

基于强电场放电的 ROS 制取及喷淋杀灭细菌芽孢试验

蔡丽娇, 张芝涛, 高金莹, 金忠林

(大连海事大学 环境工程研究所, 辽宁 大连 116026)

摘要: 利用强电离放电等离子体制取活性氧(reactive oxygen species, ROS), 将 ROS 溶液以喷淋方式喷出处理染有枯草芽孢杆菌黑色变种菌悬液的载体, 通过试验考察 pH 值、溶液温度、喷淋时间、ROS 溶液作用时间等因素对细菌芽孢悬液杀灭率的影响。试验结果表明: 碱性条件下枯草芽孢杆菌黑色变种快速杀灭率高于酸性条件; 模拟战剂杀灭率随温度降低、喷淋时间以及溶液对其作用时间延长而增大; 各因素对模拟战剂杀灭率的影响由强到弱顺序为: 作用时间, 喷淋时间, pH 值, 溶液温度。

关键词: 强电离放电等离子体; ROS 溶液; 枯草芽孢杆菌黑色变种

中图分类号: X703

文献标志码: A

文章编号: 1007-7162(2011)03-0005-04

目前紧急应对灾区疫情防疫的消杀剂主要有戊二醛、过氧化氢、甲醛、环氧乙烷等^[1-4], 但是这些消杀剂大多存在着致死速率低、杀灭效果不显著、易造成二次污染等问题, 因此研制出一种高效、广谱、快速、无二次污染、无副作用的“绿色”消杀剂, 已成为全球的热点关注问题。

活性氧(reactive oxygen species, ROS), 有时也

称为氧自由基(oxygen radical), 是一般具有较强氧化性质的普通分子与氧自由基的统称^[5], 而强电离放电 ROS 是采用白希尧等^[6]研制的等离子体发生装置, 通过使用特殊的电介质层和特殊的加工工艺, 在常温常压下通过强电场将水与氧气电离, 最终通过高效混溶装置, 制取含有大量活性氧粒子的 ROS 溶液。制取机制如图 1 所示。

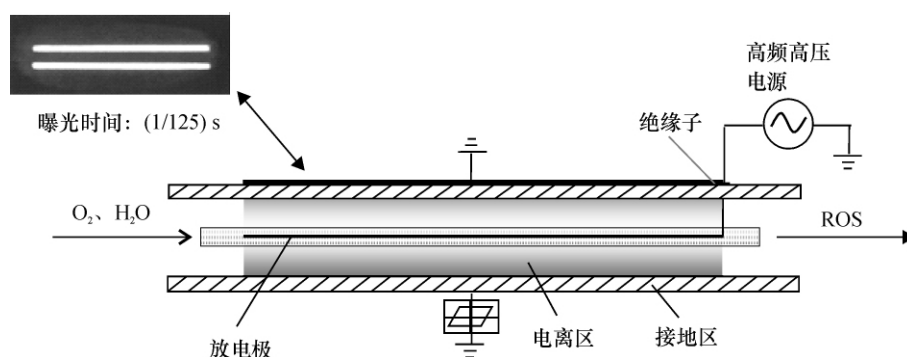


图 1 强电场电离制取 ROS 机制

ROS 溶液在消毒杀菌技术上具有高效、无选择性、杀菌彻底等优点。这是因 ROS 具有极强的氧化性, 可无选择性地破坏细菌的细胞膜, 并渗透到细胞内破坏有机物的链状结构, 从而使细胞死亡^[7]。

按照《实验室安全标准》要求, 本试验选取《消毒技术规范》中细菌芽孢的代表, 枯草芽孢杆菌黑色变种(*Bacillus subtilis* var. *niger*) ATCC9732 作为细菌芽孢代表物。基于强电场电离放电制取 ROS, 对细

菌芽孢菌悬液进行载体喷淋, 考察 ROS 溶液的 pH 值、水温、喷淋时间及暴露时间等因素对杀灭率的影响, 验证基于强电离放电制取 ROS 溶液杀灭细菌芽孢的有效性。

1 材料与方法

1.1 试剂

1% 硫代硫酸钠溶液, PBS 洗脱液为 0.03 mol/L

收稿日期: 2011-05-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(50877005)

作者简介: 蔡丽娇(1986-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为等离子体应用。

的磷酸盐缓冲溶液, $\text{pH} = 7.2$.

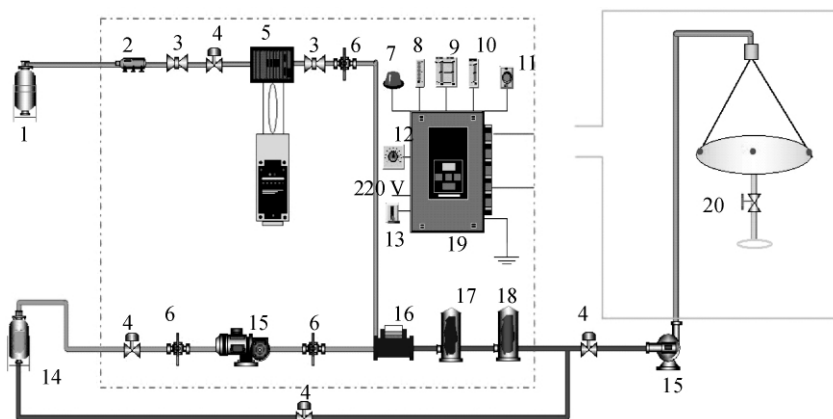
1.2 菌种

枯草芽孢杆菌黑色变种(*Bacillus subtilis* var. *niger*) ATCC9732, 为实验室保存菌种, 购置于中国工业微生物菌种保藏管理中心.

1.3 仪器与装置

紫外-可见分光光度计(CE2501, 英国 CECIL

公司), 显微镜(CX31RTSF, 日本 Olympus 公司), 垂直净化工作台(YJ-875B, 上海阳光试验仪器有限公司), CO_2 培养箱(Hera cell150, 美国 Thermo 公司), 涡旋振荡器(PVC-2400, GRANT-BIO 公司), 实验室 pH 计(Seven Easy, 梅特勒-托利多仪器有限公司), 活性氧溶液制备器(大连海事大学环境工程研究所). 实验流程如图 2 所示.



1. 氧气罐; 2. 过滤器; 3. 电磁阀; 4. 流量阀; 5. ROS 源; 6. 止回阀; 7. 报警; 8. 液位表; 9. 功率调节表; 10. 温度表; 11. 开关; 12. 压力表; 13. 气流表; 14. 水箱; 15. 泵; 16. 文丘里; 17. 缓冲器; 18. 混合器; 19. 控制单元; 20. 长度调节; 21. 冷却系统

图2 试验反应流程图

1.4 试验方法

将活性氧溶液制备装置开启, 待系统稳定后(约 24 min), 在密闭模拟试验场进行定量杀菌喷淋试验.

1.4.1 中和剂实验

根据《消毒技术规范》进行中和剂试验, 试验菌悬液浓度稀释到 5×10^5 cfu/mL.

1.4.2 定量喷淋杀菌试验

按照《消毒技术规范》进行细菌芽孢培养, 当细菌芽孢形成率达 95% 以上时, 将模拟战剂浓度稀释为 1.0×10^6 cfu/mL 后, 取 10 μL , 进行染菌. 将装有染菌片的无菌培养皿放在灭菌取样点规定位置, 开启喷淋装置. 喷淋后, 待活性氧溶液在染菌片上作用一定时间后, 迅速滴加相应剂量的中和剂, 中和 10 min, 再分别将菌悬液稀释到适当浓度, 进行活菌计数, 计数时, 每组 3 个平行样, 取平均值, 杀灭率之间差别采用 t 检验. 对照组以不含氧活性粒子的水溶液代替消毒液, 其他操作相同.

1.4.3 复活试验

在溶液温度为 20 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 为 7.2 时, 将不同喷淋时间下处理后的样品安放在无菌环境下, 在杀灭后的 24、36、48、72 和 96 h 进行活菌计数培养, 以观察

常态下枯草芽孢杆菌黑色变种经活性氧溶液作用后, 有无复活现象出现.

2 结果与讨论

2.1 pH 值的影响

试验条件: 环境温度 $T_1 = 23$ $^{\circ}\text{C}$, 环境相对湿度 $D = 42.6\%$, 溶液温度 $T_2 = 20$ $^{\circ}\text{C}$, 喷淋时间 $t = 2$ s, 保持制备装置氧气通入量为 4 L/min, 试验结果如图 3 所示.

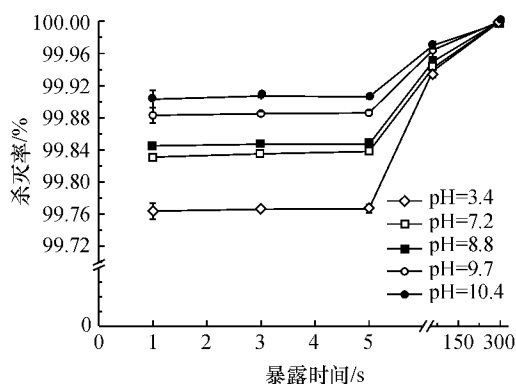


图3 pH 值对杀灭率的影响

由图 3 可知, 在相同时间作用条件下, 枯草芽孢杆菌黑色变种的杀灭率随着溶液的 pH 值增高而不

断提高,碱性条件下的杀灭效果高于酸性条件下,但是随着作用时间的延长,酸性条件下杀灭率提高效果显著. 活性氧溶液中含有超氧阴离子自由基($\cdot O_2^-$)、氢过氧基($\cdot HO_2$)、羟基自由基($\cdot OH$)及臭氧(O_3),而其中的臭氧浓度较高. 臭氧在酸、碱性条件下的标准电极电位分别为 2.07 V 和 1.24 V,因此臭氧本身在酸性条件下的氧化能力高于碱性条件下的氧化能力. 而试验结果显示,碱性条件下的杀灭率高于酸性条件下的杀灭率,这是因为,臭氧传质到水中后会发生分解反应,生成氧化能力很强的羟基自由基(标准电极电位 2.81 V)等氧化能力高于臭氧的活性氧物质. 臭氧分解产生自由基的引发剂为($\cdot OH$)^[8],随着 pH 值的不断增大,ROS 溶液的氧化能力不断增强,在相同作用时间下的枯草芽孢杆菌黑色变种杀灭率增大. 由于杀灭率受溶液酸碱性影响,因此以下试验均在 pH = 7.2 的中性溶液下进行.

2.2 溶液温度的影响

试验条件: 环境相对湿度 $D = 42.6\%$, 溶液 pH = 7.2, 喷淋时间 $t = 2$ s, 保持制备装置氧气通入量为 4 L/min, 为了模拟防疫现场, 通过改变环境温度从而使水温发生变化, 试验结果如图 4 所示.

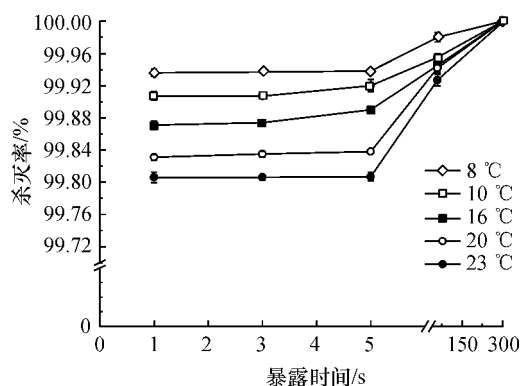


图4 溶液温度对杀灭率的影响

芽孢杆菌属细菌由于可以产生抗逆性内生孢子, 因此可以耐受高低温, 但是由试验结果发现, 使用 ROS 溶液对枯草芽孢杆菌黑色变种进行灭活, 杀灭效果随着温度的降低而不断增强, 并且在相同水温条件下, 杀灭率随消杀剂作用时间的增长而逐渐提高. 这可能是由于, 一方面高温不利于溶液吸收氧活性物质, 另一方面($\cdot OH$)易在低温条件下生成, 高温促进($\cdot OH$)及活性物质的分解. 因此, 溶液温度对于模拟战剂杀灭效果的影响, 主要是通过消杀剂成分的改变来实现的, 溶液温度变化对模拟战剂性质并无显著影响.

2.3 喷淋时间的影响

试验条件: 环境温度 $T_1 = 23$ °C, 溶液 pH = 7.2, 环境相对湿度 $D = 42.6\%$, 溶液温度 $T_2 = 20$ °C, 保持制备装置氧气通入量为 4 L/min, 不同喷淋时间下, 消杀剂覆盖模拟战剂载体的密度如图 5 所示, 试验结果如图 6 所示.

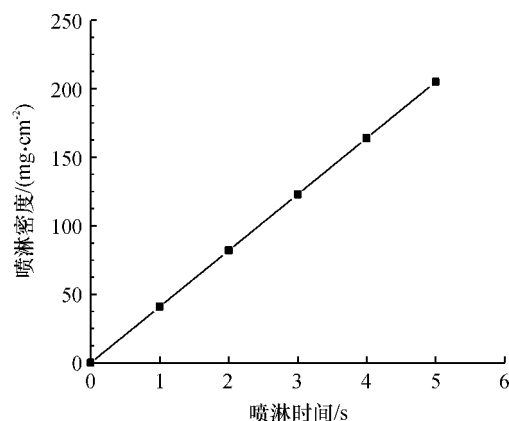


图5 喷淋密度与喷淋时间的关系

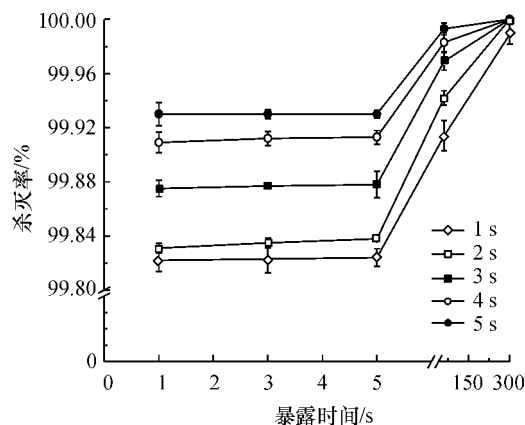


图6 喷淋时间对杀灭率的影响

通过试验发现, 随着喷淋时间的延长, 使消杀剂覆盖模拟战剂载体的密度增大, 进而使 ROS 溶液中氧活性粒子撞击靶目标的中靶率增高, 促进活性氧粒子与模拟战剂的生化反应进行. 因此, 枯草芽孢杆菌黑色变种的杀灭率随着 ROS 溶液喷淋时间延长而增大, 当喷淋时间达 2 s 时, 保持作用时间 1 min 时, 杀灭率可达 99.9% 以上, 达到《中华人民共和国国家标准消毒灭菌效果的评价方法与标准》要求, 所以在 pH 值影响与溶液温度影响试验研究中, 选取喷淋时间为 2 s 即可, 若喷淋时间延长易造成消杀剂流失浪费.

2.4 正交实验结果

由单因素试验结果确定正交实验的因素及水平, 见表 1. 根据正交实验方法, 采用 $L_9(3^4)$ 表安排试验, 结果见表 2.

表1 正交因素水平表

	A	B	C	D
	pH	溶液温度/℃	喷淋时间/s	暴露时间/s
水平	1、2、3	1、2、3	1、2、3	1、2、3
数值	3、4、7、2、10、4	8、16、23	1、2、3	5、60、300

表2 正交试验结果

试验号	A	B	C	D	杀灭率/%
1	1	1	1	1	99.761
2	1	2	2	2	99.954
3	1	3	3	3	100.000
4	2	1	2	3	100.000
5	2	2	3	1	99.992
6	2	3	1	2	99.914
7	3	1	3	2	100.000
8	3	2	1	3	99.990
9	3	3	2	3	99.906
k_1	99.905	99.920	99.888	99.886	k 为 同水平 平均值
k_2	99.969	99.979	99.953	99.956	
k_3	99.965	99.940	99.997	99.997	
R	0.064	0.006	0.109	0.111	R 为极差
优方案	A_2	B_2	C_3	D_3	

由实验结果可知,ROS 溶液杀灭载体模拟生物战剂的最佳方案为 $A_2B_2C_3D_3$. 即在 pH 值为 7.2 时,调节溶液温度为 16℃,开启喷淋装置,喷淋 3 s 后保持 ROS 溶液作用 5 min. 在此条件下,可保证芽孢细菌百分之百致死. 另外,通过正交实验中的极差值可知,各因素对 ROS 溶液喷淋致死载体枯草芽孢杆菌黑色变种的影响主次顺序为: 作用时间 > 喷淋时间 > pH 值 > 溶液温度. 因此,在应用 ROS 溶液杀灭细菌时,应主要注意保持 ROS 溶液对细菌的作用时间.

3 结论

应用强电离放电等离子体制取 ROS 以喷淋方式可以有效地灭活枯草芽孢杆菌黑色变种悬液载体,具有高效、快速、环保等特点,是“绿色”消毒防疫技术. 从整体上看,碱性条件下更有利于 ROS 溶液快速致死细菌芽孢; 随着溶液温度的降低,ROS 溶液致死细菌芽孢的效率不断提高; 随着喷淋时间与作用时间的延长,细菌芽孢杀灭率增大,在喷淋时间为 2 s 时,杀灭率已达到《中华人民共和国国家标准消毒灭菌效果的评价方法与标准》要求; 各因素对 ROS 溶液处理枯草芽孢杆菌黑色变种悬液载体的影响顺序为: 暴露时间 > 喷淋时间 > pH 值 > 溶液温度.

参考文献:

- [1] 袁治勋. 常用消毒与灭菌方法 [J]. 中国消毒学杂志, 2010, 27(2): 34-35.
- [2] 胡国清. 我国突发公共卫生事件应对能力评价体系研究 [J]. 中南大学流行病学与卫生统计学院, 2006.
- [3] 胡国庆. 消毒服务机构的监督检查管理和要求 [J]. 中国消毒学杂志, 2010, 27(6): 56-78.
- [4] Van Doornmalen JPCM, Kopinga K. Temperature dependence of F-D-and z-values used in steam sterilization processes [J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 107(3): 1054.
- [5] 李培峰, 方允中. 活性氧对蛋白质的损伤作用 [J]. 生命的化学, 1994, 14(6): 1-3.
- [6] Riebel A H. Ozonation of carbon-nitrogen bonds. I. Nucleophilic attack of ozone [J]. J Am Chem Soc, 1960, 82: 1801-1807.
- [7] 郑荣梁. 自由基生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1992.
- [8] 陈岚. 除草剂 2,4-D 的 O_3 、 O_3/H_2O_2 高级氧化技术研究 [J]. 杭州: 浙江大学环境与资源学院, 2005.

Experiments of ROS Spraying Killing Ore Bacteria Based on Strong Ionization

Cai Li-jiao, Zhang Zhi-tao, Gao Jin-ying, Jin Zhong-lin

(Institute of Environmental Engineering, Dalian Maritime University, Dalian 116026, China)

Abstract: Reactive Oxygen Species (ROS) solution, which was produced through strong ionization discharging plasma, was used to kill *Bacillus subtilis* var. niger. ROS solution was sprayed to cope with biological pollution. Several operation parameters, such as PH value, solution temperature, spraying time and effect time, were studied. The effects of operating conditions on the killing rate of *Bacillus subtilis* var. niger were analyzed. The results show that the treatment efficiency of *Bacillus subtilis* var. niger in alkaline solution is higher than that in acid solution. The killing rate of *Bacillus subtilis* var. niger increases with the decrease of the temperature and the increase of the spraying time and effect time. , and the order of strength of the affecting factors is effect time > spraying time > pH value > solution temperature.

Key words: strong ionization discharging plasma; ROS solution; *Bacillus subtilis* var. niger