



·前沿技术与交叉科学·

阵列式等离子体射流处理芽孢的实验研究^{*}

陈 弘 钰, 张 勇, 刘 振, 闫 克 平

(浙江大学 化学工程与生物工程学院, 杭州 310027)

摘 要: 研制了一套单极性微秒脉冲阵列式等离子体射流系统, 该系统可在大气压下激发产生等离子体射流, 实现大面积的灭菌处理。该系统可产生峰值电压 20 kV、频率 15 kHz 的高压脉冲, 激发产生的射流均匀稳定, 覆盖面积达 37.7 cm², 射流长度达 6 cm, 射流功率为 40.05 W, 处理 5 min 可使射流覆盖范围内的枯草芽孢杆菌的芽孢基本全部失去活性。考察了不同参数对灭菌效率的影响, 结果表明, 灭菌率与工作电压、脉冲频率、处理时间呈正相关, 在氦气氛围下有较好的灭菌效果。SEM 显示等离子体射流能够对枯草芽孢杆菌的芽孢外壳结构造成损坏, 导致芽孢无法正常代谢, 最终死亡。

关键词: 低温等离子体; 阵列式射流; 高频微秒脉冲; 表面洗消; 枯草芽孢杆菌

中图分类号: 187.3R187.4

文献标志码: A

doi: 10.11884/HPLPB202234.220003

Experimental study on spores treatment by array plasma jet

Chen Hongyu, Zhang Yong, Liu Zhen, Yan Keping

(College of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract: In recent years, with the advancement in the field of biomedical applications, atmospheric pressure non-thermal plasma technology has shown many advantages in disinfection and sterilization. In terms of its application, the key lies in how to easily generate a large-area, uniform and stable plasma. In this work, a set of unipolar microsecond pulse array plasma jet system is developed, which can be excited to generate plasma jet under atmospheric pressure and realize large-area sterilization treatment. The system generates high-voltage pulses with a peak voltage of 20 kV and a frequency of 15 kHz. The jet is uniform and stable, covering an area of 37.7 cm², the jet length is stable at 6 cm and the jet power is 40.05 W. Treating for 5 min can basically inactivate all *Bacillus subtilis* spores in the area covered by the jet. The effects of different parameters on the sterilization efficiency are investigated, and the results show that the sterilization rate is positively correlated with the working voltage, pulse frequency and treatment time. The sterilization effect is better in helium atmosphere. The SEM images show that the plasma jet damaged the shell structure of *Bacillus subtilis* spores, hence the spores failed to metabolize normally and eventually died.

Key words: non-thermal plasma, array jet, high frequency microsecond pulse, surface decontamination, *Bacillus subtilis*

表面灭菌是医疗、食品和航天行业中的重要一环, 通过减少或消灭微生物来保护人员安全。传统的灭菌手段有热力灭菌(如干热、湿热)、化学灭菌(如环氧乙烷、戊二醛)、辐射灭菌(如紫外线、 γ 射线)^[1]等, 但都存在一定的限制和不足, 例如导致材料发生形变、丧失性能, 或由于辐射和致癌物质而需要采取更全面的安全措施和更多的成本投入。这些需求推进了新的灭菌技术的诞生。

低温等离子体技术是一种新型非热灭菌技术, 具有低能耗、操作简便、绿色环保等优点, 对热敏性材料、电子仪器和人体组织的处理有明显优势, 可填补传统灭菌领域的空缺^[2]。等离子体是一种由自由电子、离子和中性粒子等组成的气体, 按照其热力学性质可进一步分为热等离子体和非热等离子体, 后者又可分为平衡等离子体和非

* 收稿日期: 2022-01-04; 修订日期: 2022-04-08

联系方式: 陈弘钰, hongyuch@zju.edu.cn。

通信作者: 刘 振, zliu@zju.edu.cn。

平衡等离子体。非平衡等离子体因其温度较低(小于 60 ℃)又被称为低温等离子体,通常由放电激发气体产生,如介质阻挡放电(DBD)、沿面放电、滑动弧放电和射流放电等。射流放电通常会产生细长的等离子体束,能进入狭缝或腔体,可应对复杂表面结构的处理。同时等离子体射流可在开放空间内产生,不仅摆脱了电极结构的空间限制,还能将等离子体射流从整套装置中独立出来,大大提升了安全性能,这一特性使等离子体射流在医学领域的应用具有很大优势。相比直流放电、交流放电、射频放电和微波放电等激励方式,脉冲放电具有击穿电压高、电子能量大、电子密度范围广、多通道均匀放电等优点^[3]。

在目前的报道中,低温等离子体已对细菌^[4]、真菌^[5]、芽孢^[6-8]、脂多糖^[9]、蛋白质和朊病毒^[10]等起到灭活作用,具有极高的发展潜力和广阔的应用前景。芽孢具有极强的抗逆性,可在高温高压、强酸强碱、紫外线辐射等极端条件下存活^[11],灭活难度高,给医疗卫生领域带来极大的挑战。等离子体中的某些组分会对芽孢结构产生影响,如活性氧氮的刻蚀作用可以增加细胞膜的通透性,进入芽孢内部后可对蛋白质和遗传物质产生不可逆的损害;高能电子的轰击作用可使细胞壁、细胞膜穿孔,使胞内物质外溢而失活;紫外线可对芽孢衣蛋白进行光子氧化,对DNA双螺旋结构也具有破坏作用^[11]。枯草芽孢杆菌的芽孢通常用作评估医疗行业无菌性的生物指标,因此本文选择该芽孢进行阵列式等离子体射流灭菌效果的评估。

为满足实际应用中对不同复杂表面结构进行快速处理的需求,本文介绍了一套自主研发的单极性微秒脉冲阵列式等离子体射流系统,该系统可产生较大面积的等离子体射流,并且对枯草杆菌芽孢具有较好的灭活能力。本文研究了工作电压、脉冲频率、处理时间和气体组成等参数对芽孢灭活的影响。

1 实验系统与方法

1.1 实验系统

实验系统主要由载气气源、气体流量计、高频窄脉冲高压电源、阵列式等离子体发生器、电化学测试探头和示波器等部分组成,其中脉冲电源和等离子体发生器为实验室自主研制。等离子体消杀流程如图1所示,气体经转子流量计通入射流喷头,经过两个分布器使气体达到射流通道入口时流速均匀,随后进入细长的绝缘通道,对通道两侧的电极施加脉冲电压后即可触发产生射流,对细菌进行消杀。

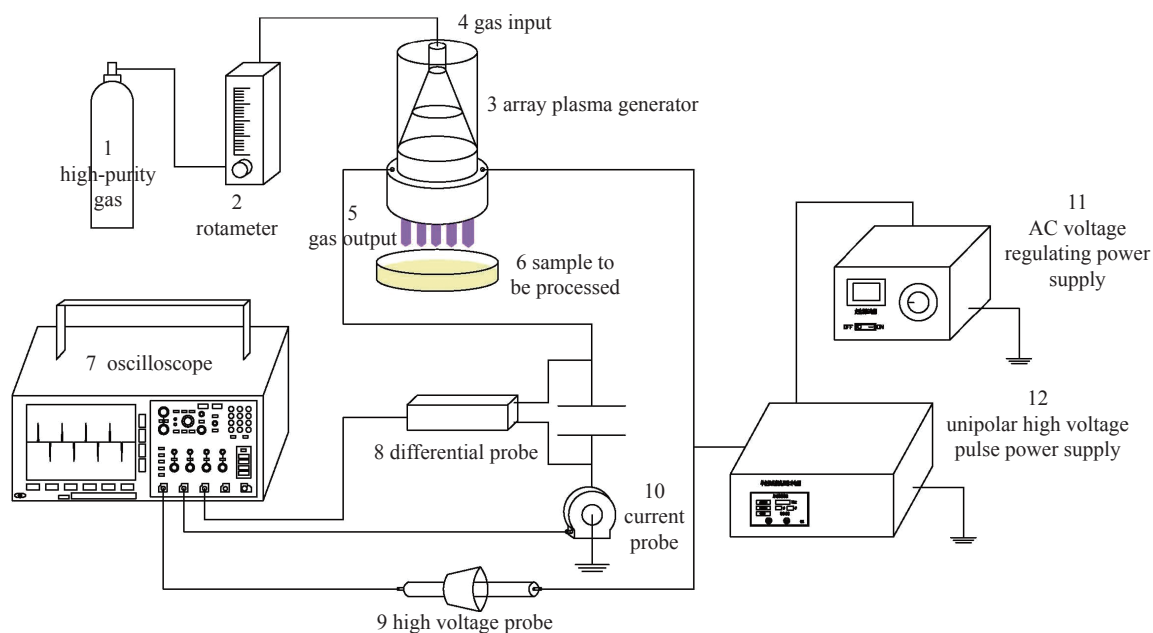


Fig. 1 Flowchart of plasma disinfection

图1 等离子体消杀流程图

脉冲电源可稳定提供峰值范围为 1~25 kV 的脉冲电压,频率可在 1~20 kHz 内调节。等离子体发生器为 9×9 阵列式射流喷头,结构如图2所示。射流喷头的主体材料为有机玻璃,绝缘介质为聚四氟乙烯,内部绕有两段漆包线,穿线孔垂直于射流通道,高低压错层分布,穿线方向互相垂直,分别作为射流的高压端和接地端。系统工作时可将射流喷头置于支架上,也可手持。

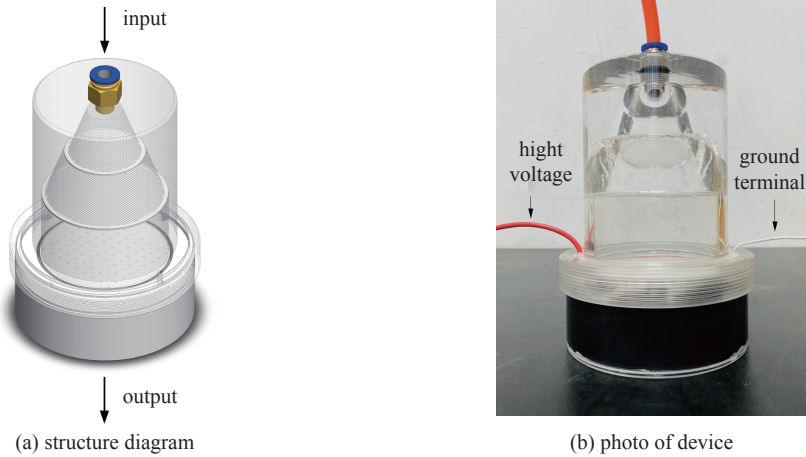


Fig. 2 9×9 array plasma generator
图 2 9×9 阵列式等离子体发生器

射流通道的分布及尺寸如图 3 所示,其孔径为 1.5 mm,呈 9×9 阵列式分布,共 81 个通道,相邻通道的间距分别为 8 mm(图 3(a))、7 mm(图 3(b))。射流可覆盖的矩形面积为 37.7 cm²,射流长度可稳定在 4 cm。

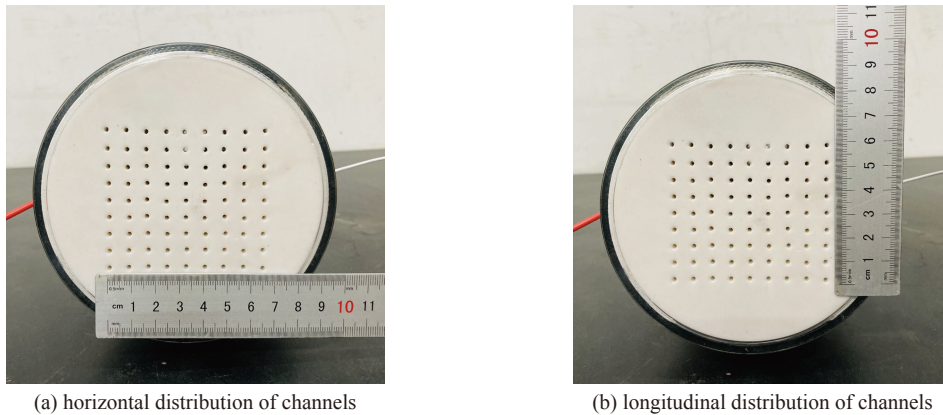


Fig. 3 Distribution and size of jet channels
图 3 射流通道的分布及尺寸

1.2 实验方法

1.2.1 电学性能的诊断

脉冲电源的电压、电流波形检测采用泰克示波器(Tektronix DPO2024B),电压探头为北极星高压探头(Northstar PVM-5),电流探头为皮尔森电流探头(Pearson 6585),差分探头为三华差分探头(Sapphire SI-9002),电压、电流的探测位置如图 1 所示。

1.2.2 发射光谱

脉冲放电过程伴随着强烈的光辐射,利用多通道光纤光谱仪(Avantes AvaSpec)可对其发射光谱进行检测,再检索 NIST(美国国家标准与技术研究院)原子光谱数据库,即可得到放电过程中产生的活性成分。

1.2.3 芽孢的制备

实验采用枯草芽孢杆菌的芽孢作为生物指示剂。芽孢是细菌休眠体,当环境条件恶劣时由细菌内部产生。芽孢含水量低、抗逆性强,灭活难度大,是检测灭菌效率的合适指标。实验所用指示菌为枯草芽孢杆菌 ATCC9372,经培养后获得该菌芽孢,将菌苔刮下收集后放入 80 °C 水浴中杀灭残余的细菌繁殖体,制得芽孢悬液,如图 4 所示。



Fig. 4 Spore suspension of *Bacillus subtilis*
图 4 枯草杆菌芽孢悬液

1.2.4 等离子体射流灭菌

使用涂布仪将芽孢悬液均匀地涂布固体琼脂表面,置于等离子体射流喷头下方一定距离处,调节合适的参数(工作电压、脉冲频率、处理时间、气体流量和气体组成),利用等离子体射流处理芽孢数分钟,随后将琼脂平板置于 37 °C 生化培养箱 24 h,可得到不同形貌的菌斑。通过观察对比菌斑的大小、密度和分布位置等可定性分析不同条件下等离子体射流的灭菌效率。射流装置的工作状态如图 5 所示。

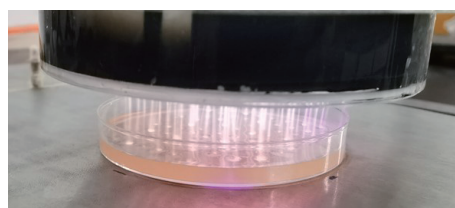


Fig. 5 Spores on AGAR plate was treated by plasma jet
图 5 等离子体射流处理琼脂平板上的芽孢

由于样品浓度较大,进行原位计数较为困难,故使用异养平板计数法进行灭菌效果的定量分析。将处理过的菌液进行 10 倍的逐级稀释,并将每次稀释的菌液分别进行接种培养。选取菌落总数在 30~300 CFU(菌落形成单位, colony-forming units)之间的平板进行计数,颗粒计数采用 ImageJ 软件,每个浓度计数 3 个样本,取其平均值为有效值,再乘以相应的稀释倍数,即可得到菌落总数的结果。

1.2.5 扫描电镜

按照标准方法制备样品用以扫描电镜(Nova Nano 450)观察。样品为等离子体处理前后的芽孢悬液,离心分离后放入 2.5% 戊二醛溶液中固定 12 h,用 PBS 洗涤 3 次去除固定液,放入质量分数为 1% 锇酸溶液中固定 1.5 h,再次用 PBS 洗涤 3 次去除锇酸,用梯度乙醇溶液(50%、70%、90%)脱水,再用 100% 乙醇洗涤两次。用二氧化碳临界点干燥仪干燥,溅射涂布机喷上金膜,所得样品即可用于扫描电镜观察其形貌特征。

2 分析与讨论

2.1 电学性能诊断

利用示波器、高压探头及电流探头对脉冲电源的电压、电流波形进行检测,可计算单次脉冲能量及不同频率下的脉冲功率,其结果如图 6 所示。图 6(a)为脉冲电压及电流波形,电压峰值为 19.9 kV,脉冲电流峰值为 1.48 A,脉冲宽度约为 1 μ s。通过对脉冲的瞬时电压 U_i 和瞬时电流 I_i 的乘积对时间进行积分,可获得单次脉冲的能量(E_i)曲线,如图 6(b)所示。在 20 kV、15 kHz 的参数下运行时,单次脉冲的能量峰值为 11.6 mJ,注入等离子体的能量为 2.67 mJ,等离子体射流的功率为 40.05 W,当气体流量为 40 L/min 时,能量密度为 60.08 J/L。

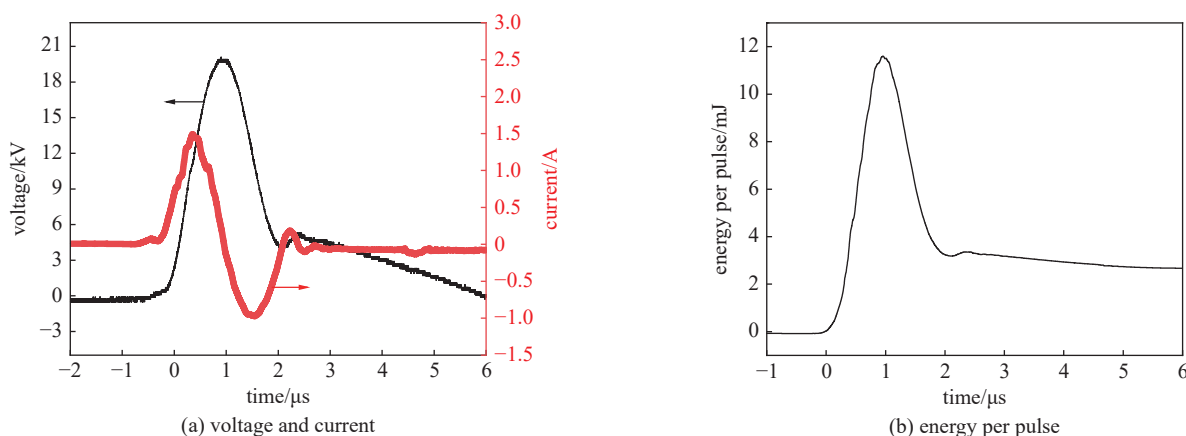


Fig. 6 Voltage and current waveform (a) and single pulse energy (b) of pulsed plasma jet
图 6 脉冲等离子体射流的电压及电流波形 (a) 和单次脉冲能量 (b)

2.2 发射光谱分析

在工作电压 20 kV、脉冲频率 15 kHz、气体流量 40 L/min、管口距离 20 mm 的条件下,对不同气体成分的等离子体射流进行发射光谱的分析,谱图如图 7 所示。在纯氦气氛下,发射光谱主要由 He、O、N 的谱线组成,O 和 N 来源于空气。由于 O_2 的加入,He I 与 N I 谱线的强度降低,O II 谱线的强度提高,射流中活性氧(ROS)组分增加。加入 H_2O 后,光谱中出现明显的羟基自由基谱线,可以推测 H_2O 是等离子体射流中羟基自由基的主要来源之一。在同时加入 O_2 和 H_2O 后,并未带来 O I 与羟基自由基谱线强度一同增强的情况,谱线强度反而整体减弱,可见二者存在相互抑制的关系。

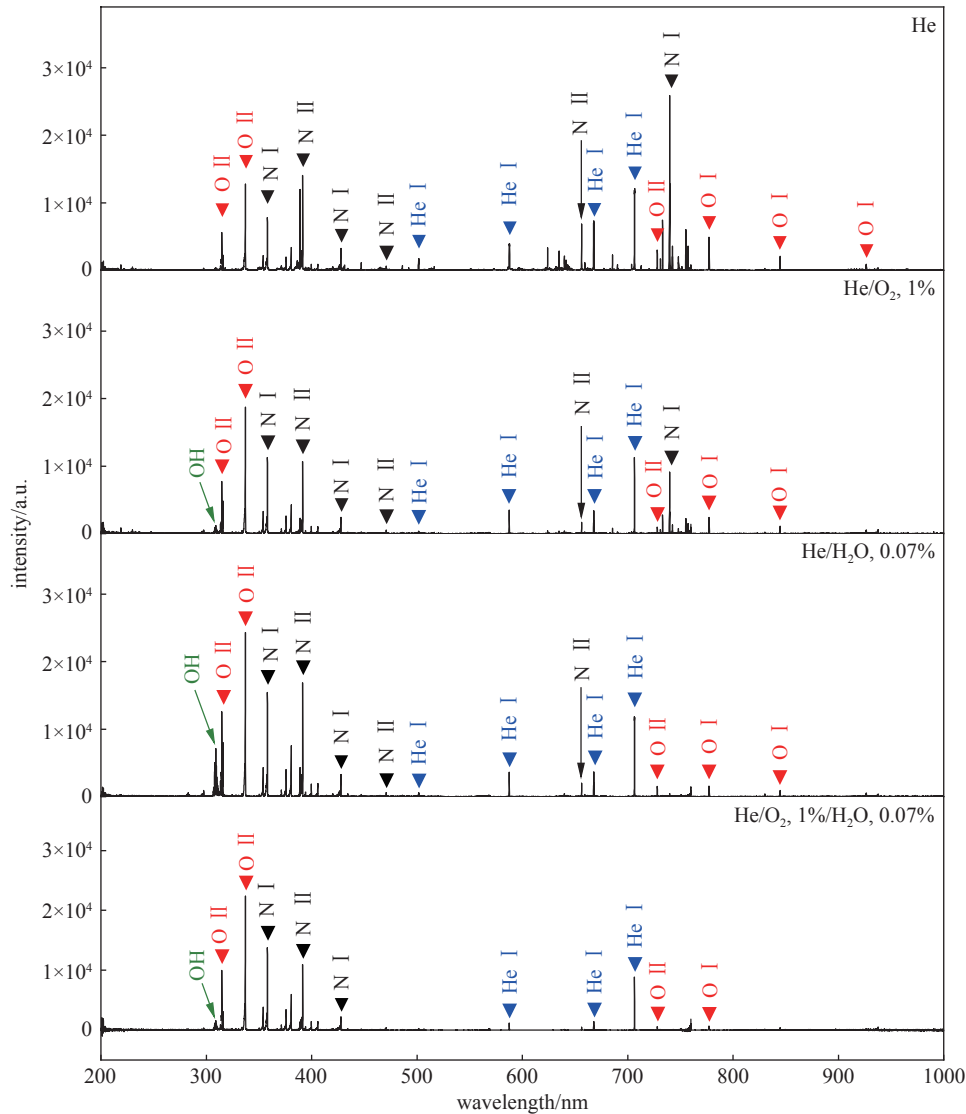


Fig. 7 Emission spectra of plasma jets with different gas compositions

图 7 不同气体成分下等离子体射流的发射光谱

研究表明,等离子体可与细胞的遗传物质、蛋白质、脂质等发生相互作用,其内的活性氧和活性氮在细菌灭活中起到重要作用^[12]。等离子体中的活性粒子会首先作用于细胞膜上的膜蛋白、不饱和脂肪酸、磷脂层等,以改变细胞膜的通透性。在膜结构被破坏之后,活性粒子会与水分子或胞内生物分子进一步反应生成新的活性物质,进而引发 DNA 易错性修复机制^[12],使细胞死亡。同时等离子体中还含有大量的 NO,研究表明,低浓度的 NO 可促进细胞生长并组织细胞程序性死亡,但高浓度的 NO 会导致细胞周期停滞、衰老或凋亡^[13]。

2.3 阵列式射流形貌

等离子体射流的形貌受到多个因素的影响,主要包括工作电压、脉冲频率和气体流量等。在 20 kV、15 kHz 的条件下,通入 40 L/min 的氦气可产生长度为 6 cm 的 9×9 阵列式等离子体射流,如图 8(a)所示。所有通道都可激发产生射流,且分布均匀、边界清晰,在白天也能看到明显的紫色光亮,如图 8(b)所示。可直接作用于人体皮肤表面,且无灼热感或麻痹感,如图 8(c)所示。

2.4 阵列式等离子体射流处理芽孢

使用阵列式等离子体射流对枯草芽孢杆菌的芽孢进行灭菌处理,芽孢载体为直径 90 mm 的琼脂平板,琼脂厚度 5 mm,琼脂上表面与射流通道出口的距离为 20 mm。

2.4.1 系统功率

等离子体功率受工作电压及脉冲频率的影响,一般来说,功率越大,单位时间内注入气体的能量越大,生成的活性基团浓度越高,对细菌的灭活能力越强。

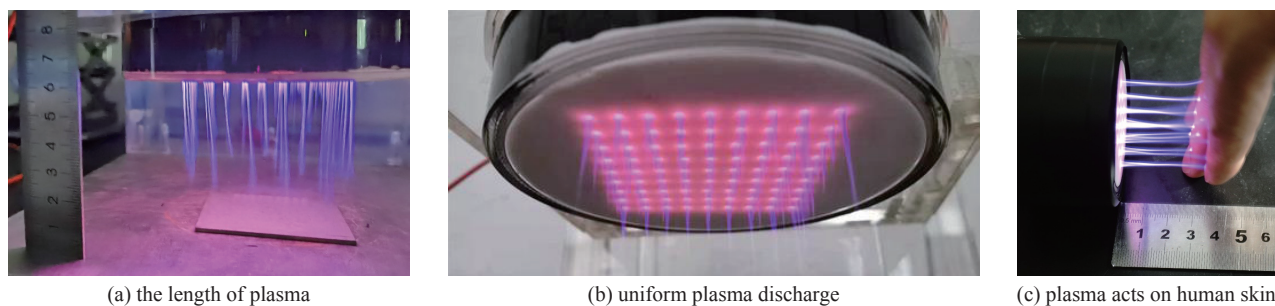


Fig. 8 Array jet discharge

图 8 阵列式射流放电

考察工作电压对等离子体灭活效率的影响,其结果如图 9 所示。脉冲频率固定为 15 kHz, 氦气流量为 35 L/min, 处理时间 3 min。设备高低压电极间距为 10 mm, 由此可得电场强度的大小。当工作电压峰值为 20 kV 时, 电场强度为 2×10^6 V/m。随着工作电压的提升, 电场强度逐渐增大, 琼脂上的菌落数量逐渐减少。

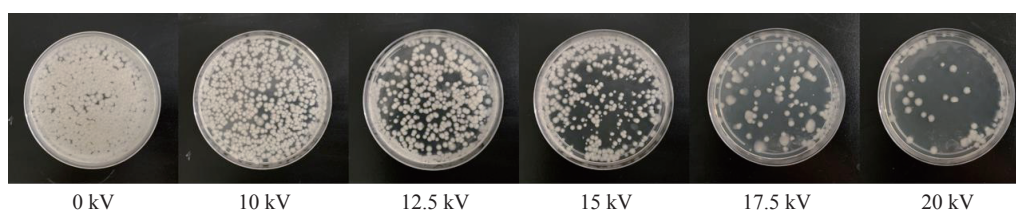


Fig. 9 Sterilizing effect of jet under different voltage

图 9 不同工作电压下射流的灭菌效果

考察脉冲频率对等离子体灭活效率的影响,其结果如图 10 所示。工作电压峰值为 20 kV, 电场强度为 2×10^6 V/m, 氦气流量为 35 L/min, 处理时间 3 min。在 5~15 kHz 范围内, 提高脉冲频率对菌落密度的影响较小, 但在相同的培养时间内, 15 kHz 作用下的菌斑粒径减小, 说明细菌生长受到抑制。

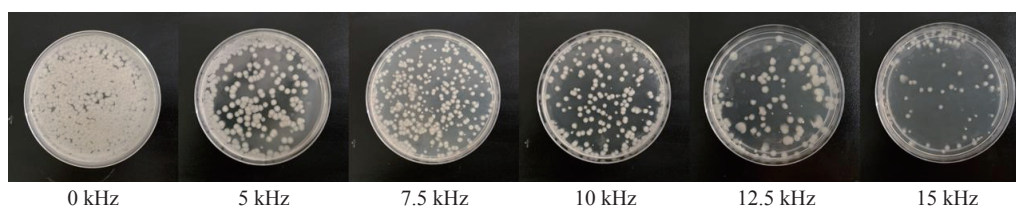


Fig. 10 Sterilizing effect of jet at different pulse frequencies

图 10 不同脉冲频率下射流的灭菌效果

2.4.2 处理时间

射流处理时间是直接影响灭菌效率的因素之一。氦气流量为 40 L/min, 脉冲电源的工作电压峰值为 20 kV, 脉冲频率为 15 kHz, 灭菌效果如图 11 所示。当处理时间达到 5 min 时, 射流覆盖范围内的芽孢基本全部失去活性, 可见处理时间对灭菌效率有较大的影响。

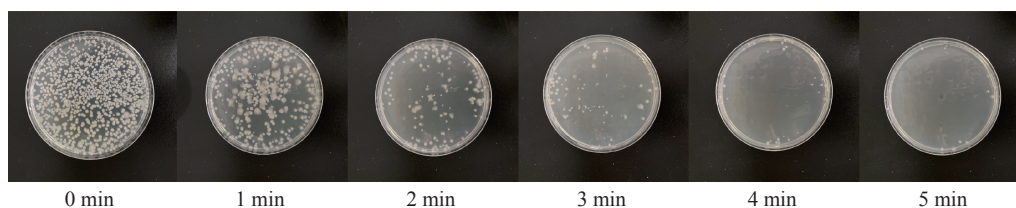


Fig. 11 Sterilizing effect of jet under different treatment time

图 11 不同处理时间下射流的灭菌效果

2.4.3 气体组成

通常来说, 适当增加 O_2 含量可以提升等离子体中活性氧的浓度^[4], 但其电负性又倾向于吸收气体中激发出的高能电子, 导致电子密度下降, 因此过高浓度的 O_2 反而会削弱等离子体的灭菌能力。提高气体湿度可以提升

等离子体中羟基自由基的浓度,羟基自由基可以氧化多聚糖和磷脂双分子层,从而破坏细胞壁和细胞膜,使细胞失去活性^[15]。

对比不同气体氛围对射流灭菌的影响,其中 O₂ 的体积分数为 1%, H₂O 的相对湿度为 3%, 工作电压峰值为 20 kV, 脉冲频率为 15 kHz, 气体总流量为 40 L/min, 灭菌效果如图 12 所示。总体上看, He 的灭菌效果好于 Ar, He 在 3 min 时即可将芽孢基本杀灭, 而 Ar 要 5 min 以上才能达到同样的效果。加入 O₂ 会导致灭菌速率在前期下降, 后期回升, 这可能是由于活性氧中部分组分为长效成分, 其含量的增加相应带来瞬态成分含量的降低, 至使灭菌出现滞后现象。在 He 中分别掺杂 O₂ 或 H₂O 后, 灭菌效果略有降低, 但当二者同时加入后, 1 min 内的灭菌效果明显下降。结合发射光谱的结果来看, O₂ 和 H₂O 的同时加入阻碍了 He 的激发, 且抑制了羟基自由基的生成, 导致活性粒子密度降低, 射流的灭菌性能减弱。

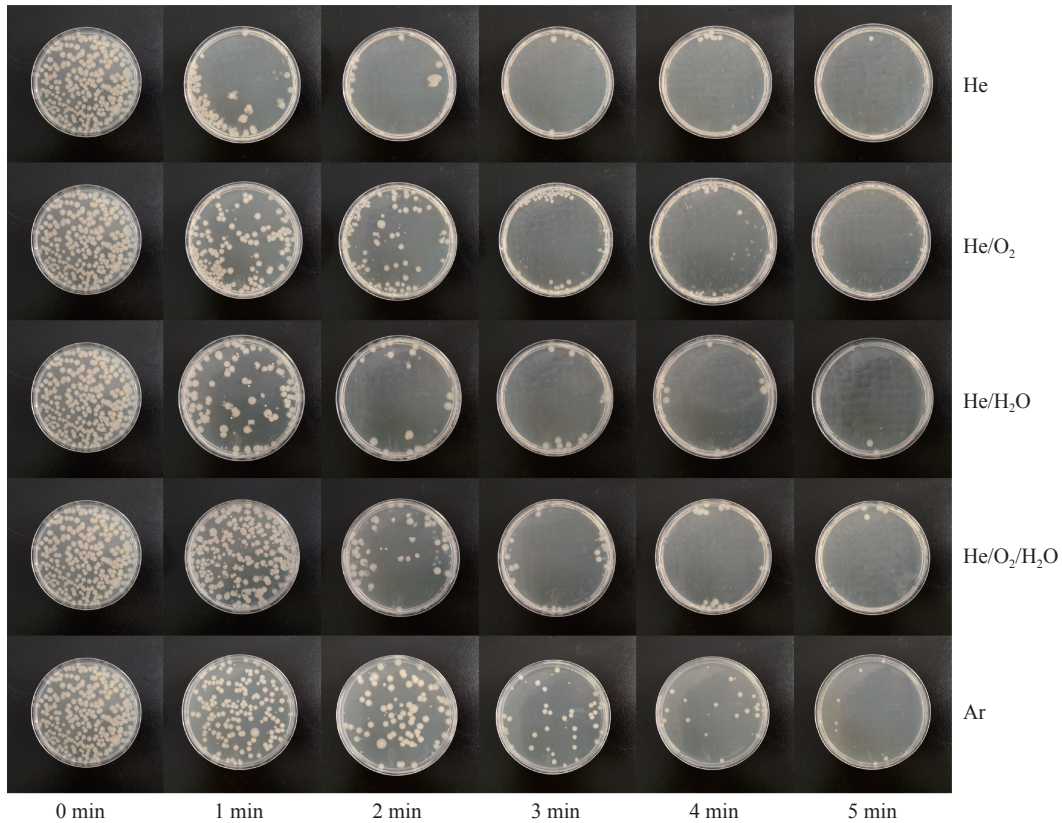


Fig. 12 Sterilization effect of jet under different gas atmosphere

图 12 不同气体氛围下射流的灭菌效果

在同样的工作条件下对芽孢进行定量实验处理, 结果如图 13 所示。灭菌对数值的趋势与定性实验的结果基本吻合, He 的处理效果最佳, 可达到 3 个对数值的灭菌效果; Ar 的处理效果较差, 约为 2 个对数值; 掺杂气体会在

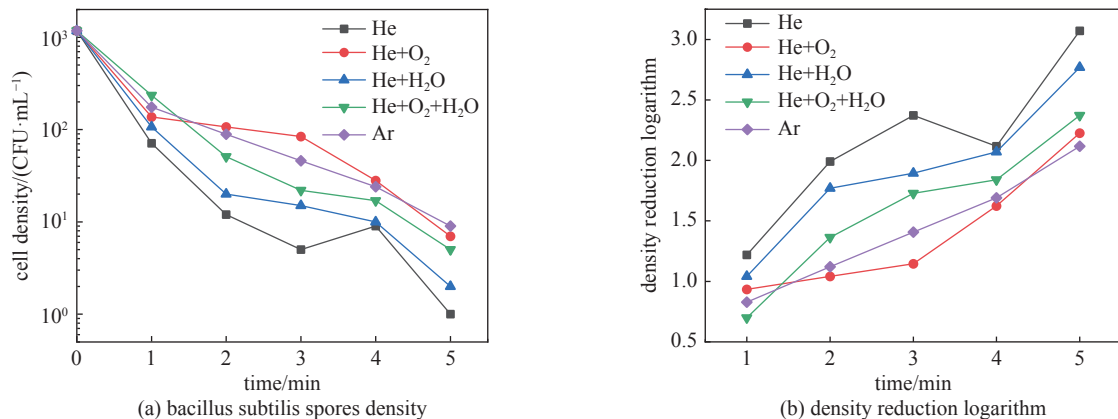


Fig. 13 Sterilization data of jet under different gas atmosphere

图 13 不同气体氛围下射流的灭菌实验数据

一定程度上削弱等离子体的灭菌能力,但基本能达到2个对数值以上的灭菌效果。

2.5 芽孢的扫描电镜观察

分别取等离子体射流处理前后的芽孢进行扫描电镜观察,图14为放大20 k倍的扫描结果。处理条件为工作电压20 kV,脉冲频率15 kHz,氦气流量40 L/min,处理时间3 min。可见对照组芽孢个体圆滑饱满,芽孢壁结构完整;实验组芽孢的外壳结构遭到严重破坏,出现不同程度的塌陷和破碎,芽孢内部结构出现明显空缺,内容物流出,以致芽孢无法进行正常的代谢活动,最终失去活性。

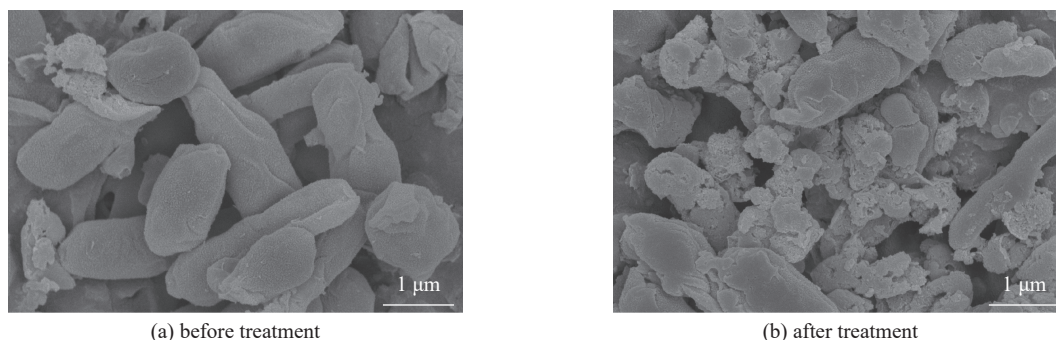


Fig. 14 SEM images of *Bacillus subtilis* spores before and after treatment

图14 处理前后枯草杆菌芽孢的SEM

3 结 论

本文采用自主研发的单极性微秒脉冲9×9阵列式等离子体射流系统,对枯草芽孢杆菌的芽孢进行了灭活处理。系统峰值电压可达20 kV,峰值电流为1.48 A,射流功率为40.05 W。工作时阵列中所有孔道均匀产生等离子体,射流覆盖面积达37.7 cm²,射流长度可稳定在4~5 cm,最高可达6 cm。射流温度保持在室温,可直接作用于人体皮肤数分钟,适用于热敏性材料的表面处理。在放电电压20 kV,脉冲频率15 kHz,氦气流量40 L/min的条件下,处理5 min可使射流覆盖范围内的芽孢基本全部失去活性。考察了不同参数对灭菌效率的影响,工作电压、脉冲频率、处理时间三者与灭菌效率均呈正相关,不同的气体会在灭菌前期(1 min内)对灭菌速率有一定影响,后期(5 min后)趋近一致。SEM结果显示,等离子体射流能够破坏芽孢的细胞壁和细胞膜,导致细胞失活。

本文对阵列式等离子体射流的规模放大进行了尝试,得到了稳定的大面积等离子体射流,为后续研发大规模等离子体射流系统提供经验。低温等离子体灭菌技术作为近年的研究热点,基础理论与实验应用都在不断推进,但由于等离子体的瞬态性和生物组织的复杂性,其相互之间的作用机理仍未有定论,需要进一步的探索。同时等离子体射流的标准化、扩大化,也是将该技术推向工业化需要解决的问题。

参考文献:

- [1] 郑超. 低温等离子体和脉冲电场灭菌技术[D]. 杭州: 浙江大学, 2013. (Zheng Chao. Non-thermal plasma and pulsed electric field induced disinfection[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013)
- [2] 郑超, 徐羽贞, 黄逸凡, 等. 低温等离子体灭菌及生物医药技术研究进展[J]. 化工进展, 2013, 32(9): 2185-2193. (Zheng Chao, Xu Yuzhen, Huang Yifan, et al. State-of-the-art non-thermal plasma disinfection and medicine[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2013, 32(9): 2185-2193)
- [3] 邵涛, 章程, 王瑞雪, 等. 大气压脉冲气体放电与等离子体应用[J]. 高电压技术, 2016, 42(3): 685-705. (Shao Tao, Zhang Cheng, Wang Ruixue, et al. Atmospheric-pressure pulsed gas discharge and pulsed plasma application[J]. High Voltage Engineering, 2016, 42(3): 685-705)
- [4] Hosseini S M, Rostami S, Samani B H, et al. The effect of atmospheric pressure cold plasma on the inactivation of *Escherichia coli* in sour cherry juice and its qualitative properties[J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(2): 870-883.
- [5] Ulbin-Figlewicz N, Jarmoluk A, Marycz K. Antimicrobial activity of low-pressure plasma treatment against selected foodborne bacteria and meat microbiota[J]. Annals of Microbiology, 2015, 65(3): 1537-1546.
- [6] Fiebrandt M, Hillebrand B, Lackmann J W, et al. Inactivation of *B. subtilis* spores by low pressure plasma-influence of optical filters and photon/particle fluxes on the inactivation efficiency[J]. Journal of Physics D: Applied Physics, 2018, 51: 045401.
- [7] Huang Y H, Ye X P, Doona C J, et al. An investigation of inactivation mechanisms of *Bacillus amyloliquefaciens* spores in non-thermal plasma of ambient air[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, 99(1): 368-378.
- [8] Wang S W, Doona C J, Setlow P, et al. Use of Raman spectroscopy and phase-contrast microscopy to characterize cold atmospheric plasma inactivation of individual bacterial spores[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(19): 5775-5784.
- [9] Rossi F, Kylián O, Hasiwa M. Decontamination of surfaces by low pressure plasma discharges[J]. Plasma Processes and Polymers, 2006, 3(6/7): 431-442.

- [10] Whittaker A G, Graham E M, Baxter R L, et al. Plasma cleaning of dental instruments[J]. *The Journal of Hospital Infection*, 2004, 56(1): 37-41.
- [11] 成军虎, 张彦, 韩忠. 低温等离子体技术灭活细菌芽孢的研究进展[J]. 现代食品科技, 2021, 37(4): 302-310. (Cheng Junhu, Zhang Yan, Han Zhong. Research progress on inactivation of bacterial spores by cold plasma technology[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2021, 37(4): 302-310)
- [12] Kalghatgi S, Kelly C M, Cerchar E, et al. Effects of non-thermal plasma on mammalian cells[J]. *PLoS One*, 2011, 6: e16270.
- [13] Graves D B. The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology[J]. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2012, 45: 263001.
- [14] 卢新培. 等离子体射流及其医学应用[J]. 高电压技术, 2011, 37(6): 1416-1425. (Lu Xinpei. Plasma jets and their biomedical application[J]. *High Voltage Engineering*, 2011, 37(6): 1416-1425)
- [15] 李和平, 于达仁, 孙文廷, 等. 大气压放电等离子体研究进展综述[J]. 高电压技术, 2016, 42(12): 3697-3727. (Li Heping, Yu Daren, Sun Wenting, et al. State-of-the-art of atmospheric discharge plasmas[J]. *High Voltage Engineering*, 2016, 42(12): 3697-3727)