

基于悬浮电极介质阻挡放电的低温等离子体 灭菌实验研究

江敏^{1,2} 易志健¹ 黄逸凡¹ 朱剑豪^{1,2} 喻学锋¹

¹(中国科学院深圳先进技术研究院 生物医药与技术研究所 深圳 518055)

²(深圳市中科摩方科技有限公司 深圳 518114)

摘要 基于介质阻挡放电原理,该文工作搭建了一种悬浮式电极的低温等离子体装置,并开展了细菌灭活的实验。实验结果表明,该装置对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌具有显著的灭活效果:作用时间30 s内金黄色葡萄球菌和大肠杆菌灭活效率达到99.99%以上;作用距离对灭菌效果具有明显影响作用,其中作用距离为1 mm时的灭菌效果最佳。

关键词 介质阻挡放电;低温等离子体;杀菌

中图分类号 O 539 文献标志码 A

A Study of Low-Temperature Plasma Sterilization Based on Floating-Electrode Dielectric Barrier Discharge

JIANG Min^{1,2} YI Zhijian¹ HUANG Yifan¹ Paul K. CHU^{1,2} YU Xuefeng¹

¹(Institute of Biomedicine and Biotechnology, Shenzhen Institutes of Advanced Technology,
Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

²(China Morefound Technology Ltd., Shenzhen 518114, China)

Abstract In this work, a floating-electrode dielectric barrier discharge plasma device was constructed based on the principle of dielectric barrier discharge, and its application of bacterial inactivation was studied. The experimental results show that the device has a significant sterilization performance in the inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The inactivation efficiency of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* is more than 99.99% within 30 s. Treatment gap distance also plays an important role in sterilization and the best distance is 1 mm.

Keywords floating-electrode dielectric barrier discharge; low temperature plasma; sterilization

收稿日期: 2017-11-22 修回日期: 2018-03-09

基金项目: 深圳市海外高层次人才孔雀团队项目(KQTD2016030111500545); 广东省引进领军人才项目(00201520)

作者简介: 江敏, 硕士, 助理工程师, 研究方向为低温等离子体技术; 易志健, 本科, 研究方向为等离子体技术; 黄逸凡(通讯作者), 研究员, 博士生导师, 研究方向为等离子体技术, E-mail: yf.huang@siaat.ac.cn; 朱剑豪, 讲席教授, 研究方向为等离子体技术; 喻学锋, 研究员, 博士生导师, 研究方向为二维材料和等离子体技术。

1 引 言

低温等离子体是部分电离的气体, 含有带电离子、高能电子、激发态的活性原子、分子和自由基等多种化学成分, 可被广泛应用在材料制备、表面改性处理、生物医学、空气净化、食品等领域。在生物医学领域, 低温等离子体最初的应用主要是对食物和器械的灭菌消毒。自 1996 年 Laroussi^[1]证实了大气压辉光放电等离子体对细菌有强烈的灭活作用后, 低温等离子体在灭菌方面的应用越来越多。

Montie 等^[2]利用辉光放电等离子体处理材料, 发现材料表面附着的革兰氏阴性细菌、革兰氏阳性细菌、真菌、孢子等含量均呈指数趋势迅速降低, 并提出了活性氧致使细胞膜破碎的假设。Lu 等^[3]采用一种单电极射流装置对金黄色葡萄球菌进行灭菌机理研究, 表明活性氧粒子在细菌灭活过程中起到重要的作用。同时, 他们利用该装置对白色念珠球菌进行灭活实验, 结果表明具有明显的灭活效果^[4]。Matthes 等^[5] 6 次重复利用氩气等离子体射流对金黄色葡萄球菌微生物膜进行灭活实验, 结果显示, 等离子体造成细菌失活效果很稳定, 且金黄色葡萄球菌微生物膜不会产生等离子体抗体。华中科技大学的卢新培课题组研制出一种微细大气压低温等离子体射流装置, 能够快速地杀死根管内部的粪肠球菌^[6]。范明阳与郝小龙^[7]研究了氮氧源大气压等离子体射流对表面大肠杆菌的灭活作用, 发现处理 3 min 后, 氮氧 1:4 的大气压等离子体射流对大肠杆菌的灭活率达到 98.4%, 其中 NO_x 、OI、 $\cdot\text{OH}$ 等活性物质在表面大肠杆菌灭活过程中起到了重要作用。

目前, 很多研究都表明低温等离子体对常见的细菌、真菌均具有显著的灭活效果^[8-13]。然而这些研究大部分采用的是等离子体射流装置, 对其他产生等离子体的装置涉及比较少。同时, 射

流结构作用面积小、功耗高、需外加气体等, 在一定程度上也束缚了等离子体射流的应用推广。而悬浮式电极介质阻挡放电 (Floating-Electrode Dielectric Barrier Discharge, FE-DBD) 的低温等离子体装置基于介质阻挡放电原理进行设计开发, 具有等离子体射流无可比拟的柔和、大面积均匀放电等优点, 可广泛应用在杀菌消毒、美容、凝血、伤口愈合、皮肤疾病、肿瘤治疗等医学领域。本文搭建了一款简易的 FE-DBD 低温等离子体装置, 旨在对 FE-DBD 低温等离子体在灭菌时的放电特性和灭菌效果进行初步研究。

2 实验方法

2.1 实验装置的搭建

本文实验装置如图 1 所述。整个装置的负载是由前盖、高压电极和壳体组成。其中, 前盖和壳体采用直径 35 mm 的聚四氟乙烯制成, 两者采用螺纹连接; 高压电极为直径 30 mm、0.5 mm 厚的圆形铜板并内置于聚四氟乙烯中, 有效防止在放电过程中发生爬电、边缘击穿等现象。圆形铜板连接高压交流电源。当人体或金属物质靠近聚四氟乙烯前盖时, 在两者之间间隙处就会发生放电产生等离子体。其中, 产生的等离子体面积的大小取决于高压电极铜板的面积, 等离子体密度取决于所施加电源的电压和频率。本文采用南京苏曼的 CTP-2000K 低温等离子体实验电源, 放电电压检测采用 Tektronix P6015A 高压探头, 放电电流检测采用 Pearson 6585 电流探头, 示波器采用 Tektronix TBS1102。

2.2 细菌制备及灭菌方法

在进行实验前, 先进行培养基制备和金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的培养。

(1) 培养基配制: 取 40 g 的 Luria-Bertani 营养琼脂, 溶解定容到 1 000 mL;

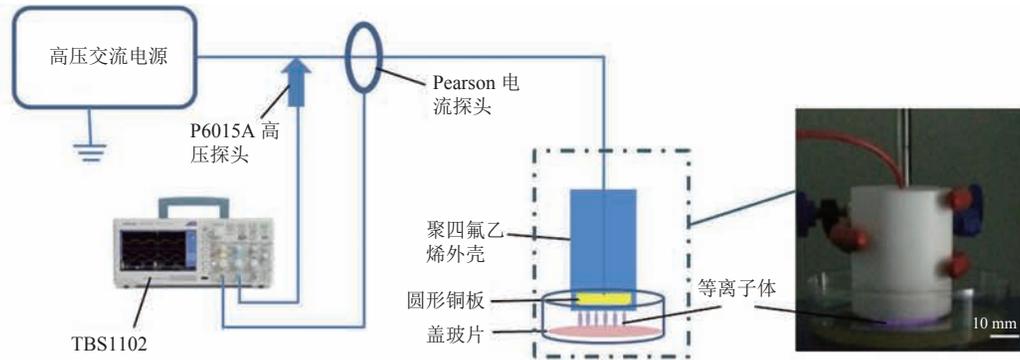


图 1 悬浮电极介质阻挡放电低温等离子体灭菌装置示意图

Fig. 1 Schematic of FE-DBD cold temperature plasma

细菌营养液配制: 取 25 g 的 Luria-Bertani 肉汤, 溶解定容到 1 000 mL。

(2) 实验器材及其培养基、营养液的灭菌: 将上述配制的培养基、细菌营养液及相关器材进行 121℃ 的高压灭菌处理。

(3) 制备待涂培养皿: 在每个培养皿中放置 15 mL 的培养基, 均匀涂覆, 待其凝固备用。

(4) 细菌传代与浓度确定: 首先各挑取一个金黄色葡萄球菌和大肠杆菌分别放置于 5 mL 经灭菌后的细菌营养液中, 在 37℃ 细菌培养箱培养 8 h; 然后用活菌培养计数法测得金黄色葡萄球菌和大肠杆菌浓度均为 3.2×10^5 mL。

(5) 灭菌方法: 首先, 取上述金黄色葡萄球菌和大肠杆菌浓度的菌悬液均匀地涂在经灭菌的盖玻片上 (2 cm × 2 cm), 二者各涂 6 片, 每片涂 50 μL 菌悬液; 其次, 按图 1 所示, 将涂有菌悬液的盖玻片进行等离子体处理; 最后, 将每组参数处理后的盖玻片放置于 10 mL 的细菌营养液浸泡, 反复摇动使盖玻片的细菌充分融入营养液中。

(6) 细菌培养与计数: 从上述 (5) 中充分洗涤盖玻片的细菌菌液中各取 100 μL 菌液分别涂覆在带培养基的培养皿中, 然后放置于 37℃ 细菌培养箱过夜培养, 用活菌培养计数法计数存活的菌落数。

3 结果与讨论

3.1 放电特性

利用电压、电流探头和示波器对 FE-DBD 低温等离子体装置的电气参数进行测定。未放电时的电压、电流波形如图 2 所示, 此时施加的电压峰值为 19.6 kV, 电流峰值为 16 mA。随着盖玻片靠近装置的前盖时, 在两者之间的间隙处逐渐产生等离子体。当盖玻片与装置前盖距离为 3 mm 时, 此时放电的电压、电流波形如图 3 所示, 此时电压峰值为 20 kV, 电流峰值为 50 mA。

从图 2 和图 3 可以看出, FE-DBD 低温等离子体装置放电的电压、电流均比放电前升高, 且电流变化相对明显, 从 16 mA 升高到 50 mA。这是因为当与盖玻片上菌悬液作用时, 放电能量需先将装置前盖与盖玻片之间的气体击穿, 引起气体分子发生电离, 产生大量带电粒子。在外加电场的作用下, 这些带电粒子漂移到阳极产生电流细丝, 从而导致电流明显升高。此外, 从电压电流波形中可见, FE-DBD 低温等离子体的放电方式为典型的空气介质阻挡丝状放电类型。

3.2 灭菌结果分析

利用 FE-DBD 低温等离子体灭菌装置对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌进行灭活试验, 并通过活菌培养计数法计数存活菌落数来评估作用时间

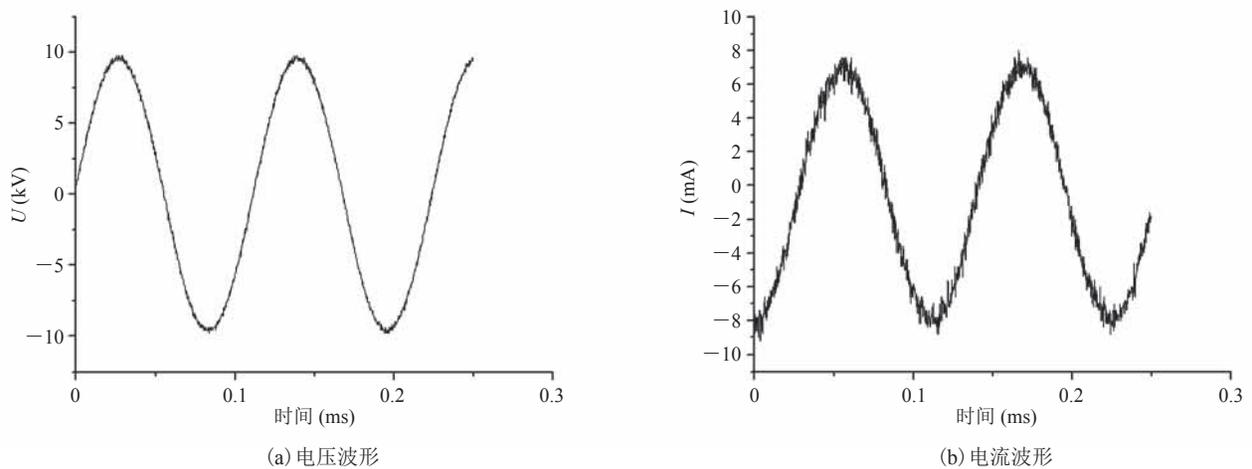


图 2 悬浮电极介质阻挡放电低温等离子体装置未放电前电压、电流波形

Fig. 2 The waveforms of voltage and current before FE-DBD plasma device discharging

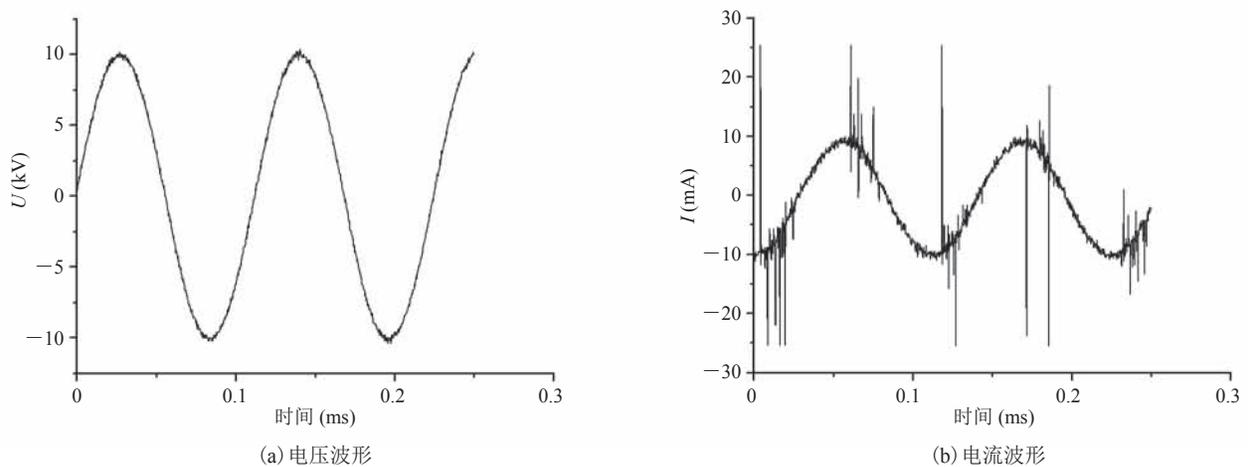


图 3 悬浮电极介质阻挡放电低温等离子体装置对菌悬液放电的电压、电流波形图

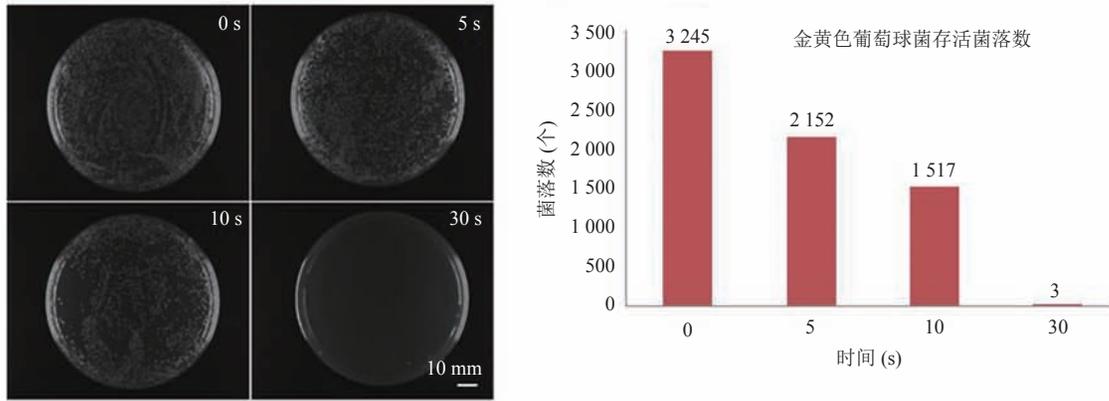
Fig. 3 The waveforms of voltage and current as FE-DBD plasma device discharging

和作用距离对灭菌效果的影响。图 4 和图 5 分别显示了经不同作用时间、不同作用距离处理后在 37℃ 培养箱中过夜培养 24 h 的金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的灭活现象。

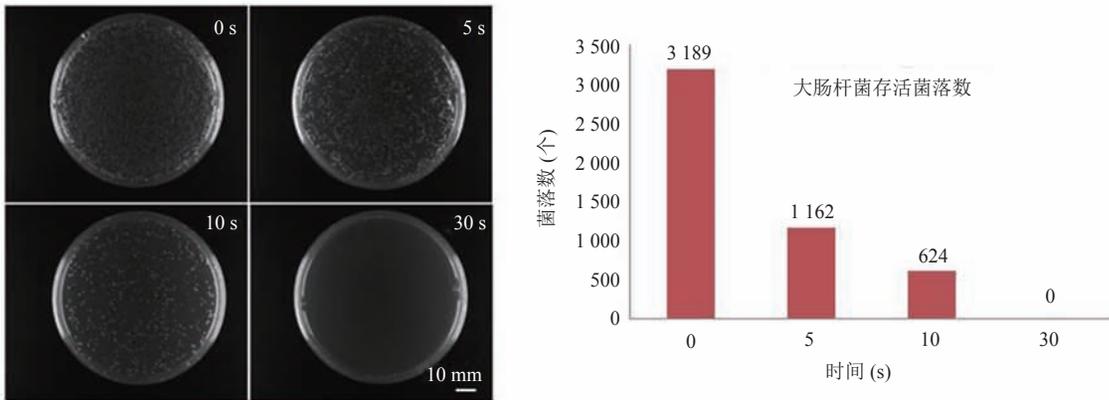
从图 4 可以看出,当放电电压峰值为 20 kV、电流峰值为 50 mA、距离为 3 mm 时,FE-DBD 低温等离子体对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌作用 5 s 时间,部分细菌已开始失活。随着作用时间的增加,被灭活的细菌数量也急剧增加。当作用时间为 30 s 时,金黄色葡萄球菌灭活效率达到

99.9%,而大肠杆菌灭活效率达到 100%。

从图 5 可以看出,当放电电压峰值为 20 kV、电流峰值为 50 mA、作用时间为 10 s 时,不同作用距离对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的灭活效果趋势是一致的:灭菌效果随着作用距离的增加而逐渐变差。当装置端面与盖玻片的距离为 1 mm 时,金黄色葡萄球菌灭活效率为 98.33%,而大肠杆菌灭活效率为 100%;当作用距离调整到 5 mm,金黄色葡萄球菌的灭活效率仅为 19.44%,大肠杆菌灭活效率为 52.34%。这是因



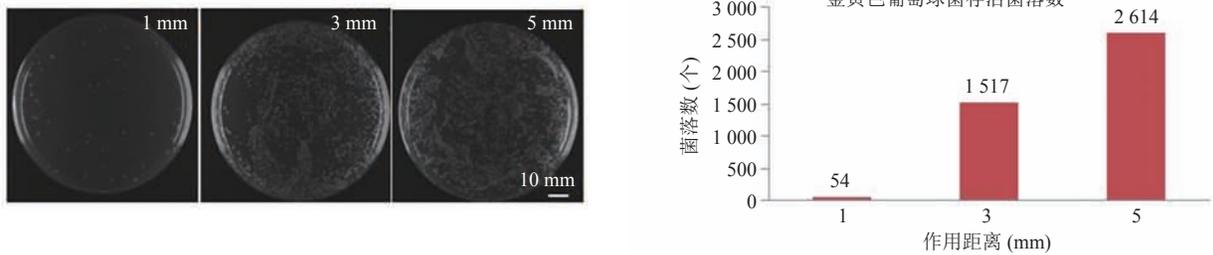
(a) 灭活金黄色葡萄球菌



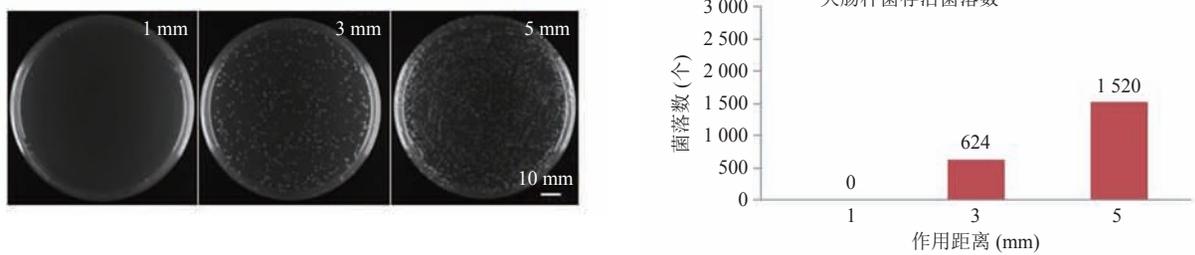
(b) 灭活大肠杆菌

图 4 作用时间对灭菌效果的影响

Fig. 4 Effect of different action time on sterilization



(a) 灭活金黄色葡萄球菌



(b) 灭活大肠杆菌

图 5 作用距离对灭菌效果的影响

Fig. 5 Effect of different distance on sterilization

为等离子体中高能粒子(如活性粒子、激发态离子等)本身比较容易失活,在等离子体产生过程中也伴随着不断地消失衰减,故随着作用距离的增大,灭菌效果逐渐变差。此外,FE-DBD 等离子体对大肠杆菌灭活效果优于金黄色葡萄球菌,这与细菌的结构有关:大肠杆菌属于革兰氏阴性菌,细胞壁较薄;而金黄色葡萄球菌属于革兰氏阳性菌,细胞壁较厚,强度较坚韧。

4 与国内外相似研究对比分析

在装置设计上, Kim 等^[14]设计了几种适合人体不同部分处理的 FE-DBD 电极结构和放电装置:主要采用石英或绝缘橡胶为阻挡介质,且放电端的阻挡介质厚度均为 1 mm,镍金属为电极,装置整体安全性能高,产生的等离子体能够与人皮肤直接接触。张波等^[15]利用紫铜圆柱体作为高压电极,石英玻璃为阻挡介质搭建了一款 FE-DBD 等离子体,并通过电气和光学特性诊断了其放电特性,表明其放电形式为空气介质阻挡丝状放电类型。在应用上, Fridman 等^[16]研究了 FE-DBD 低温等离子体在凝血和灭菌的应用。实验表明 FE-DBD 能够有效地灭活细菌和促进血液凝固。随后其团队又利用 FE-DBD 低温等离子体对黑色素瘤细胞进行处理,发现 FE-DBD 能够有效地引起癌细胞的凋亡^[17]。赵会超等^[18]利用自行搭建的 FE-DBD 低温等离子体杀菌消毒仪进行杀菌实验研究,实验表明该装置能够有效地灭活大肠杆菌。FE-DBD 低温等离子体具有低温、柔和,能够与人体直接接触且不产生疼痛感等优势,但目前针对 FE-DBD 低温等离子体的放电特性和应用研究还比较少。本工作主要是搭建一款简易的 FE-DBD 低温等离子体装置,对其灭活细菌效果和放电特性进行了研究,为 FE-DBD 低温等离子体的应用推广积累理论基础。对比现有研究现状,本文实验结果验证了 FE-DBD 低温等离

子体的放电形式为空气介质阻挡丝状式放电,且具有优异的灭菌性能,能够高效灭活以大肠杆菌为代表的革兰氏阴性菌和以金黄色葡萄球菌为代表的革兰氏阳性菌。

5 结论与展望

本文基于介质阻挡原理,研制了一款 FE-DBD 低温等离子体装置,并用此装置进行金黄色葡萄球菌和大肠杆菌灭活的研究。实验结果表明,该装置对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌具有明显的灭活作用。作用时间、作用距离对两种细菌灭活效果趋势是一致的。其中,随着作用时间从 5 s 增加到 30 s,细菌灭活效率逐渐增大;当作用时间为 30 s 时,细菌灭活效率达到 99.99% 以上。随着作用距离的增加,对两种细菌的灭菌效果均是递减的,即作用距离为 1 mm 时的灭菌效果优于 3 mm 和 5 mm。

目前对 FE-DBD 低温等离子体的研究,大多数以实验探索为主,理论研究和在临床应用中推广尚有诸多问题亟待进一步解决,如 FE-DBD 低温等离子体与生物组织的作用机制,对正常组织细胞的影响,如何设计高效且符合医用的等离子体装置等。

参 考 文 献

- [1] Laroussi M. Sterilization of contaminated matter with an atmospheric pressure plasma [J]. IEEE Transactions on Plasma Science, 1996, 24(3): 1188-1191.
- [2] Montie TC, Kelly-Wintenberg K, Roth JR. An overview of research using the one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP) for sterilization of surfaces and materials [J]. IEEE Transactions on Plasma Science, 2000, 28(1): 41-50.
- [3] Lu XP, Jiang ZH, Xiong Q, et al. A single electrode

- room-temperature plasma jet device for biomedical applications [J]. *Applied Physics Letters*, 2008, 92(15): 151504.
- [4] Xiong Z, Lu XP, Feng A, et al. Highly effective fungal inactivation in He+O₂ atmospheric-pressure nonequilibrium plasmas [J]. *Physics Plasmas*, 2010, 17(12): 123502.
- [5] Matthes R, Assadian O, Kramer A. Repeated applications of cold atmospheric pressure plasma does not induce resistance in staphylococcus aureus embedded in biofilms [J]. *GMS Hygiene and Infection Control*, 2014, 9(3): Doc 17.
- [6] Lu XP, Cao YG, Yang P, et al. An RC plasma device for sterilization of root canal of teeth [J]. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 2009, 37(5): 668-673.
- [7] 范明阳, 郝小龙. 大气压氮氧等离子体射流灭活表面大肠杆菌及其发射光谱分析研究 [J]. *核聚变与等离子体物理*, 2017, 37(1): 118-124.
- [8] Jiang CQ, Schaudinn C, Jaramillo DE, et al. *In vitro* antimicrobial effect of a cold plasma jet against *Enterococcus faecalis* biofilms [J]. *ISRN Dentistry*, 2012: 295736.
- [9] Pan J, Sun K, Liang YD, et al. Cold plasma therapy of a tooth root canal infected with *Enterococcus faecalis* biofilms *in vitro* [J]. *Journal of Endodontics*, 2013, 39(1): 105-110.
- [10] Morris AD, McCombs GB, Akan T, et al. Cold plasma technology: bactericidal effects on *Geobacillus stearothermophilus* and *Bacillus cereus* microorganisms [J]. *Journal of Dental Hygiene*, 2009, 83(2): 55-61.
- [11] Lee MH, Park BJ, Jin SC, et al. Removal and sterilization of biofilms and planktonic bacteria by microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure [J]. *New Journal of Physics*, 2009(11): 115022.
- [12] Lerouge S, Wertheimer MR, Yahia LH. Plasma sterilization: a review of parameters, mechanisms, and limitations [J]. *Plasmas and Polymers*, 2001, 6(3): 175-188.
- [13] Fuliful F, Khalaf MK, Abbas AH, et al. Inactivation efficacy staphylococcus aureus bacteria by a dielectric barrier discharge plasma jet [J]. *Journal of Applied Sciences Research*, 2017, 13(7): 28-34.
- [14] Kim YJ, Jin S, Han GH, et al. Plasma apparatuses for biomedical applications [J]. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 2015, 43(4): 944 -950.
- [15] 张波, 朱颖, 方志. 人体可接触的悬浮电极介质阻挡放电研究 [J]. *真空科学与技术学报*, 2017, 37(5): 475-483.
- [16] Fridman G, Peddinghaus M, Ayan H, et al. Blood coagulation and living tissue sterilization by floating-electrode dielectric barrier discharge in air [J]. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 2006, 26(4): 425-442.
- [17] Fridman G, Shereshevsky A, Jost MM, et al. Floating electrode dielectric barrier discharge plasma in air promoting apoptotic behavior in melanoma skin cancer cell lines [J]. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 2007, 27(2): 163-176.
- [18] 赵会超, 刘少斌, 李玉泉, 等. 基于 DBD 悬浮电极低温等离子体杀菌消毒仪研制 [J]. *核聚变与等离子体物理*, 2015, 35(1): 86-91.