

УДК 537.523/527; 533.9.004.14

Применение плазменной струи тлеющего разряда атмосферного давления на постоянном токе для инактивации *Staphylococcus aureus*

А.А. Кириллов, А.В. Павлова, Е.А. Сафронов, Л.В. Симончик, Н.В. Дудчик

*Представлены результаты определения химического состава плазменных струй тлеющего разряда атмосферного давления на постоянном токе в различных газовых смесях методами эмиссионной и абсорбционной спектроскопии и их инактивационного воздействия на поверхность агаризованной питательной среды, контаминированной бактериями *Staphylococcus aureus*.*

PACS: 52.77.—j; 82.80.Dx

Ключевые слова: неравновесная плазма, эмиссионная спектроскопия, ИК абсорбционная спектроскопия, инактивация микроорганизмов.

Введение

К настоящему времени разработаны различные источники неравновесной плазмы атмосферного давления, перспективные для биомедицинских приложений [1–3], среди которых особое место занимают плазменные струи, позволяющие проводить обработку объектов различных форм и размеров вне замкнутого разрядного объема. Несмотря на обилие работ, в которых демонстрируются попытки использования плазменных источников в биомедицине, механизмы воздействия плазменных струй на микроорганизмы остаются недостаточно изученными.

В работе приводятся результаты исследования низкотемпературных плазменных струй тлеющего разряда атмосферного давления (ТРАД) на постоянном токе [4] в различных плазмообразующих газах и их использование для инактивации бактерий *Staphylococcus aureus*. Применяемые плазменные струи являются стационарными, что существенно облегчает установление взаимосвя-

зей между инактивационной способностью струй и параметрами их плазмы.

Описание установки

Разрядное устройство представляет собой кварцевую цилиндрическую разрядную камеру с внутренним диаметром 8 мм, внутри которой соосно расположены закругленный катод (стержень диаметром 6 мм) и плоский анод толщиной 4 мм из нержавеющей стали, между которыми зажигался ТРАД на постоянном токе. Межэлектродный промежуток равен 1 мм, рабочее значение тока разряда составляло 30 мА. Расход рабочего газа устанавливался равным 3 л/мин. Генерируемая в ТРАД плазма выносится вместе с потоком газа через центральное отверстие в аноде диаметром 1,5 мм в окружающий воздух на расстояние до нескольких сантиметров (видимое свечение плазмы), при этом диаметр струи составляет 2–3 мм. Разряд поддерживался нестабилизированным источником питания постоянного тока с выходным напряжением до 1,5 кВ с балластным резистором около 10 кОм. Плазменные струи ТРАД, истекающие в воздух, были получены для различных плазмообразующих газов и смесей, таких как 95%He–5%O₂, 95%Ar–5%O₂, N₂ и воздух.

Плазменная обработка микроорганизмов

Бактерицидная эффективность разработанных плазменных струй исследовалась на грамположительных бактериях *Staphylococcus aureus*. Используемый в работе штамм *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 имеет типичные биохимические характеристики вида, обладает высокой устойчивостью к высушиванию и воздействию других неблагоприятных факторов окружающей среды.

Кириллов Андрей Алексеевич, ст. научн. сотрудник.
 Павлова Александра Витальевна, мл. научн. сотрудник.
 Сафронов Евгений Александрович, научный сотрудник.
 Симончик Леонид Васильевич, зав. лабораторией.
 Институт физики им. Б.И. Степанова НАН Беларуси.
 Беларусь, 220072, Минск, пр-т Независимости, 68,
 Тел.: +375 17 2841430.
 E-mail: a.kirillov@ifanbel.bas-net.by;
 y.safronau@ifanbel.bas-net.by
 Дудчик Наталья Владимировна, зав. лабораторией.
 Республиканский научно-практический центр гигиены.
 Беларусь, 220012, Минск, ул. Академическая, 8.
 Тел.: +375 17 2841385. E-mail: n_dudchik@tut.by

Статья поступила в редакцию 20 октября 2013 г.

© Кириллов А.А., Павлова А.В., Сафронов Е.А., Симончик Л.В., Дудчик Н.В., 2013

Суспензия микроорганизмов с исходной концентрацией 10^7 КОЕ/мл помещались на поверхность недифференцированной плотной питательной среды в чашках Петри. После приготовления образцов центральная зона каждого из 4-х секторов 90-миллиметровой чашки Петри обрабатывалась плазменной струей ТРАД с различным временем экспозиции. Температура струи в точке воздействия на бактерии контролировалась с помощью хромель-алюмелевой термопары и на выбранном расстоянии 4 см между анодом и поверхностью агара не превышала 45°C .

Определение инактивационной способности плазмы производилось методом счета колоний. Для этого после плазменной обработки пластины агара культивировались в течении 18 часов при температуре 37°C . Количество выросших макроколоний давало число выживших микроорганизмов на образце.

Результаты обработки *S. aureus* в течении 10 мин. плазменными струями, полученными в различных плазмообразующих газовых смесях, представлены на рис. 1. В случае струй Ar/O_2 и He/O_2 бактерицидный эффект приблизительно одинаков, что можно заключить по числу колоний в соответствующих секторах чашки Петри. Этот эффект существенно слабее при обработке азотной струей. Наилучший инактивационный эффект наблюдался для воздушной струи (остались единичные колонии по краям сектора). Следует отметить, что, несмотря на малый диаметр струи, инактивация происходит по всей площади секторов для всех газовых смесей.

Для выяснения влияния плазменной обработки на свойства питательной среды стерильные чашки Петри с агаризованной питательной средой обрабатывались воздушной плазменной струей с последующим высевом бактерий. Получено, что плотность выросших колоний на поверхности питательной среды, обработанной и не обработанной плазмой, одинакова. Это позволяет сделать вывод, что инактивация происходит вследствие непосредственного воздействия плазмы на микроорганизмы.

Спектральные характеристики и бактерицидные компоненты плазменных струй

Эмиссионные спектры излучения струй регистрировались с использованием дифракционного монохроматора МДД 500'2. Изображение части струи, расположенной на 1 см ниже края анода, фокусировалось (1:1) в плоскости входной щели монохроматора высотой 1 см, которая располагалась параллельно струе. В бактерицид-

ном диапазоне 200–300 нм в спектрах азотной и воздушной струй наблюдалось излучение, обусловленное полосами NO. Как показано в [5], освещенность поверхности образца с бактериями из-за света плазмы струй очень низка и не может играть существенной роли в гибели микроорганизмов. В спектрах излучения всех струй, за исключением азотной, присутствует интенсивная полоса OH (A–X). В спектре азотной струи преобладают интенсивные полосы NO, CN, NH в ультрафиолетовой части спектра. Напротив, спектр воздушной струи (рис.2), в основном, сосредоточен в диапазоне свыше 400 нм, где наблюдается активное свечение NO_2 , обусловленное трехчастичной хемиллюминесцентной реакцией $\text{NO} + \text{O} + \text{M} \rightarrow \text{NO}_2 + \text{M} + h\nu$ [6].

Для анализа состава плазменных струй методом абсорбционной ИК-спектроскопии ис-

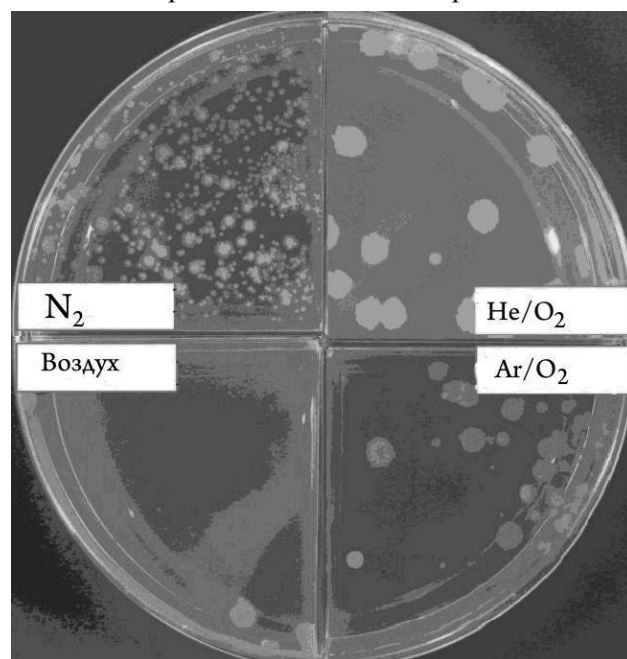


Рис. 1. Результаты инактивации *S. aureus* плазменными струями N_2 , Ar/O_2 , He/O_2 и воздуха после 10 мин. обработки

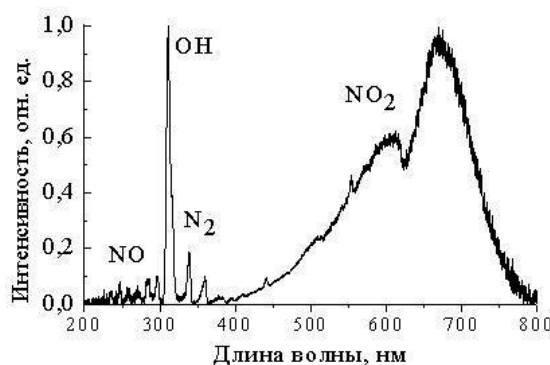


Рис. 2. Спектр излучения воздушной плазменной струи ТРАД на постоянном токе.

пользовался Фурье-спектрометр Nexus фирмы Thermo-Nicolet и газовая кювета 186–0305 фирмы Perkin-Elmer с окнами из германия. ИК-спектры регистрировались в спектральном диапазоне 600–4000 см^{-1} с разрешением 2 см^{-1} после 128 сканов с использованием DTGS-детектора. Оптический путь газовой кюветы составлял 135 см. Была выбрана треугольная функция аподизации, приводящая к дифракционной аппаратной функции, что позволило определить мольные доли бактерицидных компонент струй, сопоставляя экспериментальные и расчетные спектры поглощения. Вычисление спектров поглощения осуществлялось с использованием базы спектральных данных Hitran [7]. Забор газа в кювету проводился с помощью трубки диаметром 3,5 мм, которая помещалась на ось струи параллельно газовому потоку.

В спектрах поглощения всех струй наблюдаются колебательно-вращательные полосы H_2O и CO_2 . Эти газовые компоненты либо присутствуют в плазмообразующем газе (воздух), либо подмешиваются в струю (He/O_2 , Ar/O_2 и N_2) из окружающего воздуха. Поскольку интерес представляют компоненты струй, воздействие которых приводит к гибели микроорганизмов, то из спектров поглощения полосы H_2O и CO_2 удалялись путем вычитания. В спектрах поглощения струй He/O_2 и Ar/O_2 имеется колебательно-вращательная полоса озона (1000–1080 см^{-1}). В струе He/O_2 мольная доля O_3 вблизи отверстия в аноде составляет 150 ppm и, немного увеличившись при удалении от анода, затем спадает на расстоянии 4 см к величине 80 ppm. Содержание озона в струе Ar/O_2 в 1,3 раза ниже. В спектре воздушной струи присутствуют полосы оксида азота, диоксида азота, оксида диазота и азотистой кислоты (см. рис. 3). Мольные доли NO , NO_2 , N_2O и HNO_2 монотонно убывают от 400 ppm, 350 ppm, 6 ppm и 100 ppm вблизи анода до 40 ppm, 20 ppm, 1 ppm и 10 ppm на расстоянии 4 см. В азотной струе вблизи отверстия диоксид азота практически отсутствует. При удалении от анода его мольная доля вначале увеличивается до 10 ppm и затем на расстоянии большем, чем 1 см, спадает. Концентрация NO_2 в азотной струе ниже, чем в воздушной струе, более чем на порядок величины. Концентрация N_2O в азотной струе монотонно убывает и ниже, чем в воздушной, в несколько раз.

Вследствие высоких констант скоростей реакций гидроксила OH с присутствующими в струях продуктами плазмохимических реакций [8], в том числе и указанными выше бактерицидными компонентами, концентрация OH резко убывает, как только прекращается его образование, и на рас-

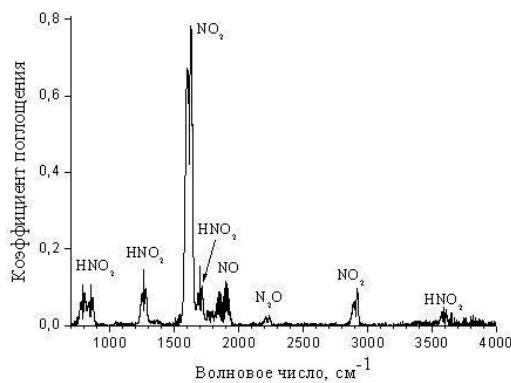


Рис. 3. Спектр поглощения газовых компонент воздушной струи за вычетом H_2O и CO_2 вблизи анода

стоянии 4 см от отверстия OH практически отсутствует. По этой же причине гидроксил OH не мог быть зарегистрирован с помощью используемой нами методики абсорбционной спектроскопии, т.к. спектр поглощения записывался не непосредственно в струе, а спустя какое-то время после забора газа в кювету и установки ее в Фурье-спектрометр.

Таким образом, основным фактором инактивационного действия исследуемых плазменных струй на бактерии *Staphylococcus aureus* являются химически активные молекулярные газовые компоненты. В He/O_2 и Ar/O_2 струях это озон, мольные доли которого на расстоянии 4 см от анода, где размещаются образцы с микроорганизмами, составляют, соответственно, 80 ppm и 60 ppm, а в воздушной струе — оксид азота, диоксид азота и азотистая кислота с мольными долями 40 ppm, 20 ppm и 10 ppm. Концентрация бактерицидных компонент в азотной струе ниже, чем в воздушной, более чем на порядок величины.

Заключение

Проведено исследование воздействия He/O_2 , Ar/O_2 , воздушной и азотной плазменных струй на основе ТРАД на постоянном токе на бактерии *Staphylococcus aureus*. Наименьший инактивационный эффект наблюдался при использовании азотной струи, наибольший — при использовании воздушной струи, обработка которой поверхности питательной среды площадью 15 см^2 , засеянной свежей культурой золотистого стафилококка с поверхностной плотностью 10^5 – 10^6 КОЕ/ см^2 приводит к биодеконтаминации за время 10 мин. Причиной высокой бактерицидности воздушной струи, по-видимому, является наличие в ней оксида азота, диоксида азота и азотистой кислоты, мольные доли которых составляют 40 ppm, 20 ppm и 10 ppm, что суммарно приблизительно равно мольной доли озона — бактерицидной компоненты He/O_2 и Ar/O_2 плазменных струй, воздействие

которых на микроорганизмы менее эффективно. Полученный результат показывает, что созданная плазменная струя ТРАД является перспективной для биомедицинских приложений.

*Работа выполнена при частичной финансовой поддержке
Белорусского республиканского фонда фундаментальных
исследований (грант Ф13М-063).*

Литература

1. Kong M.G., Kroesen G., Morfill G., et al. // New Journal of Physics. 2009. V. 11. P. 115012

2. Weltmann K.D., Kindel E., Woedtke T., et al. // Pure Appl. Chem. 2010. V. 82. No. 6. P. 1223

3. Lu X., Laroussi M., Puech V. // Plasma Sources Sci. Technol. 2012. V. 21. No. 3. P. 034005

4. Arkhipenko V.I., Kirillov A.A., Safronau Ya.A., Simonchik L.V. // Eur. Phys. J. D. 2010. V. 60. P. 455.

5. Kolb J.F., Mattson A.M., Edelblute C.M., et al. // IEEE Trans. Plasma Sci. 2012. V. 40. No. 11. P. 3007

6. Becker K.H., Groth W., Thran D. // Chem. Phys. Letters. 1972. V. 15. No. 2. P. 215

7. <http://www.cfa.harvard.edu/HITRAN/>

8. Atkinson R., Baulch D. L., Cox R. A., et al.. // Atmos. Chem. Phys. 2004. V. 4. No. 6. P. 1461

DC atmospheric pressure glow discharge plasma jet application for *Staphylococcus aureus* inactivation

A.A. Kirillov¹, A.V. Paulava¹, Y.A. Safronau¹, L.V. Simonchik¹, and N.V. Dudchik²

¹Stepanov Institute of Physics NAS of Belarus
68 Nezalezhnastsi Ave. Minsk, 220072, Belarus
E-mail: y.safronau@ifanbel.bas-net.by

²Republican Scientific-Practical Center of Hygiene
8 Akademichnaya str. Minsk, 220012, Belarus

E-mail: n_dudchik@tut.by

*The results of chemical analysis of dc atmospheric pressure glow discharge plasma jets in various gas mixtures using emission and absorption spectroscopy methods are presented as well as bacteria inactivation effect of the jets acting on the surface of nutrient agar medium contaminated with *Staphylococcus aureus*.*

PACS: 52.77.—j; 82.80.Dx

Keywords: nonequilibrium plasma, emission spectroscopy, infrared absorption spectroscopy, inactivation of microorganisms.

Bibliography — 8 references

Received October 20, 2013