

УДК537.523/527; 533.9.004.14

Инактивация микроорганизмов в холодной аргоновой плазме атмосферного давления

А.П. Семенов, Б.Б. Балданов, Ц.В. Ранжуров, Ч.Н. Норбоев,
Б.Б. Намсараев, В.Б. Дамбаев, С.В. Гомбоева, Л.Р. Абидуева

Показана высокая эффективность бактерицидного действия холодной аргоновой плазмы генерируемой слаботочными высоковольтными разрядами при атмосферном давлении. Изучение выживаемости бактерий в диффузной плазме импульсно-периодического режима отрицательной короны и тлеющего разряда атмосферного давления показало, что полная инактивация микроорганизмов наблюдается после обработки пластин после 2 минут в каждом режиме.

PACS: 52.77.—j;82.80.Dx

Ключевые слова: аргоновая плазма, микроорганизмы, слаботочная искра, плазменные струи, плазменная инактивация, тлеющий разряд атмосферного давления.

Введение

В настоящее время все большую актуальность приобретают работы, направленные на исследование свойств газоразрядных процессов, определяющих возможности их применения для стерилизационной и обеззараживающей обработки в области защиты промышленных материалов, оборудования, электроники от биоповреждений и микробиологически индуцированной коррозии [1–3].

Обработка живых тканей в плазме оказывает желаемый терапевтический эффект при стерилизации и заживлении ран, остановке кровотечения,

а также при лечении ряда кожных заболеваний [4–6]. Это направление приобретает особое значение в последние годы, что связано с возрастающей потребностью человечества в новых, не требующих высоких температур технологиях стерилизации и обеззараживания с высокой производительностью, простотой эксплуатации, эффективностью и надежностью.

Особое место среди плазменных методов занимают исследования разрядов, генерирующих низкотемпературную (холодную) неравновесную плазму при атмосферном давлении [7–11]. В качестве источников низкотемпературной неравновесной плазмы атмосферного давления рассматриваются различные типы газовых разрядов, среди которых можно отметить скользящий, коронный, барьерный и импульсные разряды атмосферного давления. Несмотря на широкий круг работ (см., например, [12, 13]), посвященных исследованиям различных характеристик разрядов, и доказанную высокую эффективность использования разрядов в биомедицинских целях в лабораторном масштабе, обработка холодной плазмой при атмосферном давлении с целью уничтожения микроорганизмов не получила широкого применения. Это связано, во-первых, с тем, что источники холодной плазмы в настоящее время представляют собой технически сложное оборудование с низкой экономической эффективностью. Во-вторых, для обработки биологических объектов, живых тканей животных и человека используются разряды атмосферного давления при высоком напряжении 10–40 кВ, что требует обеспечения высокого уровня безопасности. Поэтому выбор параметров разряда, при которых осуществляется безопасное и неразрушающее воздействие, — одна из основных физических задач плазменной медицины.

Семенов Александр Петрович, профессор.
Балданов Баир Батоевич, ст. научный сотрудник.
Ранжуров Цыремпил Валерьевич, мл. научн. сотр.
Норбоев Чингис Норбоевич, вед. инженер.
Институт физического материаловедения СО РАН
Россия, 670047, Бурятия, Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 8
Тел.: (3012) 43–31–84. E-mail: baibat@mail.ru;
semenov@ipms.bsnet.ru

Намсараев Баир Бадмабазарович, профессор.
Дамбаев Вячеслав Борисович, ст. научн. сотр.
Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН.
Россия, 670047, Бурятия, г. Улан-Удэ.
Тел.: (3012) 43–49–02. E-mail: bair_n@mail.ru
Гомбоева Саяна Владимировна, доцент.
Восточно-Сибирский государственный университет
технологий и управления.
Россия, 670013, Бурятия, г. Улан-Удэ.
Тел.: (3012) 41–71–46. E-mail: sv2@rambler.ru
Абидуева Лыгжима Ранжуровна, доцент.
Бурятский государственный университет.
Россия, 670013, Бурятия, г. Улан-Удэ.
Тел.: (3012) 44–55–03. E-mail: abidueva75@mail.ru

Статья поступила в редакцию 12 мая 2014 г.

© Семенов А.П., Балданов Б.Б., Ранжуров Ц.В., Норбоев Ч.Н., Намсараев Б.Б., Дамбаев В.Б., Гомбоева С.В., Абидуева Л.Р., 2014

Целью данной работы является изучение воздействия низкотемпературной (холодной) аргоновой плазмы, генерируемой слаботочными высоковольтными разрядами, на инактивацию микроорганизмов.

Экспериментальная техника и методика

Для генерации низкотемпературной (холодной) аргоновой плазмы разработаны два типа генераторов неравновесной плазмы на основе слаботочных высоковольтных разрядов.

Первый способ предназначен для обработки поверхностей и базируется на использовании специального разряда — тлеющего разряда атмосферного давления (ТРАД), состоящего из большого количества потоков низкой интенсивности, широко охватывающих поверхность обрабатываемого объекта (рис. 1). Разряд создается в специальной электродной конструкции с многоострийным секционированным катодом и плоским металлическим анодом [7]. Устойчивость разряда относительно перехода отрицательной короны в искровой пробой разрядного промежутка достигается слабой прокачкой газа через разрядный промежуток. Газ продувался перпендикулярно направлению электрического тока. Скорость прокачки газа v на входе в разрядную камеру варьировалось в пределах от 0,45 до 2,24 м/с.

Второй способ базируется на использовании плазменных струй слаботочного искрового разряда атмосферного давления, формируемых в потоке аргона [8, 9].

В исследовании использовали штаммы природной ассоциации микроорганизмов и вегетативной формы *Escherichia coli* М 17. Эффективность об-

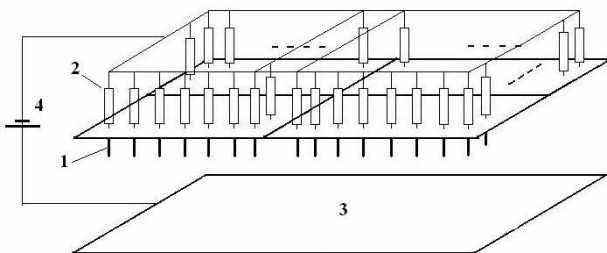


Рис. 1. Схема экспериментальной установки: 1 — катод; 2 — балластные сопротивления; 3 — анод; 4 — источник питания.

работки микроорганизмов в газоразрядной камере ТРАД оценивали с использованием тест-полосок. Полноту деконтаминации определяли, помещая тест-полоски в индикаторную среду. Для оценки чувствительности микроорганизмов к холодной аргоновой плазме, генерируемой плазменными струями слаботочного искрового разряда, использовали методику, основанную на измерении диаметров зон поражения засеянного газона. Для этого засеивали газон тест-микроорганизмом: 100 мкл рабочей суспензии вносили на чашку Петри с агаризованной средой РПА и тщательно растирали шпателем. Чашки с засеянным газоном помещали в газоразрядную камеру под плазменные струи. Обработанные плазмой чашки инкубировали в термостате в течение суток при температуре 37 °С, после чего измеряли диаметр образовавшихся зон поражения.

Результаты эксперимента и их обсуждение

Бактерицидная эффективность воздействия диффузной аргоновой плазмы, формируемой в импульсно-периодическом режиме отрицательной короны и в режиме тлеющего разряда атмосферного давления (рис. 2), исследовалась на бактериях природной ассоциации микроорганизмов. Тест-полоски с микроорганизмами помещались на плоский анод, время обработки пластин в плазме варьировалось от 2 до 5 мин.

Изучение выживаемости бактерий в плазме импульсно-периодического режима отрицательной короны показало, что после обработки пластин в течение 2 и 5 минут (ток разряда $I = 250$ мкА) бактерии погибают полностью (пробирки 1, 2 на рис. 3.). В режиме тлеющего разряда атмосферного давления (ток разряда $I = 700$ мкА, время обработки $t = 2$ и 5 мин), где разряд представляет совокупность однородных, самостоятельных свечений, перекрывающих все межэлектродное расстояние, бактерии также погибают полностью (пробирки 3, 4 на рис. 3.). Рост микроорганизмов после обработки в холодной аргоновой плазме отсутствует на протяжении семи суток культивирования тест-полосок в жидкой питательной среде.

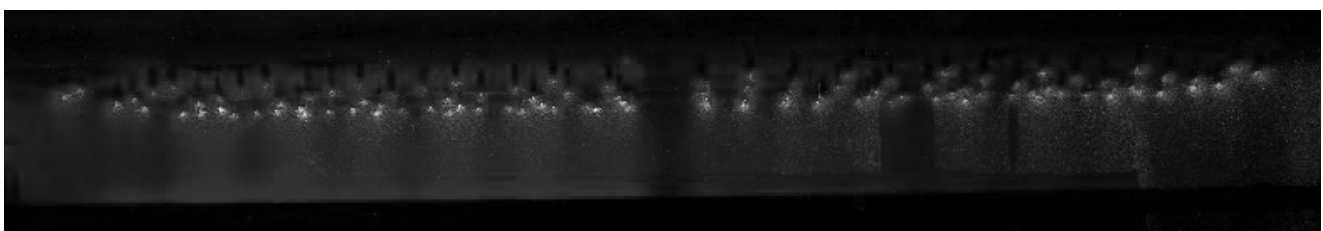


Рис. 2. Фотография свечения тлеющего разряда атмосферного давления. Межэлектродное расстояние $d = 2$ см.



Рис. 3. Результаты бактерицидного действия холодной аргоновой плазмы. H — необработанная пластина; K — контроль; 1, 2 — обработка импульсной короной, $t = 2$ и 5 мин, соответственно; 3, 4 — обработка в режиме ТРАД, $t = 2$ и 5 мин, соответственно

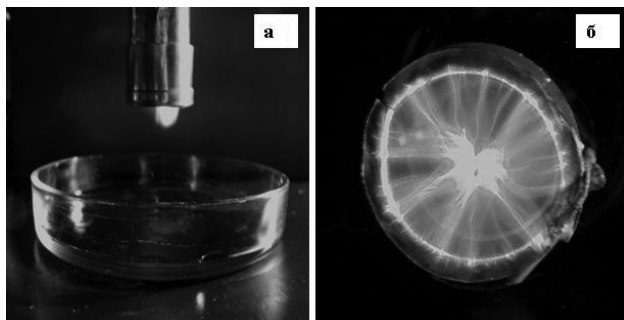


Рис. 4. Генератор холодной аргоновой плазмы на основе плазменных струй ТРАД: а — инактивация микроорганизмов в чашке Петри. б — вид разряда с торца.

Исследована эффективность биоцидного действия холодной аргоновой плазмы, генерируемой плазменными струями слаботочного искрового разряда, при воздействии на бактерии природной ассоциации микроорганизмов и вегетативной формы *E. coli*. На рис. 4 представлена фотография генератора холодной аргоновой плазмы на основе плазменных струй слаботочного искрового разряда.

Время обработки чашек плазменными струями слаботочного искрового разряда варьировалось от 5 до 60 с. Расстояние от источника плазмы до поверхности, на которой росли микроорганизмы, составляло от 0,5 до 3 см. Воздействие плазменных струй слаботочной искры на микроорганизмы регистрируется в виде круглых прозрачных областей, которые являются зонами инактивации роста микроорганизмов (рис. 5).

Полученные данные показывают, что обработка чашек плазменными струями слаботочной искры в течение 10 с приводит к гибели практически всех микроорганизмов в радиусе 0,9 см. После 60-секундной обработки диаметр зоны инактивации бактерий увеличивается в 1,6 раза.

Определение инактивационной способности аргоновой плазмы, проведенное методом счета колоний, показывает, что после минутной обработки остаются лишь единичные выросшие макроколонии микроорганизмов (рис. 2, 1f). Диаметр зоны инактивации значительно увеличивается при прямом контакте плазменных струй с поверхностью чашек (кривые 1, 2, на рис. 6), чем при удаленном воздействии (кривая 3 на рис. 6).

Бактерицидные свойства плазменных струй слаботочного искрового разряда исследовались по воздействию на вегетативную форму штаммов *Escherichia coli*. Культура *Escherichia coli* была выращена на агаризованной богатой среде в виде газона. Опытные купоны с *Escherichia coli* подвергали воздействию плазменных струй, варьируя продолжительность экспозиции от 5 до 60 с.

Полная гибель клеток *E. coli* зарегистрирована через 5 с обработки на расстоянии 0,5 см от сопла. При увеличении расстояния от сопла генератора до 3 см число выживших макроколоний микроорганизмов значительно возрастает. Увеличение времени плазменной обработки до 40 с на расстоянии 3 см от сопла, приводит к существенному снижению числа выживших микроорганизмов (рис. 7, (2)).

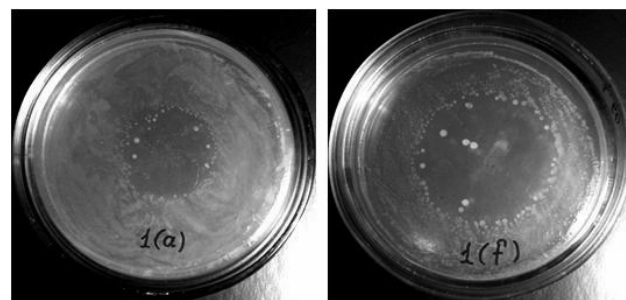


Рис. 5. Зоны инактивации бактериального роста природной ассоциации микроорганизмов в результате воздействия плазменных струй слаботочного разряда:

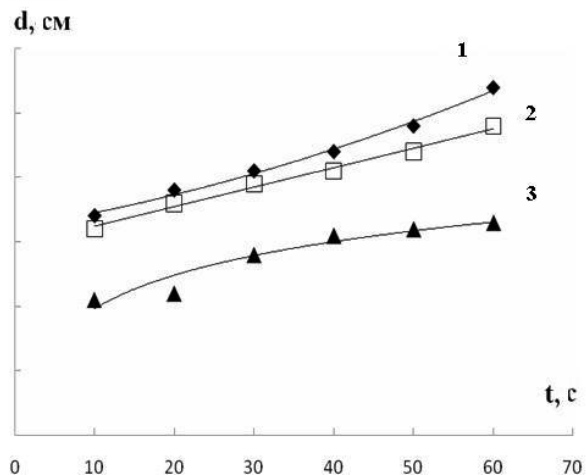


Рис. 6. Зависимость диаметра зоны инактивации от времени воздействия. Расстояние от сопла генератора холодной аргоновой плазмы: 1–0,5 см; 2–1,5 см; 3–3 см.

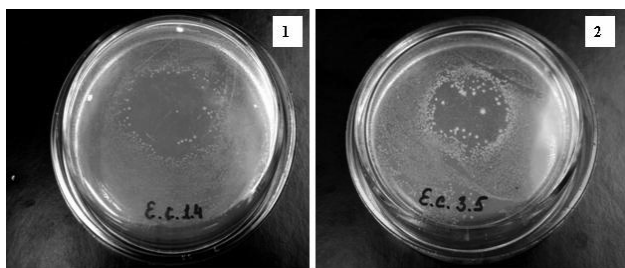


Рис. 7. Зоны инактивации бактериального роста *E. coli* в зависимости от расстояния от сопла h генератора плазменных струй: 1 — $h = 0,5$ см, $t = 30$ с, 2 — $h = 3$ см, $t = 40$ с

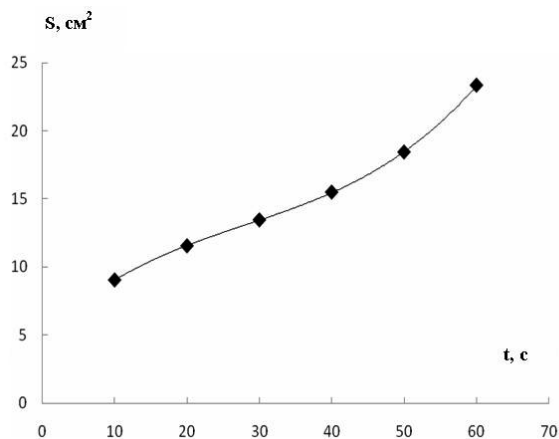


Рис. 8. Зависимость площади зоны инактивации от времени воздействия. Расстояние от сопла генератора $h = 0,5$ см.

Отметим, что зона инактивации не ограничивается диаметром сопла генератора, в пределах которого формируются плазменные струи слаботочной искры. Как видно на рис. 8, увеличение времени обработки чашек плазменными струями слаботочной искры позволяет проводить эффективную инактивацию на значительно большей площади. Данные результаты согласуются с результатами, представленными в работе [17], где с увеличением времени обработки холодными плазменными струями атмосферного давления (99,5% гелий и 0,5% кислород) бактерий *Pseudomonas aeruginosa* на твердом агаре диаметр зоны инактивации увеличивается. Обработка низкотемпературной гелиевой плазмой также приводит к ингибирующему эффекту на агаризированной культуре *Staphylococcus aureus* [18].

Заключение

Показана высокая эффективность бактерицидного действия источников холодной аргоновой плазмы на основе слаботочных высоковольтных разрядов. Изучение выживаемости бактерий в диффузной плазме импульсно-периодического режима отрицательной короны и тлеющего разряда атмосферного давления показало, что пол-

ная инактивация микроорганизмов наблюдается после обработки пластин после 2 минут в каждом режиме. Установлено, что увеличение времени обработки плазменными струями слаботочной искры позволяет проводить эффективную инактивацию микроорганизмов на значительно большей площади, чем площадь сопла генератора плазмы.

Литература

1. Heinli J., Isbar G., Stolz W., et al. // Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. 2011. V. 25. P. 1.
2. Sohbatzadeh F., Hossienzadeh Colagar A., Mirzanejhad S., et al. // Applied Biochemistry and Biotechnology. 2010. V. 160. P. 1978.
3. Yang L., Chen J., and Gao J. // Journal of Electrostatics. 2009. V. 67. P. 646.
4. Fridman G., Vasilets V., Gutsol A., et al. // Plasma Processes and Polymers. 2008. V. 5. P. 503.
5. Fridman G., Shereshevsky A., Jost M.M., et al. // Plasma Chemistry and Plasma Processes. 2007. V. 27. P. 163
6. Kalghatgi S.U., Fridman G., Cooper M., et al. // IEEE Transactions on Plasma Science. 2007. V. 35. P. 1559
7. Kong M.G., Kroesen A.V., Morfill G., et al. // New Journal of Physics. 2009. V. 11. P. 115012.
8. Weltmann K.D., Kindell E., Woedtke T., et al. // Pure Appl. Chem. 2010. V. 82. No. 6. P. 1223.
9. Lu X., Laroussi M., Puech V. // Plasma Sources Sci. and Technol. 2012. V. 21. No. 3. P. 034005.
10. Arkhipenko V.I., Kirillov A.A., Safronau Ya.A., et al. // Eur. Phys. J. D. 2010. V. 60. P. 455.
11. Кириллов А.А., Павлова А.В., Сафронов Е.А., и др. // Прикладная физика, 2013. № 5. С. 52.
12. Morent R., De Geyter N. Biomedical Engineering — Frontiers and Challenges. Chapter 2. Inactivation of Bacteria by Non-Thermal Plasmas / InTech, 2011. P. 374.
13. Machala Z., Hensel K., Akishev Yu. Plasma for Bio-Decontamination, Medicine and Food Security / NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology. 2012. XVII, p. 479.
14. Балданов Б.Б., Ранжуров Ц.В. // ЖТФ. 2014. Т. 84. Вып. 4. С. 152
15. Балданов Б.Б. // Физика плазмы, 2009. Т. 35. № 7. С. 603.
16. Балданов Б.Б. // ЖТФ. 2011. Т. 81. Вып. 4. С. 135.
17. Alkawareek, M. Y., Algwari, Q. T., Laverty, G., et al. // PLoS ONE. 2012. V. 7. P. e44289.
18. Focea R., Poiata A., Motrescu I., et al. // African Journal of Biotechnology. 2012. V. 11. P. 4234

Inactivation of microorganisms in cold argon plasma at the atmospheric pressure

*A. P. Semenov¹, B. B. Baldanov¹, Ts. V. Ranzhurov¹, Ch. N. Norboev¹,
B. B. Namsaraev², V. B. Dambaev², S. V. Gomboeva³, and L. R. Abidueva⁴*

¹Institute of Physical Materials Science of the Siberian Branch of the RAS
8 Sakh'yanova str., Ulan-Ude, 670047, Russia
E-mail: baibat@mail.ru; semenov@ipms.bsnet.ru

²Institute of General and Experimental Biology of the Siberian Branch of the RAS
Ulan-Ude, 670047, Russia
E-mail: bair_n@mail.ru

³East Siberia State University of Technology and Management
Ulan-Ude, 670013, Russia
E-mail: sv2@rambler.ru

⁴Buryat State University
Ulan-Ude, 670013, Russia
E-mail: abidueva75@mail.ru

Received May 12, 2014

High efficiency of the bactericidal action of the cold argon plasma generated by low-current high-voltage discharges at atmospheric pressure is shown. Research of survival rate of bacteria in diffusion plasma of the impulsno-periodic mode of the negative corona and the decaying discharge at atmospheric pressure has shown, that full inactivation of the microorganisms is observed after processing of plates after 2 minutes in each mode.

PACS: 52.77.—j; 82.80.Dx

Keywords: argon plasma, microorganisms, low-current spark, plasma jet, plasma inactivation, glow discharge at atmospheric pressure.

References

1. J. Heinlin, G. Isbar, W. Stolz, et al., Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology **25**, 1 (2011).
2. F. Sohbatzadeh, A. Hossienzadeh Colagar, S. Mirzanejad, et al., Applied Biochemistry and Biotechnology, **160**, 1978 (2010).
3. L. Yang, J. Chen, and J. Gao, Journal of Electrostatics **67**, 646 (2009).
4. G. Fridman, V. Vasilets, A. Gutsol, et al., Plasma Processes and Polymers **5**, 503 (2008).
5. G. Fridman, A. Shereshevsky, M. M. Jost, et al., Plasma Chemistry and Plasma Processes **27**, 163 (2007).
6. S. U. Kalghatgi, G. Fridman, M. Cooper, et al., IEEE Transactions on Plasma Science **35**, 1559 (2007).
7. M. G. Kong, A.V. Kroesen, G. Morfill, et al., New Journal of Physics **11**, 115012 (2009).
8. K. D. Weltmann, E. Kindell, T. Woedtke, et al., Pure Appl. Chem. **82**, 1223 (2010).
9. X. Lu, M. Laroussi, and V. Puech, Plasma Sources Sci. and Technol. **21**, 034005 (2012).
10. V. I. Arkhipenko, A. A. Kirillov, Ya. A. Safronau, et al., Eur. Phys. J. D. **60**, 455 (2010).
11. A. A. Kirillov, A. V. Pavlova, E. A. Safronau, et al., Prikladnaya Fizika, No. 5, 52 (2013).
12. R. Morent and N. De Geyter, Biomedical Engineering — Frontiers and Challenges. Chapter 2. Inactivation of Bacteria by Non-Thermal Plasmas / InTech, 2011. p. 374.
13. Z. Machala, K. Hensel, and Yu. Akishev, NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology. **XVII**, 479 (2012).
14. B. B. Baldanov and Ts. V. Ranzhurov, Tech. Phys. **84**, 152 (2014).
15. B. B. Baldanov, Plasma Phys. Rep. **35**, 603 (2009).
16. B. B. Baldanov, Tech. Phys. **81**, 135 (2011).
17. M. Y. Alkawareek, Q. T. Algwari, G. Laverty, et al., PLoS ONE. **7**, e44289 (2012).
18. R. Focea, A. Poiata, I. Motrescu, et al., African Journal of Biotechnology **11**, P. 4234 (2012).