

远程氧等离子体对大肠杆菌的灭菌效果与机理研究

刘红霞, 陈杰璐, 周媛

(西安交通大学环境科学与工程系, 710049, 西安)

摘要: 采用 Langmuir 双电子探针和电子自旋共振诊断技术分别定量测定了远程氧等离子体场中各活性物种的分布, 考察了远程氧等离子体对医用聚四氟乙烯表面大肠杆菌的灭活作用, 并通过对灭菌后菌悬液蛋白质泄漏量、脂质过氧化物生成量及细菌 DNA 电泳图的测定分析了其灭菌机理。结果表明: 远程氧等离子体中的电子、离子浓度随远程距离的增大迅速降低, 30 cm 后接近于 0, 而自由基浓度则相对降低缓慢, 40 cm 处仍为初始浓度的 70%; 远程氧等离子体 60 s 内的灭菌效果值在放电区可高达 3.42, 在远程距离 40 cm 以内也均在 3.32 以上, 符合消毒灭菌的要求; 电子、离子对细菌细胞膜的快速刻蚀及自由基对胞膜中多价不饱和脂肪酸的攻击分别是放电区及远程 30 cm 后灭菌的主要原因。氧等离子体中紫外光的灭菌效果微弱。

关键词: 远程氧等离子体; 大肠杆菌; 灭菌

中图分类号: R18 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-987X(2008)01-0096-05

Germicidal Efficiency and Mechanisms of *Escherichia Coli* by Remote Oxygen Plasma

LIU Hongxia, CHEN Jierong, ZHOU Yuan

(Department of Environmental Science and Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

Abstract: Double Langmuir electron probes and electron spin resonance (ESR) were used to measure the distribution of electrons, ions and free radicals in remote oxygen plasma. The germicidal effect (GE) of *Escherichia coli* on the surface of medical polytetrafluoroethylene (PTFE) film by remote oxygen plasma was investigated, and then, the quantity of protein leakage and the production of lipid peroxide in bacterial suspension as well as DNA agarose electrophoresis were measured after sterilization to analyse the inactivation mechanisms. The results show that in remote oxygen plasma, the concentrations of electrons and ions decrease rapidly with the increasing distance from the center of induction coil, which approach to zero at 30 cm, whereas the concentration of free radicals reduces slowly, namely, decrease 30% within 40 cm. GE reaches 3.42 in discharge zone (0 cm) and exceeds 3.32 within 40 cm when plasma treatment parameters are set as plasma RF power at 100 W, treatment time at 60 s and oxygen flux at 40 cm³/min. Fast etching action on cell membrane by electrons, ions and attacking polyunsaturation fatty acid (PUFA) in cell membrane by free radicals are the primary reasons of oxygen plasma sterilization in discharge and remote zone, respectively. The GE of UV radiation in remote oxygen plasma gets feeble.

Keywords: remote oxygen plasma; *Escherichia coli*; sterilization

近年来,对应于临床医学和人类生存环境的要求,低温等离子体灭菌以其具备的快速、低温、无损

收稿日期: 2007-05-09. 作者简介: 刘红霞 (1972—), 女, 在职博士生, 讲师; 陈杰璐 (联系人), 女, 教授, 博士生导师.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30571636); 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (20060698002); 陕西省科技攻关重点资助项目 (2003K10-G61); 西安市科技攻关资助项目 (GG06049).

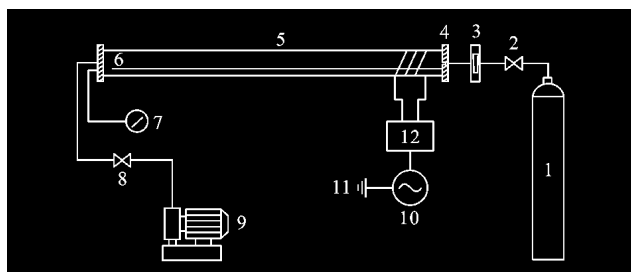
材料基质、干式无污染等特点实现了灭菌技术的“绿色化”,在消毒医学、材料科学、军事等领域中的应用研究引起国内外学者的广泛关注,被认为是新一代最有前途的灭菌技术^[1-2]。但是,迄今为止,关于其灭菌机理的研究,仍停留在只是以等离子体场中活性物种混存下的表观反应结果为依据作出的推测^[3],尚未能建立起具有普遍说服力的灭菌机理。究竟等离子体中各活性物种在灭菌中各自起着何种作用,贡献份额多少,仍然是等离子体灭菌基础理论研究中亟待解决的问题。据此,我们提出利用远程等离子体场,以实现其活性物种(电子、离子、自由基)的有效分离,从而解明它们各自在灭菌中的作用规律。

本文采用 Langmuir 双电子探针和电子自旋共振(ESR)波谱仪对远程氧等离子体的活性物种分布进行了定量测定,考察了远程氧等离子体对大肠杆菌的灭活作用,并通过对灭菌后菌悬液蛋白质泄漏量、脂质过氧化物——丙二醛(MDA)生成量及细菌 DNA 电泳图的测定,分析了远程氧等离子体的灭菌机理。

1 材料与方法

1.1 实验装置

如图 1 所示,自行研制的远程等离子体反应器由进气系统、反应室、抽气系统和射频电源及电极组成。射频电源为 SY-500 型晶控射频功率源,频率为 13.56 MHz,输出功率连续可调,与 SP-II 型射频匹配器配合。采用电感耦合放电方式,通过调整电感耦合可使电源反射功率接近于 0。反应室为长 1 m、直径为 45 mm 的硬质玻璃管,在感应线圈处放电,在准理想管式反应器中,等离子体沿一维方向向远端扩散,形成远程等离子体。



1: 贮气罐;2: 进气阀门;3: 质量流量计;4: 电感线圈(放电区);
5: 反应室(远程区);6: 试样;7: 热偶真空计;8: 电磁阀;
9: 真空泵;10: 射频电源;11: 接地保护;
12: 射频匹配网络

图1 远程等离子体反应器结构示意图

1.2 实验方法

1.2.1 Langmuir 双电子探针与 ESR 诊断 将

Langmuir 探针导杆与等离子体反应器相连,探针位置可调。通过函数记录仪获得探针两端电压与流经探针电流之间的伏安特性曲线,从而求得等离子体空间的离子浓度^[4]。

以清洁天然羊毛为等离子体自由基捕捉剂^[5],置于距电感线圈中点不同距离处的载物板上进行处理,处理后试样常温保存 24 h,采用 ESR 波谱仪(BRUKER 公司,ESP-500 型)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 163.84 ms,增益 60,扫描时间 163.84 ms。

1.2.2 载体定量灭菌实验 大肠杆菌(*Escherichia coli*, ATCC 8099)为本实验室保存菌种。冻干菌种融化后,复苏划线接种于营养琼脂(北京奥博星生物技术责任有限公司)培养基平板,挑取典型单菌落,接种斜面 37℃ 培养过夜。将 5 mL 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,用细菌浓度比浊管来粗测其含菌浓度并配制成每毫升含 $10^6 \sim 10^8$ 菌落数的菌悬液。取 0.01 mL 该菌悬液均匀涂于 25 mm×25 mm 医用 PTFE 膜(阜新氟化学有限责任公司制造,厚度 20 μm,预先进行脱脂、漂洗并经高压蒸汽灭菌)表面,晾干^[6]。实验时,先将一部分染菌样片直接置于距电感线圈中点不同距离处的载物板(预先清洗干净并烘干灭菌^[7])上,在不同放电功率、处理时间、氧气流量下进行处理;再将另一部分染菌样片置于 LiF 小瓶(预先清洗干净并烘干灭菌^[7])内,放入远程氧等离子体场中不同位置进行处理。放电气体为氧气(梅赛尔北方工业气体有限公司),其纯度(体积分数)高于 99.99%。处理后的样片(阳性对照不经处理)经充分振荡洗脱成菌悬液,取样进行活菌培养计数。灭菌效果(germicidal effect, GE)以 E 表示,按下式计算^[8]

$$E = \lg N_0 - \lg N_t$$

式中: N_0 为阳性对照组样品生长菌落数; N_t 为实验组样品生长菌落数。

1.2.3 泄漏蛋白质含量的测定 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(国药集团化学试剂有限公司)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带入牛血清白蛋白(国药集团化学试剂有限公司)标准曲线回归方程求得泄漏蛋白质浓度。

1.2.4 MDA 的测定 利用 MDA 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所),将 1.2.3 小节中洗脱的菌悬液离心取上清液,于 532 nm 波长处比色测吸光度,按下式计算其中 MDA 的浓度

$$c(\text{MDA}) = \frac{A_m - A_{m0}}{A_s - A_{s0}} \times 10^{-5} \times n$$

式中: $c(\text{MDA})$ 为样本中 MDA 的浓度(mol/L); A_m 为测定管的吸光度; A_{m0} 为测定空白管的吸光度; A_s 为标准管的吸光度; A_{s0} 为标准空白管的吸光度; n 为样本测试前的稀释倍数。

1.2.5 DNA 琼脂糖电泳测定 用 1.2.3 小节中洗脱的菌悬液用离心柱型细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN 生物技术有限公司)进行 DNA 提取,在 ECP3000 型电泳仪(北京市六一仪器厂)上进行 DNA 测定^[9]。电泳缓冲液 TBE (Tris-硼酸盐缓冲液)的工作浓度为 50 mmol/L,工作 pH 值为 7.5~7.8。

实验中所用化学试剂均为分析纯。

2 结果与讨论

2.1 远程氧等离子体中活性物种的分布

图 2 所示为在远程氧等离子体中采用 Langmuir 双电子探针和 ESR 测定的电子、离子和自由基的分布状态。从图中可以看出:在同一功率下,电子、离子浓度随远程距离的增大迅速降低,在 30 cm 后趋近于 0,自由基浓度则逐渐降低,在 40 cm 处仍为初始浓度的 70%。这是因为远程等离子体场中各活性物种(电子、离子、自由基)的存活寿命不同(电子-离子再结合与自由基-自由基再结合的反应速度常数分别为 $10^{-7} \text{ cm}^3/\text{s}$ 和 $10^{-33} \text{ cm}^6/\text{s}$ 的数量级)^[10-11],沿气流方向在距放电区一定距离处可获得电子、离子与自由基的分离。

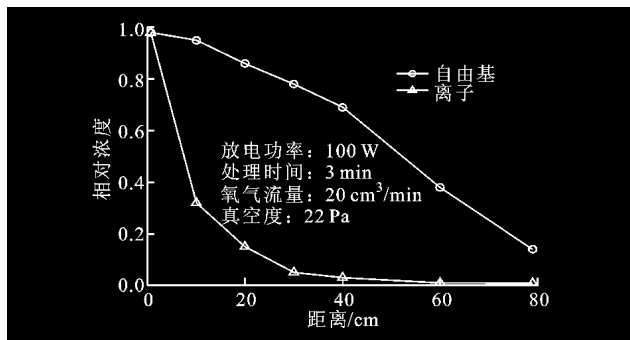


图2 远程氧等离子体中离子与自由基相对浓度的分布

2.2 远程等子体处理条件对灭菌效果的影响

图3~图6分别表示不同距离、放电功率、时

间、氧气流量对灭菌效果的影响。由图3可知,远程氧等离子体的 E 值在放电区可高达 3.42,在远程区 ($\leq 40 \text{ cm}$) 也均在 3.32 以上,完全符合消毒灭菌的要求。由于远程区电子、离子的相对浓度趋于 0,因此在灭菌的同时还可有效抑制其对染菌载体表面的刻蚀,增强自由基反应,这一点对医用材料来讲尤为重要^[12]。

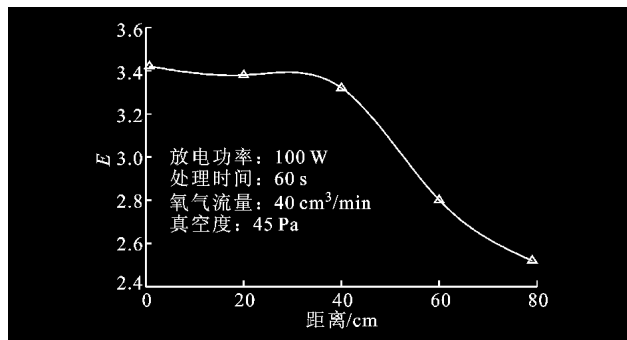


图3 试样距放电区距离对灭菌效果的影响

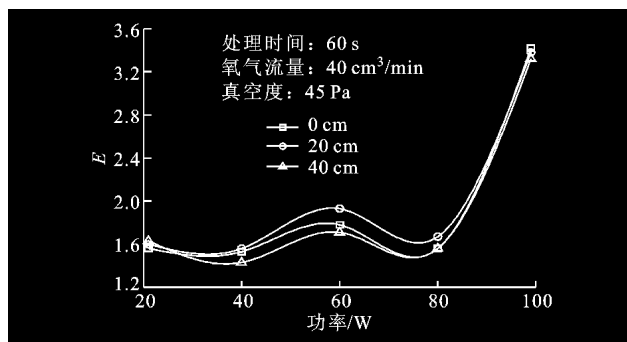


图4 放电功率对灭菌效果的影响

由图4可知,距放电中心 40 cm 内,随着功率的增大,灭菌效果均呈波动式变化,在达到 80 W 后则迅速增强。这是由于功率增大时,定量氧气分子获得的能量增大,则氧气的电离度以及活性粒子的平均能量增高,使得活性粒子对细菌的作用概率和强度增强,从而增加了灭菌效果。实验确定,远程氧等离子体的最佳灭菌功率为 100 W。

由图5可知,距放电中心 40 cm 内,处理 20 s 后,灭菌效果迅速增强,达 50~60 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,60 s 后反应接近完全,即氧等离子体可在短时间内有效杀灭大肠杆菌。实验确定,远程氧等离子体的最佳灭菌时间为 60 s。

由图6可知,距放电中心 40 cm 内,灭菌率均随气体流量的增大先增大后降低,这是因为随着气体流量的增大,氧原子的密度同步提高,但由于维持功率不变,即放电区的射频磁场和电场强度基本不变,则等离子体的电离度就随气体流量的增大而下降,使得活性粒子对细菌的作用概率和强度减弱,从而

使灭菌率下降.综合考虑各实验条件,确定远程氧等离子体灭菌的适宜气体流量为 $40\text{ cm}^3/\text{min}$.

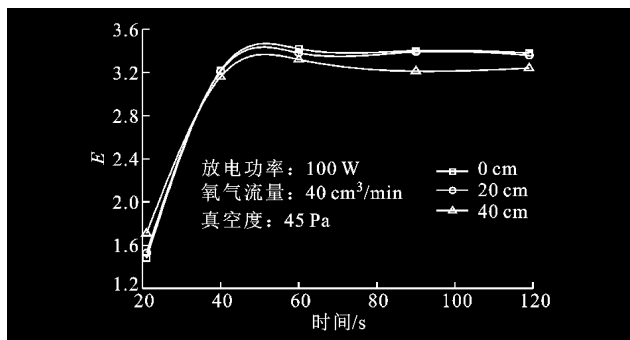


图5 处理时间对灭菌效果的影响

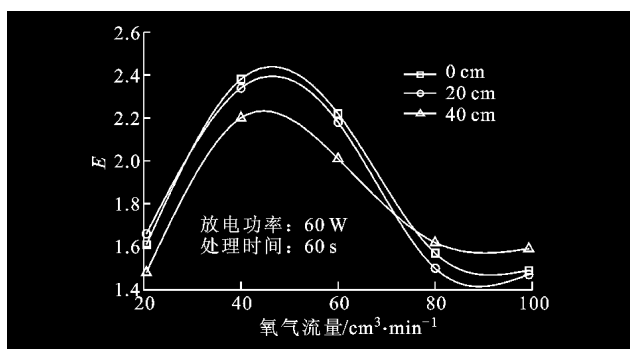


图6 氧气流量对灭菌效果的影响

2.3 远程氧等离子体灭菌机理的研究

图7和图8分别是灭菌后菌悬液中蛋白质泄漏量和MDA生成量随远程距离的变化曲线.由图7可知,在一定条件下,远程距离增加,蛋白质泄漏量逐渐降低,在20~40 cm内维持相对稳定,之后又快速下降.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,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3的灭菌曲线对比可知,电子、离子对细菌表面强烈的刻蚀作用是放电区大肠杆菌死亡的主要因素.

由图8可知,放电区MDA的生成量逐渐增加.这是因为放电区电子、离子的快速刻蚀抑制了自由基的作用,而在远程30 cm后,MDA的生成量快速增加则表明远程区细菌的灭活主要是靠自由基攻击细胞膜中的多价不饱和脂肪酸(PUFA)生成MDA,引起细胞损伤或细胞代谢及功能障碍而最终死亡.

图9为100 W、60 s、 $40\text{ cm}^3/\text{min}$ 、45 Pa条件下灭菌前后的大肠杆菌DNA琼脂糖电泳图.从图中可以看出,DNA仅在远程距离40 cm及60 cm处有一定程度的拖尾,在其他位置几乎没有拖尾现象,说明在放电区,氧等离子体中的活性物种——紫外光几乎没有发生作用,而在远程区,紫外光也仅是协同

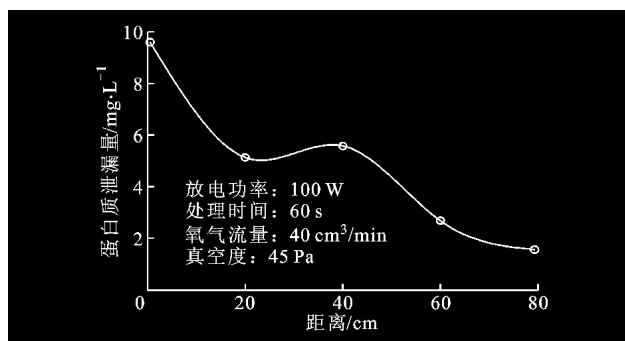


图7 蛋白质泄漏量随远程距离的变化曲线

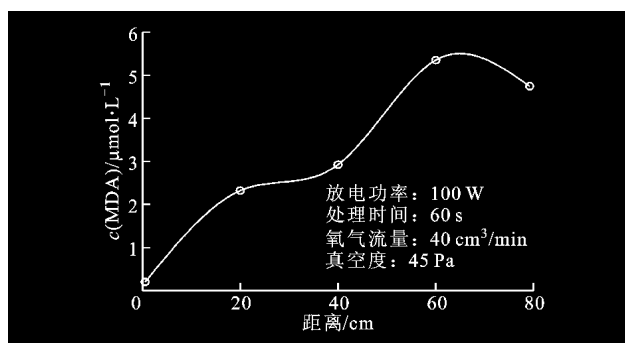
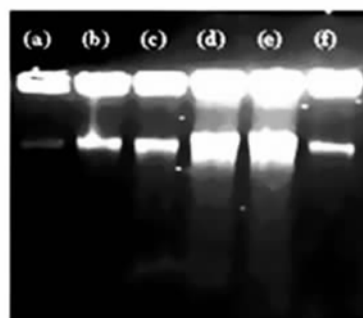


图8 MDA生成量随远程距离的变化曲线

自由基完成灭菌,并非主导因素.这是因为射频低温氧等离子体中紫外光波长虽然介于140~360 nm之间,但只有波长小于196 nm的紫外光子才能够有效打破C=C和C=N双键,波长大于220 nm的紫外光子杀菌效果微弱^[13].



(a)未经等离子体处理;(b)距等离子体放电中心0 cm;(c)距等离子体放电中心20 cm;(d)距等离子体放电中心40 cm;(e)距等离子体放电中心60 cm;(f)距等离子体放电中心80 cm

图9 远程氧等离子体处理前后大肠杆菌8099的DNA琼脂糖电泳图

图10为100 W、 $40\text{ cm}^3/\text{min}$ 、45 Pa条件下,样片置入LiF小瓶($\lambda \geq 120\text{ nm}$ 的紫外光子可通过^[14])内经等离子体处理与样片直接经等离子体处理后的灭菌效果比较,也表明了氧等离子体中紫外光在大肠杆菌的灭活过程中作用微弱.

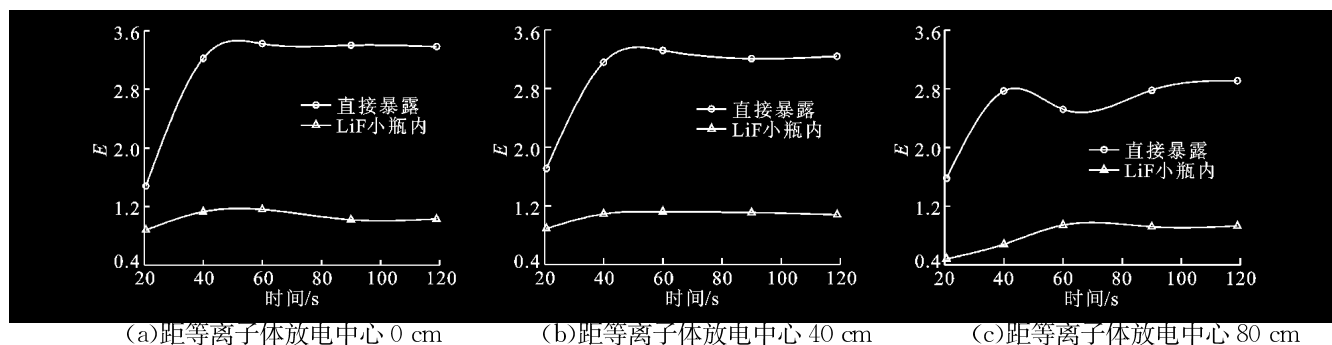


图10 氧等离子体中紫外线灭菌效果与总灭菌率之比较

3 结论

当放电功率为 100 W、处理时间为 60 s、氧气流量为 $40 \text{ cm}^3/\text{min}$ 、真空度为 45 Pa 时,远程氧等离子体在距放电中心 40 cm 以内对医用 PTFE 表面的大肠杆菌均可有效灭活.由于远程区($\geq 30 \text{ cm}$)电子、离子的相对浓度趋于 0,因此在灭菌的同时还可有效抑制其对染菌载体表面的刻蚀,增强自由基反应,从而实现可控性等离子体灭菌技术.

对氧等离子体灭菌机理的研究表明,放电区的灭菌是电子、离子对细胞膜的快速刻蚀作用的结果,此时氧等离子体中的自由基及紫外光作用微弱,而在远程 30 cm 后,随着电子、离子浓度的迅速降低,形成了一个相对较纯的高浓度自由基氛围,其对胞膜中PUFA的攻击成为导致细菌死亡的主要原因,此时紫外光在一定程度上攻击细菌的 DNA,导致 DNA 损伤及断裂,与自由基协同完成灭菌过程,但并非主要因素.

参考文献:

- [1] LAROUCSI 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: 81-86.
- [2] 顾春英, 薛广波. 等离子体消毒和灭菌 [J]. *上海预防医学杂志*, 1999, 11 (11): 486-491.
GU Chunying, XUE Guangbo. Plasma disinfection and sterilization [J]. *Shanghai Journal of Prevention Medicine*, 1999, 11 (11): 486-491.
- [3] LEROUGE S, WERTHEIMER M R, YAHIA L H. Plasma sterilization: a review of parameters, mechanisms, and limitations [J]. *Plasma and Polymers*, 2001, 6(3): 175-188.
- [4] OSTRIKOV K N, DENYSENKO I B, TSAKADZE E L. Diagnostics and two-dimensional simulation of low-frequency inductively coupled plasmas with neutral gas heating and electron heat fluxes [J]. *Journal of Applied Physics*, 2002, 92(9): 4935-4946.
- [5] LI Yong, WANG Qi, GUO Jinliang. ESR studies on the interaction of calixarenes and free radicals [J]. *Materials Science and Engineering*, 1999, C10: 25-28.
- [6] 张文福. 医学消毒学 [M]. 北京:军事医学科学出版社, 2002: 287-295.
- [7] CHANTAL E H, CHENG C, JOHN E D, et al. Optimizing the sterilization of PLGA Scaffolds for use in tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2001, 22: 25-31.
- [8] PUREVDORJ D, IGURA N, HAYAKAWA I, et al. Inactivation of escherichia coli by microwave induced low temperature argon plasma treatments [J]. *Journal of Food Engineering*, 2002, 53: 341-346.
- [9] SAMBROOK J, LASSELL D W. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂, 译. 北京:科学出版社, 2002: 389-395.
- [10] CHEN Jierong, YAN Jinglian, ZHANG Yunze. Surface modification of medical PVC by remote oxygen plasma [J]. *Composite Interfaces*, 2004, 11(2): 123-130.
- [11] GOLDMAN A, AMOUROUX J. Plasma chemistry [C]// KUNHARDT E E, LUSSEN L H. *Electrical Breakdown and Discharge in Gases, Macroscopic Processes and Discharge*. New York: Plenum, 1983: 293-346.
- [12] KO T M, COOPER S I. Surface properties and platelet adhesion characteristics of acrylic acid and allylamine plasma treated polyethylene [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 1993, 47 (1): 1601-1619.
- [13] BOL'SHAKOV A A, CRUDEN B A, MOGUL R, et al. Radio-frequency oxygen plasma as a sterilization source [J]. *AIAA Journal*, 2004, 42(4): 823-832.
- [14] SOLOSHENKO I O, KHOMICH V A, TSIOLKO V V, et al. Experimental and theoretical investigation of cold sterilization of medical instruments by plasma DC glow discharge [C]// *International Conference on Spectroscopy of Molecules and Crystals*. Bellingham, Washington: SPIE, 2002: 308-314.

(编辑 荆树蓉 赵大良)