE	0.4591	2.8938	2.9400
		R^2	0.9538	0.4224	0.3966
	大肠杆菌	$\lg(N_0)$	7.97 ± 0.17	7.80 ± 2.55	7.80 ± 2.56
		δ	6.11 ± 0.78	1.29 ± 2.17	1.29 ± 2.17
		RMSE	0.2119	2.6772	2.6846
		R^2	0.9743	0.5516	0.5459
金黄色葡萄球菌	$\lg(N_0)$	8.16 ± 0.45	8.12 ± 0.20	8.04 ± 0.86	
	δ	2.71 ± 1.69	1.31 ± 0.57	0.10 ± 0.21	
	RMSE	0.4554	0.2044	0.8574	
	R^2	0.9060	0.9796	0.9167	

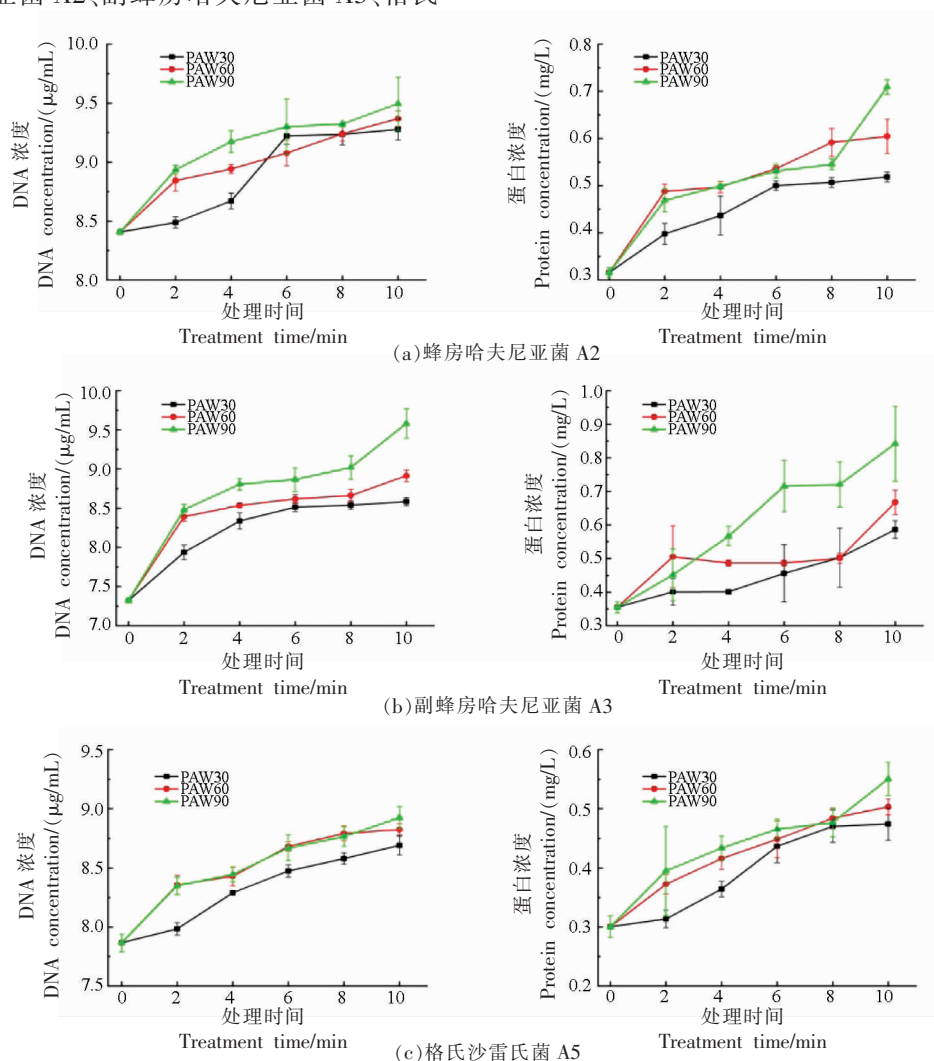
注: N_0 为初始菌落总数(CFU/mL); K_{\max} 为最大失活率(min^{-1}); δ 为标尺参数; RMSE 为平方根误差和; R^2 为决定系数。

(表3)。在PAW60、PAW90对于蜂房哈夫尼亚菌A2、副蜂房哈夫尼亚菌A3、格氏沙雷氏菌A5处理6 min时对数线性模型拟合更好,对3种细菌的最大失活率分别为 (1.61 ± 0.42) 、 (1.63 ± 0.40) 、 (1.49 ± 0.52) min^{-1} 。而PAW30处理条件、以及采用PAW60、PAW90对于大肠杆菌和金黄色葡萄球菌进行杀菌,威布尔模型更为准确。威布尔模型 δ 标尺参数表明了杀灭90%细菌所需的时间,在PAW30条件下时对蜂房哈夫尼亚菌A2、副蜂房哈夫尼亚菌A3、格氏沙雷氏菌A5、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的标尺参数分别为 (1.43 ± 0.81) 、 (0.71 ± 0.45) 、 (3.37 ± 1.21) 、 (6.11 ± 0.78) 、 (2.71 ± 1.69) min。证实PAW随着放电时间的延长杀菌作用增强^[29]。

2.4 PAW处理后细菌细胞膜完整性的变化

本研究使用PAW30、PAW60、PAW90分别对蜂房哈夫尼亚菌A2、副蜂房哈夫尼亚菌A3、格氏

沙雷氏菌A5处理2~10 min后菌株的DNA和蛋白质泄露情况如图2所示。不同放电时间制备的PAW均会使菌株的DNA和蛋白发生泄露,且泄露量随着时间的延长而增大,PAW30、PAW60在对不同菌株处理6 min后,菌株DNA和蛋白质的泄露量趋于平缓,这可能是由于PAW已基本破坏了受试菌株的细胞膜结构,导致无更多内容物流出,或者由于PAW中杀菌活性成分如 NO_2^- 、 NO_3^- 、 O_3 、 H_2O_2 的部分降解导致杀菌作用减缓有关。PAW90处理副蜂房哈夫尼亚菌A3后其DNA和蛋白质泄露情况比PAW30、PAW60处理后的泄露量大,说明PAW对副蜂房哈夫尼亚菌A3细胞膜的破坏能力要优于蜂房哈夫尼亚菌A2和格氏沙雷氏菌A5。试验结果表明ROS或RNS等强氧化的活性物质破坏了细菌的细胞膜或破坏了细菌的氧化还原平衡来达到抑菌目的^[30]。



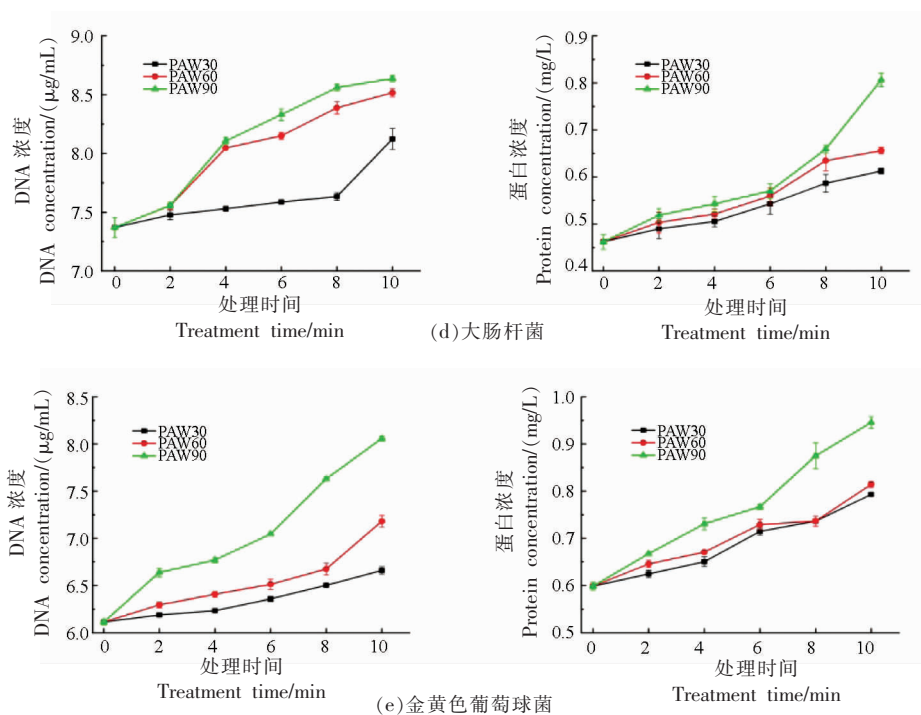


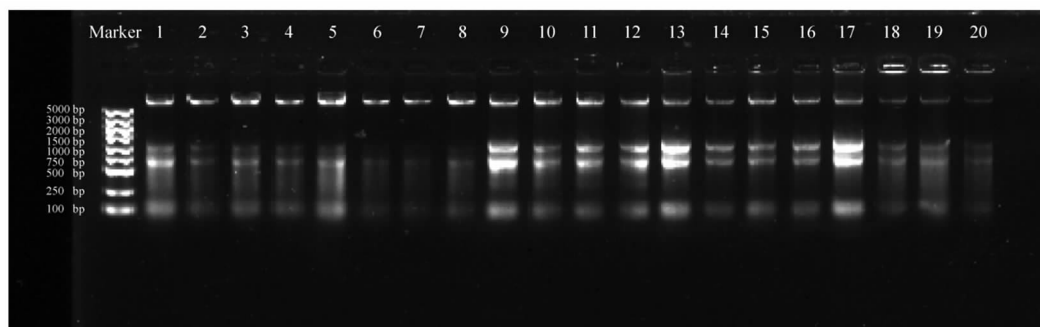
图 2 不同 PAW 对 5 种菌株细胞膜完整性的影响

Fig.2 Effects of different PAW on cell membrane integrity of the strains

2.5 PAW 处理后细菌胞内核酸的变化

对采用 PAW30、PAW60、PAW90 分别对蜂房哈夫尼亚菌 A2、副蜂房哈夫尼亚菌 A3、格氏沙雷氏菌 A5 处理 10 min 后提取总 DNA 进行 1.5% 琼脂糖核酸电泳结果如图 3 所示，核酸电泳结果表

明菌株经 PAW30、PAW60、PAW90 处理 10 min 后的 DNA 的条带亮度均弱于未经 PAW 处理的菌株，又进一步说明 PAW 破坏了细菌的完整性因此造成了细菌 DNA 的泄漏。



注:1,5,9,13,17 泳道分别为蜂房哈夫尼亚菌 A2、副蜂房哈夫尼亚菌 A3、格氏沙雷氏菌 A5、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌;2,6,10,14,18 泳道为 PAW30 处理 10 min;3,7,11,15,19 泳道为 PAW60 处理 10 min;4,8,12,16,20 泳道为 PAW90 处理 10 min。

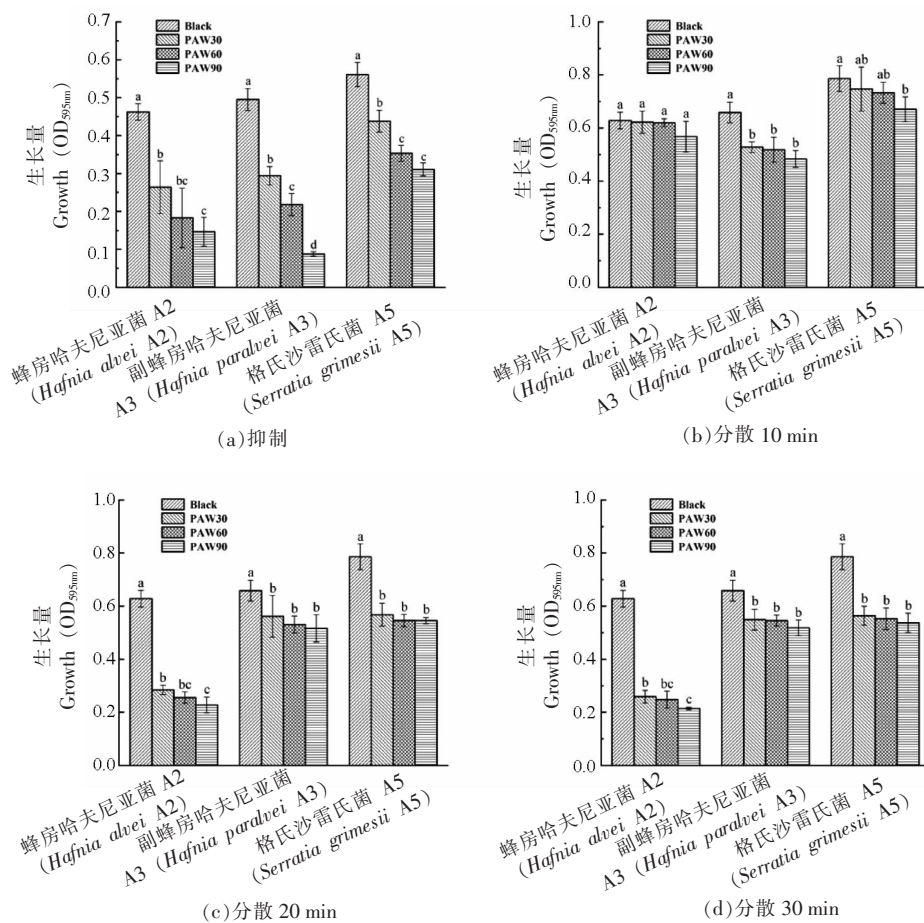
图 3 5 种菌株经不同 PAW 处理 10 min 的核酸电泳图

Fig.3 Nucleic acid electrophoresis of the five strains treated with different PAW for 10 min

2.6 PAW 处理对细菌生物被膜形成的抑制和清除效果

选取 PAW30、PAW60、PAW90 处理 2 min 后的菌悬液测试 PAW 对 3 种菌株生物被膜形成的

抑制作用,结果(图 4a)。PAW30、PAW60、PAW90 对于 3 种菌株的生物被膜形成均具有抑制作用,且随着处理时间的延长抑制效果也更加明显,这是因为 PAW 对细菌的杀灭作用有关,菌液中活菌



注:小写字母代表显著性差异($P<0.05$)。

图4 不同PAW对3种菌株生物被膜的抑制和分散作用

Fig.4 Inhibitory and dispersive effects of different PAW on biofilms of three strains

数目减少,进而减缓和抑制了生物被膜的形成^[31]。

同时测验了PAW30、PAW60、PAW90对于3种菌株成熟生物被膜作用10~30 min后的清除效果(图4b~4d),结果表明PAW30、PAW60、PAW90在10 min内无法分散蜂房哈夫尼亚菌A2和格氏沙雷氏菌A5的成熟生物被膜,但能在一定程度上分散副蜂房哈夫尼亚菌A3的生物被膜;而在20~30 min时PAW30、PAW60、PAW90可分散3种菌株成熟生物被膜。这与Govaert等^[32]研究相似,成熟生物被膜对于PAW的抵抗能力更强使得PAW在短时间内难以破坏。现研究证实PAW中的抑菌活性成分能与生物被膜中的不同组分发生反应,羟自由基可以与烷烃、醇、羧酸和胺等关键生物被膜成分发生反应,含有羟基和羧基的有机分子可以作为生物被膜中OH自由基的捕获剂^[33],PAW

中的酸性物质能破坏生物被膜基质中的磷脂中多不饱和脂肪酸,带电粒子则通过影响生物被膜基质中胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)的C-H键破坏EPS结构,带电粒子聚集在生物被膜表面也会增加静电作用从而导致生物被膜发生坍塌^[34]。

3 结论

本研究通过不同放电时间制备的PAW对蜂房哈夫尼亚菌、副蜂房哈夫尼亚菌、格氏沙雷氏菌浮游态灭活以及生物被膜的抑制和清除效果进行了研究。结果表明,随着APPJ放电时间的延长所活化的PAW中的杀菌物质含量增加,增强了PAW对所选测试菌株细胞膜完整性的破坏能力以及灭活效果。PAW对于生物被膜抑制能力优于对生物被膜的清除能力。本研究为PAW在三文鱼

腐败菌控制的应用提供了一定依据。下一步可以对其控制生物被膜的机制进行更深入的探讨。

参 考 文 献

- [1] ANAGNOSTOPOULOS D A, PARLAPANI F F, BOZIARIS I S. The evolution of knowledge on seafood spoilage microbiota from the 20th to the 21st century: Have we finished or just begun? [J]. Trends in Food Science & Technology, 2022, 120: 236–247.
- [2] ODEYEMI O A, BURKE C M, BOLCH C J S, et al. Evaluation of spoilage potential and volatile metabolites production by *Shewanella baltica* isolated from modified atmosphere packaged live mussels [J]. Food Research International, 2018, 103: 415–425.
- [3] PIOTROWSKA - CYPLIK A, MYSZKA K, CZARNY J, et al. Characterization of specific spoilage organisms (SSOs) in vacuum - packed ham by culture - plating techniques and MiSeq next - generation sequencing technologies [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2017, 97(2): 659–668.
- [4] YIN Z Q, YUAN C, DU Y H, et al. Comparative genomic analysis of the *Hafnia* genus reveals an explicit evolutionary relationship between the species *alvei* and *paralvei* and provides insights into pathogenicity [J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 768.
- [5] MACÉ S, JOFFRAUD J J, CARDINAL M, et al. Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from spoiled raw salmon (*Salmo salar*) fillets stored under modified atmosphere packaging [J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 160(3): 227–238.
- [6] KIM H W, HONG Y J, JO J I, et al. Raw ready - to - eat seafood safety: Microbiological quality of the various seafood species available in fishery, hyper and online markets [J]. Letters in Applied Microbiology, 2016, 64(1): 27–34.
- [7] ZHU Y L, HOU H M, ZHANG G L, et al. AHLs Regulate biofilm formation and swimming motility of *Hafnia alvei* H4 [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1330.
- [8] LANGSRUD S, MOEN B, MØRETRØ T, et al. Microbial dynamics in mixed culture biofilms of bacteria surviving sanitation of conveyor belts in salmon - processing plants [J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 120(2): 366–378.
- [9] XU Z M, ZHOU X X, YANG W S, et al. *In vitro* antimicrobial effects and mechanism of air plasma - activated water on *Staphylococcus aureus* biofilm [J]. Plasma Processes and Polymers, 2020, 17(8): 1900270.
- [10] MILHO C, SILVA M D, ALVES D, et al. *Escherichia coli* and *Salmonella Enteritidis* dual - species biofilms: interspecies interactions and antibiofilm efficacy of phages [J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 18183.
- [11] LAHIRI D, NAG M, SARKAR T, et al. Antibiofilm activity of α -amylase from *Bacillus subtilis* and prediction of the optimized conditions for biofilm removal by response surface methodology (RSM) and artificial neural network (ANN) [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2021, 193: 1853–1872.
- [12] AICHAR F E, MURAS A, PARGA A, et al. Quorum quenching and anti - biofilm activities of halotolerant *Bacillus* strains isolated in different environments in Algeria [J]. Journal of Applied Microbiology, 2022, 132(3): 1825–1839.
- [13] FRASSINETTI S, GABRIELE M, MOCCIA E, et al. Antimicrobial and antibiofilm activity of *Cannabis sativa* L. seeds extract against *Staphylococcus aureus* and growth effects on probiotic *Lactobacillus* spp. [J]. LWT - Food Science and Technology, 2020, 124: 109149.
- [14] ABELEDA H E P, JAVIER A P, MURILLO A Q M, et al. Alpha - amylase conjugated biogenic silver nanoparticles as innovative strategy against biofilm - forming multidrug resistant bacteria [J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2020, 29: 101784.
- [15] PANKAJ S K, WAN Z, KEENER K M. Effects of cold plasma on food quality: A review [J]. Foods, 2018, 7(1): 4.
- [16] BOURKE P, ZIUZINA D, HAN L, et al. Microbiological interactions with cold plasma [J]. Journal of Applied Microbiology, 2017, 123(2): 308–324.
- [17] SAKLANI P, NATH S, DAS S K, et al. Recent development of non - thermal cold plasma technology for safe and sustainable seafood processing: A re-

- view[J]. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 2019, 8(11): 2459–2476.
- [18] EKEZIE F G C, SUN D W, CHENG J H. A review on recent advances in cold plasma technology for the food industry: Current applications and future trends[J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 69: 46–58.
- [19] UMAIR M, JABBAR S, AYUB Z, et al. Recent advances in plasma technology: Influence of atmospheric cold plasma on spore inactivation[J]. Food Reviews International, 2022, 38(S1): 789–811.
- [20] ALBERTOS I, MARTÍN-DIANA A B, CULLEN P J, et al. Effects of dielectric barrier discharge (DBD) generated plasma on microbial reduction and quality parameters of fresh mackerel (*Scorpaenopsis scorpaenoides*) fillets[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2017, 44: 117–122.
- [21] ALBERTOS I, MARTÍN-DIANA A B, CULLEN P J, et al. Shelf-life extension of herring (*Clupea harengus*) using in-package atmospheric plasma technology[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2019, 53: 85–91.
- [22] NARASIMHAN S L, SALVI D, SCHAFFNER D W, et al. Efficacy of cold plasma-activated water as an environmentally friendly sanitizer in egg washing[J]. Poultry Science, 2023, 102(10): 102893.
- [23] OZEN E, KUMAR G D, MISHRA A, et al. Inactivation of *Escherichia coli* in apple cider using atmospheric cold plasma[J]. International Journal of Food Microbiology, 2022, 382: 109913.
- [24] QIAN J, MA L J, YAN W J, et al. Inactivation kinetics and cell envelope damages of foodborne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis* treated with cold plasma[J]. Food Microbiology, 2022, 101: 103891.
- [25] WEN G, XU X Q, ZHU H, et al. Inactivation of four genera of dominant fungal spores in groundwater using UV and UV/PMS: Efficiency and mechanisms[J]. Chemical Engineering Journal, 2017, 328: 619–628.
- [26] LI Y L, PAN J, WU D, et al. Regulation of *Enterococcus faecalis* Biofilm formation and quorum sensing related virulence factors with ultra-low dose reactive species produced by plasma activated water[J]. Plasma Chemistry and Plasma Processing, 2019, 39(1): 35–49.
- [27] CHAROUX C M G, PATANGE A D, HINDS L M, et al. Antimicrobial effects of airborne acoustic ultrasound and plasma activated water from cold and thermal plasma systems on biofilms[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 17297.
- [28] ZHAO Y M, OJHA S, BURGESS C M, et al. Inactivation efficacy and mechanisms of plasma activated water on bacteria in planktonic state[J]. Journal of Applied Microbiology, 2020, 129(5): 1248–1260.
- [29] BALZER J, DEMIR E, KOGELHEIDE F, et al. Cold atmospheric plasma (CAP) differently affects migration and differentiation of keratinocytes via hydrogen peroxide and nitric oxide-related products[J]. Clinical Plasma Medicine, 2019, 13: 1–8.
- [30] OLATUNDE O O, BENJAKUL S, VONGKAMJAN K. Dielectric barrier discharge cold atmospheric plasma: Bacterial inactivation mechanism[J]. Journal of Food Safety, 2019, 39(6): e12705.
- [31] ZHU Y L, LI C Z, CUI H Y, et al. Feasibility of cold plasma for the control of biofilms in food industry[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 99: 142–151.
- [32] GOVAERT M, SMET C, VERGAUWEN L, et al. Influence of plasma characteristics on the efficacy of cold atmospheric plasma (CAP) for inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* biofilms[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2019, 52: 376–386.
- [33] MAI-PROCHNOW A, ZHOU R W, ZHANG T Q, et al. Interactions of plasma-activated water with biofilms: Inactivation, dispersal effects and mechanisms of action[J]. Npj Biofilms and Microbiomes, 2021, 7(1): 11.
- [34] KADRI H E, COSTELLO K M, THOMAS P, et al. The antimicrobial efficacy of remote cold atmospheric plasma effluent against single and mixed bacterial biofilms of varying age[J]. Food Research International, 2021, 141: 110126.

Antibacterial Activities of Plasma-activated Water Against the Spoilage Bacteria Isolated from Salmon

Tan Xiqian¹, Pei Jianbo¹, Zhang Defu¹, Cui Fangchao¹, Meng Yuqiong², Ma Rui², Li Xuepeng¹, Li Jianrong^{1*}

(¹School of Food Science and Engineering/Institute of Marine Science and Technology, Bohai University, Jinzhou 121013, Liaoning

²State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Qinghai University, Xining 810016)

Abstract Plasma-activated water (PAW) was prepared by using atmospheric pressure plasma jet technology with compressed air at 0.15 MPa as the working gas. PAW was activated for 30 s, 60 s, and 90 s at a power of 380 W. The physicochemical properties of PAW were analyzed, and the inhibitory effects of different plasma-activated waters on various spoilage bacteria (*Hafnia alvei*, *Hafnia paralvei*, and *Serratia grimesii*) isolated from spoiled salmon as well as *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were studied. The inactivation kinetics model of PAW was analyzed using the GInaFIT Tool. The integrity of cell membrane and changes in intracellular nucleic acids after sterilization were determined. Furthermore, the inhibitory and dispersion effects of PAW on the biofilm of *H. alvei*, *H. paralvei*, and *S. grimesii* were investigated. It was found that the pH value of PAW gradually decreased with increasing discharge time, while the redox potential, conductivity, and content of H₂O₂, O₃, NO₂⁻, and NO₃⁻ increased. PAW activated for 60 s could completely kill the pathogenic bacteria after 6 min of treatment. PAW60 and PAW90 exhibited a better fit to the logarithmic model when treating *H. alvei* A2, *H. paralvei* A3, and *S. grimesii* A5 for 6 min. Cell integrity was disrupted, and DNA leakage occurred after PAW treatment. The formation of biofilms by the pathogenic bacteria mentioned above could be inhibited by PAW treatment for approximately 2 min, and the dispersion of mature biofilms required 20–30 min. This study provides a theoretical basis for using plasma-activated water to inhibit pathogenic and spoilage bacteria in seafood products.

Keywords plasma activated water; spoilage; salmon; inactivation; biofilm