第 51 卷 第 6 期：2892-2903　　高电压技术　　Vol.51, No.6: 2892-2903
2025 年 6 月 30 日　　High Voltage Engineering　　June 30, 2025
DOI: 10.13336/j.1003-6520.hve.20241587

大气压冷等离子体对鸭源鸡杆菌活性及生物膜形成的抑制作用

张　华[1]，焦　浈[2]，刘　亿[3]，崔东洁[2]，许航博[2]，马若男[2]
（1. 河南牧业经济学院食品与生物工程学院，郑州 450046；2. 郑州大学农学院，郑州 450001；
3. 郑州大学电气与信息工程学院，郑州 450001）

摘　要：鸭源鸡杆菌(*Gallibacterium anatis*，*G. anatis*)是一种危害畜禽养殖业的常见致病菌，为此探讨大气压冷等离子体射流(atmospheric cold plasma jet，ACPJ)对 *G. anatis* 活性及生物膜形成的抑制作用。首先采用发射光谱初步确定 ACPJ 活性成分。测定 ACPJ 处理不同时间后培养基(含血清)的理化性质和活性成份含量。然后通过平板计数法统计 ACPJ 处理鸭源鸡杆菌菌悬液不同时间后抑菌率。并利用结晶紫半定量黏附实验表征 ACPJ 对生物膜形成的影响。采用荧光染料碘化丙啶以及透射电镜观测 *G. anatis* 细胞壁膜完整性及显微形态变化。最后利用荧光定量 PCR 评估处理后 *G. antis* 毒力基因的表达量变化。空气 ACPJ 产生了丰富的激发态 O、N_2、N_2^+、NO 等。ACPJ 处理后的培养基酸性、氧化性、电导率及温度与处理时间呈现正相关，并在培养基中生成长效的 H_2O_2、NO_3^- 和 NO_2^- 以及短效的 $ONOO^-$等抑菌成分。ACPJ 处理 3、4 min 能够有效抑制 *G. antis* 活性及生物膜形成。ACPJ 中的活性成分会破坏 *G. antis* 的细胞壁膜完整性及显微形态，导致胞内内容物外泄，从而抑制细菌活性及生物膜形成。此外，ACPJ 还能通过下调与生物膜形成相关毒力因子基因的表达抑制生物膜形成。上述研究结果将为 ACPJ 应用于家禽传染病的防治及禽舍消毒杀菌提供理论依据。

关键词：等离子体射流；家禽；鸭源鸡杆菌；抑菌；生物膜；毒力基因

Inhibitory Effect of Atmospheric Cold Plasma on the Bacterial Activity and Biofilm Formation of *Gallibacterium anatis*

ZHANG Hua[1], JIAO Zhen[2], LIU Yi[3], CUI Dongjie[2], XU Hangbo[2], MA Ruonan[2]
(1. School of Food and Biological Engineering, Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450046, China;
2. School of Agricultural Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;
3. School of Electrical and Information Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: *Gallibacterium anatis* (*G. anatis*) is a common pathogen that poses threat to livestock and poultry farming industry. This study investigates the inhibitory effects of atmospheric cold plasma jet (ACPJ) on the bacterial activity and biofilms information of *G. anatis*. The active components of ACPJ were initially identified through optical emission spectra (OES). Subsequently, the physicochemical properties and content of active ingredients of medium (including serum) were determined following ACPJ treatment for different time. The bactericidal efficacy of *G. anatis* treated by ACPJ at different time was quantified using the plate counting method. The impact of ACPJ on biofilm formation was assessed through a crystal violet semi-quantitative adhesion assay. The integrity of cell wall and membrane and morphological changes of *G. anatis* were observed through the fluorescent dye propyl iodide and transmission electron microscopy. The expression of *G. anatis* virulence genes after ACPJ treatment was assessed using fluorescence quantitative PCR. Air ACPJ generates abundant excited O, N_2, N_2^+, NO, etc. After ACPJ treatment, the acidity, oxidation, conductivity, and temperature of the medium are positively correlated with the treatment time. ACPJ generates various antibacterial agents in the medium, including long-lived species (H_2O_2, NO_3^- and NO_2^-) and short-lived species ($ONOO^-$). 3 and 4-min ACPJ treatment effectively inhibits the bacterial activity and biofilm formation of *G. antis*. The active species of ACPJ can compromise the cell wall and membrane integrity as well as the micromorphology of *G. anatis*, which results in the release of

基金资助项目：河南省重大科技专项(221100110200)；河南省科技攻关计划项目(242102111042；23210211013)。
Project supported by Major Scientific and Technological Special Project of Henan Province(221100110200), Foundation of Key Technology Research Project of Henan Province (242102111042, 23210211013).

intracellular contents, ultimately inhibiting the bacterial activity and biofilm formation. Moreover, ACPJ also exerts inhibitory effects on biofilm formation by downregulating the expression of genes associated with virulence factors implicated in the process of biofilm development. These results will provide a theoretical basis for the application of ACPJ in preventing and controlling poultry infectious diseases, as well as disinfecting poultry houses.

Key words：plasma jet; poultry; *Gallibacterium anatis*; antibacterial; biofilm; virulence genes

0　引言

鸭源鸡杆菌(*Gallibacterium anatis*，*G. anatis*)为巴氏杆菌科鸡杆菌属的代表种，属革兰氏阴性菌，通常栖息于家禽的上呼吸道和下生殖道[1-2]。根据其溶血特性，被分为 2 个表型不同的生物变种：其中“hemolytica”会引起 β 溶血，而“anatis”则是不会引起溶血的变种。在某些免疫抑制、合并感染(尤其是与大肠杆菌或支原体合并感染)或各种应激因素的情况下，溶血型鸭源鸡杆菌会引起鸡的输卵管炎、腹膜炎和呼吸系统疾病以及产蛋量减少和死亡率增加[3-4]。由鸭源鸡杆菌引起的感染性疾病呈现全球分布——英国等欧洲国家[3]，埃及、摩洛哥等非洲国家[5-6]，印度、伊朗、土耳其等亚洲国家[7-9]，均有分离到鸭源鸡杆菌的报道。鸭源鸡杆菌在我国鸡群中也普遍存在[10]。该细菌主要影响鸡，但其他种类的家禽和野生鸟类也可能受到感染[11]。此外，它还能够感染更广泛的宿主范围，包括哺乳动物，如：牛[12]和人类[13]。鸭源鸡杆菌具有溶血性、多种毒力因子以及多重耐药性等特点，通过抗生素治疗其感染面临诸多挑战。此外，随着我国家禽业“无抗”时代的来临，积极探索新型高效防控和治疗方案已成为研究热点。

等离子体被称为物质的第 4 种状态。它是一种含有电子、自由基、离子等各种活性物质的电离混合物[14]。如今，随着等离子体技术的不断发展，低温等离子体因其温度低、产生的活性物质丰富等特点，在医学[15]、农业食品[16-17]和畜牧业[18]等领域的应用备受关注。大量研究表明，大气压冷等离子体富含各种活性氧(reactiveoxygen species，ROS)，如羟基自由基(•OH)、超氧阴离子自由基($\bullet O_2^-$)、臭氧(O_3)、单线态氧($^1O_2$)、过氧化氢(H_2O_2)等；活性氮(reactive nitrogen species，RNS)如过氧亚硝酸根($ONOO^-$)、硝酸根(NO_3^-)、亚硝酸根(NO_2^-)、一氧化氮(NO)等成分。这些活性成分能够灭活多种致病微生物[19-21]。与其他杀菌技术(UV、臭氧等)相比，大气压冷等离子体源多种多样，能够适用于众多场景下的各类目标物处理。比如，大气压栅状介质阻挡放电等离子体可用于空气消毒[22]，表面等离子体可用于大面积处理[23]。此外，大气压冷等离子体射流(atmospheric cold plasma jet，ACPJ)可以直接处理人体组织，被广泛应用于医学研究[15]。Abdoli 等证实空气等离子射流可以有效杀灭鸡蛋壳上的肠炎血清型沙门氏菌，同时对蛋壳角质层的完整性和鸡蛋质量没有影响[16]。Yong 等使用等离子体(在氮气流中加入氧气)处理生鸡胸肉中大肠杆菌，灭活效果显著[24]。Lee 等的研究结果显示等离子体射流可有效灭活切片鸡胸肉上的单核细胞增生李斯特菌并延长肉类保质期[25]。此外，等离子体射流也能够满足内部深处细小空间的消毒，比如牙根管[15]。

虽然等离子体技术已应用于禽类产品中食源性致病菌的杀菌消毒，但对禽类呼吸道致病菌的灭活仍鲜有报道。能否利用等离子体射流灭活家禽呼吸道内部病菌，进而防治家禽病害的发生？基于此设想，本文以病鸡中分离得到的鸭源鸡杆菌为研究对象，检测 ACPJ 对鸭源鸡杆菌菌株的抑菌效果及抗生物膜形成的作用，并通过测定鸭源鸡杆菌细胞壁膜完整性、细胞形态显微结构及毒力基因的表达，探究 ACPJ 对鸭源鸡杆菌抑菌机制；同时，检测 ACPJ 气相活性成分与处理后培养基的物化特性和活性成分含量，从而评估 ACPJ 中关键抑菌成分。本文的研究结果将为 ACPJ 在家禽疾病防控领域的进一步应用提供理论依据。

1　实验材料与实验方法

1.1　鸭源鸡杆菌

选取分离自病鸡(罗曼粉壳蛋鸡)上腭裂处的鸭源鸡杆菌(GAC026)作为研究对象，菌株在含 5%胎牛血清血平板上厌氧培养 24 h，置于 37 ℃培养箱中。传代 3 次，接种于 Luria-Bertani 培养基(Luria-Bertani broth，LB)，含有质量分数为 5%~10%的胎牛血清。于 37 ℃、180 r/min 下厌氧培养 24 h。每毫升菌液中含有的细菌群落总数初始值约为 10^8 CFU/mL，将其作为待用菌悬液。

1.2　ACPJ 装置

如图 1(a)所示，本实验采用 ACPJ 装置处理培

养基中的鸭源鸡杆菌。装置采用高频交流电源，频率为 35 kHz。气体放电发生在管道与铜电极之间，在 6 mm 的间隙中产生等离子体，并通过喷嘴向外喷出，形成射流。使用空气作为工作气体，经预实验评估，在较低能耗下保证杀菌效果，选择体积流量为 15 L/min。将 1.1 节中配置好的菌悬液(100 mL)置于喷嘴下(喷嘴末端浸没在液面下 5 mm)，进行不同时间(1、2、3、4 min)的处理。处理过程中的放电电压和电流分别用高压探头(Tektronix，P6015A)和电流探头(Pearson Electronics，2877)进行测量，波形数据由示波器(Teledyne，WaveSurfer 3000)记录。放电过程稳定，电压电流如图 1(b)所示。

1.3 ACPJ 气相活性成分检测

采用发射光谱(optical emission spectroscopy，OES)来检测 ACPJ 活性成分。OES 可用于检测等离子体中的活性物质种类及状态。将光谱仪 AvaSpec-ULS 4096CL-EVO(型号为 Avantes)光纤探头置于距离等离子体射流末端 1 cm 处，并放置准焦透镜垂直于等离子体射流，遮挡其他光源，采集 200~900 nm 范围的光谱信号。数据采用 Avasoft 8.10.0 软件进行分析和量化。

1.4 ACPJ 处理培养基(含血清)的理化性质和活性成份检测

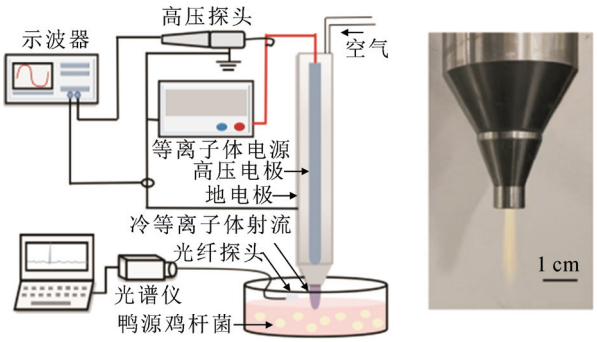
分别制备 100 mL LB 培养基(含 10%胎牛血清)，经 ACPJ 处理 1、2、3 和 4 min 后测定溶液中的物理化学特性，如：pH、氧化还原电位(oxidation-reduction potential，ORP)、温度与电导率以及活性氧氮成份。使用未经处理的培养基 0 min 作为对照。

1.4.1 pH、ORP、温度与电导率的测定

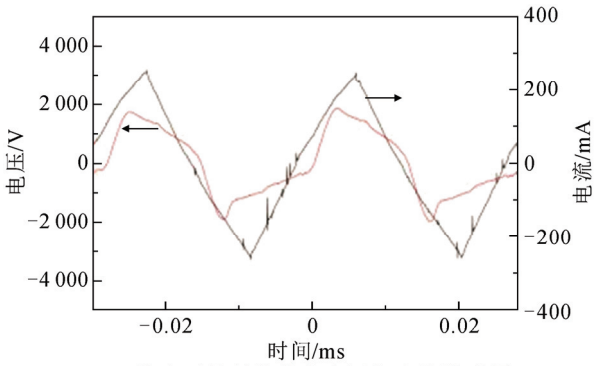
在常温下用 pH 计、氧化还原计(型号为 Mettler Toledo)、温度计和便携式电导率表(型号为 F3-Fild)测量经射流不同处理时间菌液的 pH 值、ORP、温度和电导率。

1.4.2 过氧化氢(H_2O_2)、硝酸根(NO_3^-)和亚硝酸根(NO_2^-)含量测定

H_2O_2：使用过氧化氢检测试剂盒测定 H_2O_2 的浓度[26]。将 ACPJ 处理后的培养基用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution，PBS) (50 mmol/L，pH=6.0)稀释 50 倍。在检测孔内分别加入 50 μL 稀释后的样品和标准品，随即加入 100 μL H_2O_2 检测试剂，混匀后于室温下反应 30 min，多功能酶标仪(型号为 Varioskan)检测 560 nm 处的吸光度。根据标准曲线计算培养基中的 H_2O_2 浓度。



(a) 等离子体射流实验接线图与射流实物图



(b) 等离子体射流放电电压与电流波形图

图 1 等离子体射流装置及放电特性波形图

Fig.1 Waveforms of plasma jet device and its discharge characteristics

NO_3^-：使用盐酸和氨基磺酸检测 ACPJ 处理后培养中的 NO_3^- 含量[27]。配制不同浓度 $NaNO_3$ 标准溶液用于标准曲线的测定。分别取 5 mL 标准溶液和培养基于 15 mL 离心管中，加入 100 μL 的 1 mol/L 的盐酸和 10 μL 质量分数为 0.8%的氨基磺酸，混匀后用紫外分光光度计测定溶液在 220 nm 处的吸光度，根据标准曲线计算培养基中 NO_3^- 的浓度。

NO_2^-：采用 Griess 反应法测定 NO_2^- 的含量[28]。配制不同浓度的 $NaNO_2$ 标准溶液用于标准曲线的测定。分别取 5 mL 标准溶液和培养基于 15 mL 离心管中，加入 10 g/L 的对苯氨基磺胺 100 μL，反应 5 min 后随即加入 1 g/L 的 N-1-盐酸萘乙二胺(N-(1-Naphthyl)ethylenediamine Dihydrochloride，NEDA·2HCl)100 μL，反应 1 h 后测定溶液在 550 nm 处的吸光度，根据标准曲线计算 NO_2^- 的浓度。

1.4.3 羟自由基(•OH)、单线态氧($^1O_2$)超氧阴离子($\bullet O_2^-$)和过氧亚硝酸根($ONOO^-$)含量测定

利用电子自旋共振(electron spin resonance，ESR)结合相应化合物和清除剂分别检测短寿命活性物质。

利用 5,5-二甲基-1-吡咯啉-N-氧化物(5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide，DMPO)和 2,2,6,6-四甲基哌啶(2,2,6,6-Tetramethylpiperidine，TEMP)检测·OH 和 $^1O_2$ 的含量[29]。分别取 20 μL DMPO 和 10 μL TEMP 加入 100 mL 培养基中，经振荡器混匀。将 ACPJ 置于液面下方处理 0、2、4 min。DMPO 与·OH 反应生成自旋加和物 DMPO-OH，在 ESR 谱图中呈现为 1:2:2:1 的特征峰。TEMP 可以与液相 $^1O_2$ 粒子反应形成稳定的加和物 TEMPO，在 ESR 图谱中呈现 1:1:1 的特征峰。

利用 1-羟基-2, 2,6,6-四甲基-4-氧代-哌啶盐酸盐(1-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-oxo-piperidine hydrochloride，TEMPONE-H)检测·O_2^-和 $ONOO^-$的含量[30-31]。取 10 μL TEMPONE-H(浓度为 20.83 g/L)加入 100 mL 培养基中，经振荡器混匀。将 ACPJ 置于液面下方处理 0、2 min 和 4 min。TEMPONE-H 能够与•O_2^-和 $ONOO^-$反应生成稳定的自旋加和物 1-羟基-2,2,6,6-四甲基-4-氧代哌啶氧基(1-hydroxy-2，2，6，6-tetramethyl-4-oxo-piperidinoxyl，TEMPONE)。此外，联合利用 TEMPONE-H 和•O_2^-清除剂超氧化物歧化酶(superoxide dismutase，SOD，浓度为 40 000 U/mL)确定 $ONOO^-$的含量(U 是酶活力单位)。

1.5　抑菌活性测定

使用血平板培养基平板计数法来探究 ACPJ 对鸭源鸡杆菌的抑菌效果[23]。将上述鸭源鸡杆菌分装至 500 mL 烧杯中，使每杯含有 100 mL 菌悬液。ACPJ 分别处理 1、2、3 min 和 4 min。使用未经 ACPJ 处理的鸭源鸡杆菌 0 min 作为对照，将菌液离心收集后进行稀释涂布，37 ℃厌氧培养 48 h 后观测结果。

1.6　结晶紫半定量黏附实验

取 ACPJ 处理 1、2、3、4 min 的鸭源鸡杆菌菌液 1 mL，同时以 0 min 作为空白对照，离心，沉淀菌体，转入 24 孔板中，加入 1 mL 培养基(含血清)，35 ℃静置培养 96 h 后，清洗除去培养基和浮游菌，自然晾干之后每孔加入 750 μL 甲醇固定 15 min，去掉甲醇自然晾干，加入 750 μL 的 0.1%结晶紫染色 15 min，用自来水清洗，自然干燥，加入 750 μL 95%乙醇，37 ℃溶解 30 min，用酶标仪在 590 nm 波长处测量各孔的吸光度[32]。

1.7　ACPJ 对鸭源鸡杆菌细胞壁膜完整性的影响

1.7.1　碘化丙啶染色

碘化丙啶(propidium iodide，PI)能透过受损的细胞膜与 DNA 分子结合，因此受损细胞会发出红色荧光[33-34]。取经 APPJ 处理不同时间的菌悬液 0.5 mL 于离心管中，8 000 转/min，离心 8 min，弃上清。在菌沉淀中加入 1 mL PBS，轻轻重悬细胞进行清洗，离心，弃上清，重复 1 次，对细胞进行 2 次清洗。取 100 μL PI 工作液分别加入到不同处理组的菌沉淀中进行染色，37 ℃条件下避光孵育 15 min。使用酶标仪在激发波长为 488 nm 和发射波长为 617 nm 处读取吸光值。

1.7.2　透射电子显微镜观测细胞形态

收集经 ACPJ 处理不同时间的细菌细胞于 4%戊二醛中过夜，河南中医药大学透射电子显微镜中心制备常规超薄切片，透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)(型号为 JEM-1400)观察检测。

1.8　ACPJ 对鸭源鸡杆菌毒力因子基因表达量的影响

鸭源鸡杆菌菌悬液未经 ACPJ 处理组设置为对照，ACPJ 处理 2 和 4 min 与之比较。鸭源鸡杆菌的 RNA 提取、逆转录按照细菌 OMEGA 试剂盒、逆转录试剂盒操作说明书进行操作。将反转出的 cDNA 放于–20 ℃保藏。参考鸭源鸡杆菌 TH22 菌株基因组(GenBank No.CP103874.1)基因序列，利用 NCBI 引物-BLAST(National Center for Biotechnology Information，Primer，Basic Local Alignment Search Tool)设计 *OmpW*、*OmpA*、*Ipxd*、*GtxA*、*TolC*、*BamA*、*GapA* 和 *GyrB* 基因(内参基因)引物(表 1)。南京金斯瑞生物科技股份有限公司进行引物合成。

表 1　引物设计

Table 1　Design of primer

基因	引物	序列
OmpA	正向引物	TAACCACCGAATACACCGTA
	反向引物	CAAGCAAACACTTTCTACGC
Tolc	正向引物	ATGGCTCGCAACACTTTATT
	反向引物	CGGTTGGTTTTAAGTTCAGC
GtxA	正向引物	TATGGAGAAACCGGTAACGA
	反向引物	GTGTCGGAACTAAGAGCATC
Ipxd	正向引物	GTATTGCACCATTGGAGTGT
	反向引物	TGATCATCAGCGCAATAAGG
OmpW	正向引物	GGTTGGGTCAAGAGTAACAC
	反向引物	AAAGACGCTAATGGCAATGT
BamA	正向引物	AATTGGAGATCGAAGAGGGT
	反向引物	CCGGTTGAATTTCCATCTGT
GapA	正向引物	GAACATTGGAGTGCTGTCTT
	反向引物	ACGAAATCGGTGTTGATGTT
GyrB	正向引物	TGTGCGTTTCTGGCCAAGTC
	反向引物	CGCTCACCAACTGCAGATTC

RT-PCR 反应体系(15 μL)为：模板 1 μL，上、下游引物各 0.5 μL，双蒸水 5 μL，8 μL 的 2 倍浓度的 Taq Pro Universal SYBR qPCR 预混液。qPCR 反应条件为：95 ℃，30 s；95 ℃，10 s，52 ℃，30 s，40 个循环；95 ℃，15 s；60 ℃，60 s；95 ℃，15 s。

1.9 数据统计分析

本研究的所有试验均独立重复 3 次，试验结果用平均值±方差表示，使用 SPSS 22.0 处理数据。采用 LSD-t 检验进行多组样品之间的方差分析，P 值 < 0.05 说明具有显著差异。使用配对 t 检验进行 2 组样品之间的方差分析，*表示 P<0.05、**表示 P<0.01、***表示 P<0.001。

2 结果与讨论

2.1 ACPJ 活性成分

首先通过 OES 检测放电产生的 ACPJ 中的各种气态活性成分。如图 2 所示，随着电压的增加，各种谱峰强度均增强。比如原子氧 O 谱线(波长为 777.3、844.5、926.5 nm，下同)，N_2 第二正带系(second positive system，SPS，$C^3\prod_u \rightarrow B^3\prod_g$)(313.6、325.7、327.6、336.8、357.7、395.7、495.6、419.9、424.5 nm)，N_2^+ 第一负带系(first negative system，FNS，$B^2\sum_u \rightarrow X^2\sum_g$)(391.5 nm 和 400~520 nm)。同时产生了 NO_γ($A^2\sum^+ \rightarrow X^2\prod$)(200~300 nm) 和 OH(A→X) 带(306.8 nm)的发射光谱。O 主要通过空气中 O_2 裂解产生，在发射光谱中占主要地位。N_2 的 SPS、FPS 及 N_2^+的 FNS 均可直接或间接由电子碰撞激发[35]。NO_γ 体系易被 N_2 和 O_2 发生化学反应激发[36]。OH 可以通过水分子被电子或等离子体中半衰期较长的物质碰撞激发分解产生[37]。结果表明，ACPJ 可以产生丰富的活性氧氮成分。

2.2 ACPJ 处理后培养基(含血清)的理化性质和活性成分

ACPJ 中的活性氧氮成分能够进一步与液体发生复杂的物理化学反应产生一系列的次级活性氧氮成分[38]。本研究通过测定 pH、ORP、电导率、温度来分析 ACPJ 处理后的 LB 培养基(含 10%胎牛血清)的理化性质，并测定了培养基中 3 种长效活性成分(H_2O_2、NO_3^- 和 NO_2^-)和 3 种短效活性成分(•OH、$•O_2^-$ 和 $ONOO^-$)的相对含量。

2.2.1 pH、ORP、温度与电导率

前人研究表明酸性环境能够促进活性成分的生物效应，特别是抑菌活性[39]。酸性能够对微生物胞内的生物大分子物质造成损伤[40]。如图 3 所示，随着 ACPJ 处理时间的增加(0 到 4 min)，pH 从 8.2 下降到 4.8(P<0.05)，培养基酸化的主要原因是气相等离子体中产生的氮氧化物溶于水中产生硝酸和亚硝酸(反应式(1)、(2))[41]。较低的 pH 有利于活性成分穿过细胞壁膜，使微生物更易受活性成分的氧化攻击[42]。ORP 是评价溶液整体氧化还原电势指标，可以用于评价培养基中 ROS 的整体水平。文献研究表明，高 ORP 值与细胞膜损伤具有直接关系[43]。如图 3 所示，随着 ACPJ 处理时间的增加，ORP 从 362.90 mV 显著增加到 643.45 mV(P<0.05)，这表明培养基中产生了大量具有氧化能力的活性成分。培养基中的温度变化结果如图 3 所示，随着 ACPJ 处理时间的延长，温度逐渐升高，但在 4 min 内温度

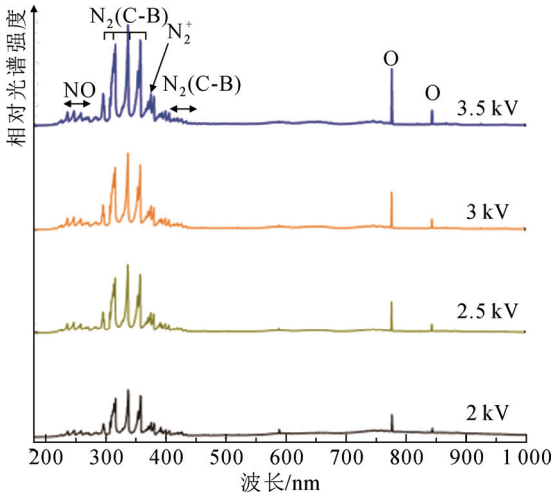


图 2 ACPJ 在 200~1 000 nm 范围内的发射光谱

Fig.2 Optical emission spectra of ACPJ in the range of 200~1 000 nm

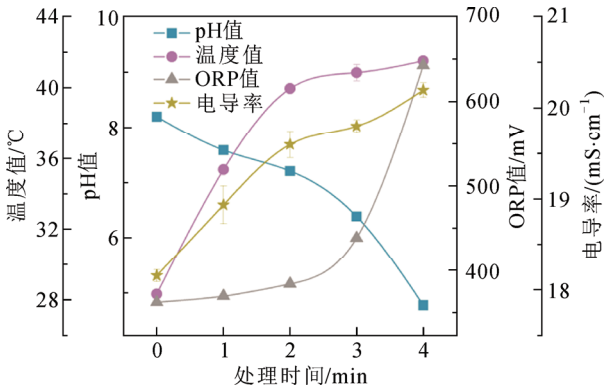


图 3 ACPJ 处理培养基(含血清)后的 pH、ORP、温度及电导率变化

Fig.3 Alterations in pH, ORP, temperature and conductivity of the medium (with serum) treated by ACPJ treatment

低于 42 ℃，这表明培养基的温度不足以引起微生物失活。最后，检测了电导率的变化。如图 3 所示，随着 ACPJ 处理时间从 0 min 延长到 4 min，电导率值从 18.14 mS/cm 显著增加到 20.19 mS/cm (P<0.05)。电导率的升高与活性粒子浓度增加有关[44]。这表明培养基中的活性氧氮积累量随着 ACPJ 处理时间的延长而增大，这与 ORP 结果相一致。

$$NO_2 + H_2O \rightarrow NO_2^- + NO_3^- + 2H^+ \quad (1)$$

$$NO + NO_2 + H_2O \rightarrow 2NO_2^- + 2H^+ \quad (2)$$

2.2.2　过氧化氢、硝酸根和亚硝酸根含量变化

H_2O_2 是 ACPJ 产生的一种重要氧化物质，根据温度不同，其半衰期从 8 h 到 20 d 不等[41]。如图 4(a)所示，随着 ACPJ 处理时间从 0 min 延长到 4 min，H_2O_2 浓度从 0 显著增加到 0.40 mmol/L(P<0.05)，说明培养基中的 H_2O_2 含量随着 ACPJ 处理时间的延长而增多。H_2O_2 可能通过与亚硝酸根的反应产生过氧亚硝酸(反应式(3))，进一步发挥杀菌作用[45]。ACPJ 产生的 RNS，如 NO_3^- 和 NO_2^-，被认为在抑菌过程中起着关键作用[46]。如图 4(b)所示，随着 ACPJ 处理时间增加，NO_3^- 浓度从 0 提高到 2.25 μmol/L(P< 0.05)。如图 4(c)所示，当 ACPJ 处理 4 min 时，培养基中的 NO_2^- 浓度升高到 13 μmol/L(P< 0.05)。

$$HNO_2 + H_2O_2 \rightarrow ONOO^- + H_2O \quad (3)$$

2.2.3　羟自由基、单线态氧、超氧阴离子和过氧亚硝酸根含量测定

前人研究表明等离子体的生物效应主要由短寿命的活性成分发挥作用[47]。在本研究中利用 EPR 检测培养基里的短效活性成分。如图 5(a)所示，发现 ACPJ 在培养基中产生了少量•OH。$^1O_2$ 也被报道在灭活微生物中起到重要作用[20, 47]，但是在这个实验中并没有检测到 $^1O_2$(如图 5(b)所示)，其原因将在下文中讨论。

此外，利用 TEMPONE-H 检测到相应特征峰，说明培养基中有 $\bullet O_2^-$ 和 $ONOO^-$ 产生(图 5(c))。为了进一步鉴别两者的产生，将培养基中加入 $\bullet O_2^-$ 的特异性清除剂 SOD，发现特征峰轻微减弱。这说明 ACPJ 在培养基中主要产生的是 $ONOO^-$，仅产生了微量 $\bullet O_2^-$(图 5(d))。总的来说，本实验中检测到的 ROS(•OH，$\bullet O_2^-$ 和 $^1O_2$)量很少或没有，推测可能是因为培养基本身作为良好的清除剂消耗掉了这些短效的 ROS。之前研究发现有机物能很好地清除活性氧，比如牛血清白蛋白(bovine serum albumin，BSA)、牛肉膏及蛋白胨[48-49]。之前研究中也发现组

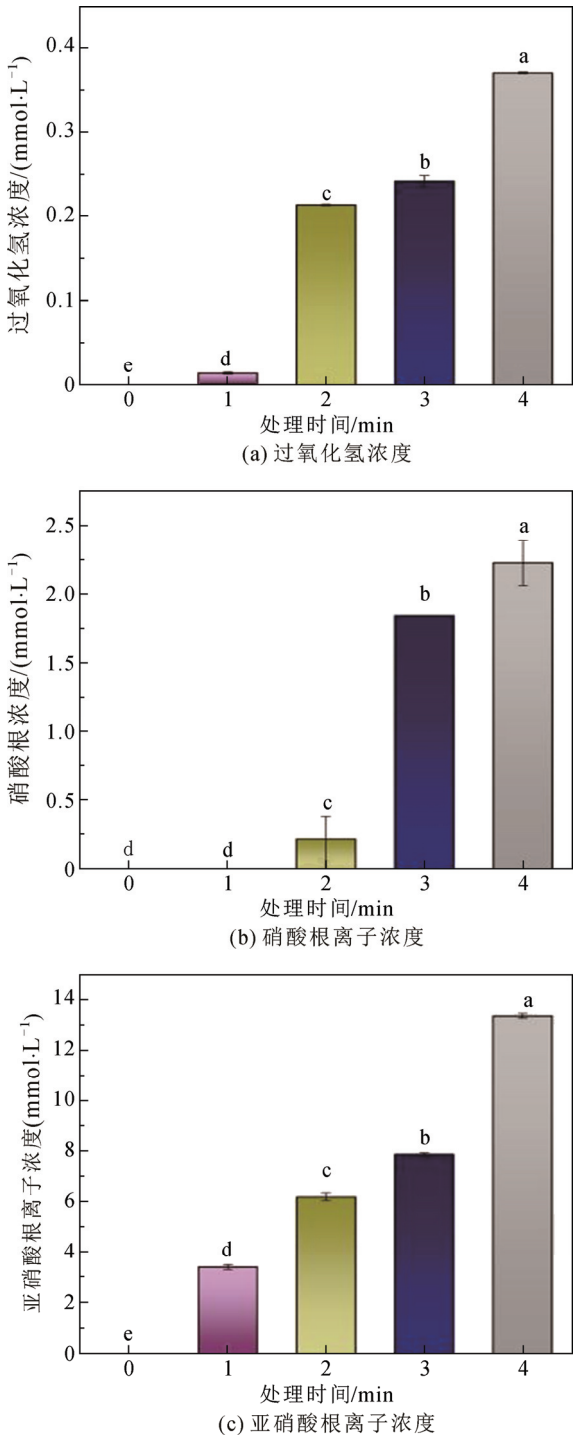


图 4　ACPJ 处理后培养基(含血清)中长效活性成分含量

Fig.4　Long-lived species in the medium (with serum) after ACPJ treatment

氨酸能很好地清除掉单线态氧[50]，因此推测培养基里面的有机物质清除掉了 ACPJ 产生的短寿命活性物质。而 $ONOO^-$ 的寿命相对较长，能够发挥更好的生物损伤效应。

2.3　ACPJ 抑制鸭源鸡杆菌活性及生物膜形成

在本研究中，实验采用含血清的鸭源鸡杆菌悬

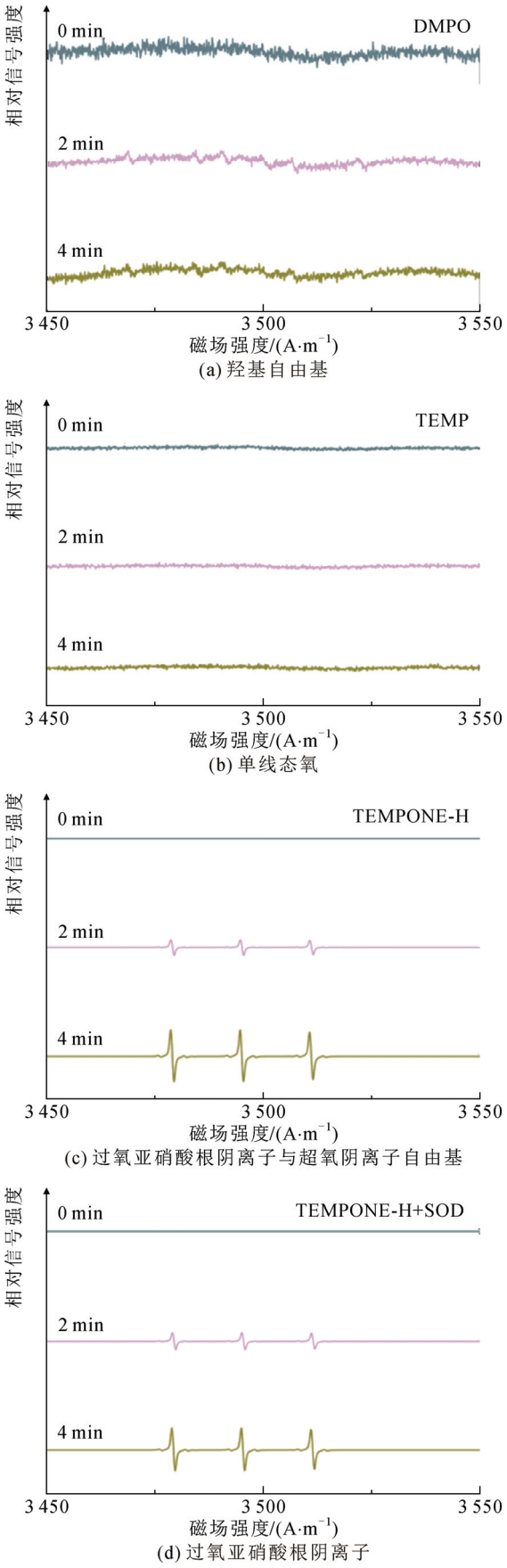


图 5 ACPJ 处理后培养基(含血清)中短效活性成分含量

Fig.5 Short-lived species in the medium (with serum) after ACPJ treatment

液，以接近该菌真实栖息于体内的生存环境。如图 6 所示，经 ACPJ 处理 1、2、3、4 min 后，活菌数分别降至 8.78±0.03，8.33±0.07，4.78±0.01 和 2 lg(CFU/mL)(检测下限)。与空白对照组(0 min)相比，除 1 min 处理组外，ACPJ 处理组的活菌数均显著性降低(P<0.05)。结果表明 ACPJ 处理 3 min 就可以有效抑制鸭源鸡杆菌的生长，4 min 时抑菌率接近 100%。Pan 等研究发现经长时间等离子体处理后，粪肠球菌的细菌菌落数量显著减少，处理 8 min 或 10 min 后具有显著的抑菌效果(P<0.05)[51]。Alkawareek 等利用 ACPJ 处理金黄色葡萄球菌、蜡样芽胞杆菌、铜绿假单胞菌和大肠杆菌，发现 10 min 后革兰氏阳性菌和阴性菌都能被完全杀灭[52]。大量研究表明等离子体对微生物的作用主要归因于活性氧氮成分。结合活性物质检测结果，ACPJ 在培养基中产生的 $ONOO^-$对细胞外部结构有很强的氧化作用，引起细胞膜或细胞内大分子物质(如 DNA、蛋白质、碳水化合物等)的氧化损伤，最终导致死亡[53]。此外，本研究发现 ACPJ 处理 3 min 后才能有效抑制鸭源鸡杆菌的生长，与纯水环境下的杀菌效果相比较弱[47]，推测血清成分具有缓冲保护作用，消耗掉了大量短寿命 ROS(•OH，$\bullet O_2^-$和 $^1O_2$)。虽然处理过程中产生了 H_2O_2，但是在 4 min 的处理时间下，此浓度(0.40 mmol/L)无法发挥杀菌作用[20,54]。因此在本处理体系下，主要是 $ONOO^-$发挥作用。

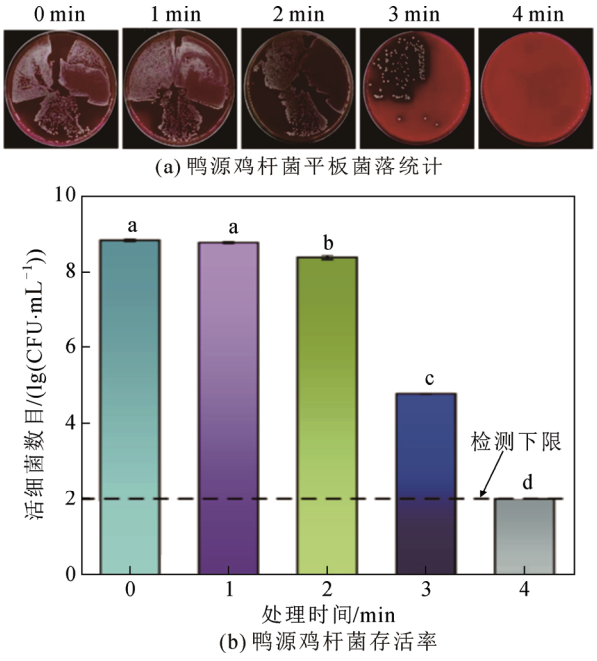


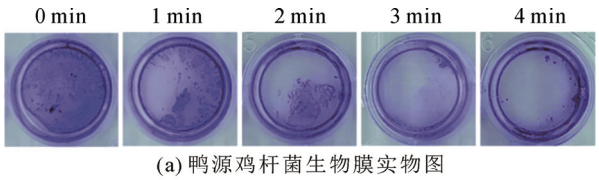
图 6 ACPJ 对鸭源鸡杆菌的抑菌效果

Fig.6 Antibacterial effect of ACPJ treatment against *G. anatis*

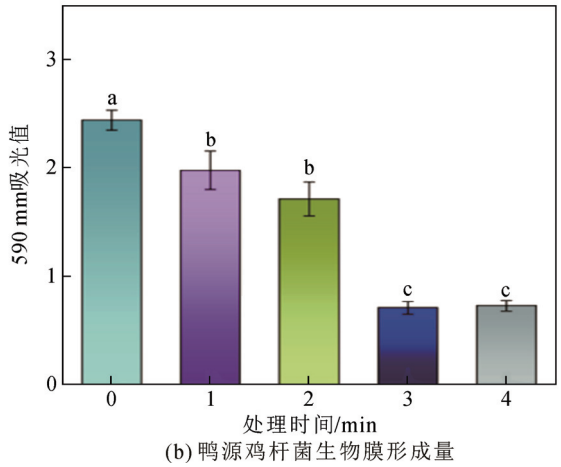
实际情况下，细菌能够通过形成生物膜，进而侵染家禽诱发病害。生物膜形成的三维网状结构能够黏附在非生物或生物表面，将细菌包裹在黏性基质内以抵抗抗生素和宿主免疫反应，从而提高了对抗菌药物的耐药性[55-56]。像许多细菌一样，鸭源鸡杆菌也可形成生物膜，主要由蛋白质、胞外多糖、胞外 DNA 和脂质组成 [57-58]。由图 7 可见，24 孔板内鸭源鸡杆菌细菌生物膜面积与 ACPJ 处理时间呈相关性。ACPJ 处理 3、4 min 后均对生物膜的形成有显著的抑制作用(P<0.05)。Wang 等研究结果显示，大气压氮气等离子体处理能有效抑制金黄色葡萄球菌的生物膜再生能力[59]。Mai-Prochnow 等使用等离子体射流处理铜绿假单胞菌 10 min 后，共聚焦显微镜下无法观察到附着的生物膜细胞[60]，与本研究结果一致。

2.4　ACPJ 破坏鸭源鸡杆菌细胞壁膜完整性

为了深入探究 ACPJ 抑制鸭源鸡杆菌活性以及生物膜形成机制，首先评估了 ACPJ 对鸭源鸡杆菌细胞形态及细胞壁膜完整性的影响。使用 PI 染料进行细胞染色和 TEM 亚显微结构观测，如图 8(a)所示，随着 ACPJ 处理时间的增加，细胞膜受损程度增加，红色荧光强度显著增加(P<0.05)，这与抑菌结果一致。见图 8(b)，TEM 结果显示 ACPJ 处理对鸭源鸡杆菌细胞的破坏作用主要体现在细胞壁膜和细胞亚微结构的损伤及细胞内容物的流出。未经处理的鸭源鸡杆菌(0 min)细胞呈圆润且完整长杆状，具有荚膜和内膜的细胞膜结构，细胞内容物充盈丰富。ACPJ 处理 2 min 后，鸭源鸡杆菌细胞膜出现轻微破损，细胞形态无明显形变，但细胞内容物有泄漏。随处理强度增加，ACPJ 处理 4 min 后观察到细胞膜破碎或消失，细胞凹陷，细胞内容物严重流失，菌体内部的密度分布不均匀，内部结构无法清晰辨明，菌体呈现解体趋势。结果表明，ACPJ 对鸭源鸡杆菌具有明显的杀灭作用，且杀灭效果和处理时间呈正相关。蒲启康等通过透射显微镜观察到，ACPJ 对白色念珠菌的细胞结构具有显著的破坏作用，这与鸭源鸡杆菌经 ACPJ 处理后的结果相符[61]。



(a) 鸭源鸡杆菌生物膜实物图



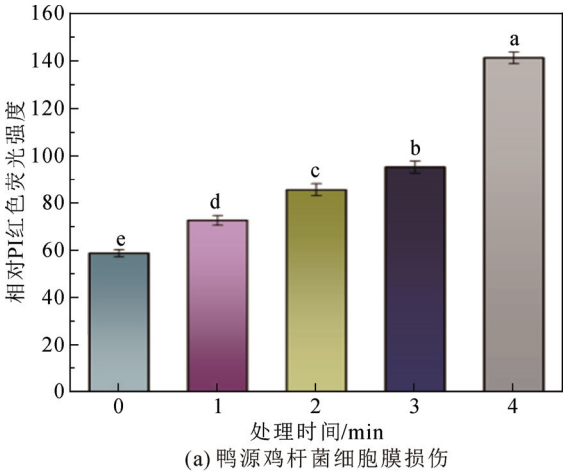
(b) 鸭源鸡杆菌生物膜形成量

图 7　ACPJ 对鸭源鸡杆菌生物膜形成的抑制效果

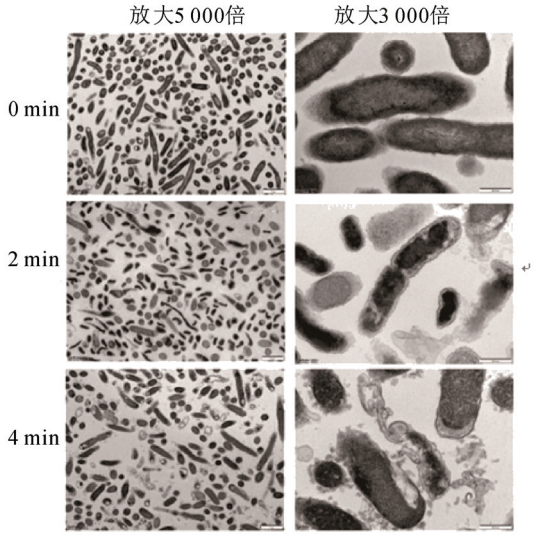
Fig.7　Inhibitory effect of ACPJ treatment on the biofilm formation of *G. anatis*

2.5　ACPJ 抑制鸭源鸡杆菌毒力因子基因表达

通过荧光定量 PCR 验证 ACPJ 处理后鸭源鸡杆菌毒力基因的表达量变化情况。结果如图 9 所示，外膜蛋白基因 *OmpA*、*OmpW* 和 *TolC*，细胞粘附素



(a) 鸭源鸡杆菌细胞膜损伤



(b) 鸭源鸡杆菌显微形态结构

图 8　ACPJ 对鸭源鸡杆菌细胞膜及亚显微结构的影响

Fig.8　Influence of ACPJ on the cell membrane and submicroscopic structure of *G. anatis*

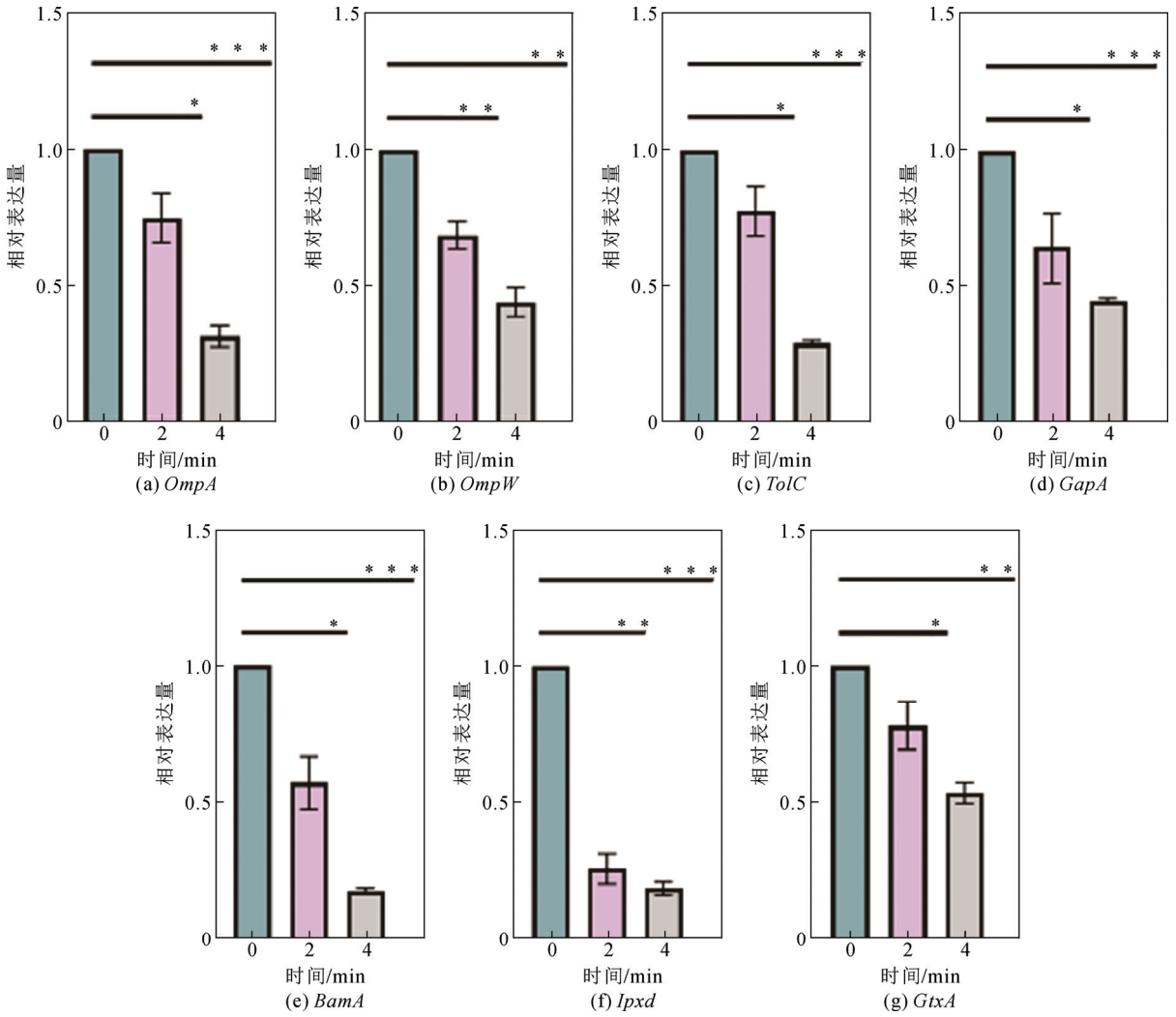


图 9 ACPJ 处理前后鸭源鸡杆菌毒力基因相对表达量变化

Fig.9 Changes in the relative expression levels of virulence genes of *G. anatis* before and after ACPJ treatment

相关基因 *GapA*，外膜蛋白组装因子 *BamA*，脂多糖合成基因 Ipxd，具有白细胞毒性的 RTX(Repeats in Toxins)样毒素基因 *GtxA* 等毒力基因的表达量均随 ACPJ 处理时间的增加显著降低。

2.6 ACPJ 抑制鸭源鸡杆菌生物膜形成的机制分析

传统的抗生素类药物能够影响细菌的毒力因子表达。比如，Kashyap 等研究发现短时间暴露于高浓度抗生素妥布霉素(10×最小抑菌浓度)可显著降低鲍曼不动杆菌参与营养摄取的基因(*OmpW*)表达[46]。Guan 等使用头孢噻肟钠和虎杖苷(植物虎杖提取物)联合处理肺炎克雷伯菌，结果显示该菌经联合处理后 *TolC* 基因表达量降低[62]。在等离子体抑菌机制研究中，潘圆圆等发现等离子体诱发的单增李斯特菌致病性减弱涉及多种毒力基因群的调控，包括生物膜形成、群体感应、鞭毛生物合成等相关基因普遍下调[63]。Thiyagarajan 等发现脑膜炎奈瑟氏菌中控制细菌引起感染的毒力因子 *PilC* 的表达量至少表示数目减少不能使用“倍”[64]。此外，等离子体对生物膜形成相关的毒力因子的影响也被大量发现报道。比如俞志远等报道的金黄色葡萄球菌生物膜形成相关基因(*IcaA*、*SarA* 和 *SigB*)[65]，廖雪等报道的鼠伤寒沙门氏菌胞外多聚物相关基因的表达均被抑制[66]。这些研究结果表明，与传统抗生素类药物相比，等离子体可能具有更宽泛的细菌生物膜抑制机制。基于以上结果，本研究重点阐明了 ACPJ 对鸭源鸡杆菌中涉及细菌致病力以及生物膜形成相关基因的表达影响，发现外膜蛋白基因 *OmpA*、*OmpW* 和 *TolC*，外膜蛋白组装因子 *BamA*，毒素基因 *GtxA*，脂多糖合成基因 *Ipxd*，细胞粘附素相关基因 *GapA* 均被下调。结合本研究其他结果，ACPJ 抑制鸭源鸡杆菌活力和生物膜形成机制如图 10 所示。随着 ACPJ 处理时间的增加，$ONOO^-$破坏

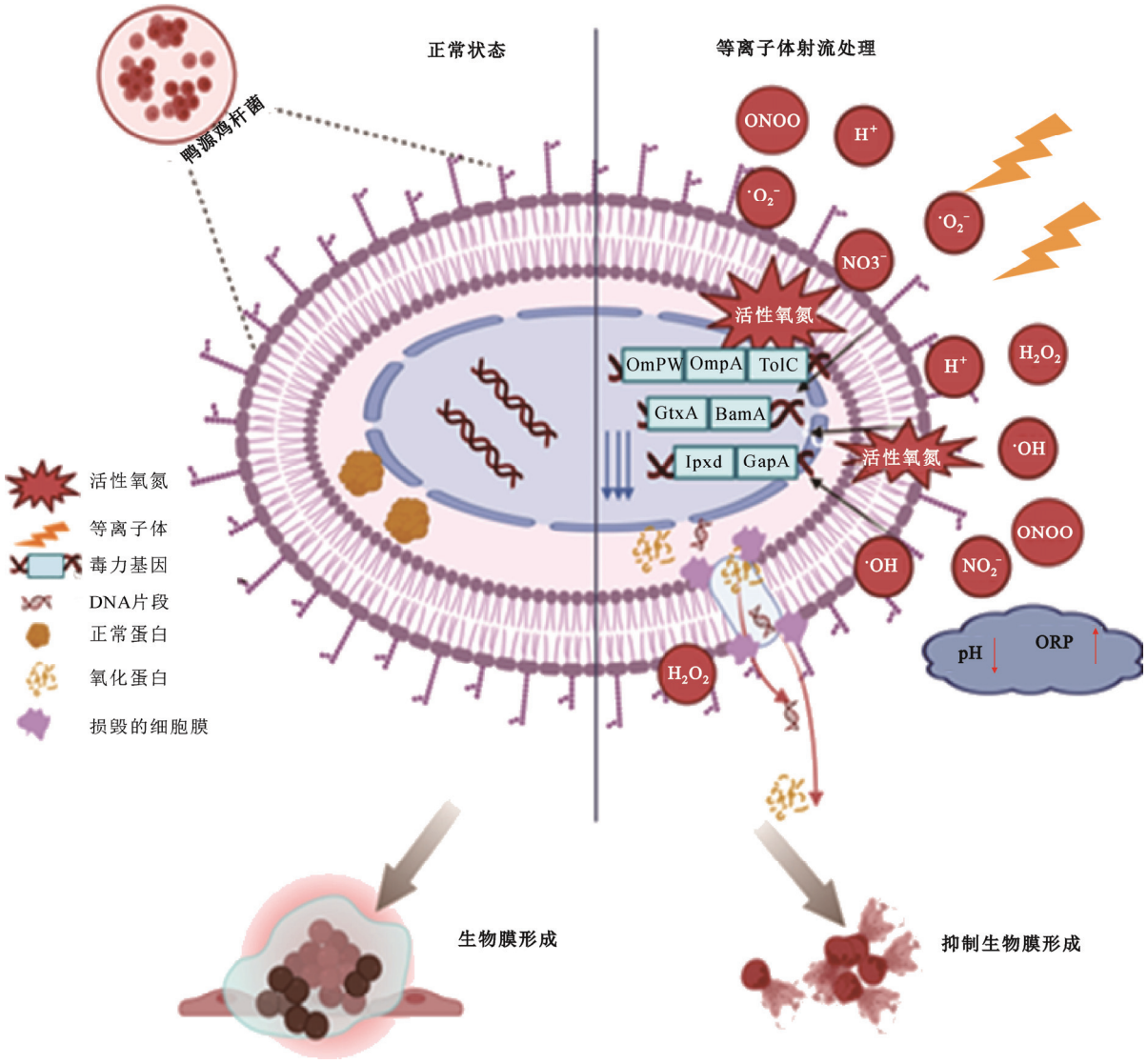


图 10　ACPJ 处理对培养基中的 *G.anatis* 抑菌机制示意图

Fig.10　Illustration of the antibacterial mechanism of ACPJ treatment against *G.anatis* in the medium

细菌的细胞壁膜，这就直接影响细菌侵染能力以及生物膜的形成。此外，由于活性氧氮成分是重要的环境压力信号分子，它们还能够通过改变毒力相关基因，以及减少脂多糖等生物膜合成相关基因的表达，最终抑制鸭源鸡杆菌生物膜的形成。

3　结论

1）ACPJ 在培养基中产生的丰富的活性氧氮成分能够破坏细胞壁膜完整性及胞内组分，显著抑制鸭源鸡杆菌活性及生物膜形成。

2）ACPJ 作为环境压力信号能够抑制鸭源鸡杆菌毒素、脂多糖合成、细胞粘附素及外膜蛋白相关毒力基因的转录，进而调控生物膜形成。

3）本研究结果表明 ACPJ 作为一种绿色杀菌技术可以有效灭活鸭源鸡杆菌，为其应用于畜禽养殖业的传染病防治及环境消杀提供理论依据。

参考文献　References

[1] BISGAARD M, KORCZAK B M, BUSSE H J, et al. Classification of the taxon 2 and taxon 3 complex of Bisgaard within *Gallibacterium* and description of *Gallibacterium melopsittaci* sp. nov., *Gallibacterium trehalosifermentans* sp. nov. and *Gallibacterium salpingitidis* sp. nov[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(Pt 4): 735-744.

[2] BOJESEN A M, NIELSEN S R, BISGAARD M. Prevalence and transmission of haemolytic *Gallibacterium* species in chicken production systems with different biosecurity levels[J]. Avian Pathology, 2003, 32(5): 503-510.

[3] JORDAN F T W, WILLIAMS N J, WATTRET A, et al. Observations on salpingitis, peritonitis and salpingoperitonitis in a layer breeder flock[J]. Veterinary Record, 2005, 157(19): 573-577.

[4] PAUDEL S, LIEBHART D, HESS M, et al. Pathogenesis of *Gallibacterium anatis* in a natural infection model fulfils Koch's postulates: 1.

folliculitis and drop in egg production are the predominant effects in specific pathogen free layers[J]. Avian Pathology, 2014, 43: 443-449.

[5] ALGAMMAL A M, ABO HASHEM M E, ALFIFI K J, et al. Sequence analysis, antibiogram profile, virulence and antibiotic resistance genes of XDR and MDR *Gallibacterium anatis* isolated from layer chickens in Egypt[J]. Infection and Drug Resistance, 2022, 15: 4321-4334.

[6] NASSIK S, TALLOUZT S, KARBACH N, et al. First report of isolation of *Gallibacterium anatis* from layer chickens in Morocco with decrease in laying performance[J]. Avian Diseases, 2019, 63(4): 727-730.

[7] SINGH B R, SINGH S V, PALANIVELU M, et al. *Gallibacterium anatis* outbreaks in domestic birds in North India: antimicrobial and herbal drug sensitivity of *Avibacterium* and *Gallibacterium* isolates[J]. Indian Journal of Poultry Science, 2018, 53(2): 225-233.

[8] ALLAHGHADRY T, NG D Y K, DIBAEI A, et al. Clonal spread of multi-resistant *Gallibacterium anatis* isolates among Iranian broilers and layers[J]. Veterinary Research, 2021, 52(1): 27.

[9] YAMAN S, SAHAN YAPICIER O. Diagnosis of *Gallibacterium anatis* in layers: first report in Turkey[J]. Brazilian Journal of Poultry Science, 2019, 21(3): 1806-1813.

[10] 彭志锋，杨 霞，郑鹿平，等. 我国鸭源鸡杆菌的研究进展[J]. 中国兽医学报，2015，35(12)：2075-2078.
PENG Zhifeng, YANG Xia, ZHENG Luping, et al. Recent advancements in the study of *Gallibacterium anatis* in China[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2015, 35(12): 2075-2078.

[11] SINGH S V, SINGH B R, SINHA D K, et al. *Gallibacterium anatis*. An emerging pathogen of poultry birds and domiciled birds[J]. Journal of Veterinary Science and Technology, 2016, 7(3): 1000324.

[12] VAN DRIESSCHE L, VANNESTE K, BOGAERTS B, et al. Isolation of drug-resistant *Gallibacterium anatis* from calves with unresponsive bronchopneumonia, Belgium[J]. Emerging Infectious Diseases, 2020, 26(4): 721-730.

[13] AUBIN G G, HALOUN A, TREILHAUD M, et al. *Gallibacterium anatis* bacteremia in a human[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2013, 51(11): 3897-3899.

[14] 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.

[15] 卢新培，罗婧怡，聂兰兰，等. 等离子体医学研究进展[J]. 高电压技术，2024，50(8)：3555-3579.
LU Xinpei, LUO Jingyi, NIE Lanlan, et al. Progresses in plasma medicine research[J]. High Voltage Engineering, 2024, 50(8): 3555-3579.

[16] ABDOLI B, KHOSHTAGHAZA M H, GHOMI H, et al. Cold atmospheric pressure air plasma jet disinfection of table eggs: inactivation of *Salmonella enterica*, cuticle integrity and egg quality[J]. International Journal of Food Microbiology, 2024, 410: 110474.

[17] JIANG H, LIN Q, SHI W Q, et al. Food preservation by cold plasma from dielectric barrier discharges in agri-food industries[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 1015980.

[18] YANG Y H, WANG Y, WEI S, et al. Effects and mechanisms of non-thermal plasma-mediated ROS and its applications in animal husbandry and biomedicine[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(21): 15889.

[19] MUMTAZ S, KHAN R, RANA J N, et al. Review on the biomedical and environmental applications of nonthermal plasma[J]. Catalysts, 2023, 13(4): 685.

[20] XU H B, ZHU Y P, DU M R, et al. Subcellular mechanism of microbial inactivation during water disinfection by cold atmospheric-pressure plasma[J]. Water Research, 2021, 188: 116513.

[21] FU J L, XU Y Y, ARTS E J, et al. Viral disinfection using nonthermal plasma: a critical review and perspectives on the plasma-catalysis system[J]. Chemosphere, 2022, 309(Pt 1): 136655.

[22] 张丽阳，郭云涛，帖金凤，等. 大气压栅状介质阻挡放电等离子体空气消毒研究[J]. 高电压技术，2024，50(7)：2972-2987.
ZHANG Liyang, GUO Yuntao, TIE Jinfeng, et al. Air disinfection by atmospheric pressure grating-like dielectric barrier discharge plasma[J]. High Voltage Engineering, 2024, 50(7): 2972-2987.

[23] 郑 超，寇艳芹，刘 振，等. 大面积常压表面等离子体快速消毒灭菌实验研究[J]. 高电压技术，2016，42(8)：2474-2480.
ZHENG Chao, KOU Yanqin, LIU Zhen, et al. Experimental study of fast disinfection by large area atmospheric surface plasma[J]. High Voltage Engineering, 2016, 42(8): 2474-2480.

[24] YONG H I, KIM H J, PARK S, et al. Evaluation of the treatment of both sides of raw chicken breasts with an atmospheric pressure plasma jet for the inactivation of *Escherichia coli*[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2014, 11(8): 652-657.

[25] LEE H J, JUNG H, CHOE W, et al. Inactivation of *Listeria monocytogenes* on agar and processed meat surfaces by atmospheric pressure plasma jets[J]. Food Microbiology, 2011, 28(8): 1468-1471.

[26] WANG J, CUI D, WANG L, et al. Atmospheric pressure plasma treatment induces abscisic acid production, reduces stomatal aperture and improves seedling growth in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Biology, 2021, 23(4): 564-573.

[27] TIAN Y, MA R N, ZHANG Q, et al. Assessment of the physicochemical properties and biological effects of water activated by non-thermal plasma above and beneath the water surface[J]. Plasma Processes and Polymers, 2015, 12(5): 439-449.

[28] JIREŠOVÁ J, SCHOLTZ V, JULÁK J, et al. Comparison of the effect of plasma-activated water and artificially prepared plasma-activated water on wheat grain properties[J]. Plants, 2022, 11(11): 1471.

[29] WU H, SUN P, FENG H, et al. Reactive oxygen species in a non-thermal plasma microjet and water system: generation, conversion, and contributions to bacteria inactivation-an analysis by electron spin resonance spectroscopy[J]. Plasma Processes and Polymers, 2012, 9(4): 417-424.

[30] CHEN C, LI F Y, CHEN H L, et al. Aqueous reactive species induced by a PCB surface micro-discharge air plasma device: a quantitative study[J]. Journal of Physics D: Applied Physics, 2017, 50(44): 445208.

[31] DIKALOV S, SKATCHKOV M, BASSENGE E. Quantification of peroxynitrite, superoxide, and peroxyl radicals by a new spin trap hydroxylamine 1-hydroxy-2, 2, 6, 6-tetramethyl-4-oxo-piperidine[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997, 230(1): 54-57.

[32] 覃俊媛，孙 晨，彭 成，等. 赶黄草水煎液对金黄色葡萄球菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物膜形成的影响[J]. 中国抗生素杂志，2023，48(1)：54-61.
QIN Junyuan, SUN Chen, PENG Cheng, et al. *Penthorum chinense* Pursh decoction inhibits *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by disrupting biofilms[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2023, 48(1): 54-61.

[33] BUZÓN-DURÁN L, ALONSO-CALLEJA C, RIESCO-PELÁEZ F, et al. Effect of sub-inhibitory concentrations of biocides on the architecture and viability of MRSA biofilms[J]. Food Microbiology, 2017, 65: 294-301.

[34] CAPITA R, BUZÓN-DURÁN L, RIESCO-PELÁEZ F, et al. Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the structural parameters and viability of the biofilms formed by *Salmonella Typhimurium*[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2017, 14(6): 350-356.

[35] YU S, CHEN Q Z, LIU J H, et al. Dielectric barrier structure with hollow electrodes and its recoil effect[J]. Applied Physics Letters, 2015, 106(24): 244101.

[36] JA KIM S, JON H M, CHUNG T H. Production of intracellular reactive oxygen species and change of cell viability induced by atmospheric pressure plasma in normal and cancer cells[J]. Applied Physics Letters, 2013, 103(15): 153705.

[37] LI D, LIU D X, CHEN Z Y, et al. A new plasma jet array source: discharge characteristics and mechanism[J]. IEEE Transactions on Plasma Science, 2016, 44(11): 2648-2652.

[38] BRUGGEMAN P J, KUSHNER M J, LOCK B R, et al. Plasma-liquid interactions: a review and roadmap[J]. Plasma Sources Science and Technology, 2016, 25(5): 053002.

[39] CUI D J, HU X X, YIN Y, et al. Quality enhancement and microbial

reduction of mung bean (*Vigna radiata*) sprouts by non-thermal plasma pretreatment of seeds[J]. Plasma Science and Technology, 2022, 24(4): 045504.
[40] QI Z H, TIAN E Q, SONG Y, et al. Inactivation of *Shewanella putrefaciens* by plasma activated water[J]. Plasma Chemistry and Plasma Processing, 2018, 38(5): 1035-1050.
[41] MAHDIKIA H, SHOKRI B, MAJIDZADEH-A K. The feasibility study of plasma-activated water as a physical therapy to induce apoptosis in Melanoma cancer cells *in-vitro*[J]. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 2021, 20(3): 337-350.
[42] PATANGE A, LU P, BOEHM D, et al. Efficacy of cold plasma functionalised water for improving microbiological safety of fresh produce and wash water recycling[J]. Food Microbiology, 2019, 84: 103226.
[43] MCPHERSON L L. Understanding ORP's in the disinfection process[J]. Water-Engineering and Management, 1993, 140(11): 29-31.
[44] WHITTAKER A G, GRAHAM E M, BAXTER R L, et al. Plasma cleaning of dental instruments[J]. Journal of Hospital Infection, 2004, 56(1): 37-41.
[45] CHEN Z T, CHENG X Q, LIN L, et al. Cold atmospheric plasma discharged in water and its potential use in cancer therapy[J]. Journal of Physics D: Applied Physics, 2017, 50(1): 015208.
[46] KASHYAP S, SHARMA P, CAPALASH N. Tobramycin stress induced differential gene expression in *Acinetobacter baumannii*[J]. Current Microbiology, 2022, 79(3): 88.
[47] XU H B, LIU C, HUANG Q. Enhance the inactivation of fungi by the sequential use of cold atmospheric plasma and plasma-activated water: synergistic effect and mechanism study[J]. Chemical Engineering Journal, 2023, 452: 139596.
[48] ZHANG Q, MA R N, TIAN Y, et al. Sterilization efficiency of a novel electrochemical disinfectant against *Staphylococcus aureus*[J]. Environmental Science & Technology, 2016, 50(6): 3184-3192.
[49] XIANG Q S, KANG C D, ZHAO D B, et al. Influence of organic matters on the inactivation efficacy of plasma-activated water against *E. coli* O157: H7 and *S. aureus*[J]. Food Control, 2019, 99: 28-33.
[50] XU H B, MA R N, ZHU Y P, et al. A systematic study of the antimicrobial mechanisms of cold atmospheric-pressure plasma for water disinfection[J]. Science of the Total Environment, 2020, 703: 134965.
[51] PAN J, SUN K, LIANG Y D, et al. Cold plasma therapy of a tooth root canal infected with *Enterococcus faecalis* biofilms *in vitro*[J]. Journal of Endodontics, 2013, 39(1): 105-110.
[52] ALKAWAREEK M Y, ALGWARI Q T, GORMAN S P, et al. Application of atmospheric pressure nonthermal plasma for the *in vitro* eradication of bacterial biofilms[J]. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2012, 65(2): 381-384.
[53] CHENG H, LIU X, LU X P, et al. Active species delivered by dielectric barrier discharge filaments to bacteria biofilms on the surface of apple[J]. Physics of Plasmas, 2016, 23(7): 073517.
[54] XU H B, FANG C, SHAO C S, et al. Study of the synergistic effect of singlet oxygen with other plasma-generated ROS in fungi inactivation during water disinfection[J]. Science of the Total Environment, 2022, 838(Pt 4): 156576.
[55] WANG B, WEI P W, WAN S, et al. *Ginkgo biloba* exocarp extracts inhibit *S. aureus* and MRSA by disrupting biofilms and affecting gene expression[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 271: 113895.
[56] ABEBE G M. The role of bacterial biofilm in antibiotic resistance and food contamination[J]. International Journal of Microbiology, 2020, 2020(1): 1705814.
[57] COSTERTON J W, STEWART P S, GREENBERG E P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections[J]. Science, 1999, 284(5418): 1318-1322.
[58] LARSEN P, NIELSEN J L, DUEHOLM M S, et al. Amyloid adhesins are abundant in natural biofilms[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(12): 3077-3090.
[59] WANG J Q, YU Z Y, XU Z M, et al. Antimicrobial mechanism and the effect of atmospheric pressure N_2 plasma jet on the regeneration capacity of *Staphylococcus aureus* biofilm[J]. Biofouling, 2018, 34(8): 935-949.
[60] MAI-PROCHNOW A, BRADBURY M, OSTRIKOV K, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm response and resistance to cold atmospheric pressure plasma is linked to the redox-active molecule phenazine[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0130373.
[61] 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.
PU Qikang, LIU Sijing, HUANG Huan, et al. Sterilization effect of an atmospheric low temperature plasma jet on *Candida albicans* biofilm[J]. Journal of Sichuan University (Medical Sciences Edition), 2019, 50(3): 339-343.
[62] KASHYAP S, SHARMA P, CAPALASH N. Tobramycin stress induced differential gene expression in *Acinetobacter baumannii*[J]. Current Microbiology, 2022, 79(3): 88.
[63] GUAN X D, JIN L, ZHOU H F, et al. Polydatin prevent lung epithelial cell from *Carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae* injury by inhibiting biofilm formation and oxidative stress[J]. Scientific Reports, 2023, 13(1): 17736.
[64] 潘园园. 低温等离子体介导的氧化胁迫诱导 *Listeria monocytogenes* 失活及分子响应机制[D]. 广州：华南理工大学，2022：96-99.
PAN Yuanyuan. Cold plasma-mediated oxidative stress triggers the inactivation of *Listeria monocytogenes* and associated molecular response mechanisms[D]. Guangzhou, China: South China University of Technology, 2022: 96-99.
[65] THIYAGARAJAN M, SARANI A, GONZALES X. Atmospheric pressure resistive barrier air plasma jet induced bacterial inactivation in aqueous environment[J]. Journal of Applied Physics, 2013, 113(9): 093302.
[66] 俞志远. 常压氮气等离子体射流处理金黄色葡萄球菌生物膜的灭菌机制及其再生能力的研究[D]. 合肥：合肥工业大学，2019：44-45.
YU Zhiyuan. Antimicrobial mechanism and the effect on *Staphylococcus aureus* biofilm regeneration capacity by atmospheric pressure N_2 plasma jet[D]. Hefei, China: Hefei University of Technology, 2019: 44-45.
[67] 廖　雪. 冷等离子体对鼠伤寒沙门氏菌生物膜的抗菌机制及其在禽蛋中的应用[D]. 镇江：江苏大学，2020：41-42.
LIAO Xue. Antibacterial mechanism of cold plasma on *Salmonella Typhimurium* biofilm and its application in poultry eggs[D]. Zhenjiang, China: Jiangsu University, 2020: 41-42.



张　华
1980—，女，博士，副教授
主要从事等离子体及等离子体活化水杀菌及其在畜牧领域的应用基础研究
E-mail: zhanghua802233@163.com

ZHANG Hua
Ph.D.
Associate professor



马若男(通信作者)
1989—，女，博士，副教授
主要从事等离子体杀菌及其在农业食品领域的应用基础研究
E-mail: maruonan@zzu.edu.cn

MA Ruonan
Ph.D.
Associate professor
Corresponding author

收稿日期　2024-09-30　修回日期　2025-05-06　　编辑　曾文君