

等离子体放电活化生理盐水杀菌应用研究

王学扬 齐志华 宋颖 刘东平

Bacteria sterilization application by using plasma activated physiological saline

Wang Xue-Yang Qi Zhi-Hua Song Ying Liu Dong-Ping

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 65, 123301 (2016) DOI: 10.7498/aps.65.123301

在线阅读 View online: <http://dx.doi.org/10.7498/aps.65.123301>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn/CN/Y2016/V65/I12>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

$\text{Ge}_x\text{Sb}_{20}\text{Se}_{80-x}$ 玻璃的拉曼光谱和 X 射线光电子能谱

Raman scattering and X-ray photoelectron spectra of $\text{Ge}_x\text{Sb}_{20}\text{Se}_{80-x}$ Glasses

物理学报.2015, 64(22): 223302 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.64.223302>

纳米分辨相干反斯托克斯拉曼散射显微成像

Nanometer resolution coherent anti-Stokes Raman scattering microscopic imaging

物理学报.2015, 64(22): 223301 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.64.223301>

分子环境变化对振动退相时间影响的实验研究

Experimental study on vibration dephasing time varying with molecular surroundings

物理学报.2015, 64(14): 143301 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.64.143301>

相干瑞利散射海水水下温度测量技术的理论研究

Theoretical study on measuring underwater temperature based on coherent Rayleigh scattering

物理学报.2014, 63(8): 083302 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.63.083302>

多色宽带相干反斯托克斯拉曼散射过程的理论与实验研究

Theoretical and experimental study on the multi-color broadband coherent anti-Stokes Raman scattering processes

物理学报.2014, 63(7): 073301 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.63.073301>

等离子体放电活化生理盐水杀菌应用研究

王学扬 齐志华 宋颖[†] 刘东平

(大连民族大学物理与材料工程学院, 大连 116600)

(2016年3月2日收到; 2016年4月5日收到修改稿)

等离子体中含有多种活性物种可实现高效安全杀菌, 活性物种与生物体相互作用多在水环境下进行. 因此等离子体与水的相互作用过程研究掀起了等离子体生物杀菌的新浪潮. 本文采用水中阵列放电产生等离子体活化生理盐水, 利用所产生的活化生理盐水对大肠杆菌开展了杀菌消毒研究, 当等离子体放电时间达到120 s时产生的活化生理盐水与大肠杆菌混合后可使大肠杆菌的存活效率降至0.001%. 通过紫外-可见吸收光谱测量及化学氧化还原沉降滴定表明放电电荷及激发态氧化性活性物种与水溶液相互作用, 转化为活化生理盐水中长寿命相对稳定存在的 H_2O_2 和 O_3 等氧化性物种, 与大肠杆菌作用并主导主要杀菌效果.

关键词: 低温等离子体, 生理盐水, 杀菌消毒, 诊断**PACS:** 33.20.Fb, 52.25.-b, 82.33.Xj, 87.50.yt**DOI:** 10.7498/aps.65.123301

1 引言

随着等离子体技术的成熟发展, 大气压低温等离子体在美容增白、止血消毒、杀菌改性等方面的应用十分广泛^[1-5]. 大气压低温等离子体可产生多种活性物种以及强氧化物, 这些物质会影响细胞内蛋白质的表达与合成, 控制细胞的凋亡, 从而杀死细菌或者真菌. 2012年, Fumagalli等^[6]利用耦合电感等离子体在水蒸汽的条件下, 对模拟生物污染物进行杀除, 并且对其过程以及起主要作用的物质进行了探究. 2014年, Montie等^[7]利用介质阻挡放电等离子体和微波等离子体两种形式, 研究了细菌孢子在直接接触等离子体和接触流动的余辉两种情况下, 在不同工作气体下的细菌杀除效率, 同时也对细菌的杀除机理进行了分析. Zhang等^[8]利用介质阻挡放电的原理, 产生针尖等离子体, 并且研究针状等离子体的放电特性和对*E. faecalis*菌的杀除. Yan等^[9]利用大气压低温等离子体诱导HepG2癌细胞凋亡, 并成功对HepG2癌细胞起到抑制效果. 然而千伏以上高压放电产生等离子体虽有高效杀菌特性, 但在医疗操作中也带来一定的危

险性, 因此, 如何保持放电活性物种的高效杀菌效果, 且避免高压击穿在医疗医患应用中带来的危险急需进一步改进.

2 研究内容与方法

气液两相放电研究的兴起, 可有效地将放电产生的O和OH等短寿命活性物种(穿透深度10 μm 以内, 存活时间1 ns以内)转化成稳定存在于生理盐水中的 O_3 和 H_2O_2 等长寿命高效氧化物(穿透深度约1 mm, 较稳定存在)并储存起来^[10]. 本文主要利用水中阵列放电产生等离子体活化生理盐水的技术, 并利用该活化生理盐水溶液成功实现了大肠杆菌高效杀除. 同时, 通过氧化还原沉降滴定法及紫外可见吸收光谱法等技术手段对等离子体活化生理盐水中的氧化性物质进行分析诊断, 杀菌结果和测量结果均采用三组平行实验取统计平均值的方式获得, 并进一步对大肠杆菌致死因子进行深入探讨.

水中阵列放电等离子体装置如图1(a)所示. 该实验装置主要由供电系统、配气系统、诊断检测系统及放电活化生理盐水系统四个部分组成.

[†] 通信作者. E-mail: songying@dlmu.edu.cn

实验采用正弦交流电源驱动, 该电源由数字信号发生器、变压器以及信号放大器三个部分组成, 可以实现峰值电压在0—30 kV, 高压交流电源频率为0—20 kHz范围内连续可调. 实验所用气体分别为Air, O₂, N₂和He, 气体纯度均为99.999%. 实验气体通过质量流量控制器调控, 经由气路输送至气体混合腔室并传至电离区内. 放电装置利用介质阻挡放电原理, 采用射流阵列的形式, 在水中产生稳定的均匀放电等离子体. 该射流阵列由19根同轴结构射流放电管, 且射流阵列通过打孔四氟绝缘板固定在内径50 mm, 高70 mm的石英水槽底部, 每根射流管内径1.5 mm, 外径2 mm, 均采用石英材质, 石英管内置同轴钨电极, 钨电极外径1 mm且表面覆盖外径1.7 mm, 内径1.52 mm的盲孔石英套管, 构成介质层, 与槽内接

地生理盐水溶液构成放电回路, 如图1(b)所示. 在交流峰值电压为10 kV, 频率为5 kHz, 气体流速2 SLM (L/min) 条件产生放电活化生理盐水. 交流峰值电压以及放电电流波形通过示波器 (Tektronix DPO5024 1 GHz) 显示, 利用高压探头 (Tektronix P6051A 1000 × 3.0 pF 100 MΩ) 和低压探头 (Tektronix P2220 10 × 16 pF 10 MΩ) 连接40 Ω电阻进行测量. 当交流峰值电压10 kV, 放电频率5 kHz时, 可以在生理盐水中形成射流放电产生等离子体活化生理盐水. 交流峰值电压和放电电流波形通过示波器 (Tektronix TDS5054 1 GHz), 高压探头 (Tektronix P6051 A 1000 × 3.0 pF 100 MΩ) 和低压探头 (Tektronix P2220 10 × 16 pF 10 MΩ) 连接40 Ω电阻进行测量.

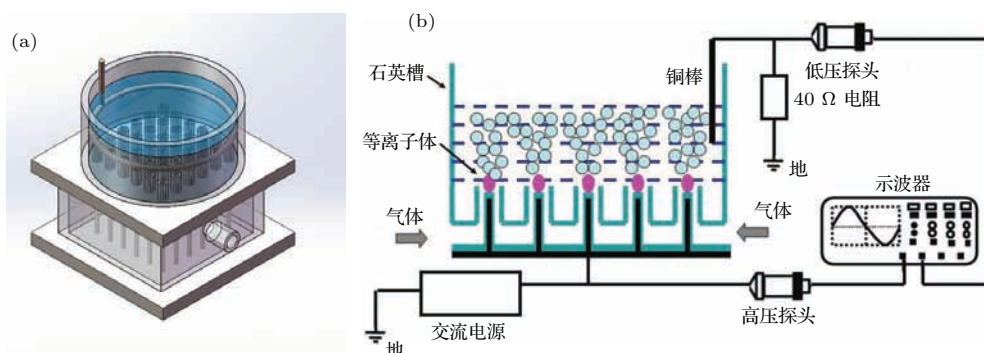


图1 (a) 水中放电等离子体阵列装置; (b) 水中放电等离子体实验系统图

Fig. 1. (a) Array device of discharge plasma in water; (b) experimental system of discharge plasma in water.

3 实验结果与分析

3.1 杀菌实验

在实验过程中, 我们主要讨论了He, N₂, O₂, Air放电产生等离子体活化生理盐水对大肠杆菌失活效率的影响. 选定大肠杆菌浓度为10⁶ mol/L, 用移液器取10 μL悬菌液滴加至1 mL放电处理后得到的等离子体活化生理盐水溶液中混合振荡1 min, 利用旋涂法在无菌环境下将含菌生理盐水溶液涂至LB培养基表面, 使等离子体活化生理盐水溶液自然蒸发后将菌样放置于37 °C培养箱内过夜培养. 利用平板菌落计数法统计存活大肠杆菌个数, 每组实验均进行三次平行实验, 取三次实验统计平均值并与空白菌样对比计算得出杀菌效率. 经过He, N₂, O₂, Air放电产生等离子体活化生理

盐水对大肠杆菌处理后, 其大肠杆菌的存活效率如图2所示. 随着放电处理时间的增长, 放电产生O和OH等短寿命活性物种与生理盐水相互作用并转换为溶液中相应长寿命稳态物种, 进而导致活化生

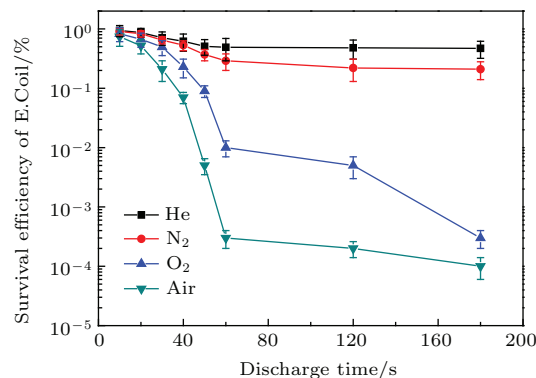


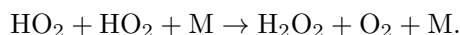
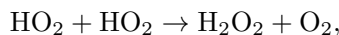
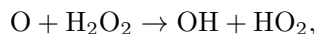
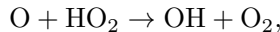
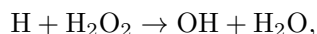
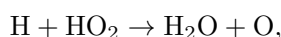
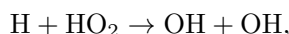
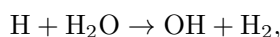
图2 大肠杆菌的存活率

Fig. 2. The survival rate of *E. coli*.

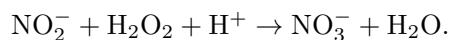
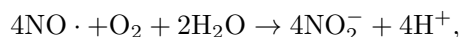
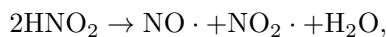
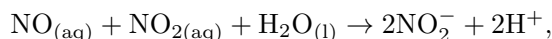
理盐水中 O_3 和 H_2O_2 等长寿命的活性物种浓度增加, 该类活化稳态物质与大肠杆菌相互作用, 导致细胞脂质过氧化, 细胞内蛋白质无法表达, 进而导致大肠杆菌存活效率急剧降低. 在放电处理 120 s 后等离子体活化生理盐水对大肠杆菌的失活效率均降低 5 个量级.

3.2 pH 检测以及分析

等离子体活化生理盐水在 He, N_2 , O_2 , Air 放电条件下 pH 值随时间的变化规律, 如图 3 所示. 在 He 或 O_2 气体放电的情况下, 随着等离子体处理时间的延长, 等离子体活化生理盐水的 pH 值呈现碱性趋势. 主要由于放电电荷与水相互作用, 将生理盐水溶液电解形成 OH 和 H_2 . O_2 放电产生等离子体活化生理盐水, 由于 O_2 的电负性, 放电过程中吸附大量电子形成氧负离子与水作用也可形成大量 OH 自由基, 反应方程如下 [11–13]:



随着放电时间的延长, 活性自由基在生理盐水中积累导致 pH 值随之升高, 在处理时间于 120 s 左右, 反应达到平衡状态, pH 值约为 7.8. 在 N_2 和 Air 条件下, 放电过程中 N_2 和 O_2 反应形成的活性氮氧化物与水相互作用导致等离子体活化生理盐水呈酸性趋势, 反应方程如下 [14–18]:



随着放电时间的延长, 活性氮氧化物与生理盐水相互作用达到平衡状态, 在空气放电处理时间于 120 s 后, 等离子体活化生理盐水 pH 约为 3.14.

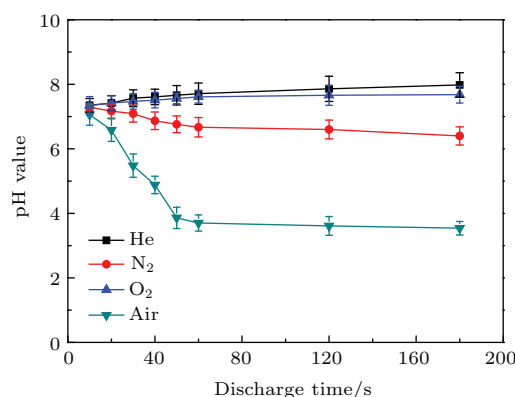


图 3 活性生理盐水溶液 pH 曲线

Fig. 3. pH curves of active physiological saline solution.

3.3 活性氧化物的检测

利用紫外-可见分光光度计对溶液中 O_3 浓度进行检测, 由于 O_3 在短波紫外区 253.7 nm 具有最大吸收值, 通过比尔-朗伯定理

$$I = I_0 \exp(-kcl), \quad (1)$$

式中, I_0 是入射光束的辐射强度; I 是光束穿透样品 (液体或者气体) 后的强度; l 是通过样品光程的长度; c 是样品内吸收物质的量浓度; k 是吸收物质对该光线波长的吸收系数. 进而计算得出 O_2 和 Air 放电产生等离子体活化生理盐水中 O_3 浓度, 如图 4 所示. 放电产生 O_3 浓度随处理时间增加而增大, 放电 60 s 后浓度达到饱和状态, 在 O_2 和 Air 放电活化生理盐水中产生溶解性 O_3 浓度分别为 0.03878 和 0.04218 mol/L, 且 Air 放电活化生理盐水中溶液呈酸性状态, 更易于溶液氧化性的表现.

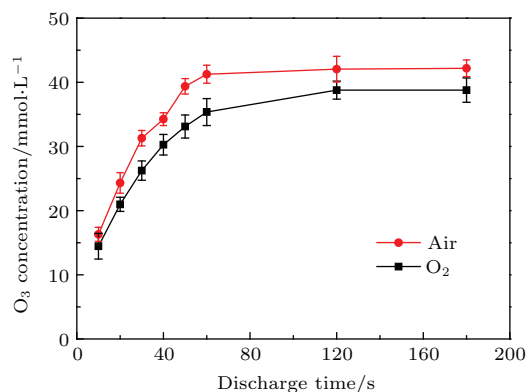


图 4 O_3 浓度随放电时间的变化曲线

Fig. 4. Ozone concentration dependence on discharge time.

在生理盐水中添加 0.1 mol/L 的 $MgSO_4$ 溶液和 0.1 mol/L 的碘化钾溶液体积比 1 : 1 的混合溶液

(电导率为4.65 S/m, pH值为7.05), 对He, N₂, O₂, Air放电产生等离子体活化生理盐水中所形成的活性稳态物质进行检测分析, 结果如图5所示, 在He和N₂放电中溶液无颜色变化及沉淀产生, 而在O₂和Air放电产生等离子体活化生理盐水中溶液呈黄褐色且生成大量的沉淀.

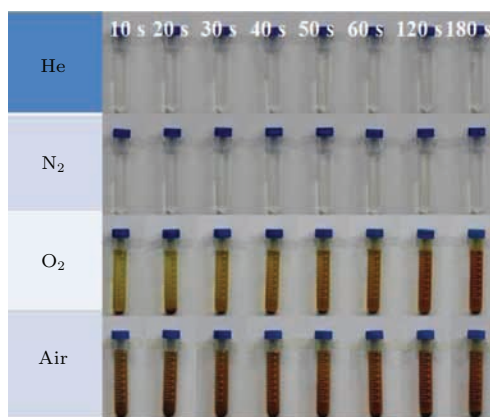


图5 (网刊彩色) 气体成分和放电时间对碘沉淀的影响
Fig. 5. (color online) The influence of the gas composition and discharge time on Iodine precipitation.

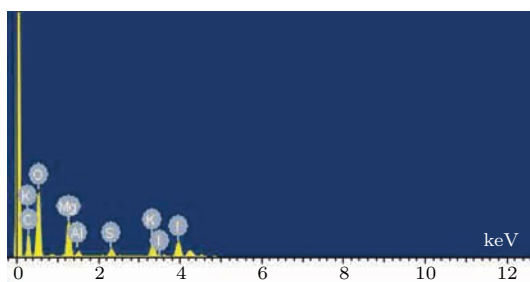


图6 扫描电镜能谱分析谱图

Fig. 6. The energy dispersive X-ray spectrometer analysis on scanning electron microscopy.

利用能谱及拉曼光谱对沉淀物质进行检测分析, 分别如图6和图7所示. 沉淀中所含元素主要是碘, 所以可以确认沉淀是碘单质. 并且利用紫外-可见分光光度计对悬浊液进行检测, 如图8所示. 随着等离子体放电时间的增加, 活化生理盐水中沉淀物随之增多, 这代表着溶液中活性氧化性物质的量随着等离子体放电时间的增加而变大. 与此同时, 将放电过后的活化生理盐水静置一段时间, 我们发现活化生理盐水中的沉淀随着时间推移慢慢溶解, 最后溶液呈黄褐色, 如图9(a)和图9(b)所示. 反应方程式如下:

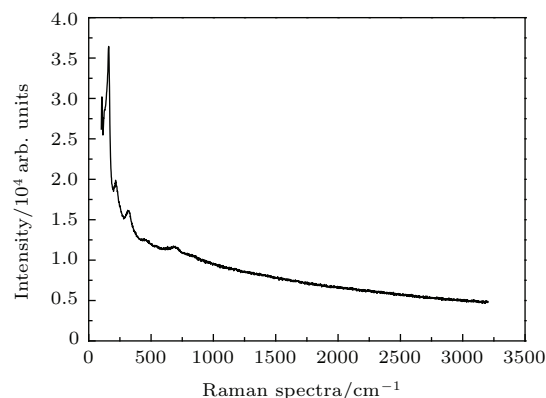
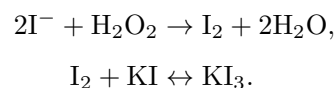
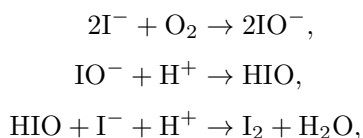


图7 拉曼光谱分析谱图

Fig. 7. Raman spectra analysis.

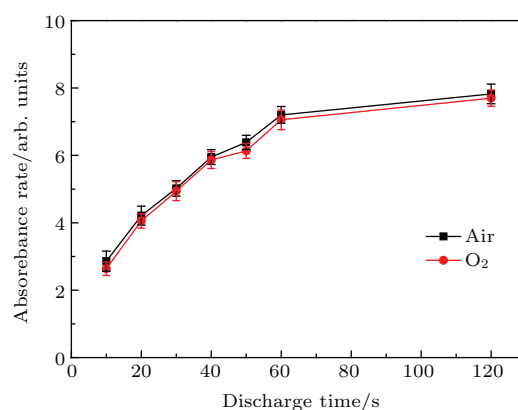


图8 (网刊彩色) 紫外-可见吸收光谱

Fig. 8. (color online) Ultraviolet-visible absorption spectra.

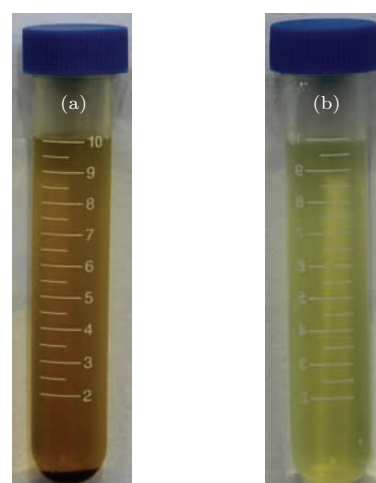


图9 (网刊彩色) 产生沉淀和沉淀溶解的照片 (a) 有沉淀; (b) 无沉淀

Fig. 9. (color online) The photographs of precipitation and precipitation dissolving: (a) Contains precipitation; (b) no precipitation.

对 O_2 和 Air 放电活化生理盐水中添加 $MgSO_4$ 溶液和 KI 溶液中产生的沉淀进行烘干, 烘干温度为 $100\text{ }^\circ\text{C}$, 排除固体中的水分和碘单质, 同时使反应生成非稳态 KI_3 , 通过对固体 KI_3 称重得出溶液中总氧化活性物质含量, 其中主要包括 H_2O_2 和 O_3 , 从而扣除溶解水中 O_3 含量, 近似得出溶液中 H_2O_2 浓度, 如图 10 所示. O_2 和 Air 放电产生 H_2O_2 浓度随处理时间增加而增大, 放电 180 s 后在 O_2 和 Air 放电活化生理盐水中产生 H_2O_2 浓度分别为 0.00207 和 0.00473 mol/L , 且 Air 放电活化生理盐水中产生 H_2O_2 的效率远高于 O_2 放电活化生理盐水中产生 H_2O_2 的效率, 放电活化生理盐水中产生溶解性 O_3 和 H_2O_2 浓度随时间积累的变化趋势与杀菌效率曲线相一致, 在高电导率的生理盐水中放电极易产生, 且放电产生的活性物种与生理盐水在气液交界面相互作用, 将短寿命活性物种转化为溶液中稳定长寿命活性物种, 该类稳定的氧化性活性物种与菌体接触, 可直接作用菌体, 其强氧化性可随溶液渗透至菌体内部, 破坏不饱和脂肪酸, 影响细胞内蛋白和遗传物质的合成, 进而导致细菌真菌死亡.

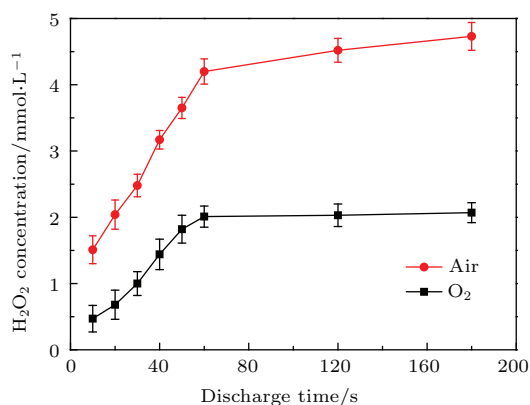


图 10 H_2O_2 浓度随放电时间的变化曲线

Fig. 10. Hydrogen peroxide concentration dependence on discharge time.

4 结 论

本研究结果表明: 在 He, O_2 , N_2 和 Air 四种放电条件下, Air 放电条件所产生的等离子体活化生理盐水杀菌效果更加突出. Air 放电等离子体处理生理盐水 60 s 后, 活化生理盐水中的

臭氧含量为 0.04218 mol/L , 180 s 后 H_2O_2 浓度为 0.00473 mol/L . 水中阵列放电等离子体活化生理盐水克服等离子体放电电荷积聚形成静电张力对细胞的无差别作用, 在 120 s 内 Air 放电活化生理盐水可实现对大肠杆菌的高效杀除, 致使其降低 5 个数量级, 达到有效灭菌标准. 因此水中阵列放电等离子体活化生理盐水可为医疗器械进行杀菌消毒, 同时也提供了另一种有效而多样的杀菌消毒方法.

参考文献

- [1] Mason N J 2009 *J. Phys. D: Appl. Phys.* **42** 194003
- [2] Yang D Z, Wang W C, Zhang S, Liu Z J, Jia L, Dai L Y 2013 *EPL-Europhys. Lett.* **102** 65001
- [3] Lee M H, Park B J, Jin S H, Kim D, Han I, Kim J, Hyun S O, Chuang K H, Park J C 2009 *New J. Phys.* **11** 115022
- [4] Park G Y, Park S J, Choi M Y, Koo I G, Byun J H, Hong J W, Sim J Y, Colins G J, Lee J K 2012 *Plasma Sources Sci. Technol.* **21** 043001
- [5] Kudo K I, Ito H, Ihara S, Terato H 2015 *J. Phys. D: Appl. Phys.* **48** 365401
- [6] Fumagalli F, Kylian O, Amato L, Hanus J, Rossi F 2102 *J. Phys. D: Appl. Phys.* **45** 135203
- [7] Montie T C, Kelly-Wintenberg K, Roth J R 2000 *IEEE Trans. Plasma Sci.* **28** 41
- [8] Zhang X H, Huang J, Liu X D, Peng L, Sun Y, Chen W, Feng K C, Yang S Z 2009 *Acta Phys. Sin.* **58** 1595 (in Chinese) [张先徽, 黄骏, 刘筱娣, 彭磊, 孙悦, 陈维, 冯克成, 杨思泽 2009 物理学报 **58** 1595]
- [9] Yan X, Xiong Z L, Zou F, Zhao S S, Lu X P, Yang G X, He G Y, Ostrikov K 2012 *Plasma Process. Polym.* **9** 59
- [10] Kong G Y, Liu D X 2104 *Chinese Journal of High Pressure Physics* **40** 2956 (in Chinese) [孔刚玉, 刘定新 2104 高压物理学报 **40** 2956]
- [11] Tochikubo F, Uchida S, Watanabe T 2004 *Jpn. J. Appl. Phys.* **43** 315
- [12] Bera R K, Hanrahan R J 1986 *J. Appl. Phys.* **60** 2115
- [13] Falkenstein Z 1997 *J. Appl. Phys.* **81** 7158
- [14] Eichwald O, Yousfi M, Hennad A, Benabdessadok M D 1997 *J. Appl. Phys.* **82** 4781
- [15] Herron J T, Green D S 2001 *Plasma Chem. Plasma Process.* **21** 459
- [16] Kossyi I A, Kostinsky A Y, Matveyev A A, Silakov V P 1992 *Plasma Sources Sci. Technol.* **1** 207
- [17] Malik M A, Ghaffar A, Malik S A 2001 *Plasma Sources Sci. Technol.* **10** 82
- [18] Lukes P, Dolezalova E, I Sisrova, Clupek M 2014 *Plasma Sources Sci. Technol.* **23** 015019

Bacteria sterilization application by using plasma activated physiological saline

Wang Xue-Yang Qi Zhi-Hua Song Ying[†] Liu Dong-Ping

(School of Physics and Materials Engineering, Dalian Minzu University, Dalian 116600, China)

(Received 2 March 2016; revised manuscript received 5 April 2016)

Abstract

The plasma activated water has great application prospects in the fields of environmental protection, biomedicine, food safety, *et al.*, due to its unique chemical activity. In this work, the plasma activated physiological saline is successfully generated by using hollow fiber-based cold microplasma jet array running in physiological saline solution. This design can lead to an obvious increase in the contact area between microplasmas and treated physiological saline solution, thus improving the chemical reaction efficiency of short-lived species. The influences of working gases such as He, N₂, O₂ and air on the sterilization efficiency of *E. coli* by using this plasma activated physiological saline are investigated as a function of discharge time. As the discharge time increases from 10 to 180 s, the sterilization efficiency of the plasma activated physiological saline significantly increases. It is found that the bactericidal efficiency of the air discharge activated physiological saline is highest. For a discharge time of 120 s, the sterilization efficiency of *E. coli* in this plasma activated physiological saline can reach as high as 99.999%. The pH value of this air discharge activated physiological saline is achieved by using acidity meter and as the discharge time increases from 10 to 60 s, the pH value decreases from 7.3 to 3.1 and the physiological solution becomes acidic. This may be due to the NO_x produced in the plasma reacting with water and producing nitric and nitrate acids. The reactive oxygen species generated in the plasma activated physiological saline are supposed to be O₃ and H₂O₂. The concentrations of O₃ and H₂O₂ are identified by using UV-visible absorption spectra and chemical deposition methods. The strong absorption peak of O₃ in UV-visible absorption spectrum is at a wavelength of 253.7 nm. The concentration of O₃ is calculated by using Beer-Lambert Law. As the discharge time increases, the concentration of O₃ in the plasma activated physiological saline obviously increases. For a discharge time of 60 s, the concentration of O₃ is 43.12×10^{-3} mol/L and nearly saturated. The concentration of H₂O₂ is obtained by the total amount of reactive oxygen species, which is calculated by using the chemical deposition method, deducting the O₃ content. As the discharge time increases from 10 to 180 s, the concentration of H₂O₂ increases from 1.5×10^{-3} to 4.7×10^{-3} mol/L. The analyses of experimental data from various methods indicate that air discharge activated physiological saline containing a variety of long-lived reactive oxygen species, such as H₂O₂ and O₃, is very effective in killing *E. coli* cells in the acidic saline solution. The air discharge activated physiological saline can provide a means to store the advanced oxidation species induced by the discharge for sterilization applications.

Keywords: non-thermal plasma, physiological saline, sterilization and disinfection, diagnose

PACS: 33.20.Fb, 52.25.-b, 82.33.Xj, 87.50.yt

DOI: 10.7498/aps.65.123301

[†] Corresponding author. E-mail: songying@dlmu.edu.cn