

## 低温氧等离子体杀灭铜绿假单胞菌的效果及机理

杨利青<sup>1</sup>, 陈杰<sup>1,2\*</sup>, 高俊玲<sup>2</sup>, 张铮<sup>1</sup>, 胡淼<sup>2</sup>

(西安交通大学<sup>1</sup>; 生命科学与技术学院<sup>2</sup>; 能源与动力工程学院, 西安 710049)

**摘要** 【目的】本文采用低温氧等离子体,在自行设计的远程等离子体反应装置中,对位于不同放电区域(放电区,余辉区,远程区)的模拟染菌载体聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)表面的铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的杀灭效果和机理进行了研究。【方法】采用扫描电子显微镜观察了等离子体处理前后细菌细胞的形貌变化,采用考马斯亮蓝法测定了等离子体处理后细菌蛋白质泄漏量,采用双悬浮探针对氧等离子体的电子温度和离子浓度以及电子自旋共振波谱对自由基浓度进行了测定。【结果】强放电区、余辉区和远程区处理 30 s 后的灭菌效果分别为 4.2、3.8 和 2.6;扫描电镜观察结果和蛋白泄漏量测定结果证明细菌细胞被损毁,在强放电区是电子、离子、自由基和紫外光子的协同作用,而在余辉区和远程区的灭杀作用主要因自由基所为。【结论】证明该反应装置可有效实现活性粒子的分离,在远程等离子体场中揭示了等离子体灭菌的规律和机理。

**关键词**: 低温氧等离子体; 铜绿假单胞菌; 灭杀效果; 机理

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)01-0092-06

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是假单胞菌属中的代表菌种。最早是在 1882 年从病人化脓的伤口中分离出来,因产绿色色素,故俗称绿脓杆菌。铜绿假单胞菌是革兰氏染色阴性细菌,致病菌株有菌毛,一般不形成芽胞,是一种常见的院内感染条件致病菌,世界卫生组织调查公认该菌为医院内感染中的主要病原之一<sup>[1]</sup>,常感染免疫力低下的病人,引起菌血症、败血症、伤口感染、泌尿系统感染和囊性纤维化等疾病。在各种革兰氏阴性菌引起的感染中,铜绿假单胞菌感染位居第二,占各种医院内感染的 30% 左右<sup>[2]</sup>。除此之外,铜绿假单胞菌也是致死率最高的革兰氏病原体,致死率达 40%<sup>[3]</sup>。加之其高度耐药及多重耐药菌株愈来愈多。迫切需要一些安全、简便、快速灭菌且无残留毒性的消毒灭菌方法。

低温等离子体灭菌技术自 1968 年 Menashi<sup>[4]</sup>的专利首次报道可用氩低温等离子体杀灭玻璃瓶表面细菌以来,即以其快速、低温、体系能量高、无损材料基质、干式无污染等特点迅速成为消毒医学领域中的研究热点,被认为是新一代最有前途的灭菌技术。

等离子体是指具有宏观时空尺度的由带等量异号电荷的微观粒子组成的准电中性多粒子体系<sup>[5]</sup>。它主要包含电子、离子、原子、分子、活性自由基及射线等,被称为继“固、液、气”三态以外的新物质聚集态,即物质第四态<sup>[6]</sup>。因在中低压状态下,作为等离子体质量主体的较重粒子(中性基团和离子)的温度要比电子温度低至少一个数量级,使得等离子体的宏观温度偏低而被称之为低温等离子体或冷等离子体<sup>[7]</sup>。

基金项目: 国家自然科学基金(30571636, 20877062); 高等学校博士学科点基金(20060698002); 陕西省 13115 科技创新工程重大科技专项; 西安科技攻关项目(GG06049)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-29-82664818; E-mail: jrchen@mail.xjtu.edu.cn

作者简介: 杨利青(1978-),女,内蒙古人,博士研究生,研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: yangliqingrun@yahoo.cn

收稿日期: 2008-06-12; 修回日期: 2008-09-29

低温等离子体灭菌技术目前仍然处于零星、分散的实验阶段,理论研究十分薄弱,主要原因是等离子体化学的基元反应十分复杂,气相等离子体活性粒子难以分离。等离子体技术应用缺乏理论指导,杀菌机理的研究均是针对等离子体活性物种混存状态下实验结果的分析,仅是推测等离子体的杀菌作用是电子、离子、自由基、紫外光综合因素所致<sup>[8]</sup>。作为医学灭菌较之其它技术更强调稳定性,方可能安全使用。因此,如何实现等离子体场中活性物种(电子、离子、自由基、紫外光)的有效分离,阐明它们各自在等离子体灭菌中的作用规律、贡献份额及其灭菌机理,探索等离子体-微生物相互作用的效应,为等离子体灭菌技术的应用提供理论指导,是等离子体灭菌技术应用中迫切需要解决的科学问题。但现阶段尚未见有效地解决这方面问题的新思路、新方法的研究报导。

本文自行设计了远程等离子体反应器,可使活性物种有效分离。采用低温氧等离子体,对位于不同放电区域(放电区,余辉区,远程区)的模拟染菌载体聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)表面的铜绿假单胞菌的杀灭效果进行研究,探讨在每一放电区域何种活性粒子起作用,贡献份额和灭菌机理如何,为预防和控制该菌感染提供一种新的思路,为解决目前铜绿假单胞菌感染严重、治疗困难的医学难题提供一些依据和基础资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和仪器

1.1.1 菌种:铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, ATCC27853)购于陕西省微生物研究所。

1.1.2 主要试剂、培养基和仪器:实验中菌种培养所用营养琼脂购于北京奥博星生物技术责任有限公司,考马斯亮蓝 G-250 和牛血清白蛋白购于国药集团化学试剂有限公司;聚对苯二甲酸乙二醇酯薄膜购于上海鹏维包装材料有限公司;扫描电镜:日本电子公司, JSM6700-F 型;电子自旋顺磁共振仪:BRUKER 公司, ESP-500 型;紫外可见分光光度计:安捷伦有限公司, Aglient8453。

### 1.2 低温等离子体反应装置

本研究室研制的低温等离子体反应装置结构如图 1。反应器为派勒斯硬质玻璃管(Φ60 mm × 1000 mm),感应电极设于气体进口端。SY 型 500 W 晶控射频功率源(频率为 13.56 MHz,输出功率在 0~500 W 范围内连续可调),通过 SP-II 型射频匹配

器网络(中科院微电子中心)与反应器感应耦合,激发低压气体产生等离子体。

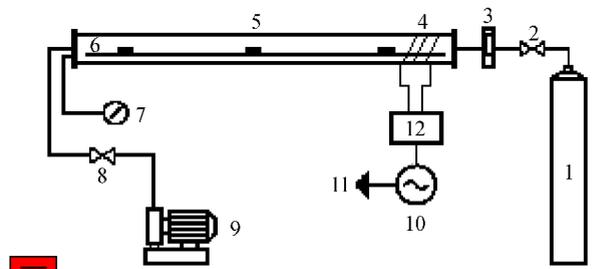


图 1 低温等离子体反应装置结构示意图

Fig.1 Schematic structure of low temperature plasma reactor. (1) gas bottle;(2) valve;(3) mass flow meter;(4) inductance coil;(5) reaction chamber;(6) sample;(7) vacuum gauge;(8) electromagnetism valve;(9) vacuum pump;(10) RF generator;(11) grounding protection;(12) matching system.

### 1.3 低温等离子体灭菌实验

将聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET)(0.08 mm)薄膜裁成 25 mm × 50 mm 尺寸大小,依次用乙醇和蒸馏水超声波洗涤 10 min,自然晾干,紫外线灭菌后备用。吸取 10 μL 新制的铜绿假单胞菌悬液<sup>[9]</sup>均匀涂布于处理过的载片上,晾干。

将低温氧等离子体处理后的涂有铜绿假单胞菌的膜片放入含有 20 mL 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 0.1 mL 加于无菌平皿内。每一稀释度接种 3 个平皿,取平均值。采用平板涂布培养法,于 37℃ 培养 48 h,进行活菌计数。

灭菌效果采用如下方程式进行计算<sup>[10]</sup>

$$GE = \log N_0 - \log N_t$$

式中  $N_0$  和  $N_t$  分别为等离子体处理前后铜绿假单胞菌的菌落形成单位(CFU)。

### 1.4 扫描电镜分析

载有铜绿假单胞菌的样品经 25% 戊二醛固定 2 h,用 0.07M PBS 磷酸缓冲液浸洗 3 次,每次 5 min,然后用 1% 锇酸固定 2 h,再依次用 25%, 50%, 75%, 95% 和 100% 浓度的乙醇进行梯度脱水,在临界点干燥。真空镀膜制样,在扫描电子显微镜下观察。

### 1.5 蛋白质泄漏量的测定

将直接经等离子体处理后的样片放入 PBS 溶液中,振荡洗脱为菌悬液,离心取上清液与质量浓度为 100 mg/L 的考马斯亮蓝 G-250 溶液混匀,室温静置 3 min,于波长 595 nm 处比色测吸光度。将样品液的吸光度值代入牛血清白蛋白标准曲线回归方程

求得泄漏蛋白质浓度。每一区域(放电区、余辉区、远程区)分别放置3片PET进行等离子体处理,然后测量,结果用均值 $\pm$ 标准偏差( $\bar{x} \pm SD$ )表示。

### 1.6 等离子体场中电子温度、离子浓度和自由基浓度的测定

采用图2所示的双悬浮探针(本研究室研制)诊断等离子体中的电子温度和离子浓度。将探针与稳流稳压电源、工作电阻 $R_1$ (300  $\Omega$ )、保护电阻 $R_2$ (2 M $\Omega$ )连接。该电源提供给探针一个连续可调的电压,电压范围100~100 V,探针电流检测范围0~1 A,检测精度小于0.5%。通过函数记录仪测定反应器中不同放电区域(放电区、余辉区、远程区)的伏安特性曲线。放电区选定了五个探测位点,分别

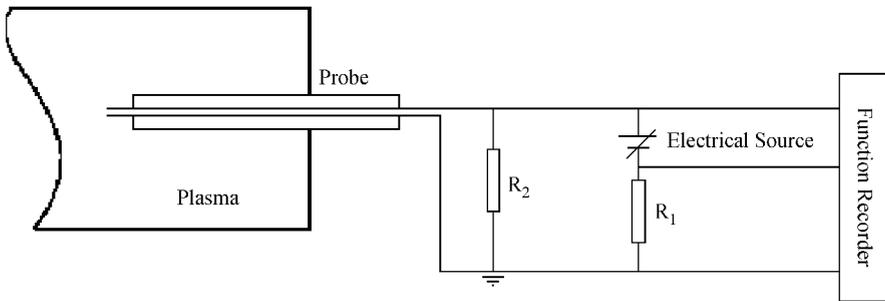


图2 Langmuir 探针测试系统

Fig.2 System of Langmuir probe testing.

## 2 结果和讨论

### 2.1 等离子体场中电子温度、离子浓度和自由基浓度

图3是不同功率下氧等离子体电子温度的轴向变化规律。随着放电功率的增大,氧等离子体的电子温度在距电感线圈中心0~10 cm处,随着轴向距离的增加而增加;在10~20 cm处,电子温度变化很小。当轴向距离为30 cm时,放电功率为30 W、60 W时的电子温度分别为2.3 eV、8.1 eV,当轴向距离超过40 cm后,由于电子、离子的浓度降低到接近于0,而无法测出;当轴向距离超过60 cm后,放电功率为90~180 W时,由于电子、离子的浓度降低到接近于0,而无法测出。随着功率的增加,电子温度的这种变化趋势是由于功率增加使等离子体内部电场的作用范围增大,因此,电子温度的最大值后移。

图4中给出了氧等离子体自由基浓度和离子浓度随着轴向位置的变化规律。从图4中可以看出,在某种确定的放电条件下,离子浓度随轴向距离的增大迅速降低,30 cm后趋近于0。而在等离子体放电功率为40 W、放电3 min、气体流量为20 cm<sup>3</sup>/min时,氧等离子体中自由基浓度随着距放电区距离的

为0 cm,10 cm,20 cm,30 cm和40 cm处,余辉区选择了45 cm和55 cm处两个探测位点,远程区选择了60 cm和75 cm处两个探测位点;每一位点测3次,取平均值。双悬浮探针采用直径为0.3 mm的钨丝制成。

取清洗过的天然羊毛为等离子体场自由基捕捉剂<sup>[11]</sup>,置于距电感线圈中点分别15、55和75 cm处的载物板上,进行氧等离子体处理后常温保存24 h,采用电子自旋顺磁共振仪(Electron Spin Resonance, ESR)进行自由基浓度测定。测定条件:室温,微波频率9.8 GHz,微波功率3.177 mW,调制幅度0.2 mT,调制频率100 kHz,时间常数为163.84 ms,增益60,扫描时间163.84 ms。

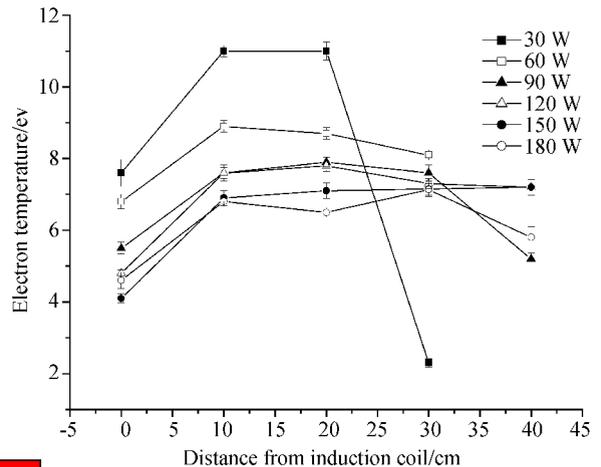


图3 不同功率下氧等离子体电子温度的轴向变化规律 (20 cm<sup>3</sup>/s)

Fig.3 Oxygen plasma electron temperature.

增大,相对浓度逐渐降低,在40 cm处自由基相对浓度为71%。

综上所述,放电功率40 W,气体流量20 cm<sup>3</sup>/min,放电时间3 min的条件下,电子温度和离子浓度在距电感线圈30 cm后接近于0,而自由基的相对浓度在60 cm处仍为39%。

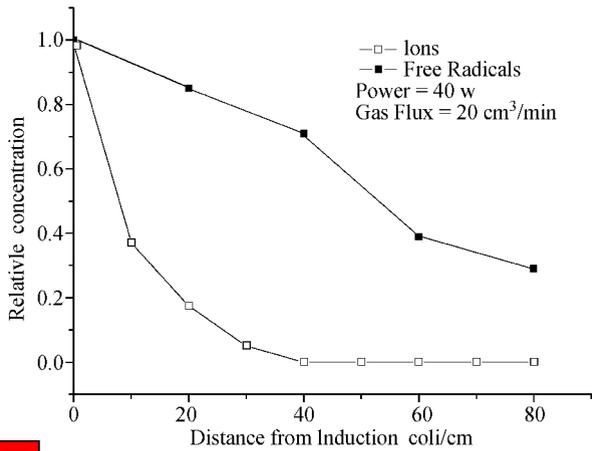


图4 等离子体自由基和离子浓度的分布

Fig.4 Oxygen plasma radicals and ions concentration( Power :40 W ; Flux 20 cm<sup>3</sup>/min ).

## 2.2 灭菌效果

图5为在放电功率40W,气体流量20cm<sup>3</sup>/min的放电条件下,氧等离子体对PET表面上铜绿假单胞菌的灭菌效果。在此条件下反应腔体内的等离子体可认为有3个不同的放电区域,距电感线圈

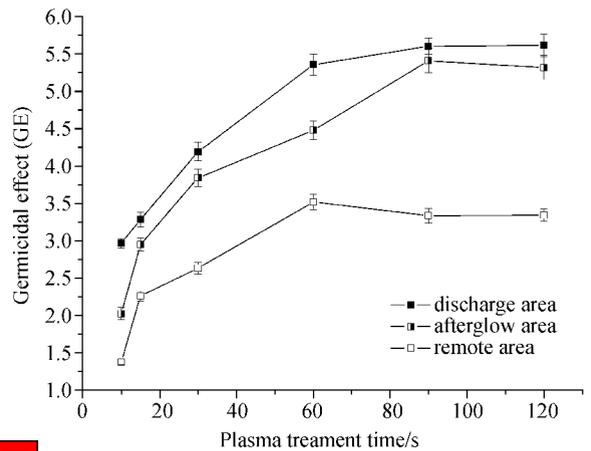


图5 氧等离子体处理后不同区域的灭菌效果图

Fig.5 Effect of plasma treatment time on germicidal effect at three different areas in oxygen plasma.

中心距离0~40cm为强放电区,40~60cm为余辉区,60~80cm为远程区。每一个区域内放置两个样品进行测试,平行实验3次,结果如图5所示,强放电区的灭菌效果最强,余辉区次之,远程区相对较弱。强放电区和余辉区处理30s后的灭菌效果分

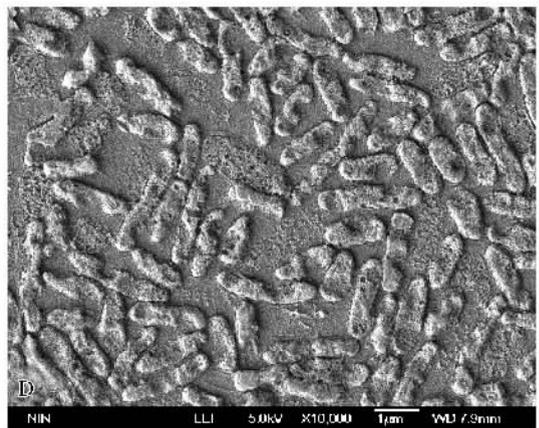
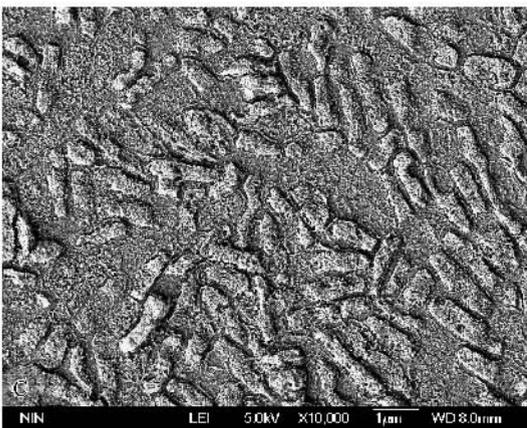
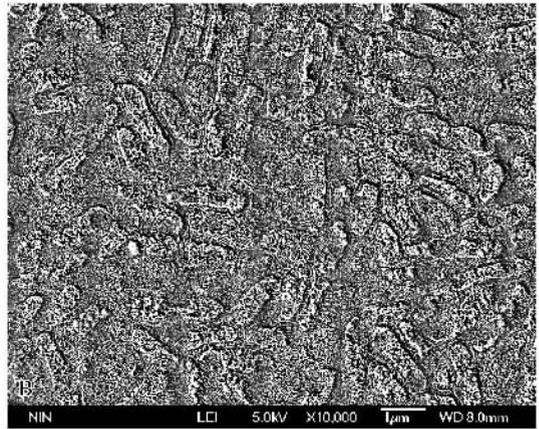
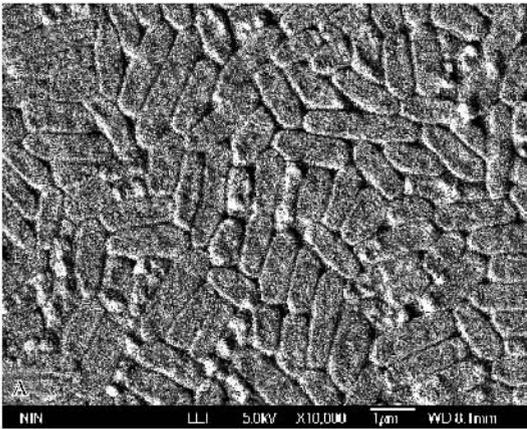


图6 铜绿假单胞菌的扫描电镜图

Fig.6 Scanning electron micrographs of *Pseudomonas aeruginosa* (A) Before plasma treatment ; (B) discharge area ; (C) afterglow area and (D) remote area (Power 40 W ; Treatment time 30 s ; Oxygen flux 20 cm<sup>3</sup>/min ).

别为 4.2 和 3.8 ,远程区为 2.6 ,相当于灭菌率分别为 99.99%、99.98% 和 99.75% ,而后随处理时间加长灭菌效果迅速增强 ,达 80 ~ 90 s 后趋于稳定 ,这是因为随着处理时间的延长反应程度快速增加 ,90 s 后反应接近完全 ,即氧等离子体可在短时间内有效杀灭铜绿假单胞菌。

图 6 所示为等离子体处理前后铜绿假单胞菌扫描电镜图。图 6-A 是等离子体处理前的完好细胞 ,从图中可观察到完整的细胞壁结构 ,图 6-D 中也有部分细胞的细胞壁未被损坏 ,证明只对部分细胞有刻蚀损伤 ,仍有一定数量的微生物存活 ,而图 6-B 和图 6-C 中可清晰地看出几乎没有完整的细胞存在 ,且图 6-B 中菌体的残骸更少 ,和图 3 和图 4 对比可知 ,放电区( 15 cm 处)电子、离子和自由基浓度都较高 ,说明放电区对细菌的杀死作用更强一些。这是因为放电区的活性粒子( 电子、离子、自由基)的击穿作用及高能自由基团的氧化作用 ,导致铜绿假单胞

菌结构破损以及生命物质的变性凝固 ,或生成挥发性小分子( 如 CO ,CO<sub>2</sub> ,CH<sub>x</sub> 和 H<sub>2</sub>O 等 )<sup>[8]</sup>而达到灭菌效果。另一方面 ,此区域紫外线强度也较大。这种高能紫外光子( 3.3 ~ 3.6 eV)可被铜绿假单胞菌的核酸吸收 ,使其破坏 ,致使细菌死亡。余辉区( 45 cm 处)虽然几乎无电子和离子存在 ,但自由基的相对浓度仍为 60.7% ,因此对细菌的杀灭作用也较强。

### 2.3 蛋白渗漏结果分析

表 1 是灭菌后菌悬液中蛋白质泄漏量随距离的变化情况。由表 1 可知 ,在一定条件下 ,随距离增加 ,蛋白质泄漏量逐渐降低 ,这是因为放电区电子、离子对细菌表面强烈的刻蚀作用导致细胞膜的破裂 ,胞质内容物流出<sup>[12]</sup> ;之后随电子、离子浓度迅速下降 ,在 30 cm 后形成相对高浓度的自由基氛围 ,刻蚀作用得到抑制。与图 5 的灭菌曲线和图 6 的扫描电镜图对比可知 ,电子、离子对细菌表面强烈的刻蚀作用是放电区铜绿假单胞菌死亡的主要因素。

表 1 蛋白质泄漏量随距离的变化

Table 1 Quantity of protein leakage at different distance after sterilization

Area ( distance )/cm	Untreated	Discharge area	Afterglow area	Remote area
Protein leakage quantity( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0	$8.16 \pm 0.0829$	$5.20 \pm 0.0465$	$2.01 \pm 0.0307$

power 40 W ; treatment time 90 s ; oxygen flux 20 cm<sup>3</sup>/min .

## 3 结论

采用本研究室自制的远程等离子体反应装置实现了活性物种的有效分离 ,对等离子体灭菌的初探结果证明 ,在放电功率 40 W ,气体流量 20 cm<sup>3</sup>/min 时 ,在反应腔体内的 3 个不同放电区域( 强放电区、余辉区和远程区)氧等离子体对 PET 表面的铜绿假单胞菌作用 90 s 后可有效杀灭 99.9% 以上的菌体。

双悬浮 Langmuir 探针和 ESR 法测定知电子温度和离子浓度在距电感线圈 30 cm 后接近于 0 ,而自由基的相对浓度在 60 cm 处仍为 39%。结合扫描电镜图和蛋白质泄漏量的分析结果 ,可说明氧等离子体杀死铜绿假单胞菌在放电区主要是电子、离子、自由基和紫外光子的协同作用对细胞的刻蚀致使其破损失亡 ,而远程区和余辉区主要因自由基的作用致死。

在远程等离子体场中揭示了等离子体灭菌的规律和机理 ,为等离子体灭菌的研究提供新思路和新方法 ,开拓一种安全、简便、低温、快速、无损材料基质、无残留毒性的医学灭菌新技术。

## 参考文献

- [ 1 ] Philippon A , Arlet G , Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* 2002 46( 1 ) : 1 - 11 .
- [ 2 ] 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. *Journal of American Medical Association* , 1995 274( 6 ) : 39 - 44 .
- [ 3 ] Brewer SC , Wunderink RG , Jones CB , et al. Ventilator associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest* , 1996 109( 10 ) : 19 - 29 .
- [ 4 ] Menashi WP. Treatment of surface. US 3383163 , 1968 .
- [ 5 ] 马腾才 , 胡希伟 , 陈银华 . 等离子体物理原理 . 第一版 . 合肥 : 中国科技大学出版社 , 1988 .
- [ 6 ] 甄汉生 . 等离子体加工技术 . 第一版 . 北京 : 清华大学出版社 , 1990 .
- [ 7 ] 陈杰谿 . 低温等离子体化学及其应用 . 第一版 . 北京 : 科学出版社 , 2001 .
- [ 8 ] Moisan M , Barbeau J , Moreau S , et al. Low-temperature sterilization using gas plasmas : a review of the experiments

and an analysis of the inactivation mechanisms.

*International Journal of Pharmaceutics* 2001 226 :1 – 21.

[ 9 ] 饶邦忠. 医学微生物学实验技术. 第一版. 武汉:武汉大学出版社 2002.

[ 10 ] 张文福. 医学消毒学. 第一版. 北京:军事医学科学出版社 2002.

[ 11 ] Mamedova Sh V, Aktasc B, Canturk M, et al. The ESR

signals in silk fibroin and wool keratin under both the effect of UV-irradiation and without any external effects and the formation of free radicals. *Biomaterials*, 2002, 23 :3405 – 3412.

[ 12 ] Liu HX, Chen JR, Yang LQ, et al. Long-distance oxygen plasma sterilization: Effects and mechanisms. *Applied Surface Science* 2008 254(6):1815 – 1821.

## Low temperature oxygen plasma sterilization effect on *Pseudomonas aeruginosa*

Liqing Yang<sup>1</sup>, Jierong Chen<sup>1,2\*</sup>, Junling Gao<sup>2</sup>, Zheng Zhang<sup>1</sup>, Miao Hu<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> School of Life Science and Technology, <sup>2</sup> School of Energy and Power Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

**Abstract [ Objective ]** Low temperature oxygen plasma was used to sterilize the *Pseudomonas aeruginosa* samples on the polyethylene terephthalate (PET) sheets in a self-designed reactor that included the discharge area, afterglow area and remote area. **[ Methods ]** Before and after plasma treatment, the cell morphology was studied by scanning electron microscopy (SEM). The cell wall or cell membrane cracking was testified to determine the content of protein by using coomassie light blue technique. Besides double Langmuir probe and electron spin resonance spectroscopy were used to determine the temperature of electrons (ions) and the concentration of free radicals, respectively. **[ Results ]** Under the treatment time of 30 s, the germicidal effects were 4.2, 3.8 and 2.6 respectively in the three areas. SEM observations showed that the plasma activity cracks the cell wall and cell membrane, resulting in cellular content leakage. In addition, the results from electron spin resonance spectroscopy and double Langmuir electron probe showed that electrons, ions and oxygen free radicals played important roles in sterilization in the discharge area, but only oxygen free radicals acted to sterilize the bacteria in the afterglow area and the remote area. **[ Conclusion ]** The active species can be separated effectively in this reaction equipment, and we further elucidated the mechanisms of plasma sterilization in the remote plasma field.

**Keywords :** low temperature plasma ; *Pseudomonas aeruginosa* ; germicidal effect ; Mechanism

( 本文责编 :王晋芳 )

Supported by the National Natural and Science Foundation of China (30571636, 20877062), the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (20060698002), the Important Scientific Technique Item of Shanxi Province in the 13115 Innovation Program and the Key Scientific Technique item of Xi'an City (GC06049)

\* Corresponding author. Tel/Fax : + 86-29-82664818 ; E-mail : jrchen@mail.xjtu.edu.cn

Received : 12 June 2008 / Revised : 29 September 2008