·调查研究·

水中细菌的低温等离子体灭活效果

张灿[1],刘文君[2],张明露[3],田芳[4],宋美娟[5],安代志[1],刘渭平[3]

1.军事医学科学院疾病预防控制所,北京 100071;2.清华大学环境学院;3.北京工商大学食品学院;
4.南京工程学院环境工程学院;5.曲阜市人民医院肾内科

摘要:目的 评价低温等离子体灭活水中细菌的效果,探讨等离子体效应对革兰阴性菌和革兰阳性菌的灭活机制。**方法** 观察低温等离子体与水中初始浓度为(9.60±1.23)×10⁶ cfu/ml 的大肠杆菌和初始浓度为(5.71±3.14)×10⁷ cfu/ml 的金黄色葡萄球菌分别反应 10、30、60、120 s 后的灭活效果,采用透射电镜(TEM)对细菌超微结构的变化进行分析。**结果** 大肠杆菌在灭菌 30 s 时灭活率达 6.98 log,金黄色葡萄球菌在灭菌 10 s 时灭活率达 7.76 log,水中大肠杆菌和金黄色葡萄球菌全部被灭活。大肠杆菌(革兰阴性菌)出现细胞变形和胞质整体不均匀;而金黄色葡萄球菌(革兰阳性菌)则出现体积膨胀和核心消失,菌体近似空壳。**结论** 低温等离子体在短时间内对水中大肠杆菌和金黄色葡萄球菌具有明显灭活作用。

关键词:低温等离子体;水;大肠杆菌;金黄色葡萄球菌;灭菌机制;超微结构

中图分类号:R123.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-5914(2013)12-1081-03

Low temperature plasma-induced inactivation effect on bacteria in aqueous solution ZHANG Can*, LIU Wen-jun, ZHANG Ming-lu, TIAN Fang, SONG Mei-juan, AN Dai-zhi, LIU Wei-ping. *Institute of Disease Control and Prevention, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

Corresponding author: LIU Wen-jun, E-mail: wjliu@tsinghua.edu.cn

Abstract: Objective To assess the inactivation effect on bacteria in water, and explore the inactivation mechanisms of the gram-negative bacteria and gram-positive bacteria by low-temperature plasma. **Methods** The inactivation effect on (9.60±1.23)×10⁶ cfu/ml of *E.coli* and (5.71±3.14)×10⁷ cfu/ml of *Staphylococcus aureus* by low-temperature plasma was observed, and their ultrastructure variation was analyzed by TEM. **Results** The *E.coli* in water were obviously inactivated after a 30 s discharge time, and the inactivation rate reached up to 6.98 log, while the *S.aureus* were inactivated after a short discharge time of 10 s with a higher inactivation ratio of 7.76 log. The *E.coli* and *S.aureus* in water were inactivated thoroughly. The TEM results showed that the cell shape of *E.coli* was changed and the cytoplasm appeared to be nonuniform, while the expansion of cells volume, the disappear of cell core and the empty shell of cell shape were found during the inactivation of *S.aureus*. **Conclusion** Low-temperature plasma can rapidly inactivate *E.coli* and *S.aureus* in water.

Key words: Low-temperature plasma; Water; *E.coli*; *S. aureus*; Inactivation mechanism; Ultrastructure

低温等离子体是近年来备受瞩目的新型高级氧化技术。1987 年,Clements 等[1]首次采用单针-板式电极成功降解水中蒽醌染料。此后低温等离子体技术应用于水体环境领域的研究逐渐增多,主要集中在水体有机污染物降解方面[2]。低温等离子体可产生自由基氧化、高能电子轰击、光化学氧化和高温热解等综合物理化学效应,引起菌体细胞的多种生物学效应,有效破坏细菌、病毒及其他微生物代谢产物等,对水中微生物构成全方位灭杀环境。本研究采用低温等离子体技术灭活水中大肠杆菌和金黄色葡萄球菌,结合透射电镜(TEM)结果初步探讨低温等离子体效应对革兰阴性菌和革兰阳性菌的不同灭活机制。

1 材料与方法

1.1 低温等离子体装置 低温等离子体装置由 CTP-2000K 型等离子体电源(输出功率为 0~500 W,频率调节范围 5~20 kHz,输出电压调节范围为 0~30 kV,南京苏曼等离子有限公司)、DBD-150 型介质阻挡放电装置(南京苏曼等离子有限公司)、调压器和石英反应釜构成,装置示意图如图 1 所示。介质阻挡放电装置由高压电极、接地电极以及不锈钢底座等组成。石英反应釜直径为 150 mm,介质挡板间距为 8 mm。

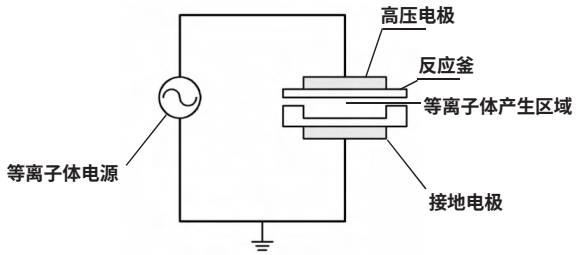


图 1 低温等离子体装置示意图

1.2 菌液制备 试验菌种为大肠杆菌(CGMCC 1.3373)和金黄色葡萄球菌(ATCC6538),均购自中国科学院微生物研究所。

将冻干菌种接入营养肉汤培养基中,采用 THZ-

基金项目:国家自然科学基金(51008303);中国博士后科学基金面上项目和特别资助(20100471829,2012T50861)

作者简介:张灿(1975-),女,助理研究员,博士,从事饮用水水质安全研究。

通讯作者:刘文君,E-mail:wjliu@tsinghua.edu.cn

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

82A 恒温水浴振荡器（江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司）于 37 ℃恒温振荡培养 24 h，三次纯化后取第 3 代培养物，密封置于 4 ℃冰箱。用无菌接种环从琼脂斜面培养基上挑取细菌加于营养肉汤中，37 ℃恒温振荡培养 24 h，置于无菌离心管以 6 000 r/min 离心（离心半径为 9.5 cm）10 min，弃去上清液，取沉淀物重新溶解于无菌生理盐水中，配制成所需浓度的菌悬液。

1.3　低温等离子体灭菌试验　将初始浓度为（9.60±1.23）×10^6 cfu/ml 大肠杆菌悬液或者初始浓度为（5.71±3.14）×10^7 cfu/ml 的金黄色葡萄球菌菌液加入无菌石英反应釜；调节调压器电压 50 V，电流稳定在 2.60 mA，保持输出功率为 130 W；分别灭活 10、30、60、120 s 后，取出菌悬液，进行菌落计数。

1.4　菌落计数及灭活率计算　大肠杆菌采用滤膜法进行计数，金黄色葡萄球菌采用倾倒法进行计数。每个样品做 3 个平行样，取平均值；并计算细菌灭活率[灭活率=log（灭菌前菌悬液的菌落计数/灭菌后菌悬液的菌落计数）]；当灭菌后菌悬液的菌落计数为“未检出”时，细菌灭活率=log（灭菌前菌悬液的菌落计数）。

1.5　TEM 分析　取灭菌前和灭菌时间分别为 30、120 s 的菌悬液置于无菌离心管中，以 6 000 r/min 离心（离心半径为 9.5cm）10 min，弃去上清液，用无菌超纯水清洗 3 次，用 2.5%戊二醛固定 4 h。经过脱水、浸透、固化处理后，制备标本[3]。采用 Lecia EM UC6 超薄切片机（德国 Leica 公司）切片（厚 50~60 nm），用乙酸铀枸橼酸铅进行染色，在 Hitachi H-7650 型透射电镜（日本 Hitachi 公司）下观察。

2　结果

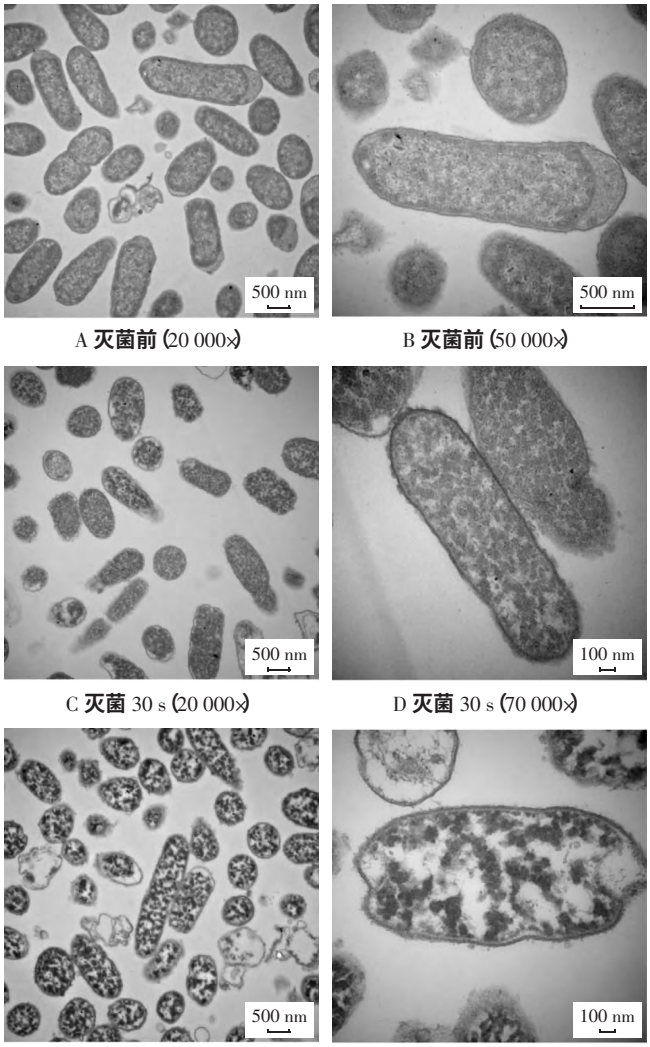
2.1　大肠杆菌的灭活情况　表 1 可知，低温等离子体灭菌 10 s 后水中大肠杆菌灭活率达 1.43 log；灭菌 30 s 后大肠杆菌灭活率提高至 6.98 log，表明水中大肠杆菌全部被灭活。

表 1　低温等离子体对水中大肠杆菌的灭活效果（n=3，$\bar{x}\pm s$）

时间（s）	菌落数（cfu/ml）	灭活率（log）
10	（3.56±0.82）×10^5	1.43±0.28
30	ND	6.98±0.06
60	ND	6.98±0.06
120	ND	6.98±0.06

注：菌悬液初始菌落数为（9.60±1.23）×10^6 cfu/ml。ND 为未检出。

处理前，大肠杆菌外形呈短杆状，形状规则，边缘整齐，胞质均匀并且完整无间隙（图 2A、B）。灭活 30 s 后，大肠杆菌细胞壁明显破损，细胞变形，菌体外部结构凹陷，胞质整体性不均匀并且出现间隙（图 2C）；细菌细胞壁有多处明显的穿孔，代谢能力差的细菌细胞壁完全模糊（图 2D）。灭活 120 s 后，细胞壁破坏，细胞变形严重，胞质不均匀程度加重，出现多个面积较大的透电子区（图 2E、F）。



A 灭菌前（20 000×）　B 灭菌前（50 000×）
C 灭菌 30 s（20 000×）　D 灭菌 30 s（70 000×）
E 灭菌 120 s（20 000×）　F 灭菌 120 s（70 000×）

图 2　低温等离子体灭活水中大肠杆菌的 TEM 结果

2.2　金黄色葡萄球菌的的灭活情况　表 2 可见，低温等离子体灭菌 10 s 后，水中金黄色葡萄球菌灭活率达 7.76 log，表明水中金黄色葡萄球菌全部被灭活。

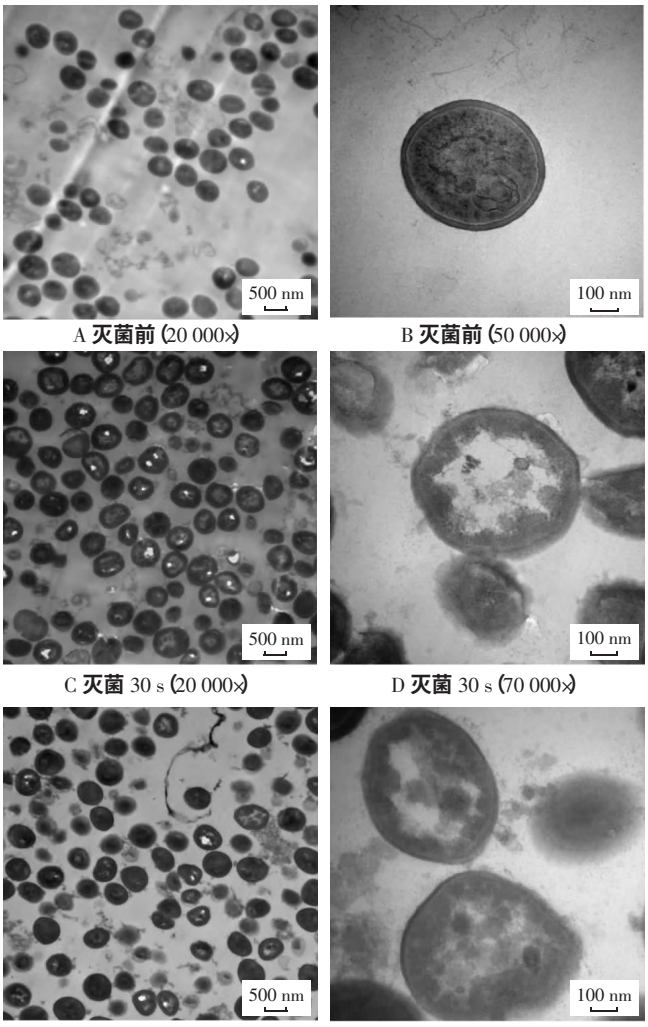
表 2　低温等离子体对水中金黄色葡萄球菌的灭活效果（n=3，$\bar{x}\pm s$）

时间（s）	灭活率（log）
10	7.76±0.28
30	7.76±0.28
60	7.76±0.28
120	7.76±0.28

注：菌悬液初始菌落数为（5.71±3.14）×10^7 cfu/ml。

处理前，金黄色葡萄球菌外形呈圆形，细胞壁结构紧密，胞质均匀且完整无间隙（图 3A、B）。灭菌 30 s 后，菌体膨胀而且形态不规则，胞质向细胞壁凝聚，菌体核心消失后明显出现了大面积透电子区，菌体犹如空壳（图 3C、D）。灭菌 120 s 后，空壳的菌体减少，解体的菌体增多（图 3E）；细胞壁破坏严重，凝聚至细胞壁的胞质又向中间扩散，菌体出现了解体（图 3F）。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



A 灭菌前 (20 000×) B 灭菌前 (50 000×)

C 灭菌 30 s (20 000×) D 灭菌 30 s (70 000×)

E 灭菌 120 s (20 000×) F 灭菌 120 s (70 000×)

图 3 低温等离子体灭活水中金黄色葡萄球菌的 TEM 结果

3 讨论

低温等离子体产生的大量活性粒子（如受激原子、分子、自由基等）、高能电子形成的高速粒子流和高压脉冲电场对细菌细胞壁和细胞膜均具有重要破坏作用[4]。1991 年，Tsong[5]提出等离子体效应中菌体细胞的“电穿孔理论”，指出细胞膜对离子的选择通透性以及磷酸分子自身的特性，致使细胞膜对电场较为敏感，高压脉冲电场直接对膜电位作用，引起细胞膜的热学和电学效应，导致蛋白质通道和磷脂双分子层的改变，促进细胞死亡。本研究显示，大肠杆菌在灭菌 30 s 时灭活率达 6.98 log，金黄色葡萄球菌在灭菌 10 s 时灭活率达 7.76 log；水中大肠杆菌和金黄色葡萄球菌全部被灭活。TEM 结果表明，低温等离子体灭活后的大肠杆菌出现细胞变形和胞质整体性不均匀；而金黄色葡萄球菌出现细菌膨胀和核心消失，菌体近似空壳。

革兰阴性菌和革兰阳性菌细胞壁的化学成分不同，在等离子体效应下具有不同损伤机制。革兰阳性菌细胞壁的主要成分是黏肽，其构成的细胞壁具有网状结构，坚固且具有较厚的厚度 (20~80 nm)[6]。革兰阴性菌细胞壁的主要成分是类脂多糖和蛋白质的混合物，含黏肽很少，肽聚糖层薄，交联松散，细胞壁强度疏松且厚度较薄 (10~15 nm)[7]。革兰阴性菌细胞壁的厚度远小于革兰阳性菌，而且结构松散，因此，在低温等离子体效应中受损伤后容易出现穿孔。此外，革兰阴性细菌细胞壁带有负电荷，在高压脉冲电场作用中容易聚集电荷，导致“电穿孔”。革兰阴性菌细胞壁在低温等离子体效应中受到损伤，活性粒子从多点受损细胞壁进入细胞内部导致细胞器损伤，导致胞质整体性不均匀。本研究中大肠杆菌出现胞质整体不均匀，并且随着处理时间的延长，胞质整体不均匀性增强，菌体出现了多个透电子区。革兰阳性菌细胞壁厚，不带电荷，因而低温等离子体中活性粒子、高能电子和高压脉冲电场对细胞壁的损伤程度会比较轻。本研究中金黄色葡萄球菌在等离子体效应中受到损伤的胞质向细胞壁凝集，菌体核心溶解，从而出现了菌体空壳；但受损伤的细胞壁不能维持原来的张力，出现了菌体膨胀；随着放电时间的延长，细胞壁和胞质损伤加重，逐渐解体。石兴民等[8]采用介质阻挡放电灭活白色念珠菌，结果表明，菌体细胞壁及细胞膜断裂，核心溶解，菌体近似空壳；这与本研究中金黄色葡萄球菌的超微结构变化相同。Lukes 等[9]研究结果表明，等离子体处理后细菌表面遭到破坏，等离子体对革兰阴性菌细胞壁损伤比对革兰阳性菌细胞壁的损伤明显。这是因为革兰阴性菌细胞壁带有负电荷，更容易在高压电场中积累电荷，导致膜穿孔，这与本研究的推论相同。但目前，关于低温等离子体在破坏革兰阴性菌和革兰阳性菌的细胞壁发生的生化反应以及低温等离子体产生的活性粒子与菌体细胞内部的大分子物质反应并不清楚，还需在将来研究中进一步探索。

参考文献

[1] Clements JS, Sato M, Davis RH. Preliminary investigation of prebreakdown phenomena and chemical reactions using a pulsed high-voltage discharge in water[J]. IEEE T Ind Appl, 1987, 23: 224-235.
[2] 孙玲芳，喻泽斌，汝旋，等.水上介质阻挡放电等离子体去除微囊藻毒素-LR 的研究[J].给水排水，2011，37 (11)：122-127.
[3] 洪涛. 生物医学超微结构与细胞生物技术[M]. 北京：北京医科大学中国协和医科大学联合出版社，1990：160-163.
[4] 刘芳，黄海涛，黄绍松，等.低温等离子体灭菌的研究进展[J]. 环境与健康杂志，2007,42 (5)：367-369.
[5] Tsong TY. Electroporation of cell membranes [J]. Biophys J, 1991, 60: 297-306.
[6] 朱亮，张梅，杨雪霞，等. 常压低温等离子体灭菌实验研究[J]. 东华大学学报：自然科学版，2009，35 (5)：609-614.
[7] 叶帼嫔，张茜，潘红，等. 低温等离子体活性水对致病菌的作用[J]. 中国科学：生命科学，2013，43 (8)：679-684.
[8] 石兴民，张冠军，袁育康，等. 低温等离子体对白色念珠菌影响的电镜观察[J]. 西安交通大学学报：医学版，2009，30 (6)：775-776.
[9] Lukes P, Clupek M, Babicky V, et al. Bacterial inactivation by pulsed corona discharge in water [C]. IEEE Pulsed Power Conference, 2007 16th IEEE International, 2007: 320-323.

收稿日期：2013-10-29 责任编辑：韩威

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net