

远程氩等离子体表面灭菌研究

刘红霞^{1,2}, 陈杰榕¹

(1. 西安交通大学环境科学与工程系, 710049, 西安; 2. 西安交通大学动力工程多相流国家重点实验室, 710049, 西安)

摘要: 研究了射频放电远程氩等离子体对材料表面金黄色葡萄球菌的灭活效果及动力学, 并结合等离子体场中活性粒子的分布状态, 分析了灭菌机理. 结果表明: 远程氩等离子体的灭菌效果强烈依赖于等离子体处理条件, 且随处理时间的延长, 不同放电距离处的灭菌速率均分为3段逐渐减慢, 并在放电功率100 W、放电时间240 s、氩气流量20 cm³/min、真空度22 Pa的条件下, 在距放电中心0~30 cm范围内可实现对金黄色葡萄球菌的有效灭活(灭菌率 $\geq 99.9\%$); 在高放电功率下且氩气电离充分时, 带电粒子(电子、离子)对菌体表面强烈的刻蚀作用是氩等离子体灭活金黄色葡萄球菌的主要原因, 自由基对细菌的杀灭力小于带电粒子, 而低放电功率下的灭菌则是由氩等离子体场中紫外光的作用所致.

关键词: 远程氩等离子体; 金黄色葡萄球菌; 表面灭菌

中图分类号: R18 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-987X(2010)09-0109-06

Study on Surface Sterilization of Remote Argon Plasma

LIU Hongxia^{1,2}, CHEN Jierong¹

(1. Department of Environmental Science and Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China;

2. State Key Laboratory of Multiphase Flow in Power Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

Abstract: The germicidal effect (GE) and kinetics of *Staphylococcus aureus* by remote argon plasma are investigated, and the inactivation mechanism combining with the distribution of reactive species in the whole plasma field is discussed. The results show that the germicidal effect strongly depends on the experimental conditions, and with exposure time increasing, the kill rate slows with three different segments. The effective inactivation appears within the distance of 0-30 cm (GE is no less than 99.9%) with the process parameters as follows: RF power of 100 W, time of 240 s, gas flow of 20 cm³/min, and pressure of 22 Pa. When the ionization degree of argon gas is sufficient under high power, the effectiveness of the remote argon plasma sterilization is believed to be attributed to the intense etching action on cell materials, which is initiated by discharge particles (electrons and Ar ions), the bombardment by free radicals is subsidiary. UV radiation in the plasma is the primary reason of bacterial inactivation under lower power.

Keywords: remote argon plasma; *Staphylococcus aureus*; surface sterilization

低温等离子体灭菌技术以其具备的快速、低温、无损材料基质、干式无污染等特点实现了灭菌的“绿色化”, 被认为是新一代最有前途的灭菌技术. 这项技术在消毒医学、材料科学、军事等领域中的应用研究引起了国内外学者的广泛关注. 但是, 在等离子体

作用于微生物的同时, 也必然作用于染菌载体表面, 引发化学修饰、刻蚀、交联、聚合等反应^[1], 尤其是随着越来越多的聚合物材料被广泛应用于现代医用设备、生物移植材料中, 等离子体在灭菌的同时使材料表面的润湿性、黏附性、生物相容性等发生不同程度

改变的问题^[2]尤其值得重视. 一般的等离子体灭菌研究都只限于在放电区进行, 此区域放电过程中生成的各活性物种(电子、离子、自由基等)混合存在, 同时作用^[3-5]. 但是, 在我们前期的研究^[6-7]中发现, 与放电区相比, 等离子体远程区的处理能够使材料表面获得更好的改性效果, 文献[8-10]中亦有同样的结论.

本文将介绍远程氩等离子体对金黄色葡萄球菌的杀灭效果及灭菌动力学, 并结合远程氩等离子体中不同活性物种(电子、离子、自由基)分布的定量测定结果, 阐明它们各自在灭菌中的作用规律, 分析灭菌机理.

1 材料与方法

1.1 菌悬液及样片制备

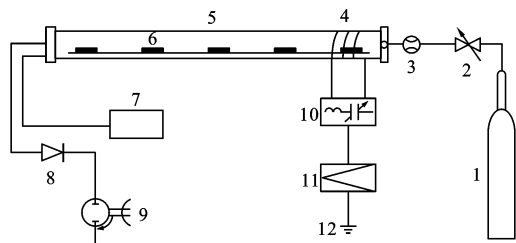
实验所用的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, ATCC 6538)为本实验室的保存菌种. 将冻干菌种融化后, 复苏划线接种于营养琼脂培养基平板. 挑取典型单菌落, 接种在斜面培养基上, 于 37 °C 培养过夜. 将 10 mL PBS 缓冲液(NaCl 8.0 g、KCl 0.2 g、Na₂HPO₄ 1.15 g 和 KH₂PO₄ 0.2 g 溶于 1 000 mL 去离子水中, pH 为 7.2)加入斜面试管内, 反复吹吸以洗下菌苔. 将菌悬液移至另一无菌试管中, 振荡使细菌悬浮后, 用细菌浓度比浊管粗测其含菌浓度, 并配成每 mL 含 10⁶~10⁸ 菌落数的菌悬液.

将盖玻片进行脱脂处理后漂洗、灭菌、晾干, 采用滴染的方法在每个盖玻片上滴 0.01 mL 菌悬液, 用接种环涂均匀后自然晾干.

1.2 远程氩等离子体处理

自行研制的远程等离子体反应器如图 1 所示, 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, 与 SP-II 型射频匹配器配合. 采用电感耦合放电, 且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 45 mm、壁厚 4 mm 的硬质玻璃管, 其右端法兰盘上有一可开启活动门, 门上设置进气孔与进气系统连接, 左端法兰盘上设有抽气孔与抽气系统连接. 放电发生于感应线圈处, 等离子体在准理想管式反应器中沿一维方向向远端扩散, 形成远程等离子体.

将染菌样片置于等离子体场中距电感线圈中心不同距离(称为放电距离, 用 l 表示)处的载物板上, 改变放电功率和放电时间进行处理. 放电气体为纯度(体积分数)高于 99.99% 的氩气(梅赛尔北方工



1: 贮气罐; 2: 进气阀门; 3: 质量流量计; 4: 电感线圈;
5: 反应管; 6: 试样; 7: 热偶真空计; 8: 电磁阀; 9: 真空泵;
10: 射频匹配器; 11: 射频电源; 12: 接地保护

图1 远程等离子体反应器结构示意图

业气体有限公司), 实验中控制氩气流量为 20 cm³/min, 体系真空度为 22 Pa. 处理后的样片(阳性对照不经处理)放入 5 mL PBS 溶液中, 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 1 mL 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 °C 下培养 48 h 后进行活菌计数. 灭菌效果 E 按下式计算^[11]

$$E = \lg N_0 - \lg N_t \quad (1)$$

式中: N_0 为阳性对照组样品生长的菌落数; N_t 为实验组样品生长的菌落数.

分析细菌存活曲线, 比较曲线各部分的 D 值(杀灭 90% 的微生物所需要的时间^[12]), 阐明不同放电距离处金黄色葡萄球菌灭活速率随时间的变化.

1.3 数码显微分析

菌片样品经处理后, 滴加刚果红水溶液(2 g 刚果红溶于 100 mL 蒸馏水中)1 滴, 轻轻晃动使其分布均匀. 自然干燥后加 1 滴盐酸乙醇溶液(用体积分数为 95% 的乙醇稀释 4.4 mL 浓盐酸至 100 mL 配成), 再次自然干燥后在数码显微镜(DMB5-223IPL 型, Motic 仪器中国厦门公司)下观察、拍照.

实验中所用的化学试剂均为分析纯.

1.4 氩等离子体诊断

采用 Langmuir 双电子探针测定等离子体空间的离子浓度. 将探针导杆与等离子体反应器相连, 如图 2 所示, 探针位置可调. 通过函数记录仪获得探针两端的电压与流经探针的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^[13].

以清洁天然羊毛为等离子体自由基捕捉剂^[14], 置于距电感线圈中点不同距离处的载物板上进行处理. 处理后将试样常温保存 24 h, 用 ESP-500 型电子顺磁共振谱仪(缩写为 ESR, BRUKER 公司生产)进行自由基浓度测定. 测定条件: 室温, 微波频率为 9.8 GHz, 微波功率为 3.177 mW, 调制幅度为 0.2

mT,调制频率为 100 kHz,时间常数为 163.84 ms,增益为 60,扫描时间为 163.84 ms.

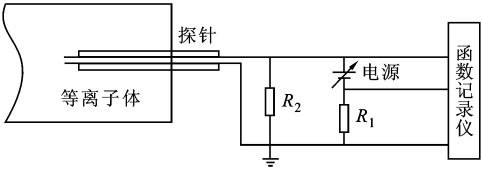
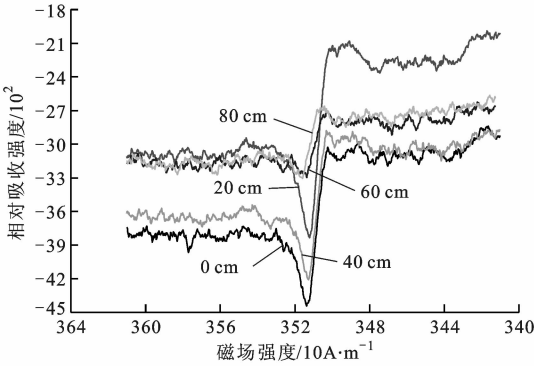


图 2 Langmuir 双电子探针测试系统示意图

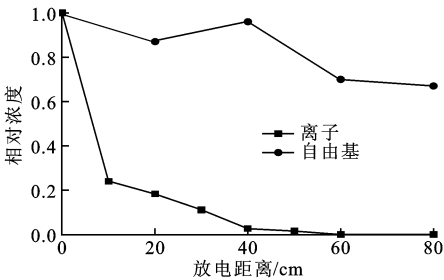
2 结果与讨论

2.1 远程氩等离子体中活性物种的分布

图 3 所示为氩等离子体中自由基的 ESR 谱图以及电子、离子、自由基的分布状态。从图 3a 中可以看出,不同放电距离下处理的试样均在 3 505 A/m 附近出现形状相同、强度不同的 ESR 吸收,这表明各试样中生成的是同一类碳自由基,但是放电距离影响自由基的浓度。对同一种自由基,可以用吸收谱线的高度代表其强度,用不同放电距离下处理的试样中自由基的质量摩尔浓度(C)与放电中心处理的试样中自由基的质量摩尔浓度(C₀)之比 C/C₀ 表示自由基的相对浓度,则试样的自由基相对浓度与放电距离的关系如图 3b 所示。从图 3b 可以看出,随着放电距离的增大,氩自由基的相对浓度缓慢降低,在



(a) ESR 谱图



(b) 相对浓度分布曲线

$P=90\text{ W}$; $t=180\text{ s}$; $q(\text{Ar})=20\text{ cm}^3/\text{min}$; $p=22\text{ Pa}$

图 3 远程氩等离子体中自由基的 ESR 谱图及离子与自由基的相对浓度分布曲线

40 cm 处仍在 90% 以上,而在同一功率下电子、离子的相对浓度则随放电距离的增大迅速降低。因此,氩等离子体沿气流方向在一定的放电距离处可获得电子、离子与自由基的有效分离,于 20 cm 后形成相对高浓度的自由基氛围。

2.2 远程等离子体处理条件对灭菌效果的影响

图 4~图 6 分别表示功率、处理时间及距离对灭菌效果的影响。

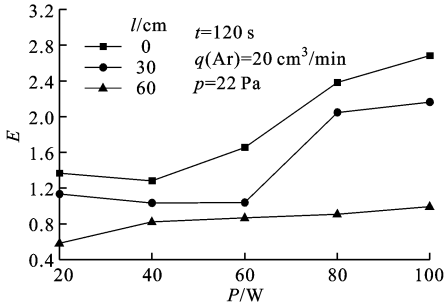


图 4 放电功率对灭菌效果的影响

由图 4 可知,随着放电功率的升高,灭菌效果增强,但增加的幅度与放电距离有关:距放电中心 30 cm 以内的灭菌效果在功率增加到一定数值后均快速增大,临界功率值随放电距离增加而增大(在 0 cm 处为 40 W,在 30 cm 处为 60 W)。这是因为放电功率升高时,氩气分子获得的能量增大,氩气的电离度及活性粒子的平均能量增高,使活性粒子对细菌的作用概率和强度升高,从而增强了灭菌效果。临界功率的不同与活性粒子的分布有关,即带电粒子更易受放电功率的影响。距放电中心 60 cm 处带电粒子已基本消亡,自由基浓度也已明显下降,因此灭菌效果微弱,且受功率影响不大。

由图 5 可知,任何放电距离处的灭菌效果均在 30 s 后随放电时间的延长迅速增加。这是由于在射频氩等离子体场中,具有高质量、低流速的 Ar^+ 和快原子需要经历 25~30 个射频周期才能达到稳定,这期间低质量的电子则呈波动式的变化,因此放电初始各种粒子均呈非稳态^[15]。与此同时,部分高能

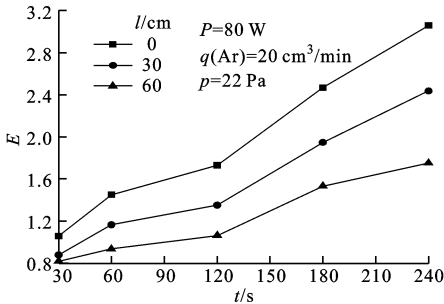


图 5 放电时间对灭菌效果的影响

态的电子转化为亚稳态,引起电子温度下降,从而造成电子扩散速率减慢^[16],不能有效轰击细菌细胞,且此时反应也是随机的。当放电时间超过 30 s 后,氩活性粒子达到稳定,此后反应程度才随处理时间的延长快速增加,从而灭菌效果增强。

图 6 是在实验的最优条件下,灭菌效果随放电距离的变化曲线。由图可知,在距放电中心 0、10、20、30、40、60、80 cm 处, E 值分别达到 3.655、3.543、3.503、3.082、2.869、1.532 和 1.002,这意味着在 30 cm 以内,氩等离子体都能有效灭活材料表面的金黄色葡萄球菌(灭菌率 $\geq 99.9\%$)。又由于 20 cm 外的电子、离子相对浓度逐渐趋于 0,而自由基浓度仍在 90% 以上(见图 3b),因此远程氩等离子体在 20~30 cm 内的灭菌还可有效抑制染菌载体表面的刻蚀,增强自由基反应,优化材料表面的改性效果,这点对医用高分子材料来讲尤为重要^[17-18]。此外,结合图 6 与图 3b 还可以看出,在 0~40 cm 内随放电距离的增加, E 值从 3.655 降至 2.869,而自由基的浓度变化并不大。由此可以推断:带电粒子(电子、离子)的作用是氩等离子体灭活金黄色葡萄球菌的主要原因。带电粒子通过对菌体表面强烈的刻蚀作用,导致细菌胞膜破裂、胞质内容物流出而死亡^[3]。自由基对菌体的杀灭力小于带电粒子。

为了进一步了解等离子体场中各活性粒子在灭菌过程中的作用规律,又研究了不同放电功率下灭菌效果随放电距离的变化趋势,结果见图 7。从图中

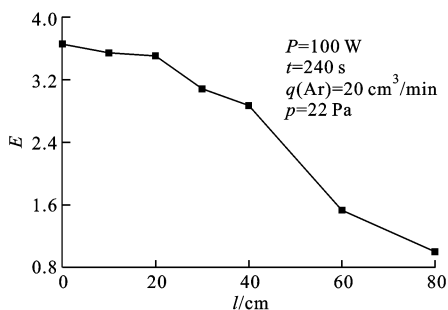


图 6 放电距离对灭菌效果的影响

可以看出:在低功率(40、50 W)下,氩气电离不充分,带电粒子与自由基的作用微弱,细菌的灭活主要是由等离子体场中紫外光的作用所致,但由于此时氩等离子体场中紫外光子的杀菌效果较差^[19],因此灭菌率较低;当放电功率增至 80 W 时,氩气电离充分,此时灭菌效果增强,并随放电距离增加快速下降,结合图 3b 可知,这与带电粒子浓度的变化呈正相关关系。由此推断:带电粒子的作用是氩等离子体灭菌的主要原因。这一结论与根据图 6 所得的结论一致。高功率下紫外光仅起到协同灭菌的作用。

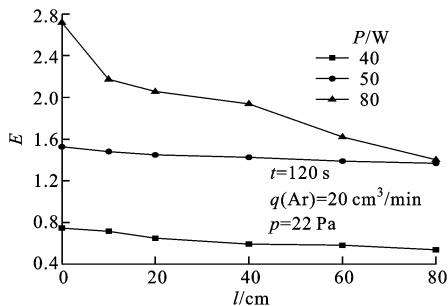


图 7 放电距离及放电功率对灭菌效果的影响

2.3 灭菌效果的显微镜观察

图 8 是在实验最优条件下,不同放电距离处灭菌后的显微照片。由图 8 可以直观地看出:未处理的金黄色葡萄球菌为完整的球形,呈葡萄状排列;处理后细菌数量显著下降,且菌体肿胀、松散,被破坏的细胞周围有明显的碎片。这些碎片是由于带电粒子的刻蚀作用导致金黄色葡萄球菌的结构被破坏、部分胞内物质释放到周围介质中所致。

2.4 远程氩等离子体灭菌的动力学研究

基于氩等离子体的放电特征^[15-16],本实验中对远程氩等离子体灭菌动力学研究从 30 s 后开始,如图 9 所示。由图可看出,随放电距离的增加,灭菌速率降低,但细菌的存活曲线均由 3 部分组成。比较曲线各部分的 D 值可知:在 0 和 30 cm 处, $D_1 < D_2 < D_3$,这表明 30 cm 内的灭菌速率是随时间的延长

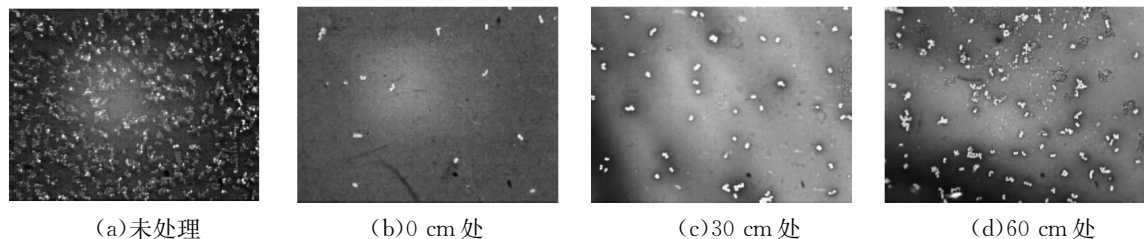


图 8 Motoc 数码相机下等离子体处理前后金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 的菌落形态(Plan 100 $\times$ /1.25oil ∞ /0.17)

逐渐降低的;在 60 cm 处 $D_2 < D_3 < D_1$, 处理时间超过 120 s 后,灭菌速率开始增大,直至 180 s 时又逐渐降低. 这与 Soloshenko 等^[20]对等离子体灭菌动力学的研究结果是一致的. 带电粒子是 30 cm 以内致死微生物的主要因素,但因其穿透性有限,因此随处理时间的延长,上层细胞对下层细胞的“遮蔽效应”使得灭菌速率不断降低. 在 60 cm 处,带电粒子基本消亡,此时细菌的死亡当是残存自由基和紫外光共同作用的结果,但是二者对菌体细胞的具体作用尚待进一步深入研究.

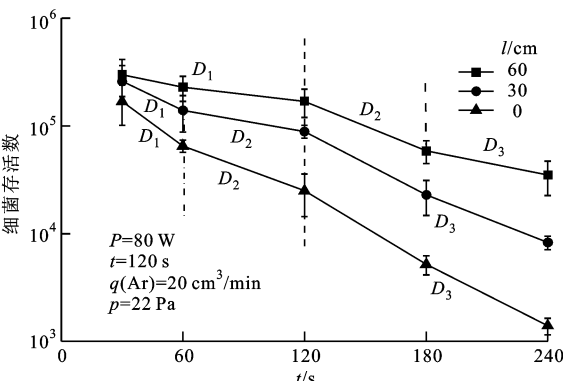


图 9 远程氩等离子体对金黄色葡萄球菌的灭活曲线

3 结 论

当放电功率为 100 W、处理时间为 240 s、氩气流量为 20 cm³/min、真空度为 22 Pa 时,远程氩等离子体在距放电中心 30 cm 内可有效杀灭材料表面的金黄色葡萄球菌. 由于在 20~30 cm 内电子、离子的相对浓度已渐趋于 0,因此在灭菌的同时还可以有效抑制其对染菌载体表面的刻蚀,增强自由基反应,获得更好的表面性能. 在放电功率高、氩气电离充分的条件下,带电粒子(电子、离子)对菌体表面强烈的刻蚀作用是等离子体灭活金黄色葡萄球菌的主要原因,自由基对细菌的杀灭力小于带电粒子,而在低放电功率下,灭菌则是由氩等离子体场中紫外光的作用所致.

远程氩等离子体的灭菌动力学分析表明,在带电粒子起主要灭活作用的 30 cm 范围内,灭菌速率随处理时间的延长分 3 段不断降低,而探究 60 cm 处灭菌速率的变化则需通过进一步研究残存自由基和紫外光对菌体细胞的作用来完成.

参考文献:

[1] KACZMAREK H, KOWALONEK J, SZALLA A, et al. Surface modification of thin polymeric films by air-

plasma or UV-irradiation [J]. Surface Science, 2002, 507/510:883-888.

[2] BALAZS D J, TRIANDAFILLU K, WOOD P, et al. Inhibition of bacterial adhesion on PVC endotracheal tubes by RF-oxygen glow discharge, sodium hydroxide and silver nitrate treatments [J]. Biomaterials, 2004, 25(11):2139-2151.

[3] 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 [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2001, 226(1/2):1-21.

[4] 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(1/3):81-86.

[5] CHOI J H, HAN I, BAIK H K, et al. Analysis of sterilization effect by pulsed dielectric barrier discharge [J]. Journal of Electrostatics, 2006, 64:17-22.

[6] 刘红霞,陈杰璐. 远程氧等离子体灭菌对基质材料医用 PTFE 表面性能的影响 [J]. 西安交通大学学报, 2009, 43(3):82-86.

LIU Hongxia, CHEN Jierong. Influence of remote oxygen plasma sterilization on surface property of substrate material [J]. Journal of Xi'an Jiaotong University, 2009, 43(3):82-86.

[7] LIU Hongxia, CHEN Jierong. Analysis of surface sterilization and properties of medical poly(tetrafluoroethylene) in remote argon plasma [J]. IEEE Transactions on Plasma Science, 2008, 36(1):230-236.

[8] CHEN Jierong, YAN Jinglian, ZHANG Yuanze. Surface modification of medical PVC by remote oxygen plasma [J]. Composite Interfaces, 2004, 11(2):123-130.

[9] 李茹,李柯,陈杰璐. 远程氩等离子体表面改性对聚氯乙烯润湿性的影响[J]. 西安交通大学学报, 2005, 39(9):1030-1034.

LI Ru, LI Ke, CHEN Jierong. Effects of wettability of medical polyvinyl chloride by remote argon plasma [J]. Journal of Xi'an Jiaotong University, 2005, 39(9):1030-1034.

[10] WANG Chen, CHEN Jierong, LI Ru. Studies on surface modification of poly(tetrafluoroethylene) film by remote and direct Ar plasma [J]. Applied Surface Science, 2008, 254(9):2882-2888.

[11] 张文福. 医学消毒学 [M]. 北京:军事医学科学出版

- 社,2002.
- [12] 孙俊. 消毒技术与应用[M]. 北京:化学工业出版社, 2003.
- [13] 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.
- [14] LI Yong, WANG Qi, GUO Jinliang. ESR studies on the interaction of calixarenes and free radicals [J]. *Materials Science and Engineering: C*, 1999, 10: 25-28.
- [15] ANNEMIE B, RENAAT G, WIM G. Comparison between a radio-frequency and direct current glow discharge in argon by a hybrid Monte Carlo-fluid model for electrons, argon ions and fast argon atoms [J]. *Spectrochim Acta: B*, 1999,54(9):1335-1350.
- [16] DHAYAL M, FORDER D, PARRY K L, et al. Using an afterglow plasma to modify polystyrene surfaces in pulsed radio frequency (RF) argon discharges [J]. *Surface and Coatings Technology*, 2003, 173/174:872-876.
- [17] KO T M, COOPER S L. 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.
- [18] 刘红霞,陈杰榕. 氩等离子体后辉光区对聚四氟乙烯膜表面优化改性的研究 [J]. *高等学校化学学报*, 2009, 30(6): 1199-1204.
- LIU Hongxia, CHEN Jierong. Optimizing the surface modification of poly(tetrafluoroethylene) in a flowing afterglow Ar plasma [J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2009,30(6):1199-1204.
- [19] LEROUGE S, FOZZA A C, WERTHEIMER M R, et al. Sterilization by low-pressure plasma: the role of vacuum-ultraviolet radiation [J]. *Plasmas and Polymers*, 2000,5(1):31-46.
- [20] SOLOSHENKO I O, KHOMICH V A, ISIOLOKO V V, et al. Experimental and theoretical investigation of cold sterilization of medical instruments by plasma DC glow discharge [C]//*Proceedings of the 14th International Symposium on Plasma Chemistry*. Prague, Czech Republic: Institute of Plasma Physics, 1999: 2551-2555.

(编辑 葛赵青)