

研究报告

等离子体射流灭活液体中铜绿假单胞菌的研究

陈绪松¹ 李栋² 刘志杰² 刘定新² 陈伟¹ 郭莉^{2*} 孔刚玉²

(1. 塔里木大学生命科学学院 新疆兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室 新疆 阿拉尔 843300)

(2. 西安交通大学 电力设备电气绝缘国家重点实验室 等离子体生物医学研究中心 陕西 西安 710049)

摘要:【目的】测定等离子射流对铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的灭活效果,探究低温等离子体射流的杀菌机理。【方法】采用平板计数法测定等离子体射流的杀菌效果,荧光显微镜、透射电镜观察等离子体作用后菌体结构的变化,蛋白浓度测定和 SDS-PAGE 电泳检测菌液上清液中可溶性蛋白的泄漏量。【结果】等离子体射流处理铜绿假单胞菌菌液 5 min,杀灭率可达到 99.9%以上。透射电镜观察可见细菌菌体结构发生改变,细胞壁、细胞膜损伤破裂,细胞内容物泄露。进一步对处理铜绿假单胞菌上清液中的蛋白质含量变化进行检测,结果显示随着处理时间的增加,上清液中蛋白质含量持续增加,在 2 min 时达到最大值。【结论】等离子体射流可以通过破坏细胞结构造成细胞质泄露,使其丧失正常的细胞功能,从而达到快速有效地杀灭铜绿假单胞菌的效果。

关键词: 等离子体射流, 铜绿假单胞菌, 荧光显微镜, 透射电镜

Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* in suspension using atmospheric pressure plasma jet

CHEN Xu-Song¹ LI Dong² LIU Zhi-Jie² LIU Ding-Xin² CHEN Wei¹ GUO Li^{2*}
KONG Gang-Yu²

(1. Key Laboratory of Protection & Utilization of Biological Resources in Tarim Basin, Xinjiang Production & Construction Group, College of Life Science, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300, China)

(2. Center of Plasma Biomedicine, State Key Laboratory of Electrical Insulation and Power Equipment, Centre for Plasma Biomedicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710049, China)

Abstract: [Objective] To determine the effect of atmospheric pressure plasma jet on the inactivation of *Pseudomonas aeruginosa*, and to explore the sterilization mechanism of atmospheric pressure plasma jet. [Methods] The bactericidal effect of atmospheric pressure plasma jet was determined by plate counting method. Treated cells were examined by fluorescence microscope and transmission electron microscope. Soluble proteins were quantified and analyzed by SDS-PAGE electrophoresis.

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 51477136); Fundamental Research Funds for Central Universities

*Corresponding author: Tel: 86-29-83395376; E-mail: guoli35@mail.xjtu.edu.cn

Received: October 18, 2016; Accepted: November 21, 2016; Published online (www.cnki.net): December 28, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 51477136); 中央高校基本科研业务费项目

*通讯作者: Tel: 86-29-83395376; E-mail: guoli35@mail.xjtu.edu.cn

收稿日期: 2016-10-18; 接受日期: 2016-11-21; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-12-28

[Results] More than 99.9% *P. aeruginosa* cells were killed after the plasma treatment for 5 min. The cell wall and membrane systems of *P. aeruginosa* was broken as evidenced by leakage of cellular contents of proteins. Amounts of proteins was detected in supernatant after treatment for 2 min.

[Conclusion] Atmospheric pressure plasma jet is able to destroy the cell integrity, which results in leakage of cellular contents and eventually kills *P. aeruginosa* effectively.

Keywords: Atmospheric pressure plasma jet, *Pseudomonas aeruginosa*, Fluorescence microscope, Transmission electron microscope

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)是一种条件致病菌,也是医院感染的主要致病菌之一,占医院内细菌感染的30%左右,且经常在机体免疫力低下时造成感染^[1]。随着各种抗生素的大量使用,导致其对常用抗菌药物的敏感性逐渐下降,经常造成严重的术后感染^[2-3]。鉴于铜绿假单胞菌对人类健康的巨大隐患,研究新的快速、安全、高效的杀菌方法显得尤为重要。

近年来,大气压等离子体射流(Atmospheric pressure plasma jet, APPJ)作为一种新的灭菌手段受到了广泛关注。这种等离子体一般是在高电压的激发下,在局域空间中发生气体电离而产生的,其产生的离子、电子、激发态原子、分子和自由基等都是活泼的反应成分^[4]。由于其处理时间短、装置结构简单、杀菌效率高、无有害残留、对材料无损伤等优点而被广泛应用于医疗器械和环境卫生等领域的灭菌^[5-6],被认为是新一代非常具有前途的灭菌技术。

早在1968年,就有Menashi等^[7]使用氩等离子体进行玻璃材料表面杀菌研究的报道。1995年,Bialasiewicz等研究了低温等离子体对多种医疗器械表面的杀菌效果,结果器械上的微生物数量减少6个数量级^[8]。1996年美国的Laroussi等使用一种以氦气为载气在大气压下产生等离子体的介质阻挡放电(Dielectric barrier discharge, DBD)装置进行了相关的杀菌实验,之后等离子体医学研究开始进入了一个蓬勃发展的时期^[9]。在此后的一段时期内,研究者们使用等离子体对多种微生物进行了相关的工作,并对等离子体与微生物的作用机制进行了深入的研究,特别是利用等离子体用于手术器

械和医疗设备方面的灭菌^[10]。Kelly-Wintenberg等使用等离子体灭菌器处理聚丙烯表面的*Escherichia coli*、*Bacillus stearothermophilus*、*Staphylococcus aureus*和*Bacillus subtilis*这4种不同的细菌,经过几分钟的处理后,各种细菌及细菌芽孢数均减少了3-6对数级^[11]。到目前为止,相关的研究结果显示,等离子体可以失活几乎所有的微生物。由于等离子体所具有的广泛杀菌能力,等离子体不仅仅只用于对各种器械和材料表面的灭菌,也可以对植物、动物和人体组织的表面进行灭菌消毒^[12-15]。Isbary等用等离子体射流处理38例细菌感染伤口,结果显示等离子体射流处理伤口细菌减少的数量接近常规处理的两倍^[16]。郑超等用等离子体射流处理酶标板小孔内的250 μ L大肠杆菌菌液,2 min就可使大肠杆菌下降6个数量级^[17]。Cao等将多个小型等离子体射流并联使用,制作成一个阵列式的大面积等离子体射流阵列,增加等离子体射流的工作面积,极大地增加了等离子体射流杀菌、消毒的效率^[18]。Zhang等使用一个浸没在80 mL、细菌浓度为 2.5×10^8 CFU/mL的铜绿假单胞菌菌液中的阵列式等离子体射流装置处理6 min就可以全部杀灭^[19]。此外,对于一些细菌在材料表面形成的生物膜,等离子体射流可以穿透15.0 μ m-25.5 μ m的厚度,从而起到了杀灭生物膜内部细菌的作用,解决了生物膜细菌难以清除的世界性难题^[20-21]。

本研究以铜绿假单胞菌为材料,采用大气压低温冷等离子体射流对菌悬液进行处理,研究发现低温等离子体射流通过破坏细胞结构,能够高效灭活溶液中的铜绿假单胞菌,为等离子体的开发和应用提供了基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器及培养基

考马斯亮蓝 G-250、R-250 及 LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability 试剂盒 L-7012 购于 Thermo Fisher 公司;牛血清白蛋白购于 MP Bio 公司。磷酸缓冲液: 8.00 g NaCl, 0.20 g KCl, 1.42 g Na_2HPO_4 , 0.27 g KH_2PO_4 , 加去离子水约 800 mL 充分搅拌溶解, 然后加入浓盐酸调 pH 至 7.4, 最后定容到 1 L。

APPJ 实验装置为本实验室自制;放电电源为低温等离子体试验电源(20 kHz, 0–250 kV)购于浙江正泰电器公司;BX53 型荧光显微镜和 H-7650 型透射电子显微镜购于 OLYMPUS 公司;UV-1800 型紫外分光光度计购于岛津公司;Multiskan Flash 型酶标仪购于 Thermo Fisher 公司;电泳仪和 GS-800 型凝胶成像仪购于 Bio-Rad 公司。

LB 培养基(g/L): 胰化蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, 蒸馏水定容至 1 L, 调 pH 至 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.2 细菌培养

铜绿假单胞菌 PAO1 菌株由重庆医科大学附属儿童医院馈赠。挑取少许冻存的铜绿假单胞菌接种于 LB 液体培养基中, 于 37 °C、250 r/min 摇床中培养过夜后, 转接于 40 mL LB 液体培养基(1:100)中, 再于 37 °C、250 r/min 培养 4 h, 4 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 0.9%生理盐水洗涤 3 次, 最后生理盐水稀释至菌浓度到 OD_{600} 为 0.9 左右备用。

1.3 等离子体灭活

吸取 500 μL 菌液于 30 mm 直径的石英培养皿中, 然后将培养皿置于等离子体射流头下方的载物台上, 菌液面距离射流喷嘴 1 cm (图 1), 等离子体射流处理时间设置为 0、1、2、3、4、5 min。放电参数为: 以氩气/空气(100:1)混合气体为载气, 氩气流量为 4 L/min, 电压为 11 kV, 工作频率为 20 kHz, 功率为 4.5 W。吸取 100 μL 处理后的菌悬液梯度稀释, 用平板计数法测定各处理组中的活菌数, 计算存活率^[22]。

1.4 荧光显微镜观察

处理后的菌悬液用 LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability 试剂盒进行染色处理观察。按试剂盒说明染色方法将 SYTO-9 和 PI 染料按 1:1 混合, 取适量加入到含有处理菌液的离心管中混匀, 黑暗环境下室温孵育 15 min, 取 10 μL 于载玻片上, 立即置于荧光显微镜下观察, 拍照。

1.5 透射电镜观察

吸取 0、3、5 min 处理的铜绿假单胞菌菌悬液各 1 mL 于 EP 管中, 4 000 r/min 离心 5 min, 吸去上清液, 加入预冷的 4%戊二醛磷酸缓冲液, 4 °C 固定过夜。进行常规电镜样品的固定、脱水、包埋和制作超薄切片, 透射电镜观察拍照^[23]。

1.6 蛋白质泄漏量的测定

用 10 g/L 牛血清蛋白制备 5 个梯度稀释度的标准品, 将处理后的菌液离心取上清液, 标准品和上清液分别与考马斯亮蓝 G-250 溶液混合(1:10), 室温静置 3–5 min, 用酶标仪在波长 595 nm 处测定吸光度, 制作标准曲线并根据标准曲线计算出上清液中蛋白质含量^[24]。

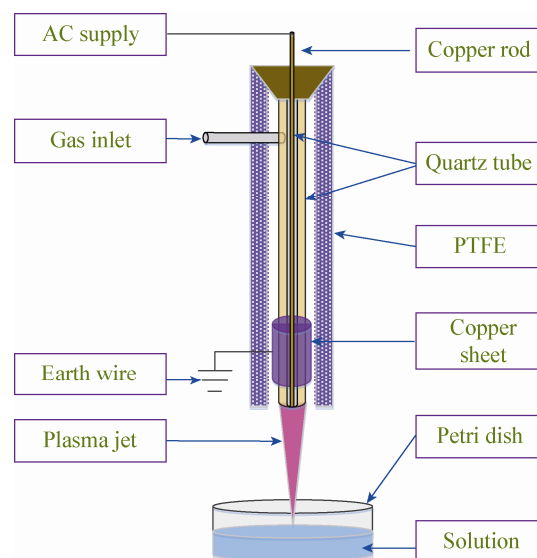


图 1 大气压低温冷等离子体射流试验装置示意图
Figure 1 Schematic diagram of the atmospheric pressure plasma jet device

1.7 SDS-PAGE 电泳

吸取 20 μL 处理后的标准 BSA 溶液, 进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳, 考马斯亮蓝 R-250 染色, 紫外凝胶成像系统检测, 拍照。

2 结果与分析

2.1 等离子体射流的灭活效果

首先采用平板计数法分析了等离子体射流对铜绿假单胞菌 PAO1 的灭活效果。图 2 结果显示, 铜绿假单胞菌的灭活效率随处理时间的增加而增强。处理 1 min 时, 活细菌数减少了约 47%; 当处理时间为 3 min 时, 活菌数量下降了近 3 个数量级, 杀灭率大于 99%; 当处理时间达到 5 min 时, 活菌数量下降超过 7 个数量级, 达到检测方法的下限, 铜绿假单胞菌几乎全部被灭活。该结果证明等离子体射流处理可在短时间内高效杀灭液体中的铜绿假单胞菌。

2.2 荧光显微镜观察结果

经等低温离子体射流处理后的菌液用 LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability 试剂盒进行染色处理后在荧光显微镜下观察。该试剂盒含有 SYTO-9 和 PI 两种核酸染料, SYTO-9 可以渗入到

完整细胞细胞膜内呈现绿色荧光, PI 则只能渗透进细胞膜破损的细胞内呈现红色荧光。研究发现, 未处理细胞基本全为绿色, 随着处理时间的增加, 红色细胞比例逐渐增多, 处理时间达到 5 min 时, 视野中基本全为红色细胞(图 3)。这说明等离子体射流的处理使细胞壁、细胞膜的通透性逐渐增加, 导致 PI 染液进入细胞内与基因组 DNA 发生了结合。

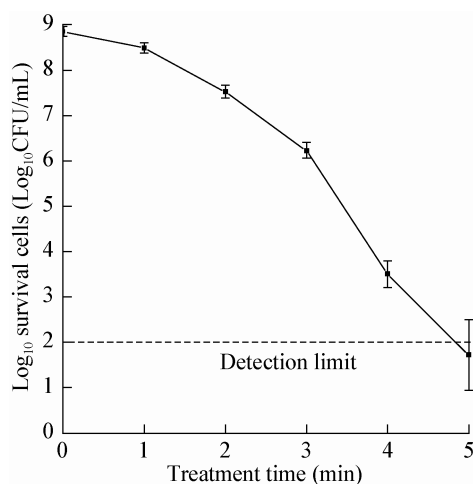


图 2 铜绿假单胞菌存活曲线

Figure 2 Survival curve of *Pseudomonas aeruginosa*

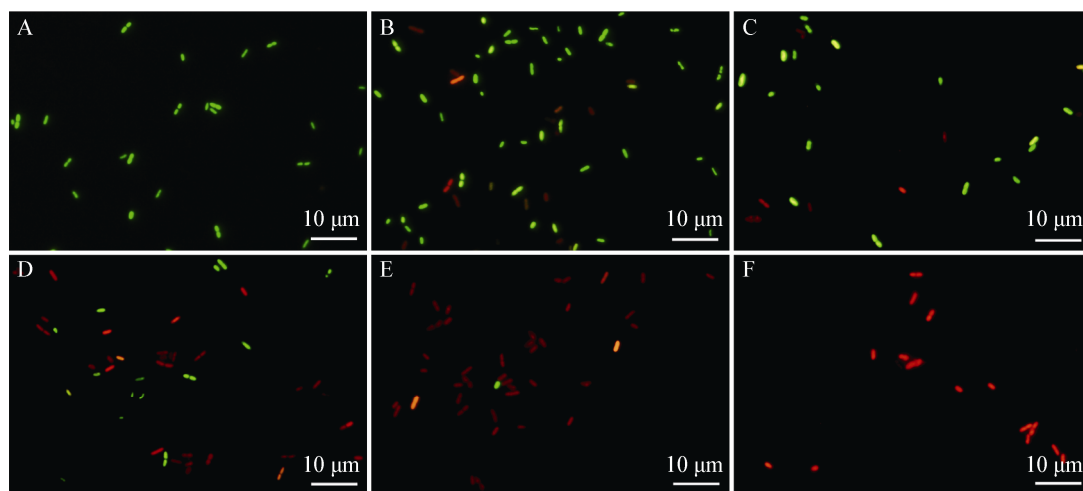


图 3 铜绿假单胞菌荧光显微镜图

Figure 3 Fluorescence microscope images of *P. aeruginosa*

Note: A: 0 min; B: 1 min; C: 2 min; D: 3 min; E: 4 min; F: 5 min.

2.3 透射电镜观察结果

为了获得对细胞超微结构变化的了解,进一步采用了透射电镜观察等离子体射流处理后细胞(图 4)。未处理的铜绿假单胞菌呈现典型的短杆状,细胞壁清晰光滑,细胞结构完整,菌体内细胞质分布均匀;经等离子体射流处理 3 min 后,铜绿假单胞菌细胞结构发生了很大变化,一些细胞的细胞壁部分区域出现断裂,细胞内细胞质不均一,出现空洞状;当处理时间达到 5 min 时,细胞结构进一步遭到破坏,几乎所用的细胞都呈现空洞状,部分细胞的细胞壁结构模糊,呈不连续状,有些细胞甚至完全碎裂崩解。这些电镜结果进一步证实,等离子体射流可以破坏细菌细胞壁的完整性,使细胞内容物泄露。

2.4 蛋白质泄露量测定结果

为了定量考察细胞内容物的泄露,对等离子体射流处理后细菌上清液中的蛋白质进行了检测。从

图 5A 可以看出,上清液中的蛋白质含量先随着处理时间的增加而增加,在 2 min 时菌液中蛋白质的含量达到最大值 58.42 mg/L;继续增加处理时间,处理后细菌上清液中的蛋白质含量开始降低,蛋白质含量总体呈现“先升后降”的趋势。结合透射电镜观察结果,这应该是因为等离子体破化了细胞壁使细胞质从破裂的细胞中泄露到生理盐水中,使溶液中蛋白质含量迅速增加。对于蛋白含量在更长时间的处理中下降的原因,推测很可能是由于等离子体中的某些成分可作用于蛋白质,使之发生变性或降解而减少。为了证明这一推测,采用等离子体射流处理了牛血清蛋白 BSA 蛋白(图 5B)。对处理后的 BSA 蛋白进行含量测定和 SDS-PAGE 电泳进行了分析,可以看出,BSA 随处理时间的增加而减少。据此结果推测等离子体产生的活性成分可作用于 BSA 等蛋白,使其变性或断裂成片段。

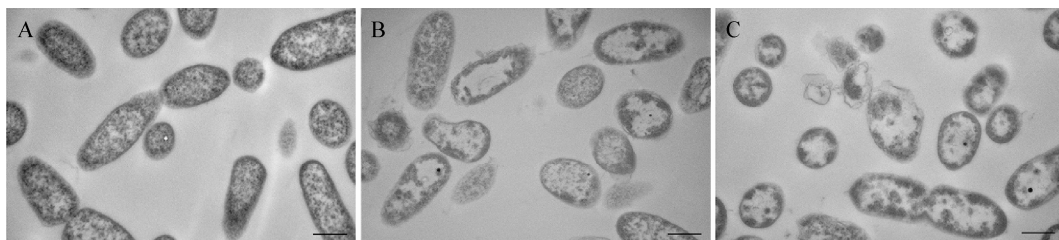


图 4 铜绿假单胞菌透射电镜图

Figure 4 Transmission electron microscope images of *P. aeruginosa*

Note: A: 0 min; B: 3 min; C: 5 min. Bar=500 nm.

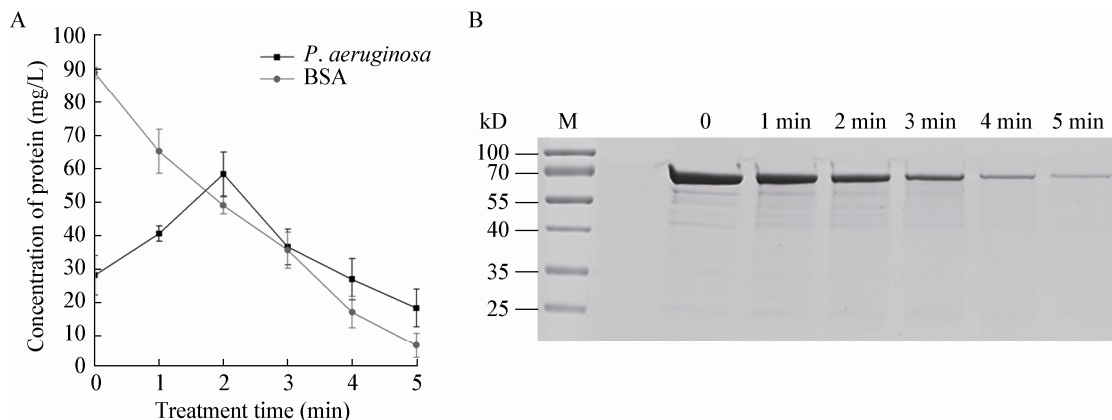


图 5 泄露蛋白质含量的测定(A)及等离子体处理 BSA 的电泳分析(B)

Figure 5 The measurements of leakage proteins (A) and analysis of BSA treated by the atmospheric pressure plasma jet (B)

3 讨论及展望

本次试验以氩/空气为载气的低温等离子体射流用于铜绿假单胞菌菌液的灭活,试验结果显示,经低温等离子体射流处理菌液 5 min,铜绿假单胞菌活菌数下降超过 7 个数量级,达到了 99.9% 的杀灭率。从 1 min 到 5 min,随着处理时间的延长,细菌杀灭率逐渐升高,说明随着处理时间的增加,菌液中积累的等离子体活性成分浓度增加^[25],和其他作用于细胞的成分增加了与菌体接触的机会。通过透射电镜观察结果以及蛋白质泄漏量试验结果分析可知,等离子体杀灭铜绿假单胞菌的原理可能与其产生的活性成分有关,这些成分作用于细胞壁和细胞膜使菌体结构完整性遭到破坏,导致菌体破裂、内容物溢出等不可逆损伤,从而直接影响细胞的物质代谢功能而达到杀灭作用。溶液中泄露蛋白质含量呈“先升后降”的趋势,后续采用 BSA 蛋白电泳进行的检测,进一步显示等离子体活性组分能够对生物大分子产生损伤,使蛋白发生降解,浓度降低。这与 Montie 等在研究等离子体失活微生物机理时提出的观点一致,他们的研究结果认为等离子体中的活性物质可以氧化改变细胞内的大分子物质结构,等离子体产生的活性氧可以将裸露的蛋白质降解为 2-氧基组氨酸,核酸被氧化降解为 8-羟基脱氧鸟苷^[26]。

关于低温等离子体的杀菌机理,有研究表明温度、紫外线、高压电场、带电粒子和活性氧(Reactive oxygen species, ROS)等,以及其他一些外部条件都在低温等离子体的灭菌过程中起作用^[26-28]。它们其中的某些成分作用于细胞壁或穿透细胞壁对细菌内部造成不可逆的损伤,导致这一结果的原因包括一系列的物理和化学反应过程,并最终引起细胞死亡^[29]。谢静等将等离子体射流引入到液相中,构建等离子体射流液相反应体系,结果发现液相中产生了 H₂O₂ 和 O₃,同时还有大量的 NO₃⁻和 NO₂⁻离子,液相 pH 降低^[30]。但由于等离子体中含有众多活性粒子、自由基和带电粒子,包含上百种化学反应^[25,31],以目前的研究而言,是哪一种因素起主导

作用以及它在分子层面是如何起作用的还需进一步的研究。

等离子体灭菌技术与传统的消毒灭菌方法相比所带来的好处是显而易见的,所以在未来的研究中开发出更经济、安全、操作简单的等离子体装置,研究提高等离子体杀菌效率的方法,揭示等离子体杀灭微生物的作用机制,以及等离子体杀菌的生物安全性研究,为等离子体杀菌技术的推广应用提供理论支持,是让等离子体技术更好地服务人类生活和健康的前提。

参考文献

- [1] Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, et al. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe: results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study[J]. JAMA, 1995, 274(8): 639-644
- [2] Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare[J]. Clinical Infectious Diseases, 2002, 34(5): 634-640
- [3] D'Arezzo S, Lanini S, Puro V, et al. High-level tolerance to triclosan may play a role in *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic resistance in immunocompromised hosts: evidence from outbreak investigation[J]. BMC Research Notes, 2012, 5(1): 43
- [4] Nie QY. Experimental studies on atmospheric pressure cold plasma jets[D]. Dalian: Doctoral Dissertation of Dalian University of Technology, 2010 (in Chinese)
聂秋月. 大气压冷等离子体射流实验研究[D]. 大连: 大连理工大学博士学位论文, 2010
- [5] Sun P, Sun Y, Wu HY, et al. Atmospheric pressure cold plasma as an antifungal therapy[J]. Applied Physics Letters, 2011, 98(2): 021501
- [6] Chu PK. Recent developments and applications of plasma immersion ion implantation[J]. Journal of Vacuum Science & Technology B, 2004, 22(1): 289-296
- [7] Menashi WP. Treatment of surfaces: US, 3383163[P]. 1968-05-14
- [8] Bialasiewicz AA, Förtsch M, Sammann A, et al. Plasma sterilization of selected ophthalmic instruments for combined intraocular surgery[J]. Ophthalmic Research, 1995, 27(Suppl. 1): 124-127
- [9] Laroussi M. Sterilization of contaminated matter with an atmospheric pressure plasma[J]. IEEE Transactions on Plasma Science, 1996, 24(3): 1188-1191
- [10] Deng XT, Shi JJ, Kong MG. Protein destruction by a helium atmospheric pressure glow discharge: capability and mechanisms[J]. Journal of Applied Physics, 2007, 101(7): 074701
- [11] Kelly-Wintenberg K, Montie TC, Brickman C, et al. Room temperature sterilization of surfaces and fabrics with a one atmosphere uniform glow discharge plasma[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1998, 20(1): 69-74
- [12] Deng SB, Ruan R, Mok CK, et al. Inactivation of *Escherichia coli* on almonds using nonthermal plasma[J]. Journal of Food Science, 2007, 72(2): M62-M66
- [13] Perni S, Shama G, Kong MG. Cold atmospheric plasma disinfection of cut fruit surfaces contaminated with migrating microorganisms[J]. Journal of Food Protection, 2008, 71(8): 1619-1625
- [14] Selcuk M, Oksuz L, Basaran P. Decontamination of grains and legumes infected with *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. by cold plasma treatment[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(11): 2519-2524

- 5104-5109
- [15] Stoffels E. "Tissue processing" with atmospheric plasmas[J]. Contributions to Plasma Physics, 2007, 47(1-2): 40-48
- [16] Isbary G, Morfill G, Schmidt HU, et al. A first prospective randomized controlled trial to decrease bacterial load using cold atmospheric argon plasma on chronic wounds in patients[J]. British Journal of Dermatology, 2010, 163(1): 78-82
- [17] Zheng C, Xu YZ, Huang YF, et al. Surface and water disinfection by pulsed plasma jet[J]. Journal of Zhejiang University (Engineering Science), 2014, 48(7): 1329-1335 (in Chinese)
郑超, 徐羽贞, 黄逸凡, 等. 脉冲等离子体射流杀灭表面和水中的细菌[J]. 浙江大学学报: 工学版, 2014, 48(7): 1329-1335
- [18] Cao Z, Walsh JL, Kong MG. Atmospheric plasma jet array in parallel electric and gas flow fields for three-dimensional surface treatment[J]. Applied Physics Letters, 2009, 94(2): 021501
- [19] Zhang XH, Liu DP, Wang HZ, et al. Highly effective inactivation of *Pseudomonas* sp. HB1 in water by atmospheric pressure microplasma jet array[J]. Plasma Chemistry and Plasma Processing, 2012, 32(5): 949-957
- [20] Xiong Z, Du T, Lu X, et al. How deep can plasma penetrate into a biofilm[J]. Applied Physics Letters, 2011, 98(22): 221503
- [21] Pei X, Lu X, Liu J, et al. Inactivation of a 25.5 μm *Enterococcus faecalis* biofilm by a room-temperature, battery-operated, handheld air plasma jet[J]. Journal of Physics D: Applied Physics, 2012, 45(16): 165205
- [22] Chen CY, Nace GW, Irwin PL. A 6 \times 6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2003, 55(2): 475-479
- [23] Cao JB, Qin LH. Investigation of transmission electron microscopic on bacillus subtilis[J]. Modern Agricultural Sciences, 2008, 5(2): 34-35 (in Chinese)
- 曹剑波, 秦利鸿. 枯草芽孢杆菌的透射电镜观察[J]. 现代农业科学, 2008, 5(2): 34-35
- [24] Goldring JPD. Spectrophotometric methods to determine protein concentration[A]. Kurien BT, Scofield RH. Western Blotting[M]. New York: Springer 2015: 41-47
- [25] Chen C, Liu DX, Liu ZC, et al. A model of plasma-biofilm and plasma-tissue interactions at ambient pressure[J]. Plasma Chemistry and Plasma Processing, 2014, 34(3): 403-441
- [26] Montie TC, Kelly-Wintenberg K, Roth JR. An overview of research using the one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP) for sterilization of surfaces and materials[J]. IEEE Transactions on Plasma Science, 2000, 28(1): 41-50
- [27] Laroussi M, Leipold F. Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure[J]. International Journal of Mass Spectrometry, 2004, 233(1/3): 81-86
- [28] Laroussi M. Low-temperature plasmas for medicine[J]. IEEE Transactions on Plasma Science, 2009, 37(6): 714-725
- [29] Laroussi M, Richardson JP, Dobbs FC. Effects of nonequilibrium atmospheric pressure plasmas on the heterotrophic pathways of bacteria and on their cell morphology[J]. Applied Physics Letters, 2002, 81(4): 772-774
- [30] Xie J, Hao XL, Zhu BL. Inactivation effect of *Microcystis aeruginosa* in water by atmospheric-pressure plasma jet[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2015, 9(4): 1651-1658 (in Chinese)
谢静, 郝小龙, 朱柏霖. 大气压等离子体射流对水中铜绿微囊藻的灭活作用[J]. 环境工程学报, 2015, 9(4): 1651-1658
- [31] Lu XP. Plasma jets and their biomedical application[J]. High Voltage Engineering, 2011, 37(6): 1416-1425 (in Chinese)
卢新培. 等离子体射流及其医学应用[J]. 高电压技术, 2011, 37(6): 1416-1425