

# 常压低温等离子体对微生物的杀灭研究

吴旭琴<sup>1</sup> 王守国<sup>2</sup> 韩 黎<sup>1\*</sup> 赵玲利<sup>2</sup> 常 啸<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>中国人民解放军总医院 医院感染管理研究科 北京 100853)

(<sup>2</sup>中国科学院微电子所 北京 100010)

**摘 要** :初步探讨 APPJ 等离子体对微生物的影响机制,用 APPJ 与 DBD 两种不同类型等离子体对不同代表微生物金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草杆菌黑色变种进行处理,分析比较不同微生物对不同等离子体的存活曲线,进而利用扫描电镜观察微生物细胞壁、膜等外部结构的变化。结果显示两种等离子体对不同微生物的杀灭作用均为先快后慢,APPJ 的作用效果远好于 DBD。DBD 对金黄色葡萄球菌及枯草杆菌黑色变种芽孢的 D 值为 70s,而 APPJ 的 D 值为 4s。同时,在 APPJ 的作用下,大肠杆菌细胞壁、膜有明显破裂发生。这证明 APPJ 可快速有效地杀灭微生物体,其灭菌机制可能与微生物细胞壁、膜的破裂有关。

**关键词** :APPJ,等离子体,灭菌,存活曲线

**中图分类号** :R378.2+1 **文献标识码** :A **文章编号** :0001-6209(2005)02-0312-03

等离子体(Plasma)是指气体在加热或者强电磁场作用下产生的高度电离的气体云,其所含的活性自由基及射线对微生物有较好的杀灭作用<sup>[1]</sup>,但由于产生等离子体的方式不同,其对微生物的杀灭机制也不同。传统的产生等离子体的方式有两种:一是大气压下的电压气体击穿电离(几千伏到上万伏),如相对低温的 DBD 技术(Dielectric barrier discharge);二是真空室中的低温大面积放电。而 APPJ (Atmospheric Pressure Plasma Jet,常压低温射频)这项新技术突破性地在大气压下产生了低温均匀等离子体。当前,APPJ 的物理机制还有待进一步解释<sup>[12]</sup>,而且其对微生物体的影响机制及杀灭机理也不清楚,已成为当前研究的热点。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, ATCC6538)、大肠杆菌(*Escherichia coli*, ATCC8099)、枯草杆菌黑色变种(*Bacillus subtilis* var. *niger*, ATCC9372)为本实验室保存菌种。所有实验菌株均培养于营养琼脂培养基中。

### 1.2 细菌悬液的制备<sup>[3]</sup>

冻干菌种融化后,复苏划线接种于营养琼脂培养基平板。挑取典型单菌落,接种斜面 37℃ 培养过夜。将 3.0~5.0mL PBS 缓冲液加入斜面试管内,反复吹吸,洗下菌苔。将菌悬液移至另一无菌试管中,振荡使细菌悬浮后,用血细胞计数板计数后,4℃ 保存于当天使用。

### 1.3 菌涂片的制备

将载体玻片用碱性皂液及蒸馏水煮沸脱脂处理,并漂洗至 pH 中性,晾干灭菌备用。吸取 10μL 上述菌悬液均匀涂布

于处理过的玻片上,晾干。

### 1.4 APPJ 及 DBD 处理

APPJ 及 DBD 等离子体处理菌涂片在中国科学院微电子所王守国教授实验室完成。具体技术参数如下:DBD(高电压击穿,仍为常压低温)等离子体的气体流量为:氩气 Ar, 15L/min,氧气 O<sub>2</sub> 45mL/min,作用距离 d 为 24mm,作用功率 P 为 1000W;APPJ 射频等离子体的气体流量:氩气 Ar, 30L/min;作用距离 d 为 7mm,作用功率 P 为 80W。

### 1.5 活菌培养计数

将 APPJ 等离子体处理后的涂有微生物体的玻片放入含有 5mL PBS 溶液的大试管中,振荡将菌洗下成为菌悬液。将该菌悬液进行系列稀释,选择适宜稀释度吸取 1mL 加于无菌平皿内。每一稀释度接种 3 个平皿。采用倾注培养法,37℃ 培养 48h 后,进行活菌计数。

### 1.6 扫描电镜分析<sup>[4]</sup>

菌片样品经处理后用 3% 戊二醛固定 2h,用 0.07mol/L PBS 磷酸缓冲液浸洗 3 次,每次 5 min。然后用 1% 锇酸固定 2h,再进行乙醇梯度脱水,醋酸异戊酯置换,在临界点干燥(日立 HCP-2)。真空镀膜(JEC-1500),在日立 S-800 扫描电镜下观察,并拍照。

### 1.7 数据分析

通过曲线得出细菌存活数与等离子体作用时间的关系是  $\lg [N_t/N_0] = -k \cdot t$ 。求出 D 值:  $D = t(\lg N_0 - \lg N_s)$ , D 值:杀灭微生物数量达 90% 所需的时间;  $N_0$  是初始的菌数,  $N_s$  是存活的菌数。实验中所采用数据均为 3 次平行实验的代表值,经 Graph Prism4.0 处理做图。

\* 通讯作者。Tel: 86-10-66937144, E-mail: lihan@301hospital.com.cn

作者简介:吴旭琴(1969-),女,江苏宜兴人,苏州大学医学院病原生物学硕士,从事医院感染微生物学研究。E-mail: grglk369@sina.com

其他作者:陈 耕<sup>1</sup>,索继江<sup>1</sup>,邢玉斌<sup>1</sup>,陈世平<sup>1</sup>

收稿日期:2004-09-08,修回日期:2004-12-17

2 结果

2.1 DBD 氩气等离子体

由图 1 所示 ,在前 120s 内 ,DBD 对金黄色葡萄球菌(革兰氏阳性菌的代表)的杀灭速度较快 ,D 值约为 1.25min ;在 120s 后 ,其杀灭速度较慢且曲线较为平滑 ,D 值约为 8min ;在 10min 内 ,DBD 对金黄色葡萄球菌杀灭率大于 2 个对数值。值得注意的是 ,在处理 30s 时 ,金黄色葡萄球菌的数量略高于处理 15s 时。使用枯草杆菌黑色变种芽孢作为细菌芽孢的代表(图 1)。结果显示 ,前 30s 的芽孢被灭活的速度较快 ,D 值约 70s ,而此后的杀灭速度很慢(D 值约为 10min)。同样有趣的是 ,在处理 1min 后的菌数多于处理 30s 的。

对革兰氏阴性菌的代表——大肠杆菌(*E. coli*) ,DBD 在前 10s 内的灭活速度很快 ,D 值约 7s ,此后速度相对减慢且曲线曲折。同样 ,观察到在处理 15s 时的菌数多于处理 30s 时。

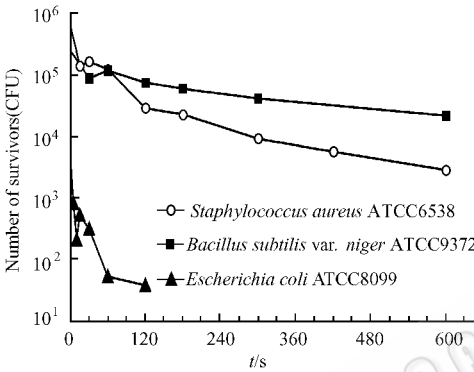


图 1 DBD 等离子体处理下的不同微生物的存活曲线  
Fig.1 Survival curve of different microbes treated by DBD plasma

2.2 氩气 APPJ 射频等离子体

结果显示 ,在 APPJ 处理下 ,前 15s 内金黄色葡萄球菌的死亡速度很快 ,D 值约 6s ,远高于 DBD 氩气等离子体处理效果 ,后期该菌的死亡速度相对减慢且曲线平滑 ,D 值约 38s ;而 APPJ 等离子体对枯草杆菌黑色变种芽孢的杀灭速率也很快 ,前 15s 内 ,D 值约 4s ,后期速度相对减慢且曲线平滑 ,D 值约 40s ,远快于 DBD 等离子体对芽孢的杀灭效率 ,对大肠杆菌的杀灭作用 ,APPJ 等离子体也远强于 DBD 等离子体 ,D 值约为 2s ,且在很短时间(5s)内将大肠杆菌全部杀死。更为明显

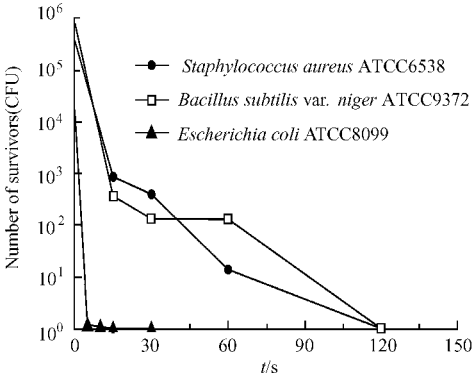


图 2 APPJ 等离子体处理下的不同微生物的存活曲线  
Fig.2 Survival curve of different microbes treated by APPJ plasma

的是 ,APPJ 作用下的微生物存活曲线持续快速下降 ,无反升现象(图 2)。

2.3 不同等离子体对不同微生物的 D 值比较

DBD 对革兰氏阳性菌的代表金黄色葡萄球菌杀灭的 D 值为 75s ,对革兰氏阴性菌的代表大肠杆菌杀灭的 D 值为 7s ,而对细菌芽孢的代表枯草杆菌黑色变种芽孢杀灭的 D 值为 70s ,同样 ,用 APPJ 技术处理这 3 种细菌代表 ,其 D 值分别为 6s、2s 和 4s ,明显比 DBD 的作用时间短。

2.4 微生物细胞壁、膜在 APPJ 作用下的结构改变

实验中 ,最重要的发现是对暴露于 APPJ 等离子体下的 大肠杆菌细胞壁的破损。图 3-B 所示 ,大肠杆菌的细胞壁、膜在 APPJ 等离子体处理 4s 后明显破裂 ,使细胞质流向周围介质中。

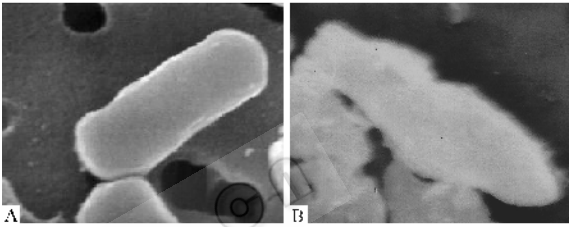


图 3 扫描电镜下经 APPJ 处理的 *E. coli* 细胞破损情况(8100×)  
Fig.3 Gross morphological damage of *E. coli* cells under SEM after APPJ treatment(8100×)  
A :Control ; B :APPJ 4s-treated.

3 讨论

APPJ 技术以射频电容方式耦合的方式在大气压下产生等离子体炬(目前除美国、德国及中国的几家实验室外 ,这种等离子体只能产生在真空室中<sup>[4]</sup>)。实验中 ,我们使用了两种以氩气作为载体气体的等离子体 ,一种是电压较高并加入氧气的 DBD ;另一种则是低电压温和的射频等离子体(APPJ)<sup>[5]</sup>。结果显示 ,APPJ 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草杆菌黑色变种的作用杀灭效率明显好于 DBD 等离子体。在 DBD 等离子体处理下 ,3 种细菌存活曲线相似 ,都可以分成三部分。第一阶段前 30s 内 ,D 值普遍较小 ,杀菌速度快 ;而第二阶段(30~60s) ,细菌数量反而有增多趋势 ;在第三阶段(60s 后) ,D 值都较大 ,杀菌速度变慢。这显示 ,DBD 等离子体杀灭微生物在不同时期可能有不同的机制 :第一阶段 ,可能是其产生的某些射线穿透细胞杀死细菌 ,有的细菌可以耐受而存活 ;第三阶段 ,其等离子体中的活性物质影响细胞的正常生理生化反应 ,如活性氧作用于细胞 ,可使细胞膜中的不饱和脂肪酸氧化而饱和 ,从而使细胞膜失去正常功能<sup>[6]</sup> ;关于第二阶段细菌数量增多也许是因为等离子体不均匀所致 ,而且这种现象也只出现于 DBD 等离子体中 ,有待进一步研究。有趣的是 ,国外有相关报道 ,单一氩气放电产生的等离子体可以促使细菌生长<sup>[7]</sup>。相对而言 ,APPJ 等离子体对微生物的影响曲线 ,可比较明显地分为两个阶段 :第一阶

段杀菌速度很快,第二阶段的速度就相对较慢(图2)。其机制大概与上面 DBD 等离子体的第一、三阶段类似。

另外,关于不同等离子体对微生物的杀灭机理,Mendis<sup>[5]</sup>研究组指出带电粒子可能在细胞外膜表面积累,产生超过细胞膜自身张力的静电力,从而引起细胞破裂,并预言革兰氏阴性菌发生这种破裂的可能性较大。相反,Montie 等<sup>[8]</sup>则认为活性自由基(比如活性氧)导致了细胞外膜的破裂。在本实验中,APPJ 技术使样品远离放电腔,不直接与带电离子作用,而主要与可能的活性自由基发生反应<sup>[9]</sup>,因此大肠杆菌细胞壁及外膜的破裂(图3)从一定程度上证明,活性自由基在 APPJ 引起微生物细胞破裂机制中发挥主要作用,而与带电粒子的关系不密切。

总而言之,APPJ 技术作为只有世界上少数实验室才掌握的新技术,其物理机制远未明晰,但其应用前景非常广阔。而其对微生物体及至其他生物体的影响作用研究更是尚处于起步阶段,因此,在相对稳定的条件下,进一步深入探讨 APPJ 的电压、频率等物理参数与处理时间、距离及不同微生物种类的关系,阐明其具体杀菌机制将为其实际应用打下坚实基础。

## 参 考 文 献

[1] Herrmann H W, Henins I, Park J, et al. Decontamination of

- chemical and biological warfare (CBW) agents using an atmospheric pressure plasma jet (APPJ). *Phys Plasmas*, 1999, **5**: 2284 – 2289.
- [2] Laroussi M, Alexeff I, Kang W. Biological decontamination by non-thermal plasmas. *IEEE Trans Plasma Sci*, 2000, **28**: 184 – 188.
- [3] Moisan M, Barbeau J, Moreau S, et al. Low-temperature sterilization using gas plasma: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *Int J Pharmaceutics*, 2001, **226**: 1 – 21.
- [4] Laroussi M, Mendis D A, Rosenberg M. Plasma interaction with microbes. *New Journal of Physics*, 2003, **5**: 41.1 – 41.10.
- [5] Mendis D A, Rosenberg M, Azam F. A note on the possible electrostatic disruption of bacteria. *IEEE Trans Plasma Sci*, 2000, **28**: 1304 – 1306.
- [6] Kelly-Wintenberg K, Montie T C, Brickman C, et al. Room temperature sterilization of surfaces and fabrics with a one atmosphere uniform glow discharge plasma. *J Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1998, **20**: 69 – 74.
- [7] Yamamoto M, Nishioka M, Sadakata M. Sterilization using a corona discharge with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> droplets and examination of effective species. *In Proc 15<sup>th</sup> Int Symp Plasma Chem*, 2001, **2**: 743 – 751.
- [8] Montie T C, Kelly-Wintenberg K, Roth J R, et al. An overview of research using the one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP) for sterilization of surfaces and materials. *IEEE Trans Plasma Sci*, 2000, **28**: 41 – 50.
- [9] Laroussi M. Sterilization of contaminated matter with an atmospheric pressure plasma. *Trans Plasma Sci*, 1996, **24**: 1188 – 1191.

## Sterilizing effect of atmospheric pressure plasma jet on microbes

WU Xu-qin<sup>1</sup> WANG Shou-guo<sup>2</sup> HAN Li<sup>1\*</sup> ZHAO Ling-li<sup>2</sup> CHANG Xiao<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Hospital Infection Control & Research, PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

(<sup>2</sup> Institute of Microelectron, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100010, China)

**Abstract**: To study the sterilizing effect and mechanism of APPJ on microbes preliminarily, three representative bacteria, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* var. *niger* were treated by two kinds of plasma, DBD (dielectric barrier discharge) and APPJ. The survival curves of different microbes were compared and analyzed; Furthermore, the morphological change to cell walls and cell membranes were studied by scanning electric microscope. These results demonstrated that in the beginning phase the sterilizing effect of two kinds of plasmas on three microorganisms was stronger than in the later phase, and APPJ was more effective than DBD (D value of DBD on *Bacillus subtilis* var. *niger* was 70s, whereas APPJ's was 4s, much more efficient). Meanwhile, the gross morphological damage of *E. coli* cells under SEM after APPJ treatment was observed. These gave the obvious evidence that APPJ can destroy the microbes very efficiently, and more likely through the damage of cell walls and membranes of microbes treated by APPJ.

**Key words**: APPJ, Plasma, Sterilization, Survival curve

\* Corresponding author. Tel 86-10-66937144; E-mail: lihan@301hospital.com.cn

Other authors: CHEN Geng<sup>1</sup>, SUO Ji-jiang<sup>1</sup>, XING Yu-bin<sup>1</sup>, CHEN Shi-ping<sup>1</sup>

Received date: 09-08-2004