

PLAZEMSKA STERILIZACIJA BAKTERIJ S KISIKOVO PLAZMO

OXYGEN PLASMA STERILIZATION OF BACTERIA

**Danijela Vujošević¹, Zoran Vranica¹, Alenka Vesel², Uroš Cvelbar²,
Miran Mozetič², Aleksander Drenik², Tatjana Mozetič³, Marta Klanjšek-Gunde⁴,
Nina Hauptman⁴**

¹Center za medicinsko mikrobiologijo, Inštitut za zdravje Crne gore, Ljubljanska bb, 8100 Podgorica, Črna gora

²Laboratorij za plazmo F4, Inštitut "Jožef Stefan", Jamova 39, 1000 Ljubljana, Slovenija

³Srednja zdravstvena šola, Poljanska 61, 1000 Ljubljana, Slovenija

⁴Kemijski inštitut, Hajdrihova 19, 1000 Ljubljana, Slovenija

alenka.vesel@ijs.si

Prejem rokopisa – received: 2006-08-16; sprejem za objavo – accepted for publication: 2006-11-13

Prikazane so osnovne značilnosti reaktivnih plazem in njihova uporabnost za sterilizacijo različnih materialov. Kisikova plazma uničuje in razgrajuje mikroorganizme (tj. bakterije) z UV-sevanjem, kemijsko razgradnjo in lokalnim ogrevanjem. V prispevku kratko opišemo vse tri načine delovanja plazme na mikroorganizme in ugotovljamo primernost različnih metod za sterilizacijo zraka in trdih materialov s poudarkom na sterilizaciji biokompatibilnih materialov. Pri uporabi sterilizacije s kisikovo plazmo se moramo zavedati nekaterih omejitev in težav, ki pri tem nastopajo.

Ključne besede: sterilizacija, plazma, kisik, bakterija, spore

The main reactive plasma characteristics are presented with their applications for sterilization of different materials. Oxygen plasma destroys and erodes microorganism with UV radiation, chemical reactions and local heating. Three mechanisms of interaction with microorganism are described. Advantages of plasma sterilization for air sterilization and solid materials including biocompatible materials are discussed, bearing in mind the limitations and disadvantages of the same method.

Key words: sterilization, plasma, oxygen, bacteria, spore

1 UVOD

Sterilizacija različnih materialov je eden od najstarejših problemov v medicini in biologiji. Zdravniki so že v starem veku ugotovili, da se rane celijo veliko hitreje, če obveze in podobni material pred uporabo izpostavijo sončnemu obsevanju. Mnogo pozneje so ugotovili, da komplikacije pri poškodbah povzročajo določeni mikroorganizmi. Ti so lahko plesni, bakterije in virusi. Za učinkovito zdravljenje poškodb bolezni in napak je treba zagotoviti sterilnost uporabljenih materialov. Tako kot je raslo znanje o povzročiteljih okužb, je raslo tudi znanje o preprečevanju okužb. Ugotovljeno je bilo, da je za preprečitev okužb ključnega pomena uničenje mikroorganizmov, ki okužbe povzročajo. Iz tega spoznanja se je rodila panoga, ki jo danes imenujemo sterilizacija. Sterilizacija pomeni popolno uničenje vseh mikroorganizmov, ki so ali bi lahko bili na določenem materialu. Ker prav vseh mikroorganizmov pogosto ni mogoče uničiti, danes velja nekoliko blažji standard: material je steriliziran, če je koncentracija mikroorganizmov na določenem materialu zmanjšana za faktor 10^6 . Sterilizacija je večni problem medicine, saj mnogih materialov preprosto ne moremo sterilizirati. Primer je npr. medicinska postelja. V zadnjem času je problem sterilizacije postal še posebej pereč ne le zaradi potencialnih groženj teroristov z biološkim orožjem, ampak tudi zaradi uvajanja novih materialov, ki niso primerni za sterilizacijo s klasičnimi postopki. Na tem

mestu omenjamo predvsem različne biokompatibilne materiale, ki se že danes uporabljajo v sodobni medicini, kot so različne proteze in implanti, in katerih uporaba se bo v naslednjih letih in desetletjih v razvitih državah še močno povečala.

Znanost o sterilizaciji je torej z novimi zahtevami in grožnjami dobila nove izzive, katerim se klasični postopki za sterilizacijo ne morejo postaviti po robu. Popolnoma jasno je, da bo treba razviti nove, učinkovite metode za sterilizacijo različnih trdnih materialov, pa tudi plinov, skupaj z zrakom.

Za sterilizacijo se sedaj največ uporabljata termična in kemična metoda. Pri termični sterilizaciji izpostavimo vzorce visoki temperaturi – navadno za prenos toplote uporabimo vodno paro, ki je segreta na okoli $130\text{ }^{\circ}\text{C}$. Voda je odličen medij za prenos toplote, saj je izparilna toplota izredno visoka. Tekočo vodo s primernim grelnikom uparimo, pare pa se potem kondenzirajo na površini vzorcev, pri čemer se sprostijo izparilna toplota. Tako je prenos toplote bistveno hitrejši, kot če bi ogrevali vzorce s suhim zrakom. Pomanjkljivost metode je prav visoka temperatura – mnogi materiali je ne prenesejo. Predstavljajmo si samo, da bi poskusili s to metodo sterilizirati živila – vzorci bi se preprosto skuhalo. Prav tako metoda ni primerna za sterilizacijo velikih prezračevalnih sistemov, saj jih je praktično nemogoče ogreti na $130\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Druga metoda je kemična. Vzorce izpostavimo zelo strupenemu plinu. Najboljši je etilen dioksid. Pri tem ni

treba vzorcev dodatno ogrevati, saj je plin izredno strupen in deluje že pri sobni temperaturi. Tudi ta metoda ni primerna za sterilizacijo prezračevalnih sistemov, ker bi poleg bakterij pomrla še vsa druga bitja, ki bi prišla v stik s plinom. Takšne nesreče so se že zgodile tudi v bolnišnicah.

Sterilizacijo lahko dosežemo tudi z različnimi sevanji. Na voljo so vsa sevanja, katerih osnovni kvanti imajo zadostno energijo – večjo od 4 eV. Pri elektromagnetnem sevanju lahko uporabimo UV-, X- in γ -žarke. V praksi se največ uporablja UV-sevanje, saj poznamo močne izvire: nizekotlačne plazme. Poleg elektromagnetnega sevanja lahko uporabimo tudi curke hitrih delcev. Največ se uporabljajo elektroni, pospešeni do energije okoli 1 MeV. Sterilizacijo s sevanjem največ uporabljajo v živilski industriji, medtem ko za uničevanje bakterij v večjih sistemih ni primerna, saj je s to metodo praktično nemogoče enakomerno obdelati velike površine.

V zadnjem času so raziskovalci ugotovili, da bi lahko prednosti termičnega, kemijskega in sevalnega načina sterilizacije združili tako, da bi kot sterilizacijski medij uporabili plazmo. Plazma je namreč močan izvir UV-sevanja, obenem pa v njej nastajajo z vidika mikroorganizmov zelo strupeni radikali, ki so bolj ali manj kratkoživi.

2 PLINSKA PLAZMA

Plinska plazma je stanje plina, v katerem v splošnem ne veljajo osnovni zakoni plinske termodinamike (slika 1). To pomeni,

- da temperatura kot termodinamska veličina sploh ni definirana;
- da je poprečna kinetična energija plinskih delcev ("kinetična temperatura") za različne delce v plinu različna;
- da je poprečna porazdelitev stanj plinskih delcev ("notranja temperatura") za različne delce v plinu različna.

Na Zemlji takšnega stanja plina ni najti, lahko pa ga ustvarimo v laboratorijih. Najpogostejša metoda za prehod plina v stanje plazme je električna plinska razelektretritev. Plini pri navadnih pogojih sicer ne prevajajo električnega toka, pri določenih okoliščinah pa steče skozi plin tok, ki je posledica migracije elektronov in plinskih ionov med elektrodama. To se najpogosteje zgodi pri plinu pri nizkem tlaku med dvema elektrodama. V električnem polju med elektrodama se pospešujejo tako elektroni kot pozitivni ioni, vendar pa pozitivni ioni pri elastičnih trkih z molekulami plina izgubijo preveč energije, da bi lahko sodelovali pri vzdrževanju plazme. Pozitivni ioni v razelektretrivni tako skrbijo le za prostorski naboj, ki preprečuje hitro difuzijo elektronov na stene posode, medtem ko elektroni pri trkih z molekulami povzročajo prehod plina v stanje plazme. Elektroni pri trkih z nevtralnimi molekulami povzročajo reakcije, ki so za primer kisika prikazane na tabeli 1.

Tabela 1: Prikaz najpomembnejših reakcij, ki potekajo v kisikovi plazmi

Table 1: Some most important reactions in the oxygen plasma

$O_2 + e^- \rightarrow O_2^+ + 2e^-$	$O + e^- \rightarrow O^+ + 2e^-$
$O_2 + e^- \rightarrow O^+ + O + 2e^-$	$O + e^- \rightarrow O^* + e^-$
$O_2 + e^- \rightarrow O^+ + O^+ + 3e^-$	$O^* + e^- \rightarrow O^+ + 2e^-$
$O_2^+ + e^- \rightarrow O^+ + O + e^-$	$O_2 + e^- \rightarrow O_2^* + e^-$
$O_2 + e^- \rightarrow O + O + e^-$	$O_2 + e^- \rightarrow O_2^- + 2e^-$
$O_2^+ + e^- \rightarrow O + O$	$O_2^+ + O_2^- \rightarrow O_3 + O$

Posledica prevajanja električnega toka skozi plin je torej vzbujanje molekul v visoka vzbujena stanja. Pogosto se zgodi, da v plazmi sploh niso prisotne plinske molekule, temveč prevladujejo disociirana (nascentni kisik) in ionizirana stanja. Plazme, v katerih je koncentracija navadnih molekul O_2 precej manjša od koncentracije vzbujenih delcev, imenujemo reaktivne plazme. Povprečna notranja energija plinskih delcev v reaktivnih plazmah pogosto dosega več elektron-voltov, kar ustreza povprečni notranji temperaturi delcev okoli 50.000 °C!

3 OSNOVNI MEHANIZMI STERILIZACIJE S PLAZMO

S plazemsko sterilizacijo so se pričeli ukvarjati šele pred dobrim desetletjem¹. Prvi poskusi so bili opravljeni z vodikovim peroksidom. Očitno gre torej za mehak prestop iz čiste kemijske sterilizacije v kombinirano plazemsko. Vodikov peroksid je močan oksidant in je že sam brez plazme dober sterilizant. Plazmo so uporabili predvsem za detoksifikacijo sistema po opravljeni sterilizaciji s peroksidom.

Kasneje so se raziskavam pridružili kemiki in fiziki, in plazemska sterilizacija je doživela nov zagon. Za začetek so ugotovili, da lahko podobne ali boljše uspehe kot s peroksidom dosežejo z različnimi popolnoma netoksičnimi plini: voda, kisik, vodik, argon, helij, dušik. Ugotovili so, da je hitrost in učinkovitost sterilizacije močno odvisna od plazemskih parametrov, kot so temperatura elektronov, gostota pozitivnih in negativnih ionov, gostota metastabilnih atomov in molekul, vrsta in koncentracija radikalov...

Danes je plazemska sterilizacija ena najbolj intenzivnih raziskovalnih področij²⁻¹⁵. Oglejmo si osnovne mehanizme, ki omogočajo sterilizacijo v plazmi.

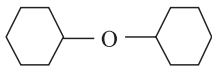
3.1 Radiacijske poškodbe. Plazma je močan izvir UV-sevanja. Absorpcija UV-žarkov v tkivu povzroča razpad kompleksnih organskih molekul in s tem počasno uničevanje živega tkiva. Z UV-obsevanjem pa je žal težko odstraniti razpadne produkte, ki so lahko tudi toksični. Radiacijske poškodbe povzročajo tudi obstreljevanje vzorcev z energijskimi ioni, vendar pa je značilna kinetična energija ionov prenizka, da bi ioni prodrli skozi bakterijsko ovojnico.

3.2 Kemijske poškodbe. Plazma je vir različnih vzbujenih molekul in radikalov, ki so kemijsko zelo aktivni.

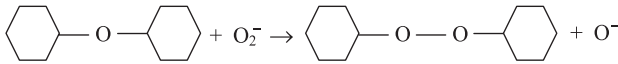
Kot primer si oglejmo kisikovo plazmo. V njej nastajajo pozitivni in negativni ioni, enoelektronsko vzbujene molekule, ozon in nevtralni kisikovi atomi. Nekateri delci (npr. negativni ioni) se kemijsko vežejo na kompleksne organske molekule in povzročajo njihov razpad na manjše molekule. Nevtralni kisikovi atomi se navadno ne vežejo na molekule, ampak povzročijo takojšnjo oksidacijo. Reakcijski produkt je CO ali H₂O, ki se v vakuumu desorbirata s površine. Proces je podoben gorenju, le da poteka oksidacija že pri sobni temperaturi.

3.3 Termične poškodbe. Mnogi plazemski delci imajo precejšnjo potencialno energijo. Pri relaksaciji delcev na površini se sprošča precejšnja energija. Druga, še pomembnejša metoda ogrevanja bakterije je oksidacija s kisikovimi atomi (glej zgornjo alinejo), ki je izredno eksotermna reakcija. Zato bakterija v reaktivni plazmi v hipu (pogosto manj kot v 1 s) preprosto zgori. Težje je ogreti bakterije v porah in na drugih nedostopnih mestih.

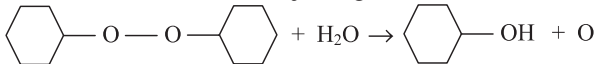
Podrobneje si oglejmo primer kemijskega jedkanja bakterijske ovojnice v kisikovi plazmi. V zunanjem ovoju endospor so ogljikovi obroči vezani s kisikovo vezjo:



Anionski radikal O₂⁻ iz plazme reagira s kisikovo vezjo:



Nastala struktura nadalje reagira z molekulo vode:



Kompleksna molekula tako razpade na dve manjši. Nastali kisikov atom lahko spet reagira z negativnim ionom, kar bi lahko pomenilo vzdrževanje cikla, dokler se atomi ne bi izgubili pri kakšni drugačni reakciji. Razmerje med številom razcepljenih vezi in adsorbiranih radikalov O₂⁻ naj bi bilo po trditvi nekaterih avtorjev (Ref 13) kar od 100 do 1000. Morebiti so avtorji spregledali še kakšno drugo možnost cepitve vezi, vsekakor pa opisani primer lepo ponazarja kemijsko plazemsko razgradnjo celične stene mikrobov.

Oglejmo si še primer termičnega uničevanja mikrobov v plazmi. Temperatura plina je sobna, ogrevamo le bakterije. V prvem približku vzamemo bakterijo za oval, ki je nameščen na podlagi. V tem primeru je toplotni stik med bakterijo in podlago zanemarljiv. Bakterijo obdelajmo s plazmo, kakršno sicer uporabljamo za razmaščevanje elektronskih komponent in plazemsko aktivacijo^{16,17}. Gre za visoko disociirano kisikovo plazmo, ki jo ustvarimo v radiofrekvenči (RF) ali mikrovalovni (MW) razelektritvi. Gostota toka kisikovih atomov (j) na površino bakterije je reda 10²⁴ m⁻² s⁻¹. Verjetnost za

oksidacijo¹⁸ (reakciji C_{org} + O → CO in 2H_{org} + O → H₂O) je pri sobni temperaturi med 0,01 in 0,1. Z indeksom "org" smo označili organsko vezan ogljik in vodik. Reakciji sta eksotermni – energija, ki se sprosti, je skoraj 10 eV na kisikov atom. Gostota energijskega toka (P) je torej:

$$P = j \cdot \eta \cdot W$$

kjer je j gostota toka delcev na površino bakterije, η verjetnost za oksidacijo in W sproščena energija na atom, ki reagira na površini. Z vstavitvijo numeričnih vrednosti dobimo:

$$P = 10^{24} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1} \times 0,01 \times 10^{-18} \text{ J} = 10^4 \text{ W m}^{-2}$$

Sprememba notranje energije bakterije je enaka produktu gostote energijskega toka in površine bakterije, enaka pa je tudi produktu mase, specifične toplotne kapacitete in spremembi temperature bakterije:

$$\Delta W = P \cdot S = m \cdot c_p \cdot \Delta T / \Delta t$$

Sprememba temperature bakterije v časovni enoti je torej:

$$\Delta T / \Delta t = (P \cdot S) / (m \cdot c_p) = 10^4 \text{ K/s}$$

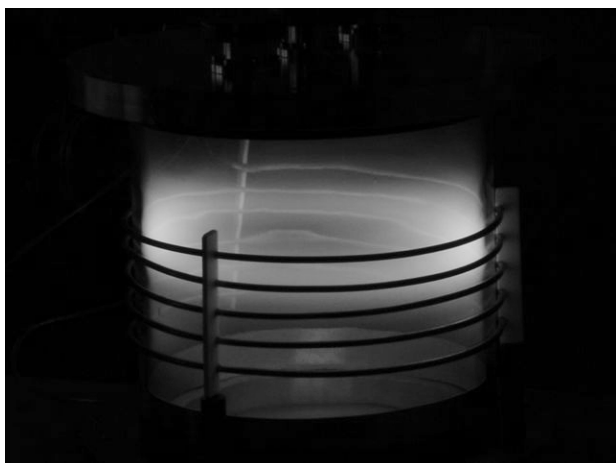
Pri tem smo vzeli za površino bakterije $S = 1 \mu\text{m}^2$, maso $m = 10^{-15} \text{ kg}$ in specifično toplotno kapaciteto $c_p = 1000 \text{ J kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$.

Izoliranim bakterijam na gladki podlagi se torej v kisikovi plazmi slabo piše. Bakterije, ki lebdi v plinu, s plazmo uničimo že v nekaj stotinkah sekunde, za tiste na podlagi pa potrebujemo več časa. Pri zgornjem izračunu smo namreč predpostavili, da je bakterija toplotno izolirana, v resnici pa je površina, s katero se dotika podlage, vendarle končno velika. Termično uničevanje bakterij s kisikovo plazmo je torej odlična metoda, če so bakterije dobro izpostavljene plazmi. Pri tem velja še enkrat omeniti, da je okolica na sobni temperaturi. Ogrevamo samo bakterije.

Žal se mnoge bakterije zadržujejo v režah, kjer je toplotni stik s podlago boljši, predvsem pa je v režah težko zagotoviti zadostno koncentracijo atomov kisika. Zaradi tega je značilni čas za sterilizacijo v kisikovi plazmi reda velikosti ene ure.

4 KRITIČNA OCENA PLAZEMSKA STERILIZACIJE

Sterilizacija biokompatibilnih materialov zaenkrat tehnološko še ni zadovoljivo rešena. Tudi raziskave s plazemsko sterilizacijo teh materialov še niso privedle do komercializacije tega postopka. Bistvena težava je v tem, da je s plazemskega vidika biokompatibilni material zelo podoben mikroorganizmom, ki jih je treba uničiti. Če je plazma zadosti agresivna, da lahko jedka mikroorganizme, je navadno tudi dovolj agresivna, da jedka podlago. V tem smislu samo kemijsko jedkanje ne more prinesiti zadovoljive sterilizacije. Tudi samo UV-sevanje ni posebej primerno za sterilizacijo biokompatibilnih materialov, saj poškoduje tudi podlago. Zaradi tega je sedaj večina raziskav za sterilizacijo biokompatibilnih

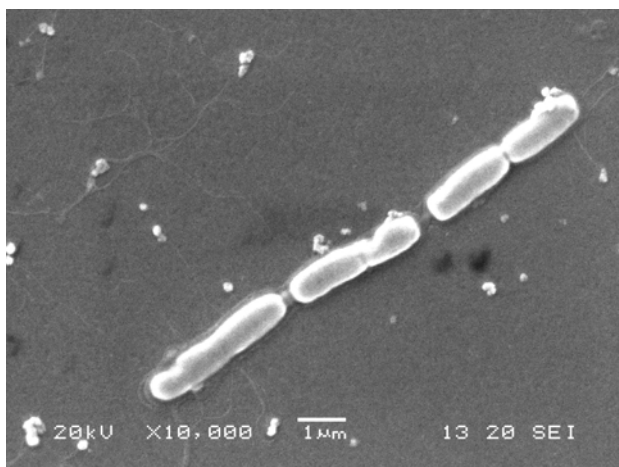


Slika 1: Primer kisikove plazme, ki nastane z radiofrekvenčnim vzbujanjem v steklenem reaktorju 30 l

Figure 1: An example of RF oxygen plasma created in a glass reactor with the volume of 30 l

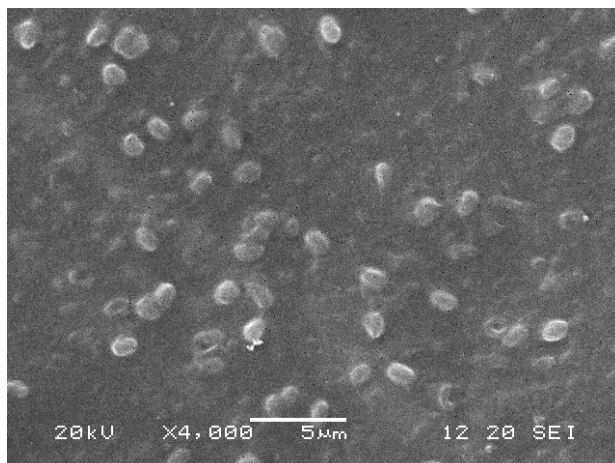
materialov s plazmo osredinjena na kombinirano delovanje vseh treh bistvenih načinov sterilizacije s plazmo. Biokompatibilni materiali imajo pogosto dovolj gladko površino, da je termični stik med bakterijami in površino razmeroma slab (**slika 2**). Zaradi tega lahko v splošnem računamo, da je temperatura bakterije večja od podlage. Pri povišani temperaturi postane pomembno kemijsko jedkanje. Znano je namreč, da je hitrost oksidacije organskih materialov z nekaterimi plinskimi radikali močno odvisna od temperature. Že nekoliko (reda nekaj 10 °C) povišana temperatura lahko povzroči porast verjetnosti za oksidacijo tudi za več velikostnih redov.

Sterilizacija biokompatibilnih materialov se zaplete, če imamo na površini tanko plast, na kateri so bakterije (**slika 3**). Neposredna hladna sterilizacija ni mogoča, saj se z jedkanjem bakterij na površini dogaja tudi erozija tanke plasti, ki je navadno bolj odporna proti eroziji z atomi. Posledice zelo kratke obdelave površine so



Slika 2: Aktivna bakterija *Bacillus subtilis* slikana z elektronskim mikroskopom (SEM) pri 10.000-kratni povečavi

Figure 2: SEM picture of an active bacteria *Bacillus subtilis*

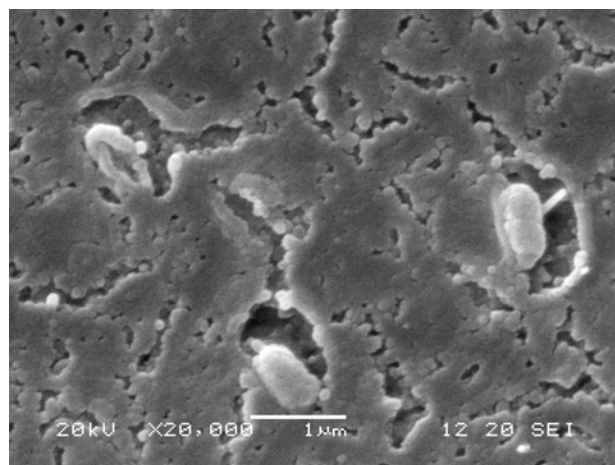


Slika 3: Spore "*Bacillus subtilis*" na podlagi v tanki plasti

Figure 3: Spores of *Bacillus subtilis* on the substrate

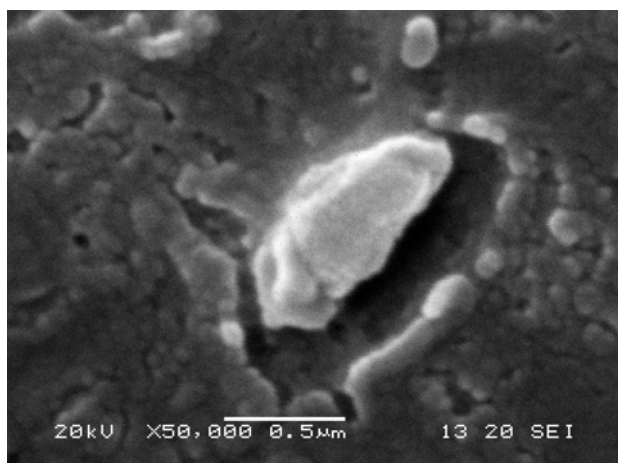
prikazane na **slikah 4** in **5**, kjer se poleg ovojnice bakterije prične degradacija plasti. Če je plast debelejša, se sorazmerno poveča dolžina obdelovanja, ki lahko traja tudi več ur. Razlog za to je izogibanje lokalnemu segrevanju, ki ga povzročajo rekombinacije delcev na površini. Ker temperatura za polimerne materiale, iz katerih so narejeni nekateri implantati, ne sme presegati temperature 100 °C, je treba reakcije omejevati s hlajenjem plinskega toka molekul, ki v vakuumski posodi odnašajo odvečno toploto s površine. Zaradi tega smo omejeni na pulzno delovanje, pri čemer hladimo vzorec v intervalih.

Plazemsko sterilizirani vzorci imajo po sterilizaciji povečano površinsko energijo, kjer so na površini nastale polarne in razcepljene vezi, ki so dovzetne za vezavo katerega koli materiala. To je zelo ugodna lastnost za vezavo materiala z tkivi, ki se takšnega materiala bolje oprimejo.



Slika 4: Slika spor "*Bacillus subtilis*" po uničenju s kisikovo plazmo pri obdelavi s 5 pulzi po 10 s

Figure 4: SEM picture of the spores of *Bacillus subtilis* after being destroyed by the oxygen plasma treatment in 5 pulses for 10 s



Slika 5: Povečava spore, ki kaže učinkovitost kisikove plazme pri eroziji ovojnice spore, kjer jedkamo pretežno s kisikovimi atomi

Figure 5: SEM picture of one spore showing the efficiency of oxygen plasma treatment. The spore's protective layer is eroded by its etching mainly with the oxygen atoms created in the plasma

Bistvene raziskave, ki danes potekajo v svetu na temo plazemske sterilizacije, so namenjene ugotavljanju vpliva plazemskih parametrov na hitrost sterilizacije in na poškodovanje biokompatibilnih materialov. V idealnem primeru bi plazma popolnoma uničila bakterije, podlaga pa sploh ne bi bila poškodovana. Idealne rešitve verjetno ne bomo nikdar dosegli, lahko pa se idealu približamo s pravilno izbiro plazemskih parametrov. Pri tem mislimo predvsem na primerno koncentracijo različnih plazemskih radikalov. Znano je namreč, da različni radikali različno reagirajo z mikroorganizmi in podlagami. Težava je le v tem, da je na današnjem nivoju znanja zelo težko individualno spreminjati koncentracije radikalov. Če želimo npr. povišati koncentracijo ionov, se navadno poveča tudi koncentracija atomov in vzbujenih molekul.

Možna rešitev je posredna uporaba plazme. Namesto plazme, ki vsebuje različne radikale, uporabimo stanja plina po prehodu skozi plazmo. Splošni izraz za takšna stanja plina je "afterglow". Plin vodimo najprej skozi plazmo, da dosežemo visoko koncentracijo vseh radikalov. Pozneje pa s katalizo na izbranih površinah relaksiramo samo določene radikale, druge pa pustimo bolj ali manj nedotaknjene. Tako lahko v končni fazi pridobimo takšno stanje plina, v katerem imamo praktično samo eno vrsto radikalov. Žal je tudi poznanje selektivne relaksacije plazemskih radikalov na površinah še vedno izredno pomanjkljivo.

Pri sterilizaciji mikroorganizmov s plazmo nastopa še vrsta težav, ki se v literaturi redko omenja. Na tem mestu omenjamo samo najpomembnejše: (1) zagotavljanje enakomernosti plazme, (2) generiranje plazme v porah, (3) toksični plini v plazmi in (4) toksični plini kot reakcijski produkti.

Ker je hladna plazma neravnovesno stanje plina, je praktično nemogoče zagotoviti homogenost plazme v celotnem plazemskem reaktorju. Posledica tega je

neenakomernost sterilizacije. Področja, kjer je plazma močnejša (vsebuje več radikalov ali pa je energija radikalov povečana) se hitro sterilizirajo, področja, kjer je plazma šibkejša, pa se sterilizirajo počasneje. Tisti predeli, kjer je sterilizacija že potekla, so brez potrebe izpostavljeni radikalom, ki pogosto povzročajo neželene spremembe tudi na materialih, ki jih steriliziramo. Področja, izpostavljena šibkejši plazmi, pa se sterilizirajo počasneje in lahko tudi po dolgotrajni izpostavi plazmi vsebujejo žive mikroorganizme ali vsaj spore. Problem nehomogenosti plazme je izredno pereč in sedaj še ni zadovoljive rešitve. Večina plinskih razelektritev, s katerimi je mogoče generirati plazme, namreč ustvarja nehomogeno plazmo ali pa plazmo z nezadovoljivo koncentracijo radikalov. To je posledica osnovnih procesov v plinskih razelektrivah, v katere se na tem mestu ne spuščamo. Da bi premostili problem nehomogenosti, so raziskovalci po svetu razvili različne razelektritve, ki omogočajo vsaj približno enakomernost plazme. Pri nizkih tlakih je plazma v marsikateri razelektritvi približno enakomerna, vendar pa vsebuje premajhno gostoto radikalov za uspešno sterilizacijo. Druga skrajnost je uporaba plazme pri navadnem zračnem tlaku, kjer je koncentracija radikalov zadostna, razmeroma hladno plazmo pa je sicer mogoče generirati z enosmerno ali nizkofrekvenčno razelektritvijo z dielektrično pregrado (angleško: dielectric-barrier glow discharge), vendar pa je takšna plazma pogosto nehomogena, vselej pa izrazito neizotropna in s tega vidika popolnoma neuporabna za sterilizacijo predmetov z zapleteno obliko. Večina raziskovalcev zato išče rešitve v uporabi razelektritev pri grobem vakuumu, kjer je plazma za silo izotropna in vsebuje zadostno koncentracijo radikalov. Ker plazma vselej vsebuje ionizirane delce, ki s prostorskim nabojem zastirajo električno polje, so za generiranje plazme z visoko koncentracijo radikalov pri grobem vakuumu najprimernejše visokofrekvenčne razelektritve, pri katerih je omogočeno približno enakomerno vzbujanje radikalov po celotnem volumnu. Sedaj je najbolj perspektivna radio-frekvenčna induktivno sklopljena razelektritev, ki jo uporabljamo tudi v naših laboratorijih.

Generiranje plazme v porah ali ozkih režah je težava, na katero so opozorili fiziki, davno preden so se pojavile prve ideje o sterilizaciji materialov s plazmo. Plazma namreč slabo prodira v pore. Značilno se koncentracija radikalov hitro zmanjšuje z globino pore. Za to sta odgovorna dva procesa: majhna koncentracija energijskih radikalov v porah, kar vodi k zmanjšanju generiranja radikalov, in relaksaciji radikalov na notranjih stenah por. Prvi pojav je mogoče popolnoma izničiti z uporabo dodatne razelektritve, ki deluje po principu votle katode: v pori, ki jo nabijemo negativno proti plazmi, se zaradi prostorskega naboja ustvari močan radialni gradient električnega polja, ki povzroči nihanje elektronov v pori. Posledica tega je lokalna ojačitev plazme, ki lahko izniči pojave, ki sicer preprečujejo normalno koncentracijo radikalov. Če so materiali, ki jih nameravamo sterilizirati, električno prevodni, lahko z

dodatno razelektrivijo z votlo katodo dosežemo odlične rezultate. Težava je v tem, da večina materialov, ki jih želimo sterilizirati s plazmo, ni električno prevodna. V teh primerih si z razelektrivijo z votlo katodo ne moremo prav nič pomagati. Delno lahko pojav ojačitve plazme v porah izolatorjev nadomestimo z uporabo radiofrekvenčnega nabijanja materiala, kar pa je sedaj še vedno v fazi znanstvenih eksperimentov. Navadno radiofrekvenčno nabijanje ne vodi k pojavu ojačitve razelektritve v votli katodi.

Naslednja težava pri plazemski sterilizaciji je značilnost vseh plazem. V njih vselej nastajajo toksični plini. Vrsta takšnih plinov in njihova koncentracija je vselej odvisna od vrste plazme. V čisti kisikovi plazmi ne najdemo posebej toksičnih plinov. Izjema je ozon, katerega koncentracija je odvisna od vrste razelektritve. Koncentracija ozona v kisikovi plazmi lahko doseže prostorninski delež 10 %, kar je več velikostnih redov nad dovoljeno koncentracijo. V tehnoloških procesih je navadno težko doseči obdelavo materialov s čistim kisikom. Četudi je zagotovljena laboratorijska čistota kisika iz jeklenke (več kot 99,999 %), je v procesni komori vselej residualna atmosfera, ki pogosto vsebuje dušik in vodno paro. V plazmi kisik reagira z obema plinomoma in tvori dušikove okside in vodikov peroksid. Posebej to velja za razelektritve pri navadnem zračnem tlaku, kjer je vsaj delno mešanje kisika z zrakom običajen pojav.

Pri plazemski sterilizaciji poleg plinov, značilnih za plazmo v nečistem kisiku, nastajajo tudi drugi radikali, ki so lahko bistveno bolj toksični od ozona, dušikovih oksidov in vodikovega peroksida. Interakcija kisika z ogljikovodiki (ki so pretežna sestavina živih bitij) je navadno nepopolna oksidacije: namesto CO₂ (ki je produkt popolne oksidacije) večinoma nastaja CO, ki je toksičen plin. Poleg obilice vodikovega peroksida, ki je prav tako posledica nepopolne oksidacije ogljikovodikov, nastajajo med plazemsko oksidacijo organskih materialov tudi nekateri drugi toksični plini. Poleg dušikovih oksidov so to lahko bolj kompleksne molekule, kamor spada tudi vodikov cianid, poleg tega pa tudi žveplov oksid in podobni plini. Plazemska obdelava organskih snovi torej lahko vodi k sintezi različnih plinov, ki so večinoma toksični, vendar pomenijo nizek volumenski delež (manj od 10 %). Težava je še večja pri uporabi zraka za sterilizacijo. V tem primeru je koncentracija različnih (pogosto zelo toksičnih) plinskih molekul, ki vsebujejo C, N, H in druge elemente, lahko velika.

Plazemska sterilizacija torej kot večina plazemskih procesov vodi k sintezi različnih toksičnih plinov in radikalov. Le-ti se delno absorbirajo v vakuumski črpalki (če proces poteka v pri znižanem tlaku), v splošnem pa bi lahko postali resen problem. Z uporabo katalizatorjev za toksične pline je mogoče ta problem bistveno zmanjšati ali celo odpraviti¹⁹.

5 SKLEP

Opisali smo osnovne mehanizme sterilizacije s plazmo. Plazemska sterilizacija temelji na termičnih, kemijskih in radioloških efekti. V vsakem primeru lahko najdemo dovolj agresivno plazmo, s katero steriliziramo poljubne materiale. Težava nastopi tedaj, ko želimo sterilizirati temperaturno občutljive biokompatibilne materiale. V tem primeru je treba izbrati takšno plazmo, ki je dovolj reaktivna, da uniči bakterije, vendar še vedno dovolj nežna, da ne poškoduje podlage. Zaradi nasprotnosti obeh zahtev je takšno plazmo pogosto zelo težko generirati, in to je verjetno razlog, zaradi katerega plazemska sterilizacija še ni komercializirana.

Zahvala

Ta članek je rezultat skupnega dela slovenskih in črnogorskih raziskovalcev pri projektu BI-SCG/04-05-št. 28 v okviru SLO-CG znanstveno-tehničnega sodelovanja.

6 LITERATURA

- ¹ M. C. Krebs, P. Becasse, D. Verjat, J.C. Darbot, *Int. J. Pharm.*, 160 (1998), 75–81
- ² M. Mozetič, T. Mozetič, P. Panjan, *Vakuumist*, 21 (2001), 10–12
- ³ A. Vesel, M. Mozetič, *Vakuumist*, 23 (2003), 9–14
- ⁴ W. Bar, G. M. de Bar, A. Naumann, S. Rusch-Gerdes, *Amer. J. Infec. Contr.*, 29 (2001), 306–311
- ⁵ M. Moisan, J. Barbeau, S. Moreau, J. Pelletier, M. Tabrizian, L. H. Yahia, *Int. J. Pharm.*, 226 (2001), 1–21
- ⁶ S. D. Ferreira, W. S. Dernell, B. E. Powers, R. A. Schochet, C. A. Kuntz, S. J. Withrow, R. M. Wilkins, *Clin. Orth. Rel. Res.*, 388 (2001), 233–239
- ⁷ M. Moisan, J. Barbeau, J. Pelletier, *Du Vide*, 56 (2001), 15–28
- ⁸ S. Cariou-Travers, J. C. Darbord, *Du Vide*, 56 (2001), 34–46
- ⁹ P. Koulik, S. Krapivina, A. Saitchenko, M. Samsonov, *Du Vide*, 56 (2001), 117–125
- ¹⁰ D. A. Mendis, *Physica Scripta T89* (2001), 173–175
- ¹¹ C. E. Holy, C. Chen, J. E. Davies, M. S. Shoichet, *Biomater.*, 22 (2001), 25–31
- ¹² R. Ben Gadri, J. R. Roth, T. C. Montie, K. Kelly-Wintenberg, P. P. Y. Tsai, D. J. Helfrich, P. Feldman, D. M. Sherman, F. Karakaya, Z. Y. Chen, *Surf. Coat. Technol.*, 131 (2000), 528–542
- ¹³ A. Kaklugin, P. Koulik, S. Krapivina, G. Norman, E. Petrov, A. Ricard, M. Samsonov, *Proc. 13th Int. Coll. Plasma Processes*, (2001), 28–32
- ¹⁴ T. K. Subramanyam, R. Schwefel, P. Awakovitz, *Proc. 13th Int. Coll. Plasma Processes*, (2001), 33–36
- ¹⁵ M. Moisan, J. Barbeau, J. Pelletier, N. Philip, B. Saoudi, *Proc. 13th Int. Coll. Plasma Processes*, (2001), 12–18
- ¹⁶ A. Vesel, M. Mozetič, *Vacuum*, 61 (2001), 373–377
- ¹⁷ D. Babič, I. Poberaj, M. Mozetič, *Rev. Sci. Instr.*, 72 (2001), 4110–4114
- ¹⁸ M. Mozetič, A. Zalar, P. Panjan, M. Bele, S. Pejovnik, R. Grmek, *Thin Solid Films*, 376 (2000), 5–8
- ¹⁹ M. Mozetič, G. A. Evangelakis, U. Cvelbar, Plazemska sterilizacija pretočnega zraka, SI21448. Urad za intelektualno lastnino Republike Slovenije (2004)