

大气压等离子体射流对细菌芽孢灭活机理研究

沈洁^{1*} 程诚^{1*} 方世东¹ 陈龙威¹ 孟月东¹ 罗家融²

(1. 中科院合肥等离子体物理研究所 合肥 230031; 2. 东华大学理学院 上海 200051)

Inaction Mechanism of Bacteria Spore with Atmospheric Pressure Plasma

Shen Jie^{1*}, Cheng Cheng^{1*}, Fang Shidong¹, Chen Longwei¹, Meng Yuedong¹, Luo Jiarong²

(1. Institute of Plasma Physics, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China;

2. College of Science, Donghua University, Shanghai 200051, China)

Abstract The possible mechanisms responsible for the inaction of *Bacillus subtilis* spore with the atmospheric pressure argon plasma generated with a lab-built single-electrode plasma jet were experimentally studied. The impacts of the inaction conditions including the plasma exposure time, temperature, ultraviolet (UV) irradiation and electric field on the inaction rate were evaluated. The morphologies and protein leakage of the spores before and after the plasma exposure were characterized with scanning electron microscopy, conventional emission spectroscopy, and optical spectroscopy. After the plasma exposure for 5 min, the killing-log-value of *Bacillus subtilis* spore was found to be less than 2.0, little depending on the heat, UV irradiation and hydroxyl radicals. We suggest that the energetic particles of the plasma may seriously damage cell walls or membranes and eventually inactivate the spores.

Keywords Bacterial inactivation, Plasma jet, Low-temperature plasma, *Bacillus subtilis* spore, SEM, Protein leakage

摘要 为研究低温大气压等离子体灭菌机理,设计了一种单电极等离子体射流装置。使用该装置对枯草杆菌芽孢进行了细菌灭活实验。利用扫描电镜(SEM)观察了氩等离子体处理前后细菌芽孢的形貌变化;测量了等离子体处理后枯草杆菌芽孢蛋白质泄漏量,并进行了光谱诊断。实验结果表明枯草杆菌芽孢经氩等离子体射流处理5 min后,芽孢杀灭率低于两个量级。温度和紫外光在细菌灭活中作用较小,羟基自由基不起主要作用。SEM结果显示氩等离子体处理5 min后枯草杆菌芽孢形态基本保持完整。根据SEM、蛋白质泄漏量和发射光谱分析结果,推断高能粒子在细菌灭活中起主要作用。高能粒子对细菌细胞壁和细胞膜造成一定的刻蚀作用,并最终导致了枯草杆菌芽孢的失活。

关键词 细菌灭活 等离子体射流 低温等离子体 枯草杆菌芽孢 扫描电镜 蛋白质泄漏

中图分类号:TM89

文献标识码:A

doi:10.3969/j.issn.1672-7126.2013.09.09

近些年来,随着低温等离子体技术的发展和深入研究,促使其在生物医学灭菌、材料科学、微电子等方面广泛应用。

低温等离子体因其在消毒、灭菌领域中具有快捷、低温、简单、高效及安全无污染等优点,同时等离子体灭菌技术在空气、食品工业、制药及包装行业、医疗行业、航天器等领域的消毒灭菌方面的研究中效果良好、独具潜力^[1-9,24]。这也正好满足了医疗行业对消毒灭菌快速、安全、绿色的要求,以及食品行业提高微生物

食品安全和质量,不影响食品的营养、功能性和感官特性,食品低温消毒保鲜创新工艺的要求。

产生低温等离子体的气体放电形式主要有电晕放电、辉光放电和介质阻挡放电(DBD)等。大气压等离子体射流通常也采用DBD方式产生。等离子体射流的重要特性是能够穿过具有高深宽比的微型结构物体(如狭缝、毛细管)^[10-12]。大气压等离子体射流可以穿过间距为150 μm的平行玻璃板、玻璃毛细管以及塑料毛细管。这个特性使射流能够处理

收稿日期:2012-10-08

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 11005126)

* 联系人:Tel:(0551)5591344;E-mail:shenjje@ipp.ac.cn

具有复杂几何形状和腔体如牙科(牙科手术器械以及牙根管的处理)。等离子体射流易于微型化或规模化放大,可以形成射流阵列处理特殊形状的物体^[13]。

有关低温等离子体杀灭微生物的机制,目前尚不完全清楚。本文采用高频高压电源为激发源,以单电极 DBD 放电方式产生大气压氩等离子体射流,由于电极阻挡介质的存在,产生的等离子体温度不高。对等离子体射流的特性进行了定性的解释,对医用聚四氟乙烯载体 (PTFE) 上的枯草杆菌芽孢灭活效果以及等离子体与细菌作用机制进行了研究。等离子体射流中有杀菌作用的成分有温度、紫外线、带电粒子、高压电场、活性成分等^[14]。本文考察了温度、紫外线对细菌灭活的影响,利用扫描电子显微镜 (SEM) 来观察等离子体处理前后细胞的形貌变化,利用光谱仪对等离子体射流发射光谱进行分析,分析其所含组分,测量了细胞内蛋白质泄漏量的变化。在实验、诊断基础上,进一步探讨等离子体射流灭菌的机理。

1 实验装置和方法

1.1 单电极氩等离子体射流的产生

单电极等离子体射流如图 1 所示,直径为 1.5 mm 的高压铜电极套在一端封闭的石英玻璃管内,并伸入圆柱形聚四氟腔内(腔体外径 35 mm,内径 15 mm)射流出口由外径为 6 mm 的石英玻璃构成,电极和石英玻璃管由 PTFE 固定。气体流量由流量计进行调节,实验时氩气的体积流量设置为 12.5 L/min。高压铜电极和交流高压电源相连,频率调节范围在 10 ~ 50 kHz。外加电压(频率 $f = 38$ kHz)和放电电流分别由 Tektronix P6015 高压探头和电流传感器测量,并由 Tektronix TDS 4024 示波器串

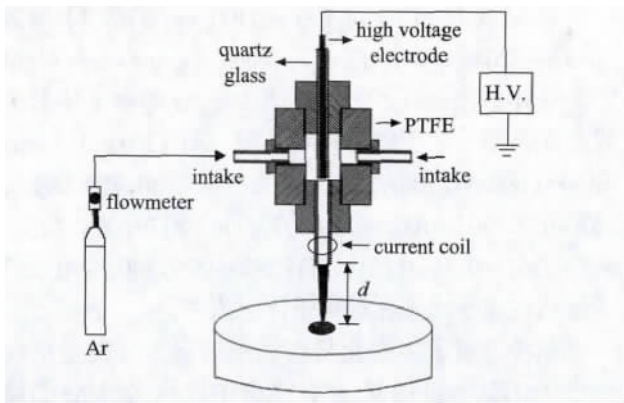


图 1 单电极等离子体射流实验装置示意图

Fig. 1 Experimental setup of the single-electrode plasma jet

口和计算机采集获得实时数据。图 2 为外加电压峰值 $V_p = 10$ kV 时外加电压及放电电流波形,此时射流长度可达 2 cm。从图 2 中可以看出在每个放电电压半周期仅有一个电流脉冲出现,这说明氩气单电极等离子体射流表现出类辉光放电特性^[15]。放电时氩等离子体射流温度低于 40℃。

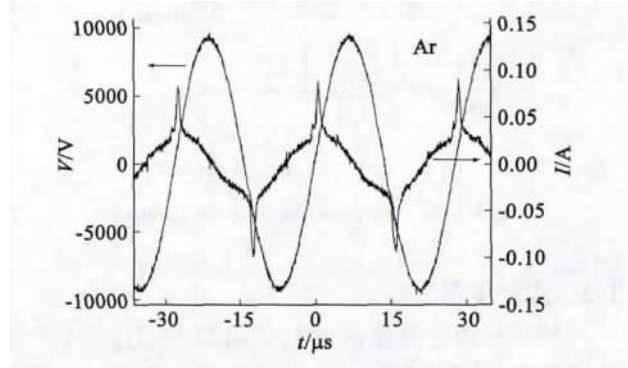


图 2 放电电压及电流波形图

Fig. 2 Discharge waveforms of voltage and current

1.2 等离子体射流等效电路

单电极等离子射流可以等效为平板 DBD 放电,只不过它不存在实际的接地电极。研究人员利用高速相机证实了等离子体射流并非完全连续的放电,实际上是一团团等离子体以类似“子弹”形式传播的结果。通常认为等离子体射流以快速离子波的形式传播,等离子体“子弹”头部含有大量的正离子,由于光致电离的作用,“子弹”头部的光子在不远处产生光电子,两处之间的强电场使光电子向等离子体团头部加速时产生电子雪崩,等离子体团头部的正离子将被电子雪崩中和。这样原先产生光电子的地方将有大量的正离子形成新的等离子体团,依次传递下去形成等离子体射流^[25-26]。当射流传播至玻璃管外时,由于空气的渗入,与等离子体发生复合,等离子体“子弹”头部的电场不足以维持其继续传播,射流长度保持不变,因此等离子体射流末端可以认为是虚地点^[27]。整个射流空间相当于平板 DBD 放电两极板之间的间隙,设其电容为 C_g ,玻璃管壁(包括高压电极外的石英管和射流空间的石英管)与管外部空间相当于介质层,设其电容 C_d 。等效电路模型如图 3,其中 R_p 、 C_p 为高压探头的等效电路。传导电流可用 $I_{cond} = (C_g/C_d + 1)I_1 - 2\pi f V_{AC} C_g$ 来表示^[16],其中 f 为电源的工作频率。在一个周期的放电持续时间内,若传导电流相比装置上的位移电流显著得多,传导电流公式可简化为: $I_{cond} \approx 2\pi f$

$V_{AC}C_d$ 可以近似认为传导电流大小与电源频率和外加电压大小成正比。当保持气体流量和频率不变, 改变电压时射流长度也随着改变。

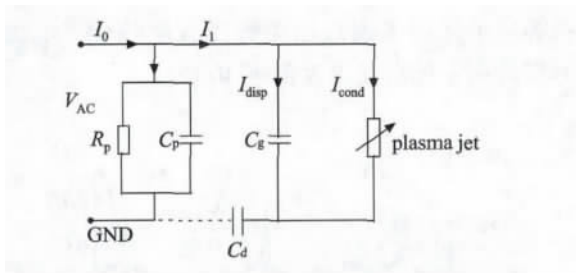


图3 等离子体射流等效电路

Fig.3 The equivalent circuit of the plasma jet

1.3 实验步骤

枯草杆菌芽孢悬液的制备可以参照国家《消毒技术规范》。用移液枪将 50 μl 细菌的菌悬液(菌液浓度为 1.16×10^8 CFU/ml)滴到直径为 6 mm 的 PTFE 载体上, 在无菌的操作间中用操作台的气流风干菌液。然后将染菌的 PTFE 载体放于培养皿中央, 并置于射流出口 1 cm 处理不同时间(处理时间分别为 10, 20, 40, 60, 120, 300 s)。处理后的样品用 5 ml 无菌水浸泡 1 h, 并稀释至一定倍数, 用平板计数法来测定样品中存活的菌落数。

为了测定处理样品的蛋白质泄漏量(蛋白质泄漏量的测定可以反映等离子体处理前后细胞损伤程度)将等离子体处理后的样品浸泡于 5 ml 磷酸缓冲液中 1 h, 经离心机 4000 r/min 离心 10 min, 吸取 1 ml 上清液, 加入 5 ml 的考马斯亮蓝溶液, 充分混合约 2 min 后用双光束紫外可见分光光度计(TU-1901)进行测试。为避免误差, 以上样品均做三组平行实验。

2 实验结果与讨论

2.1 PTFE 载体的灭活

从图 4 中可以看出, 枯草杆菌芽孢的数量随着 Ar 等离子体射流处理时间的增加而减少。在 1 min 内芽孢杀灭速率较快, 处理 1 min 左右时存活数量下降了 1 个数量级, 从 1 min 后, 芽孢杀灭速率趋于平缓, 在 5 min 时存活数量下降了不到 2 个数量级。这可能是因为“阴影效应”——下层的细菌被上层的细菌覆盖, 使得灭菌速率不断降低^[17]。

2.2 温度影响

用热气流来模拟等离子体温度对枯草杆菌芽孢

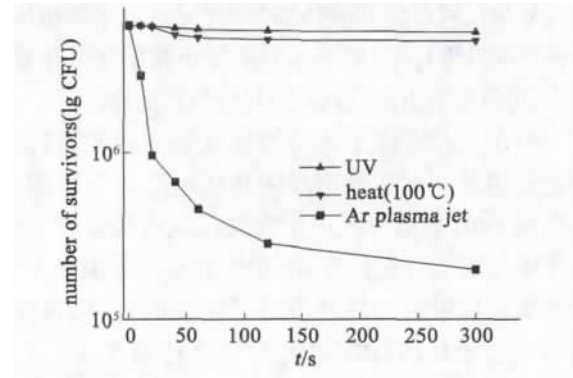


图4 不同处理时间枯草杆菌芽孢存活数

Fig.4 Survival numbers of *Bacillus subtilis* spores after plasma exposure

失活的影响。温度范围为 60 ~ 100 $^{\circ}\text{C}$ 处理时间为 5 min。枯草杆菌芽孢样品经热气流理后, 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 存活的数量下降了 4%, 80 $^{\circ}\text{C}$ 存活的数量下降了 9%, 100 $^{\circ}\text{C}$ 存活的数量下降了约 20% (如图 4 所示)。而氩等离子体射流温度低于 40 $^{\circ}\text{C}$ 。这表明等离子体射流的温度对枯草杆菌芽孢的失活基本没有作用。

2.3 UV 光辐照

等离子体射流的 UV 光能够透过石英玻璃, 而带电粒子和化学活性粒子则被石英玻璃阻隔, 故石英玻璃覆盖的枯草杆菌芽孢样品可以模拟只有 UV 光对细菌的失活作用。样品经等离子体射流处理 5 min 后, 枯草杆菌芽孢的存活数降低了约 10%。通常 UV 光辐照在波长位于“失活波段”(220 ~ 280 nm) 范围并且强度达到一定程度才会对细菌的失活有显著的效果, 而从图 5 中并没有发现 220 ~ 280 nm 的谱线。这也解释了氩等离子体射流的 UV 光对枯草杆菌芽孢失活作用很小的原因。

2.4 发射光谱图

使用波长范围为 200 ~ 1100 nm 的发射光谱(Avaspec-2048 optical fiber emission spectrometer)对 Ar 等离子体射流进行了测试。图 5 是 Ar 等离子体射流发射光谱图。从图中可以看出有 $\cdot\text{OH}$ (306 ~ 310 nm) 和 ArI (696.54, 706.72, 727.2936, 738.3980, 750.3869, 751.4652, 763.5106, 772.4207, 794.8176, 800.6157, 801.4786, 810.36931, 811.5311, 826.4522, 840.8210 nm) 等氩活性粒子出现在等离子体射流中。

氩冷等离子体射流与空气中微量水分发生反应生成 $\cdot\text{OH}$, 其含量很低, 且在光谱中只相当于 Ar 的最高发射谱线 1/5。结合 M. G. kong 等^[19-20] 的实验结果, 认为 $\cdot\text{OH}$ 不起主要灭菌作用。

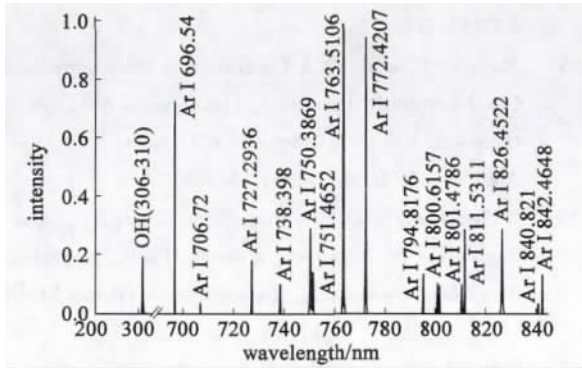


图 5 氩等离子体射流发射光谱图

Fig. 5 Emission spectra of the argon plasma

2.5 SEM 观察

细菌的基本结构是由细胞壁、细胞膜、核质、核糖体及其内容物等所组成,其中细胞壁与细胞膜共同构成保护性屏障,在抵抗各类杀菌方法中起着重要作用。由图 6 可知,等离子体处理前后枯草杆菌芽孢表面并没有明显的破坏。

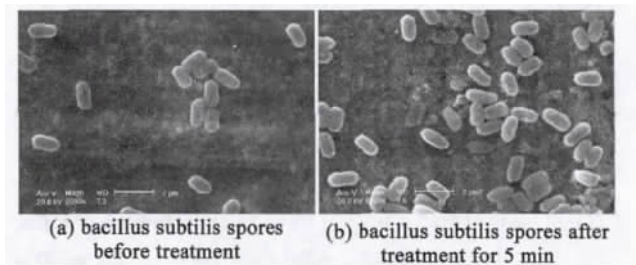


图 6 等离子体处理前后芽孢的 SEM 图片

Fig. 6 SEM photographs before and after plasma exposure

2.6 蛋白质测量

SEM 图中没有发现芽孢表面有明显破坏的迹象,而蛋白质测量可以间接反映其受损程度。为了更清楚了解芽孢表面有无损伤,我们做了蛋白质泄漏量的检测,图 7 即为蛋白质泄漏量和等离子体灭菌与时间的关系图。由图 7 可知蛋白质泄漏量随着氩等离子体射流处理时间延长而增加,在最初 1 min 处理时间内,蛋白质泄漏量迅速增加,同时等离子体处理的枯草杆菌芽孢存活数量也迅速减少,两者具有对应的趋势。在 1~5 min 的处理时间内蛋白质泄漏量缓慢增加,而芽孢杀灭速率趋于平缓。

3 结果分析

等离子体射流中有杀菌作用的成分有温度、紫外线、带电粒子、高压电场、活性成分等。通过对实验结果的分析可知,枯草杆菌芽孢经 80℃ 热气流处

理 5 min 后存活的数量仅下降了 9%;经紫外光辐射处理 5 min 后,枯草杆菌芽孢的存活数降低 10%。这表明等离子体射流温度和 UV 光对细菌灭活作用较小。通常认为高压电场对细菌灭活不起明显作用^[8,18]。从光谱图 5 中可以看出,谱线范围主要为 $\cdot\text{OH}$ (306~310 nm) 以及氩活性粒子(690~850 nm),氩等离子体射流中 $\cdot\text{OH}$ 是由于空气中微量水分电离形成的,其含量较少,光谱光强较低,对细菌失活并不起主要作用。从图 7 可以看出,蛋白质泄漏量随着氩等离子体处理时间延长而增加。本文认为高能粒子(氩离子、亚稳态氩离子、激发态氩原子等)对细菌灭活起主要作用。等离子体中的高能粒子快速轰击芽孢表面,并在微观结构上损伤了细胞的细胞壁和细胞膜,使细胞内的内容物质(如蛋白质)溢出,最终导致了微生物的失活^[21]。由于分辨率的原因,这种损伤无法在 SEM 中看出,故经 Ar 等离子体处理 5 min 的芽孢外形基本完整,这与国内外一些研究者的结论一致^[2,22-23]。

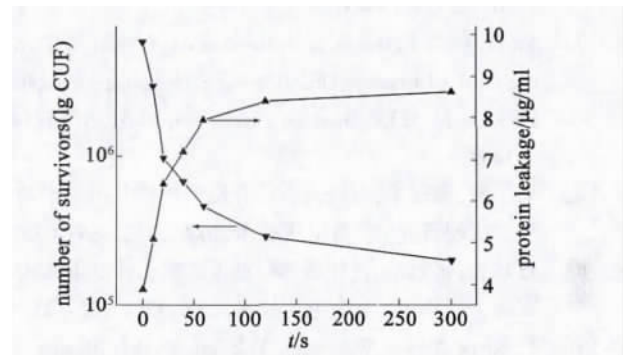


图 7 蛋白质泄漏量和等离子体灭菌随 Ar 等离子体处理时间变化的曲线

Fig. 7 Quantity of protein leakage after plasma exposure for different time

4 结束语

本文以单电极 DBD 放电方式产生大气压类辉光氩等离子体射流,并用于枯草杆菌芽孢灭活研究。实验研究表明,经氩等离子体射流处理 5 min PTFE 载体枯草杆菌芽孢存活数量降低于两个数量级。温度、紫外光、电场在细菌灭活中作用较小,活性成分($\cdot\text{OH}$)并不起主要作用,高能粒子起主要作用。等离子体射流中的高能粒子对于芽孢表面的损伤是导致细菌灭活的主要原因。

参 考 文 献

- [1] Michel Moisan¹, Jean Barbeau, Marie-Charlotte Crevier, et al. Plasma Sterilization. Methods and Mechanisms [J]. Pure Appl Chem 2002, 74(3):349–358
- [2] Masaaki Nagatsu, Fumie Terashita, Hiroyuki Nonaka, et al. Effects of Oxygen Radicals in Low-Pressure Surface-Wave Plasma on Sterilization [J]. Applied Physics Letters 2005, 86(21):211502–211504
- [3] Luigi Ragni, Annachiara Berardinelli, Lucia Vannini, 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] Hyun Woo Lee, Seoul Hee Nam, Abdel-Aleam H, et al. Atmospheric Pressure Plasma Jet Composed of Three Electrodes: Application to Tooth Bleaching [J]. Plasma Processes and Polymers 2010, 7(7):274–280
- [5] Laroussi M, Fridman A. Special Issue “Plasma Medicine” [J]. Plasma Processes and Polymers 2010, 7(7):187–192
- [6] Laroussi M. Low Temperature Plasma-Based Sterilization: Overview and State-of-the-Art [J]. Plasma Proc Polymers, 2005, 2(2):391–400
- [7] Yu H, Xiu Z L, Ren S, et al. Inactivation of Yeast by Dielectric Barrier Discharge (DBD) Plasma in Helium at Atmospheric Pressure [J]. IEEE Trans on Plasma Sci 2005, 33(4):1405–1409
- [8] 马跃, 张冠军, 石兴民, 等. 介质阻挡放电用于细菌灭活的机理研究 [J]. 高电压技术 2008, 34(2):363–367
- [9] 石兴民, 张冠军, 许桂敏, 等. 低温等离子体对细菌内毒素的灭活作用 [J]. 高电压技术 2009, 35(1):22–25
- [10] Klaus Dieter Weltmann, Eckhard Kindel, Thomas von Woedtke, et al. Atmospheric-Pressure Plasma Sources: Prospective Tools for Plasma Medicine [J]. Pure Appl Chem 2010, 82(6):1223–1237
- [11] Klaus Dieter Weltmann, Ronny Brandenburg, Thomas von Woedtke, et al. Antimicrobial Treatment of Heat Sensitive Products by Miniaturized Atmospheric Pressure Plasma Jets (APPJs) [J]. Journal of Physics D: Applied Physics 2008, 41(19):194008–198013
- [12] Brandenburg R, Ehlbeck J, Stieber C, et al. Antimicrobial Treatment of Heat Sensitive Materials by Means of Atmospheric Pressure RF-Driven Plasma Jet [J]. Contrib Plasma Phys 2007, 47:(1–2):72–79
- [13] Cao Z, Walsh J L, Kong M G. Atmospheric Plasma Jet Array in Parallel Electric and Gas Flow Fields for Three-Dimensional Surface Treatment [J]. Applied Physics Letters 2009, 94(2):021501–021503
- [14] Mounir Laroussi, Fellow. Low-Temperature Plasmas for Medicine [J]. IEEE transactions on Plasma Science, 2009, 37(6):714–725
- [15] Massines F, Gouda G. A Comparison of Polypropylene-Surface Treatment by Filamentary, Homogeneous and Glow Discharges in Helium at Atmospheric Pressure [J]. J Phys D Appl Phys, 1998, 31(24):3411–3420
- [16] Li Shou-Zhe, Huang Wen-Tong, Zhang Jialiang, et al. Optical Diagnosis of an Argon/oxygen Needle Plasma Generated at Atmospheric Pressure [J]. Applied Physics Letters 2009, 94(11):111501–111503
- [17] Heise M, Neff W, Franken O, et al. Sterilization of Polymer Foils with Dielectric Barrier Discharges at Atmospheric Pressure [J]. Plasmas and Polymers 2004, 9(1):23–33
- [18] XU Gui-min, ZHANG Guan-jun, SHI Xing-min, et al. Bacteria Inactivation Using DBD Plasma Jet in Atmospheric Pressure Argon [J]. Plasma Science and Technology 2009, 11(1):83–88
- [19] Stefano Perni, Gilbert Shama. Probing Bactericidal Mechanisms Induced by Cold Atmospheric Plasmas with Escherichia Coli Mutants [J]. Applied Physics Letters, 2007, 90(7):073902–073904
- [20] Liu Hongxia, Chen Jierong, Yang Liqing, et al. Long-Distance Oxygen Plasma Sterilization: Effects and Mechanisms [J]. Applied Surface Science 2008, 254(6):1815–1821
- [21] Ferng S F, Castro C E, Afifi AA, et al. Ozone-Induced DNA Strand Breaks in Guinea Pig Tracheobronchial Epithelial Cells [J]. Toxicol Environ Health, 1997, 51(4):353–367
- [22] Chiang M H, Wu b J Y, Li Y H, et al. Inactivation of E Coli and B Subtilis by a Parallel-Plate Dielectric Barrier Discharge Jet [J]. Surface & Coatings Technology, 2010, 204(21–22):3729–3737
- [23] J Oprezka J, Benedikt P, Awakowicz I, et al. The Role of Chemical Sputtering during Plasma Sterilization of Bacillus Atrophaeus [J]. Journal of Physics D: Applied Physics 2007, 40(9):2826–2830
- [24] 张素贞, 程 诚, 兰 彦, 等. 远程氩气等离子体引发接枝丙烯酸改性聚丙烯微孔膜的研究 [J]. 真空科学与技术学报 2009, 29(5):556–561
- [25] Sands B L, Ganguly B N, Tachibana K. A Streamer-Like Atmospheric Pressure Plasma Jet [J]. Applied Physics Letters 2008, 92(15):151503–151505
- [26] Takashima K, Adamovich I V, Xiong Z M, et al. Experimental and Modeling Analysis of Fast Ionization Wave Discharge Propagation in a Rectangular Geometry. Physics of Plasmas [J]. 2011, 18(8):083505–083522
- [27] Rubin Ye, Wei Zheng. Temporal-Spatial-Resolved Spectroscopic Study on the Formation of an Atmospheric Pressure Microplasma Jet [J]. Applied Physics Letters. 2008, 93(7):071502–071504