

单极射频低温等离子体杀菌的实验研究*

谢娜¹, 饶国洲², 朱勇¹, 李子夏¹, 唐成芳¹, 姜鸣¹, 王丹杨¹

(1. 西安医学院口腔医学系, 西安 710021; 2. 西安交通大学口腔医院, 西安 710004)

摘要:目的 探讨单极射频低温等离子体在设定最佳参数下, 作用不同时间的杀菌效果及机理。方法 将金黄色葡萄球菌(ATCC25923)和大肠埃希菌(ATCC25922)标准菌株接种于营养琼脂平板, 37℃进行活化培养24 h, 挑取菌落以无菌生理盐水稀释成 10^5 cfu/ml细胞悬液, 取10 μ l均匀涂布在无菌载玻片上, 设对照组(照射前)和实验组(照射后), 每个作用时间设3个复片, 采用单极射频低温等离子体装置(参数设置为10 W, 10 KV, 10 KHz, He/O₂=2%, 2 L/min)对其进行照射。照射时间分别为5, 10, 40, 60, 300, 600, 720和900s, 通过菌落计数法计算杀灭率, 检测不同照射时间的杀灭效果, 电镜观察照射前后的细菌形态和超微结构的变化。结果 对照组: 金黄色葡萄球菌总数1 798 cfu/10 μ l; 大肠埃希菌总数2 563 cfu/10 μ l。实验组: 5, 10, 40, 60, 300, 600, 720和900s, 其存活菌数和杀灭率分别为金黄色葡萄球菌: 945 cfu/10 μ l (47.4%), 823 cfu/10 μ l (54.2%), 731 cfu/10 μ l (59.3%), 586 cfu/10 μ l (67.4%), 324 cfu/10 μ l (81.9%), 107 cfu/10 μ l (94.0%), 6 cfu/10 μ l (99.7%), 0 cfu/10 μ l (100%); 大肠埃希菌: 1 546 cfu/10 μ l (39.7%), 1 389 cfu/10 μ l (45.8%), 1 282 cfu/10 μ l (49.9%), 1 085 cfu/10 μ l (57.7%), 579 cfu/10 μ l (77.4%), 228 cfu/10 μ l (91.7%), 11 cfu/10 μ l (99.6%)和0 cfu/10 μ l (100%)。结果表明不同照射时间其存活菌数和杀灭效果有所不同, 其中照射900s时杀灭率达100%。电镜下观察可见金黄色葡萄球菌细胞壁破裂、模糊、溶解、胞浆内容物外流, 失去完整性, 胞内染色变浅, 核质疏松; 大肠埃希菌长度缩短、边缘粗糙、胞壁溶解、胞内出现空泡样改变。结论 单极射频低温等离子体能有效地杀灭革兰氏阳性球菌和革兰氏阴性杆菌, 其杀灭率随照射时间的延长而增加, 其机理与电离产生的带电粒子破坏细菌胞壁、脂蛋白、脂多糖及DNA的作用有关。

关键词: 低温等离子体; 杀菌作用; 金黄色葡萄球菌; 大肠埃希菌; 超微结构

中图分类号: R446.5 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)05-087-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.05.026

Experimental Study on Monopole Radio Frequency Low Temperature Plasma Sterilization

XIE Na¹, RAO Guo-zhou², ZHU Yong¹, LI Zi-xia¹, TANG Cheng-fang¹, LOU Ming¹, WANG Dan-yang¹ (1. Department of Stomatology, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China; 2. Hospital of Stomatology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect and mechanism of action of monopole radio frequency low temperature plasma in the optimal parameters. **Methods** *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) and *Escherichia coli* (ATCC25922) strain was inoculated in standard nutrient agar plate, 37℃ activated cultured 24 h. Colonies were picked with sterile normal saline and diluted to 10^5 cfu/ml cell suspension, taking 10 μ l sterile evenly coated on a glass slide. The control group (before irradiation) and the experimental group (after irradiation), each time setting the role of three complex pieces, were using low-temperature plasma unipolar radiofrequency device (parameter 10 W, 10 KV, 10 KHz, He/O₂=2%, 2 L/min) be irradiated. Irradiation time was 5, 10, 40, 60, 300, 600, 720, 900 s and the sterilization rate was calculated by colony counting method to detect the effect of different exposure times. The morphology and ultrastructure of bacteria was detected by scanning electron microscope (SEM). **Results** In the control group: *Staphylococcus aureus* was total 1 798 cfu/10 μ l and *Escherichia coli* was total 2 563 cfu/10 μ l. In the experimental group: 5, 10, 40, 60, 300, 600, 720, 900s and the *Staphylococcus aureus* survival bacteria and sterilization rates was: 945 cfu/10 μ l (47.4%), 823 cfu/10 μ l (54.2%), 731 cfu/10 μ l (59.3%), 586 cfu/10 μ l (67.4%), 324 cfu/10 μ l (81.9%), 107 cfu/10 μ l (94.0%), 6 cfu/10 μ l (99.7%), 0 cfu/10 μ l (100%). *Escherichia coli*: 1 546 cfu/10 μ l (39.7%), 1 389 cfu/10 μ l (45.8%), 1 282 cfu/10 μ l (49.9%), 1 085 cfu/10 μ l (57.7%), 579 cfu/10 μ l (77.4%), 228 cfu/10 μ l (91.7%), 11 cfu/10 μ l (99.6%) and 0 cfu/10 μ l (100%). The results showed that different exposure times and sterilization bacteria survival effects were different, among 900s irradiation to kill up to 100%. Through SEM, observed the cytoderm of *staphylococcus aureus* turned to be distorted or ruptured. Similarly, the *Escherichia coli* cytoderm was decomposed partly, and vacuolar degeneration was also aggravated. **Conclusion** Both Gram positive and negative

* 基金项目: 陕西省卫生厅科研项目(2014D19), 陕西省教育厅2012年科学研究项目(12JK0757), 陕西省教育厅专项科研计划项目(2013JK0784)。

作者简介: 谢娜(1983-), 女, 硕士, 口腔系助教, 主要从事教学及干细胞研究, E-mail: springna888@163.com。

通讯作者: 饶国洲, 男, 主任检验师(教授), 硕士生导师, 主要从事分子与细胞生物学研究。

bacteria could be sterilized by monopole radio frequency low temperature plasma. The sterilization rates were enhanced with the extended exposure time. The mechanism may be related with the charged particle produced by the ionization of plasma, which causes damage to cytoderm, lipoprotein, lipopolysaccharide and DNA.

Keywords: low temperature plasma; sterilization; *staphylococcus aureus*; *escherichia coli*; ultrastructure

低温等离子体杀菌与传统杀菌方法相比具有许多优点,如杀菌能力强、速度快、无毒害物质残留等特点,使得低温等离子体杀菌技术愈来愈受到人们的关注。金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌是医院临床感染中重要的致病菌,其在自然界中无处不在,可引起细菌性食物中毒、化脓性感染、腹泻等疾病,是一种常见的病原菌。低温等离子体作为一种新型的杀菌方式,由于其操作简便且对皮肤、组织不会造成损伤等优点而成为研究热点。

本实验的前期研究中已对等离子体的物理参数做过优化,设定在 10 W, 10 KV, 10 KHz, He/O₂ = 2%, 2 L/min 时,其在低温状态下杀菌效果最佳。故本实验以革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌和革兰氏阴性菌大肠埃希菌作为研究对象,旨在探讨单极射频低温等离子体作用不同时间对不同细菌的杀灭效果及杀菌机理,为今后低温等离子体用于口腔临床治疗提供实验参数及依据。

1 材料与方法

1.1 材料 金黄色葡萄球菌(ATCC25923);大肠埃希菌(ATCC25922),由西安交通大学口腔医院中心实验室保存(-86℃冰箱)。

1.2 主要试剂与仪器 营养琼脂平板(自配);生理盐水(自配);超净工作台(海尔);台式离心机(Sigma);恒温培养箱(Thermo);普通显微镜(O-LYMPUS);电子显微镜(荷兰);单极射频低温等离子体(装置由西安交通大学机械学院研制,并与西安交通大学口腔医院中心实验室合作对低温等离子体杀菌效果检测鉴定)。

1.3 方法

1.3.1 标准菌株活化培养:将保存在-86℃冰箱中的金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌菌株分别接种到营养琼脂平板上,置 37℃恒温培养箱中培养 24 h 后取出,放于 4℃冰箱中备用。制备细菌悬液:将以上两种活化后的细菌挑取单菌落接种于营养琼脂平板上,37℃条件下培养 24 h,刮下细菌菌落加无菌生理盐水混匀悬悬浮细菌,用计数板计数,并稀释制备成 10⁵ cfu/ml 细胞悬液,取 10 μl 均匀涂布在(24×24)mm 无菌载玻片上备用。

1.3.2 等离子体照射实验:将单极射频低温等离子体装置实验参数设置为 10 W, 10 KV, 10 KHz, He/O₂ = 2%, 2 L/min,照射距离与涂布有细菌的载玻片 3 mm 处,分别照射 5, 10, 40, 60, 300, 600, 720 和 900s,照射后的玻片放入无菌培养皿中加

10 ml 无菌生理盐水洗脱,取 1 ml 洗脱液接种到营养琼脂平板上,置 37℃恒温培养箱中培养 48 h 后取出进行活菌计数,计算杀菌率。灭菌效果用杀灭微生物的百分率即杀灭率表示,杀灭率采用下列公式计算:照射前细菌数(对照组) - 照射后细菌数 / 照射前细菌数(对照组) × 100%。

1.3.3 电镜观察:将低温等离子体处理后的细菌和未处理的对照组细菌离心沉淀,收集沉淀细菌送电镜室制作电镜样本,扫描电镜和透射电镜观察细菌形态和超微结构的变化。

2 结果

2.1 培养后细菌染色形态 金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌培养后经革兰氏染色,分别为革兰氏阳性球菌(金黄色葡萄球菌)和革兰氏阴性杆菌(大肠埃希菌),见图 1。

2.2 低温等离子体的杀菌效果 经菌落计数对照组金黄色葡萄球菌总数为 1 798 cfu/10 μl;大肠埃希菌总数为 2 563 cfu/10 μl,实验结果观察到低温等离子体照射后其杀灭率随照射时间的延长而增加,细菌存活数随照射时间的延长而减少,照射 900s 时其杀灭率达 100%,见表 1。

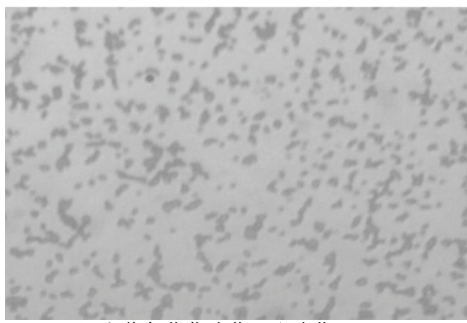
表 1 低温等离子体不同照射时间对细菌杀灭作用的影响

照射时间 (s)	金黄色葡萄球菌		大肠埃希菌	
	活菌数 (cfu/10 μl)	杀菌率 (%)	活菌数 (cfu/10 μl)	杀菌率 (%)
5	945	47.4	1 546	39.7
10	823	54.2	1 389	45.8
40	731	59.3	1 282	49.9
60	586	67.4	1 085	57.7
300	324	81.9	579	77.4
600	107	94.0	228	91.7
720	6	99.7	11	99.6
900	0	100.0	0	100.0

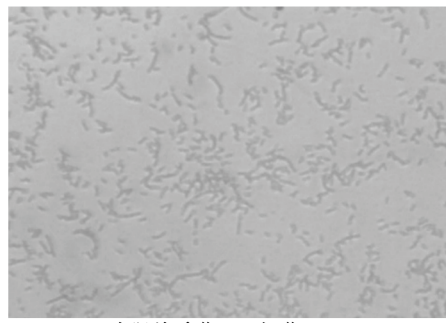
2.3 扫描电镜下细菌形态 低温等离子体照射处理 900s 后与对照组比较,在扫描电镜下金黄色葡萄球菌菌体破裂,菌体体积缩小;大肠埃希菌菌体皱缩变短,体积缩小,见图 2。

2.4 细菌超微结构的变化 低温等离子体照射处理 900s 后与对照组比较,在透射电镜下金黄色葡萄球菌细胞壁破裂、模糊、溶解、胞浆内容物外流,失去完整性,胞内染色变浅,核质疏松;大肠埃希菌长度缩短、边缘粗糙、胞壁溶解、胞内出现空泡样改变,见图 3。

3 讨论 杀菌消毒是医院工作的一个重要步骤和

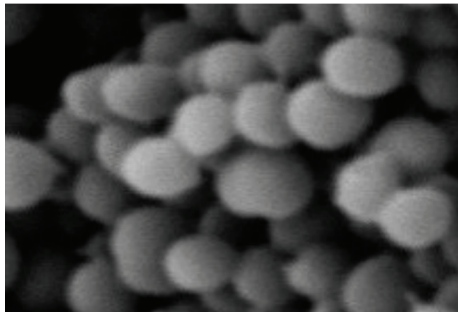


A:金黄色葡萄球菌(G^+ 球菌)($\times 400$)

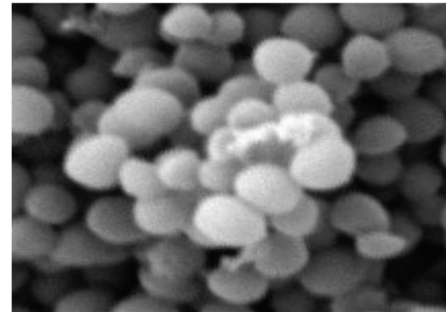


B:大肠埃希菌(G^- 杆菌)($\times 400$)

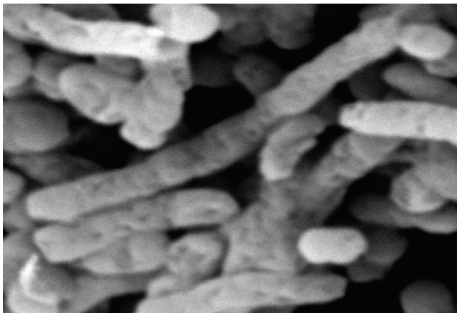
图1 革兰氏染色光镜下细菌形态



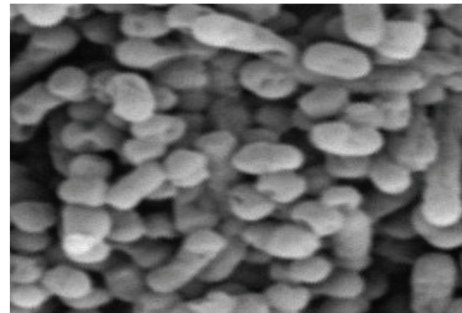
A:照射前金黄色葡萄球菌形态(对照组)($\times 50\,000$)



B:照射后金黄色葡萄球菌形态(实验组)($\times 50\,000$)

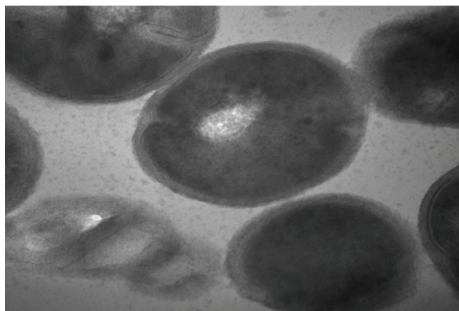


A:照射前大肠埃希菌形态(对照组)($\times 50\,000$)

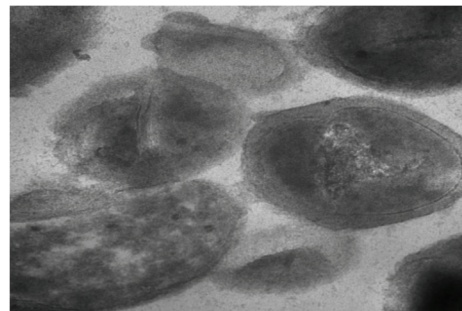


B:照射后大肠埃希菌形态(实验组)($\times 50\,000$)

图2 单极射频低温等离子体照射前、后扫描电镜下细菌形态



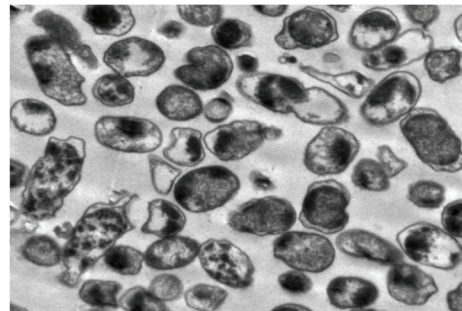
A:照射前金黄色葡萄球菌超微结构(对照组)($\times 100\,000$)



B:照射后金黄色葡萄球菌超微结构(实验组)($\times 100\,000$)



A:照射前大肠埃希菌超微结构(对照组)($\times 50\,000$)



B:照射后大肠埃希菌超微结构(实验组)($\times 50\,000$)

图3 单极射频低温等离子体照射前、后透射电镜下细菌超微结构

环节,它直接影响到人们的身体健康和生命安全, 长期以来得到极大重视。随着现代医学发展和研

究的不断深入,以及病原菌自身的变异和抗药性的不断增强使得医务工作者面临着严峻的挑战。口腔医疗工作也面临着同样的问题,尤其是在口腔疾病常规治疗过程中,如根管治疗中对根管消毒一般采用药物消毒和物理消毒方法。药物消毒主要包括氢氧化钙消毒剂、次氯酸钠、氯己定制剂、ED-TA、络合碘、甲硝唑类制剂、戊二醛溶液、激素类药物、甲醛和樟脑酚等。近年来认识到甲醛类药物有较强的细胞毒性和半抗原性,存在着造成根尖周组织损伤的可能,甚至有致癌和致突变作用。随着根管治疗技术的发展,氢氧化钙在根管治疗中的疗效得到肯定,但是氢氧化钙并不能完全杀死根管内的细菌。

等离子体分为高温等离子体、低温等离子体。高温等离子体在医院的医疗器械消毒等方面已有广泛应用,由于高温等离子体的热效应对组织及皮肤有一定的损伤,不适用于口腔内的杀菌治疗。低温等离子体流速均匀、流面积大、活性高,目前低温等离子体国内外对其机理和功能还处于探索阶段,低温等离子体是一种继固态、液态、气态之后的物质第四种状态^[1],是一种离子化气态物质,含气态分子、带电粒子、自由基、电子或辐射光子等^[2,3],其温度与人体温度相近,故对人体皮肤及组织不造成任何伤害和影响。等离子体杀菌是因为产生了大量带电粒子、活性自由基、紫外线及臭氧^[4~7]。如果将低温等离子体杀菌方法应用到口腔的根管治疗及其他治疗中,将有助于提高临床疗效和治愈率。因此,本试验将新型单极射频低温等离子体装置在前期的仪器物理参数优化下做杀菌实验研究,为下一步临床应用提供实验依据。

通过本次实验观察到单极射频低温等离子体照射后的杀菌效果,经照射处理 5, 10, 40, 60, 300, 600, 720 和 900s 后发现低温等离子体照射细菌其杀灭率随照射时间的延长而增加,细菌存活数随照射时间的延长而减少,不同照射时间其杀灭效率有所不同,照射 900s 时其杀灭率达 100%。电镜结果显示低温等离子体照射后金黄色葡萄球菌细胞壁破裂、模糊、溶解、胞浆内容物外流,失去完整性,胞内染色变浅核质疏松;大肠埃希菌长度变短、边缘粗糙、胞壁溶解、胞内出现空泡样改变,这与 Ma 等^[8]报道采用非平衡等离子处理结果相近。本实验结果表明单极射频低温等离子体能有效的杀灭革兰氏阳性球菌和革兰氏阴性杆菌。由此推测低温等离子体杀菌机理是紫外线主要作用于微生物 DNA,破坏细胞中 DNA 结构,使其丧失繁殖和自我复制能力,低温等离子体产生的电子会在细胞膜

表面聚集,其静电张力大于细胞膜表面张力,及高能粒子穿透细胞壁导致细胞膜破裂,活性离子(OH , O_3)对蛋白质和不饱和脂肪酸具有极强的氧化作用,由于这些综合因素的共同作用从而达到了有效的杀菌效果。

目前,本试验使用的低温等离子体的发射装置是以点状发射,其照射面积小,主要靠人工手动来移动照射面积和目测其照射距离,这样会造成照射死角和人为的误差并影响其杀菌效率,因此将有待于进一步改进。另外,不同的细菌由于其细胞壁及其内部的结构有所不同,所以对照射的敏感性和杀菌的效果也有所不同^[9],有关低温等离子体的杀菌机理还有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Morfill G, Kong MG, Zimmernann J. Focus on plasma medicine[J]. New Journal of Physical, 2009, 11(11): 1150-1158.
- [2] Koban I, Holtfreter B, Hubner NO, et al. Antimicrobial efficacy of Non-thermal plasma in comparison to chlorhexidine against dental biofilms on titanium discs in vitro-proof of principle experiment [J]. Journal Clinical Periodontology, 2011, 38(10): 956-965.
- [3] Joshi SG, Cooper M, Yost A, et al. Non-thermal dielectric-barrier discharge plasma-induced inactivation involves oxidative DNA damage and membrane lipid peroxidation in *Escherichia coli* [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011, 55(3): 1053-1062.
- [4] 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.
- [5] Lei X, Rui Z, Peng L, et al. Sterilization of *E. coli* bacterium with an atmospheric pressure surface barrier discharge[J]. Chinese Physics, 2004, 13(6): 913-917.
- [6] Sato T, Miyahara T, Doi A, et al. Sterilization mechanism for *Escherichia coli* by plasma flow at atmospheric pressure[J]. Applied Physics Letters, 2006, 89(7): 450-454.
- [7] Sohbatazadeh F, Colagar AH, Mirzanejhad S, et al. *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *B. cereus* bacteria sterilization using afterglow of non-thermal plasma at atmospheric pressure[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 160(7): 1978-1984.
- [8] Ma Y, Zhang GJ, Shi XM, et al. Chemical mechanisms of bacteril inactivation using dielectric barrier discharge plasma in atmospheric air[J]. IEEE Transactions on Plasma Science, 2008, 36(4): 1615-1620.
- [9] Rocas IN, Siqueira JF, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases[J]. Journal of Endodontics, 2004, 30(5): 315-320.