

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
ФАКУЛЬТЕТ РАДІОФІЗИКИ, ЕЛЕКТРОНІКИ ТА КОМП'ЮТЕРНИХ СИСТЕМ

Кафедра медичної радіофізики

«На правах рукопису»

Робота допущена до захисту в ЕК
рішенням кафедри
від ____ ____ 2024 року, протокол № ____ .
Завідувач кафедри кандидат фіз. -мат. наук, доцент
_____ Сергій РАДЧЕНКО

ДИПЛОМНА РОБОТА МАГІСТРА

на тему:

**«ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ ІНАКТИВАЦІЇ БАКТЕРІЙ ПРИ ОБРОБЦІ
НИЗЬКОТЕМПЕРАТУРНОЮ ПЛАЗМОЮ»**

Виконала:

студентка 2-го курсу магістратури
денної форми навчання
спеціальності 105 Прикладна фізика та наноматеріали
ОНП «Біомедична фізика, інженерія та інформатика»
Бевз Поліна Іллівна _____

Науковий керівник:

кандидат фіз.-мат. наук , доцент
Веремій Юлія Петрівна _____

Рецензент:

доктор біологічних наук, доцент
Цимбалюк Ольга Володимирівна _____

Засвідчую, що у цій дипломній роботі

немає запозичень з праць інших авторів без відповідних посилань

Студентка _____ Поліна БЕВЗ

Київ 2024

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота складається з 32 сторінки, 19 рис, 7 таблиць, 13 джерел

Метою даної роботи було дослідження та порівняння впливу низькотемпературної плазми на мембрану бактерій. Також було проведено експеримент по визначенню оптимального часу та потужності обробки зразків для того щоб накопичений заряд на поверхні бактерій впливав на їх оболонку. Розраховано яку площу заряджає коронний заряд на більших часах, аніж в оглянутій науковій статті й порівняно результати.

Ключові слова: Низькотемпературна плазма, грампозитивні бактерії, грамнегативні бактерії, електричне поле, поверхневий потенціал

Список аббревіатур, використаних в даній роботі

НТП – низькотемпературна плазма

ROS (АФК) – активні форми кисню

RNS (АФА) – активні форми азоту

sLm – стандартних літрів на хвилину

CFU/ml (КУО · мл⁻¹) – колонієутворюючі одиниці на мл

Зміст

ВСТУП.....	4
1.ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	5
1.1 Вплив НТП на різні штами бактерій й деактивація колоній	5
1.2 Дослідження фізичного впливу плазми на оболонку бактерій	14
2. Традиційні генератори плазми для обробки біоб'єктів	19
2.1 Коронний заряд	19
2.2 DBD розряд	20
3. Експериментальна частина.....	22
Висновки	30
Список використаних джерел	31

ВСТУП

Інактивація бактерій й контролювання чисельності бактерій може проходити різними фізичними шляхами: механічна взаємодія, опромінення лазером, магнітне поле, УЗД або низькотемпературною плазмою.

Атмосферна нерівноважна низькотемпературна плазма (далі НТП) довела свою корисність у багатьох застосуваннях, пов'язаних із живими клітинами, тканинами та бактеріями. Незважаючи на те, що запалювання та підтримання атмосферної нерівноважної плазми набагато складніше, ніж плазми низького тиску, перші зайняли провідне місце у застосуванні плазми в біології та медицині. За допомогою НТП можливо знезаражувати дрібні (в межах 2 мм) поверхні такі як канал зуба. В найближчому майбутньому НТП використовуватимуть для лікування ракових клітин, бо такий спосіб знищує осередок інфекції без порушення цілісності здорових тканин.

Останнім часом все більше науковців досліджують вплив НТП на бактерії. Існує дві точки зору: з одного боку це хімічна взаємодія між НТП та бактерією, з іншого боку процес має під собою фізичне пояснення. Взаємодія між плазмою й бактерією відбуваються за участі таких компонентів: заряджених частинок, збуджених атомів, реактивних видів (NO, O₃, OH), ультрафіолет або іонне бомбардування. Під впливом НТП на бактерію можна перелічити: зміна товщини мембрани, зменшення активності клітин, зміна міцності клітинної оболонки. Високу інтенсивність пов'язують з наелектризваністю крапельок, тобто на поверхні бактерії накопичується заряд який розтягує мембрану й призводить до «розриву» бактерії.

Метою даної роботи є порівняння фізико-хімічних властивостей впливу НТП для різних типів бактерій. В даній роботі розглядалися грамнегативні й грампозитивні бактерії, їх відмінність у будові й взаємодії з плазмою.

1.ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Вплив НТП на різні штами бактерій й деактивація колоній

В роботі авторів Nevena Ruac*, Maja Miletić, Miloš Mojović та інші «Sterilization of bacteria suspensions and identification of radicals deposited during plasma treatment» [1] автори взяли в якості плазмової установки – плазмову голку, яка складається з довгого центрального електрода, виготовленого з тонкого вольфрамового дроту (діаметром 0,5 мм), покритого керамічною трубкою. Обидва були поміщені всередину скляної трубки із зовнішнім діаметром 6 мм. Метою керамічної трубки було ізолювати центральний електрод від низького вмісту гелію, щоб уникнути створення плазми всередині скляної трубки та тіла плазмової голки. В експериментах як живильний газ використовувався гелій. Низькі потоки гелію були відрегульовані до 0,5 та 1 стандартних літрів на хвилину (sLm) контролером низької маси (OmegaFMA5400/5500). Для живлення плазмової голки використовувався синусоїдальний сигнал на частоті 13,56 МГц. Плазмову голку розміщували вертикально над кожною лункою в якій знаходилось по 0,2 мг зразка, що містить бактеріальні клітини.

Плазмове джерело генерує радикали кисню (ROS) і радикали азоту (RNS) як N, O, O₃, OH і NO, які можуть відігравати роль у метаболізмі клітин, запускаючи різні біологічні процеси протягом стерилізації. Коли зразки знаходяться в прямому контакті з розрядом, усі ці радикали легко досягають поверхні зразка. Однак, коли бактерії суспендовані в рідині, виникає необхідність додатково дослідити, чи можуть радикали, що виникли з плазми, проникнути в розчин. Електронний парамагнітний резонанс (ЕПР) є одним із діагностичних методів, за допомогою якого можна визначити наявність радикалів у розчинах.

Автори в даній статті перевірили антимікробний потенціал низькотемпературної атмосферної плазми, створеної плазмовою голкою, на двох

видах бактерій. ЕПР використовували для виявлення видів ОН, Н та NO в розчинах, які використовували для приготування суспензій бактерій.

Для вивчення антибактеріального ефекту нетеплової плазми було проведено обробки для трьох різних потужностей плазми (0,15 Вт, 0,9 Вт, 1,6 Вт), двох низьких потоків гелію (0,5 і 1 sLm) і трьох експозицій (60 с, 120 с і 180 с).

Плазмова голка використовувалася для стерилізації грампозитивних і грамнегативних бактерій. Нижче наведені результати обробки плазмою *E.faecalis* ATCC 29212 і *P.aeruginosa* ATCC 27853 більш детально. Зразки для обох штамів бактерій готувались у вигляді суспензій чотирьох різних концентрацій ($1,5 \cdot 10^8$ КУО мл⁻¹ (колонієутворюючі одиниці), $1,5 \cdot 10^7$ КУО мл⁻¹, $1,5 \cdot 10^6$ КУО мл⁻¹, $1,5 \cdot 10^5$ КУО мл⁻¹). Окрім концентрації бактерій у суспензіях, змінювався потік буферного газу, потужність, що подається на плазму, час обробки.

На рис.1.1 показано результати стерилізації грампозитивної *E.Faecalis* для потоків гелію 0,5 і 1 sLm. Можна помітити, що кращі результати були отримані для вищого потоку в 1 sLm. Це можна пояснити більшим надходженням радикалів, що утворилися в плазмі, в суспензію, що містить бактерії. Як і очікувалося, зменшення кількості колоній збільшувалося зі збільшенням часу обробки. У разі низької концентрації клітин у колонії автори спостерігали повну стерилізацію зразків. У всіх інших випадках зменшення популяції колонії було на декілька порядків від початкової.

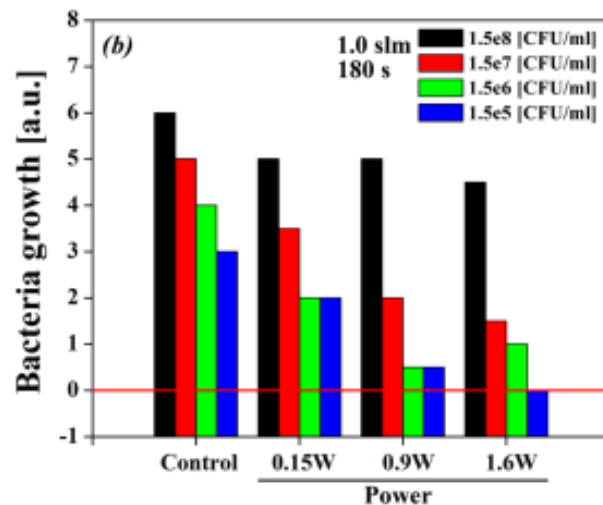
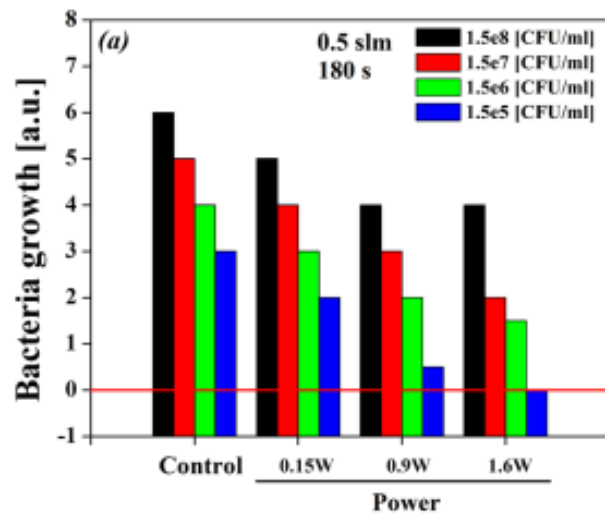
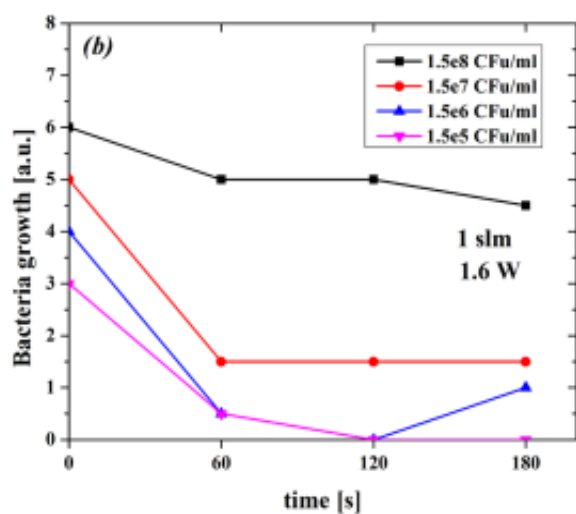
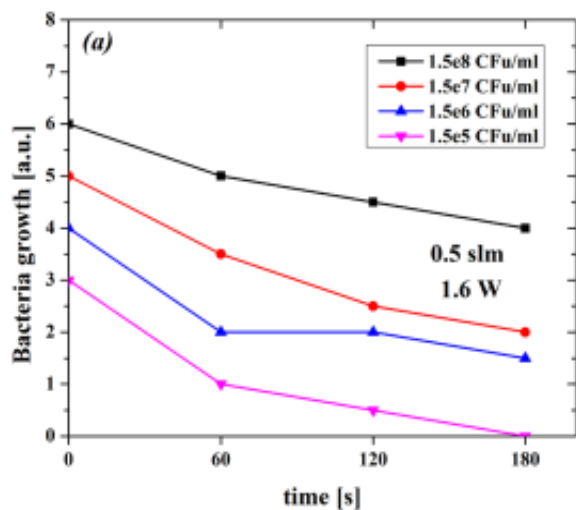


Рис 1.1(a,b) Графіки обробки *Enterococcus faecalis* для потоків 0,5 та 1 slm, залежність знищення колонії від часу (60 – 180 с) при сталій потужності

Рис. 1.2(a,b) Графіки обробки *Enterococcus faecalis* для потоків 0,5 та 1 slm, залежність від потужностей при сталому часі

На рис.1.2 показані результати для найдовшого часу обробки, порівнюючи різні потужності для різних концентрацій. Помітно, що для найменшої потужності не спостерігалось жодного значного зменшення бактеріальних колоній порівняно з необробленим контролем. З іншого боку, зі збільшенням потужності, що подається на плазму, ефект стерилізації зростає. Автори зауважили що вища потужність призвела до кращих ефектів стерилізації. Однак кінцевий результат сильно залежав від початкової концентрації бактерій. Наприклад, для найвищої концентрації

$1,5 \times 10^8$ КУО мл^{-1} скорочення було лише на один – два порядки. Можна зазначити що потік гелію в 1 sLm дав кращі результати при обробці зразків.

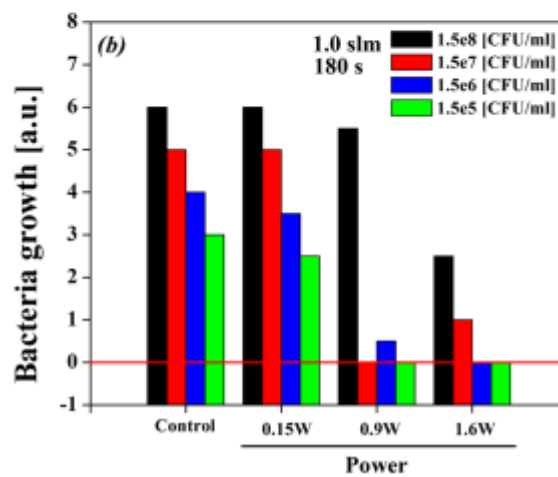
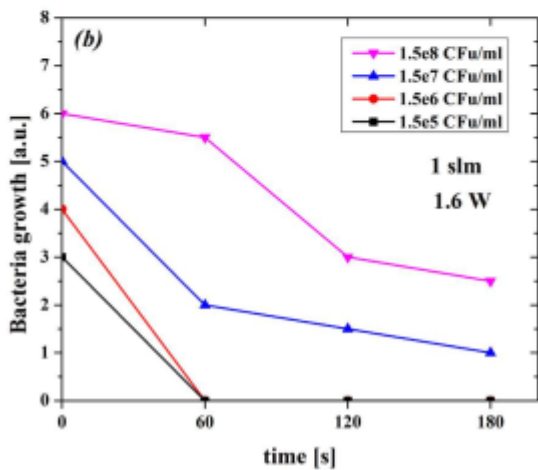
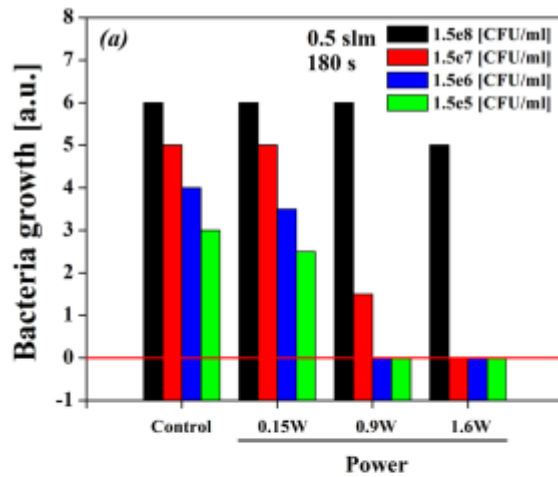
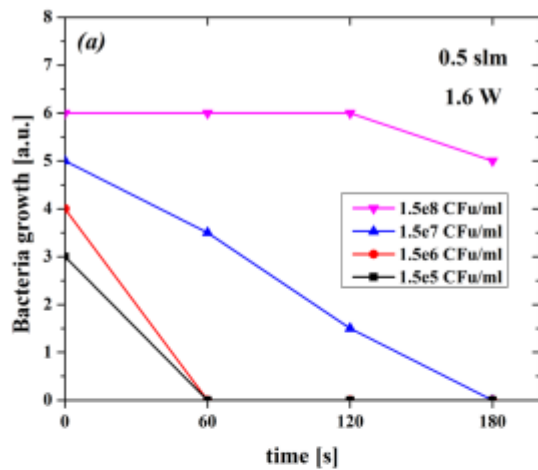


Рис. 1.3(a,b) Графіки обробки *Pseudomonas aeruginosa* для потоків 0,5 та 1 sLm, залежність знищення колонії від часу (60с – 180с) при сталій потужності
 Рис. 1.4(a,b) Графіки обробки *Pseudomonas aeruginosa* для потоків 0,5 та 1 sLm, залежність від потужностей (0,15 Вт – 1,6 Вт) при сталому часі обробки

Другий штам бактерій, використаний в експериментах, був грамнегативним *P.aeruginosa* ATCC 27853. На рис.1.3 показано результати плазмової обробки чотирьох різних концентрацій для двох різних потоків буферного газу за найвищої потужності при різному часі обробки. Як і в випадку *E.faecalis*, була досягнута

краща стерилізація з більш високим вмістом гелію. Для концентрацій $1,5 \times 10^6$ КУО мл^{-1} і $1,5 \times 10^5$ КУО мл^{-1} повна стерилізація зразків була досягнута для часу обробки 60 с. Для більш високих концентрацій зменшення бактерій становило 4 – 5 порядків величини. Залежність стерилізації від потужності, що подається на плазму, показана на рис.1.4. Зі збільшенням потужності, що вкладається в плазму, була досягнута краща стерилізація.

Можна помітити, що двома основними параметрами при стерилізації зразків бактерій є потужність, що надходить до плазми, і тривалість обробки. Потік буферного газу мав певний вплив на результати стерилізації, але не так сильно, як параметри зазначені вище. Важливість потужності, що надходить до плазми, можна пояснити наявністю активних хімічних частинок. Якщо до плазми надходить більше енергії, реакційноздатні речовини, відповідальні за стерилізацію, виробляються ефективніше та у вищих концентраціях (за винятком випадків, коли відбувається якась хімічна реакція, що сприяє більшій щільності інших компонентів). Так само тривалість обробки відповідає за загальну кількість радикалів, залучених до процесу стерилізації. Поєднання цих двох параметрів дає можливість більшого діапазону оптимальних умов стерилізації. Можна скоротити час обробки та збільшити потужність, що подається на плазму, або збільшити тривалість обробки та працювати з меншою потужністю, але мати подібний ефект стерилізації.

Наведено результати плазмової стерилізації грампозитивних і грамнегативних штамів бактерій. Стерилізацію проводили за допомогою плазмового пристрою при атмосферному тиску, а оброблені зразки мали форму суспензії. Електронний парамагнітний резонанс використовувався для виявлення радикалів, що осіли в розчині. Виявлено радикали Н, ОН та NO, що осідають у розчині після плазмової обробки. У цьому випадку найважливішим радикалом є NO, який є потужним антимікробним агентом, ефективним проти ряду

грамнегативних і грампозитивних бактерій [2]. В експериментах використовувалось чотири початкові концентрації бактерій ($10^5 - 10^8$ КУО мл⁻¹). Для вищих концентрацій спостерігається зниження на кілька порядків, а для нижчих повне знищення бактерій.

Грамнегативні й грампозитивні бактерії

Окрім двох важливих параметрів, які впливають на обробку мікрооб'єктів таких як час й потужність, ефект здебільшого залежить від концентрації бактерій і їх штаму. Загалом кажучи, існує два типи бактерій: грампозитивні та грамнегативні. Ця різниця впливає на те, як вони забарвлюються під час звичайного лабораторного тесту, який називається фарбуванням за Грамом, а також на їхню чутливість до антибіотиків. У грампозитивних бактерій клітинна стінка складається з кількох шарів пептидоглікану, що утворює товсту, жорстку структуру. Стінка грамнегативної клітини містить лише тонкий шар пептидоглікану та зовнішню мембрану, що складається з ліполісахариду.

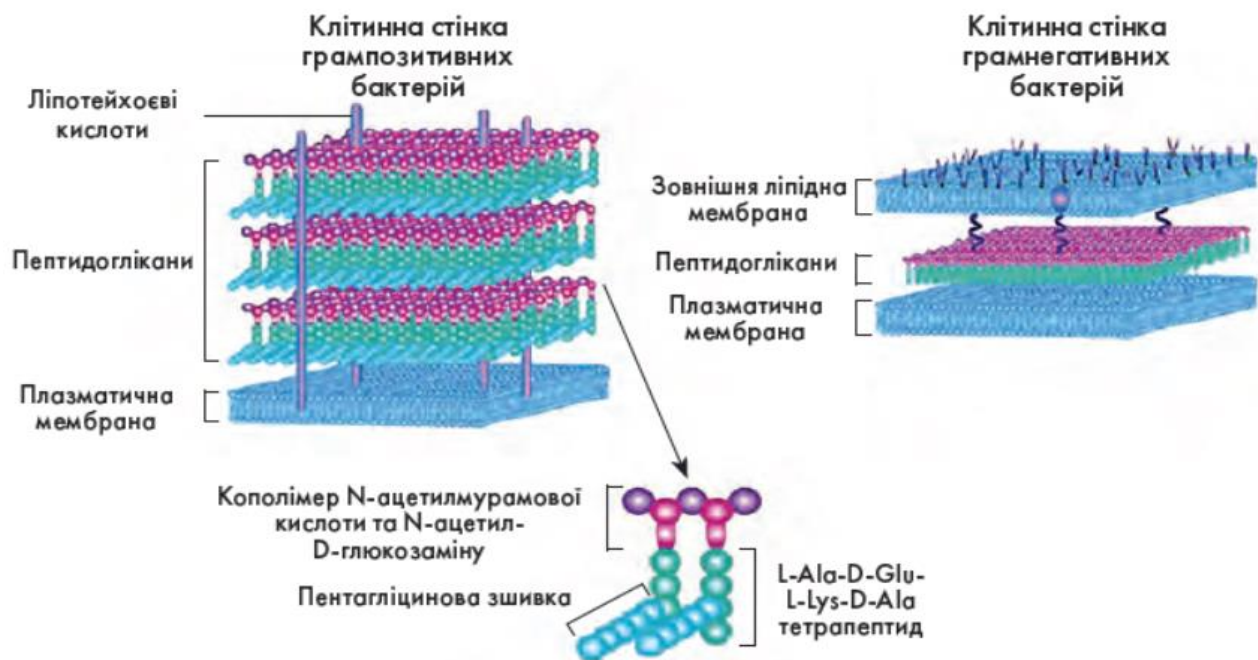


Рис.1.5 Будова клітинної стінки грампозитивних і грамнегативних бактерій

Фарбування за Грамом – це рутинний лабораторний тест, який використовується для розрізнення грампозитивних і грамнегативних бактерій. Процедура фарбування полягає в обробці бактерій кристалічним фіолетовим барвником, а потім додаванні йоду для утворення кристалічного фіолетово-йодного комплексу. Після цього клітини промивають спиртом, а потім забарвлюють контрастним барвником, зазвичай сафраніном.

- Грампозитивні бактерії зберігають кристалічний фіолетово-йодний комплекс у своєму товстому пептидоглікановому шарі і під мікроскопом виглядають фіолетовими. Наприклад (*Staphylococcus species*, *Streptococcus species*, *Corynebacterium species*, *Clostridium species*, *Listeria species*)
- Грамнегативні бактерії втрачають кристалічний фіолетово-йодний комплекс під час етапу промивання спиртом через зовнішню мембрану. Після цього вони поглинають сафраніновий контраст і під мікроскопом виглядають рожевими або червоними. Наприклад (*Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*, *Moraxella species*, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas species*, *Proteus species*, *Klebsiella species*)

Різниця в структурі клітинної стінки також впливає на чутливість цих двох типів бактерій до антибіотиків. Багато антибіотиків діють на клітинну стінку. Наприклад, пеніцилін порушує синтез пептидоглікану. Цей антибіотик більш ефективний проти грампозитивних бактерій, оскільки він може легко досягти їхнього пептидогліканового шару. Зовнішня мембрана грамнегативних бактерій може діяти як бар'єр для деяких антибіотиків, роблячи ці бактерії більш стійкими.

Все наведене вище можна узагальнити в таблиці

Характеристика	Грам-позитивні бактерії	Грам-негативні бактерії
Клітинна стінка	Товстий шар пептидоглікану	Тонкий шар пептидоглікану, оточений зовнішньою мембраною

Забарвлення за Грамом	Фіолетовий	Рожевий або червоний
Чутливість до антибіотиків	Більш чутливі до деяких антибіотиків (наприклад, пеніциліну)	Більш стійкі до деяких антибіотиків завдяки зовнішній мембрані

Реактивні форми кисню та азоту

В даній науковій роботі вчені робили зауваження на тому що така реакція різних штамів на обробку стається через утворення реактивні форми кисню (АФК) та азоту (АФА). Існує декілька теорій як саме АФК й АФА впливають на деактивацію бактерій.

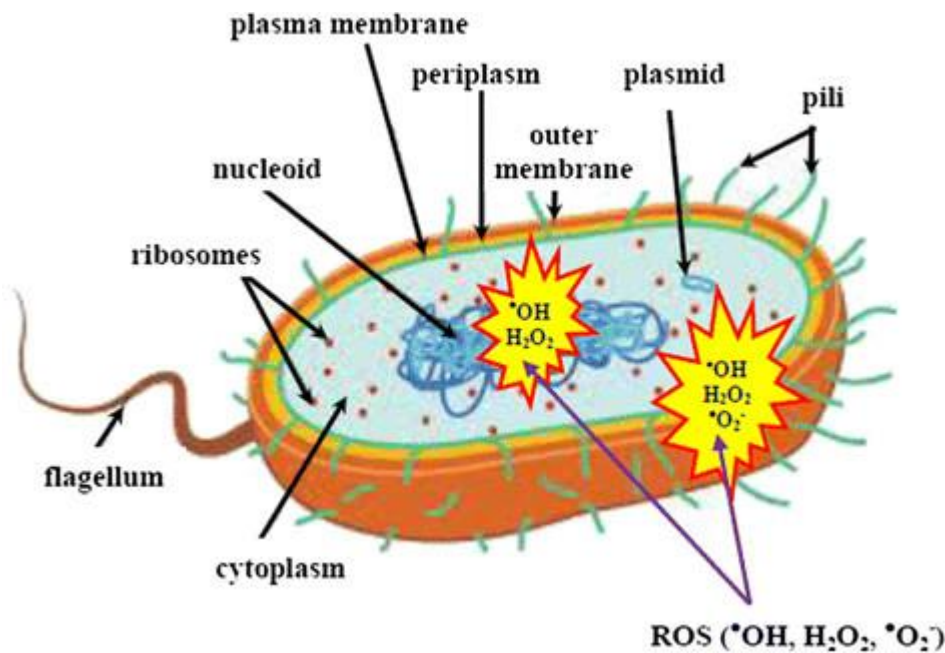


Рис.1.6 Схематичне зображення впливу АФК на мембрану бактерії

1. Порушення клітинних мембран: АФК і АФА можуть руйнувати клітинну мембрану бактерій, роблячи її більш проникною і дозволяючи витікати необхідним молекулам.
2. Пошкодження ДНК та білків: АФК і АФА можуть безпосередньо пошкоджувати ДНК і білки бактерій, перешкоджаючи їхньому функціонуванню та розмноженню.

3. Окислювальний стрес: АФК є окислювачами, тобто вони можуть викликати окислювальний стрес у бактерій. Це порушує нормальний хімічний баланс бактерій і може призвести до загибелі клітин.

Ще одним представником окрім розглянутих цими авторами є перекис водню H_2O_2 який поглинається клітинами шляхом дифузії й залежить від іонних каналів. Всередині клітини починають відбуватись розпад перекису на синглетний кисень й гідроксил. В той самий час зовнішній H_2O_2 продукує окислювальні шляхи такі як карбонілювання та перекисне окислення ліпідів.

1.2 Дослідження фізичного впливу плазми на оболонку бактерій

Якщо підходити до обробки бактерій з фізичної точки зору на огляді потрапила дипломна робота Бубликової Катерини «Електростатичне руйнування мембран бактерій плазмою атмосферного тиску» [5]. В роботі [6] проведено теоретичну оцінку умови розриву мембрани бактерії. Було висунуто припущення що при обробці плазмою бактерії набувають електростатичного заряду й що з'являється сила електростатичного натягу, яка розриває мембрану за умови що вона перевищує міцність самої оболонки клітини. Експериментальні дані для роботи були отримані для бактерій які оброблювались RDB (resistive barrier discharge), який заснований на концепції DBD, але замість діелектрику між електродами знаходиться матеріал з високим опором. Електроди використовуються для створення змінної напруги в кілька кіловольт з лінійною частотою 60 Гц. Потужність, необхідна для утримання стабільного розряду, знаходиться в межах від 50 до 300 Вт. Густина потужності плазми зазвичай коливається від 10 до 300 мВт·см⁻³. Плазма є нерівноважною, оскільки температура нейтральних частинок та іонів залишається приблизно рівною температурі навколишнього середовища, в той час як температура електронів набагато вища (до 5 еВ). Концентрація заряджених частинок знаходиться в діапазоні від 10¹¹ до 10¹² на кубічний сантиметр.

При спостереженні автор помітив по мікрофото різницю обробки грамнегативних й грампозитивних бактерій. Грамнегативні бактерії, як можна помітити по Рис. 1.7 видно що мембрана грамнегативних бактерій *E. coli* деформується й при порушенні цілісності цитоплазма витікає назовні. А на Рис. 1.8 де зображені бактерії *B. Subtilis* помітно що на відміну від грамнегативних бактерій мають більш товсту оболонку (яка містить муреїн, який впливає на міцність) й вони не зазнали після обробки видимих пошкоджень при обробці.

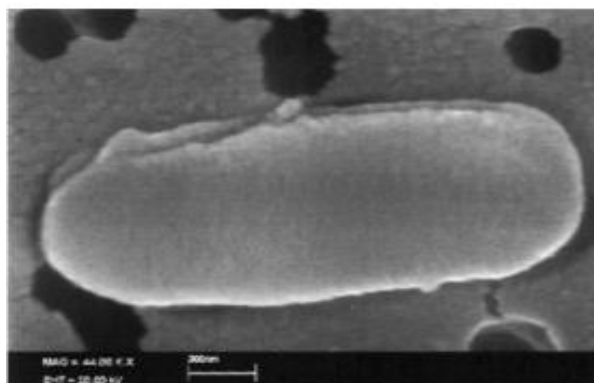
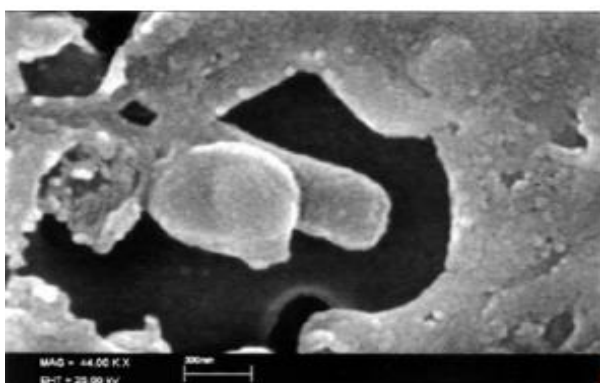
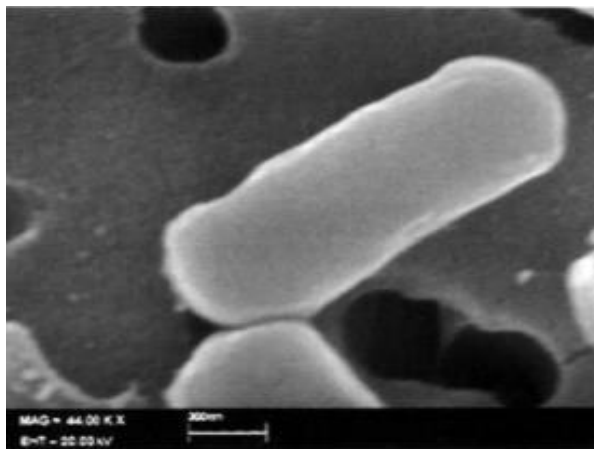
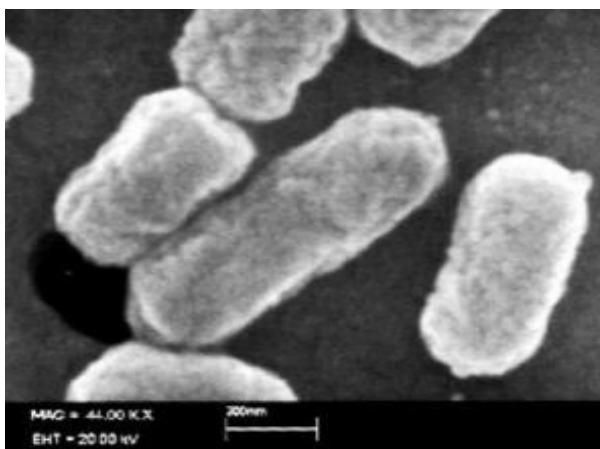


Рис. 1.7 Мікрофото грамнегативних бактерій. Необроблений контроль – згори, оброблені зразки – знизу

Рис. 1.8 Мікрофото грампозитивних бактерій. Необроблений контроль – згори, оброблені зразки – знизу

Були також фотографії (Рис. 1.9) зроблені для того щоб побачити як час обробки впливає на грампозитивні бактерії, які мають товщу мембрану. *S. aureus* в медичинській практиці часто використовують при тестуванні нових штамів антибіотиків. Обробка тривала 15 секунд й не викликала ніяких видимих морфологічних змін. При збільшенні часу обробки по фотографіям бактерій (Рис. 1.9 (в, г)) призвело до деформації й повного знищення колонії. Отже, використання нетермічної плазми для швидкої фізичної деструкції бактерій може бути ефективним методом їх інактивації, оскільки бактерії не здатні розвинути стійкість до цього підходу [7].

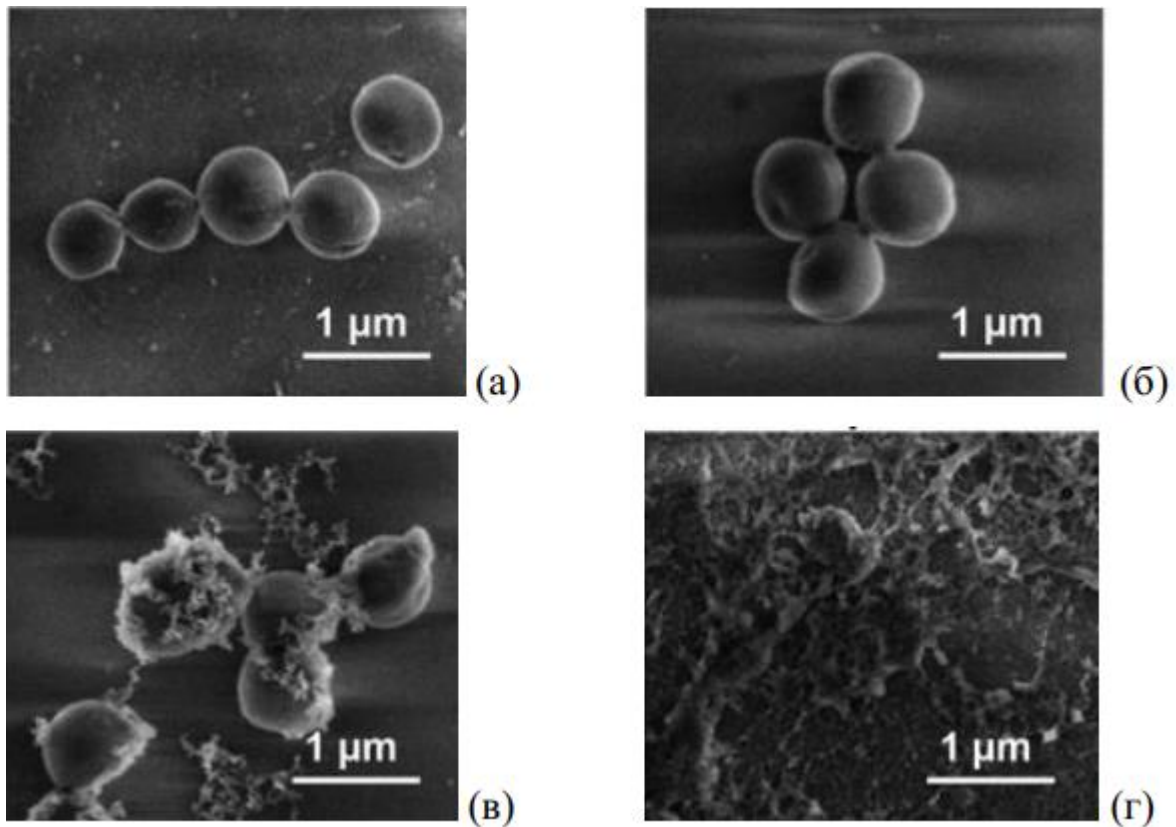


Рис. 1.9 Мікрофото *S. Aureus*: необроблений контроль (а), оброблений зразок оброблений гелієм (б,в,г) протягом 15, 30, та 60 с відповідно.

Внутрішньоклітинні види можуть прямо реагувати з біоматеріалами в межах клітини. Ці реакції можуть порушити цілісність мембрани бактерії, що може спричинити її загибель, або зробити бактерію нерухомою, хоча не обов'язково мертвою.

Спочатку розглянемо силу, яка діє на поверхню провідного тіла. У стаціонарному режимі електричне поле всередині провідника дорівнює нулю. Відповідно до крайових умов, рівнянь Максвелла, напруженість електричного поля \vec{E} на поверхні провідника направлена вздовж нормалі \vec{n} і має значення:

$$E = 4\pi\sigma, \text{ де } \sigma \text{ – густина поверхневого заряду}$$

Сила яка діє на якусь частину поверхні розміром dS : $d\vec{F} = \sigma(\vec{E} - \vec{E}_s)dS$, де

$E_s = 2\pi\sigma\vec{n}$ – електричне поле яке утворюється самою бактерією на поверхні

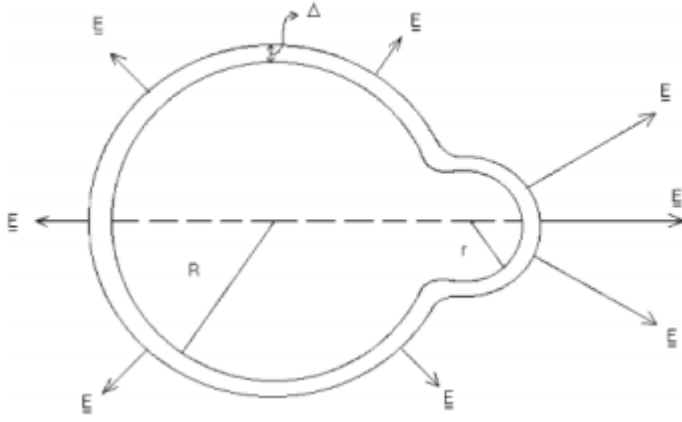


Рис.1.10 Спрощене зображення мембрани досліджуваної клітини. Стрілочками показано напрямок дії сили заряджених частинок.

«Ідеальна» клітина зображена на рис. має радіус R з нерівністю округлої форми радіуса r . Припущено що товщина стінки буде Δ , а рівномірний потенціал Φ . Логічно припустити що розриви відбуватимуться на поверхні де радіус викривлення мінімальний через те що більше електричних полів. Умова при якій відбувається електростатичне руйнування є такою що загальна електростатична сила: $d\vec{F} = \frac{2\pi E^2}{16\pi^2} \vec{n} dS = \frac{E^2}{8\pi} \vec{n} dS$ вздовж осі приєднання центрів двох сфер має перевищувати силу нятягу оболонки вздовж цієї осі: $\int_0^r \frac{E^2}{8\pi} 2\pi\rho d\rho > F_t 2\pi r \Delta$ (1), де ρ – циліндрична координата, F_t – межа міцності, $\frac{E^2}{8\pi}$ – електростатичний натяг

Відомо що $E = \frac{\Phi}{r}$ для маленької округлої випуклості. Далі автор проводить скорочення формули для умови (1)

$$\frac{E^2}{8\pi} \int_0^r 2\pi\rho d\rho = \frac{E^2}{8\pi} 2\pi \frac{\rho^2}{2} \Big|_0^r = \frac{E^2}{8} r^2 = \frac{\Phi^2}{8}$$

$$F = F_t \cdot S, S = 2\pi r \Delta$$

$$\frac{\Phi^2}{8} > F_t 2\pi r \Delta, \Phi > 4\sqrt{\pi} \sqrt{r} \sqrt{F_t} \sqrt{\Delta}, \text{ або } \Phi > 4\sqrt{\pi} \sqrt{r \cdot R} \sqrt{\frac{\Delta}{R}} \sqrt{F_t},$$

де $[\Phi] = \text{статВ}$; $[r], [R], [\Delta] = \text{см}$; $[F_t] = \text{дина}\backslash\text{см}^2$.

$$1 \text{ статВ} = 299,792458 \text{ В} \approx 3 \cdot 10^3 \text{ В}$$

Звідки можна вивести що $\Phi(V) > 3 \times 10^3 \times 4\sqrt{\pi}\sqrt{r \times R} \sqrt{\frac{\Delta}{R}} \sqrt{F_t}$

В кінцевому результаті $|\Phi(V)| \geq 0,2\sqrt{r(\mu\text{m}) \cdot R(\mu\text{m})} \sqrt{\frac{\Delta}{R}} \sqrt{F_t}$

В якому Φ – рівномірний поверхневий потенціал, r – радіус нерівності, R – радіус бактерії, F_t – границя міцності мембрани, Δ – товщина мембрани.

Автор порахував поверхневий потенціал для розриву бактерій й зробила висновок з наведених вище спостережень що віруси, які є меншими за бактерії і мають виражені поверхневі нерівності, є дуже сприйнятливими до електростатичних структурних руйнувань в нетепловій плазмі.

2. Традиційні генератори плазми для обробки біооб'єктів

2.1 Коронний заряд

Коронний розряд - це тип газового розряду, що виникає в сильних неоднорідних електричних полях навколо електродів із великою густиною. Коронний розряд проявляється візуально у вигляді світіння навколо гострих кутів електрода. Напруженість електричного поля, необхідна для виникнення коронного розряду, повинна перевищувати 3×10^4 В/см. Однак, можна навести орієнтовні діапазони: напруга: 3-30 кВ/см; струм: $10^{-6} - 10^{-8}$ А

При виникненні негативної корони, позитивно заряджені йони, що утворюються внаслідок виникнення електронних лавин, прискорюються в сильному електричному полі поблизу катода й при зіткненні вибивають із нього електрони за механізмом вторинної електронної емісії. Вибиті електрони створюють нові лавини. Утворення лавин обривається на певному віддаленні від електрода, оскільки електричне поле там слабше, й електрони не встигають набрати між зіткненнями енергії, достатньої для іонізації³ нейтральних молекул газу.

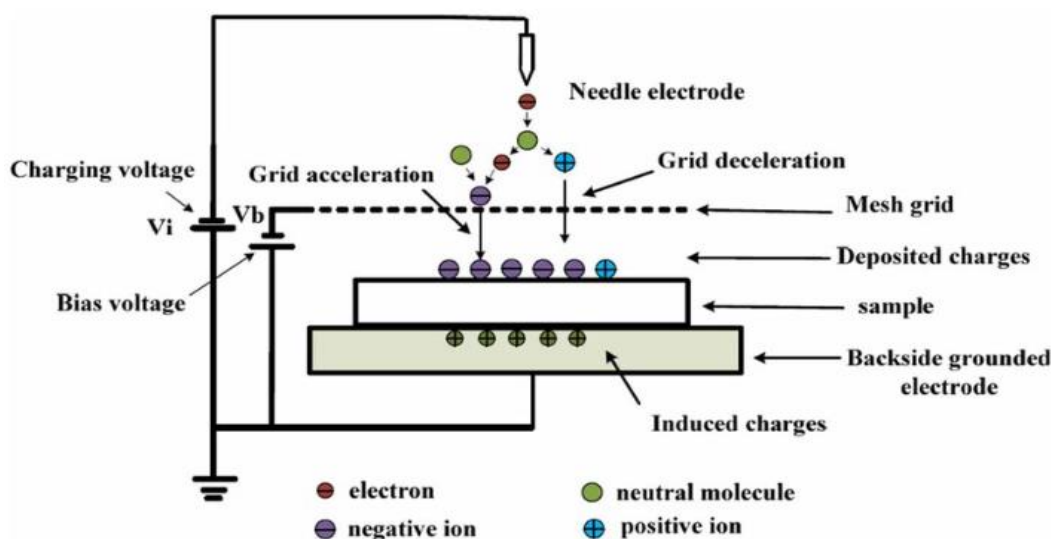


Рис.2.1 Принцип зарядки коронним розрядом. Потенціал V_b , встановлений для сітки, є стаціонарним потенціалом поверхні.

За межами області світіння електрони можуть приєднатися до нейтральних молекул газу, утворюючи негативно заряджені йони, які переносять струм до іншого електрода.

2.2 DBD розряд

Діелектричний бар'єрний розряд (ДБР) запалюється шляхом подачі високої напруги між двома електродами, при цьому принаймні один з електродів ізольований діелектриком. Використання ізоляції запобігає виникненню дугового розряду. Замість цього між електродами зазвичай утворюється багато тонких плазмових ниток, але вони мають дуже короткий час життя в діапазоні декількох наносекунд. Причиною цього є накопичення носіїв заряду на поверхні діелектрика, які створюють поле, протилежне напрузі, що подається ззовні, завдяки чому розряд знову зникає. Тому DBD працюють із змінною напругою на частоті, як правило, кілька кілогерц.

Типові частоти широко використовуваних твердотільних джерел високої напруги становлять 0,05–500 кГц. Амплітуди напруги порядку 5-20 кВ створюють електричні струми в діапазоні 10-100 мА. Потужність діелектричного бар'єрного розряду значно вища, ніж у коронного.

Electrical field strength E of first breakdown	$\approx 150 \text{ Td}$ ($p = 1 \text{ bar}$, $T = 300 \text{ K}$)
Voltage V	3 – 20 kV
Pressure P	1 – 3 bar
Repetition Frequency f	50 Hz – 10 kHz
Gap distance g	0.2 – 5 mm
Dielectric material thickness d	0.5 – 2 mm
Relative dielectric permittivity ϵ_r	5 – 10 (glass)

Таблиця 2.1 Типові умови для бар'єрного розряду [4]

DBD можуть генеруватися як за низького, так і за атмосферного тиску, причому їхні особливі властивості особливо яскраво проявляються за атмосферного тиску. Через малий час життя розряду важкі частинки можуть поглинати набагато менше енергії від змінного поля, ніж легші і швидші електрони. Таким чином, DBD є нетепловою "холодною" плазмою, в якій електрони мають високу температуру, але нейтральний газ та іони мають приблизно кімнатну температуру. Це також дозволяє обробляти чутливі до температури матеріали за допомогою цього типу розряду.

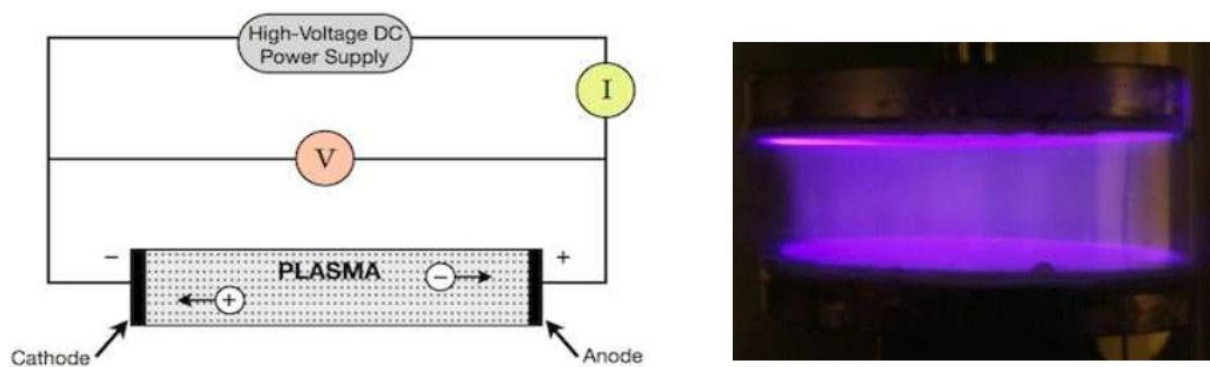


Рис.2.2 Зліва показано просту схему яка демонструє генерацію плазми, а справа показано як виглядає генерація плазми у бар'єрному розряді

DBD використовуються в широкому спектрі застосувань, включаючи генерацію озону і ультрафіолету, очищення повітря і стічних вод, стерилізацію упаковки і харчових продуктів, а також активацію, очищення, травлення і нанесення покриттів на поверхні. Перевагою DBD є те, що завдяки вільній конфігурації електродів і діелектрика він може набувати різних форм і розмірів і, таким чином, може бути дуже добре адаптований до конкретного застосування.

3. Експериментальна частина

Метою експериментальної роботи було підтвердити або спростувати вплив заряджених частинок на оболонку. Як тестовий зразок було використано тонер. Тонери – це барвники для процесів електростатичного друку.

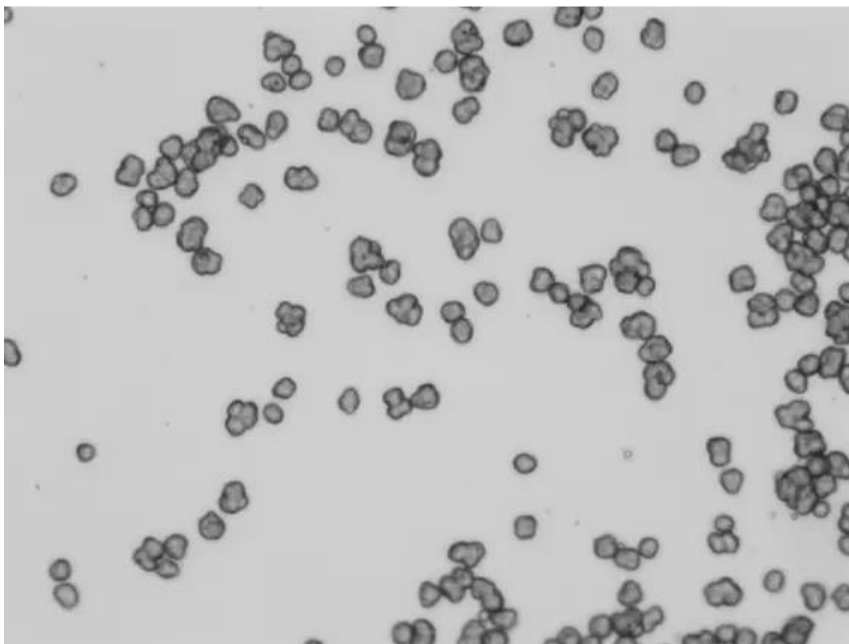


Рис.3.1 Зображення тонеру під мікроскопом

Вони в основному використовуються в копіювальних апаратах та лазерних принтерах для створення друкованого зображення на папері. Тонер це дуже дрібний порошок, що складається з частинок розміром від 5 до 30 мкм.. Тонер складається з синтетичної смоли, пігментів, намагнічуваних оксидів металів та різних допоміжних речовин.

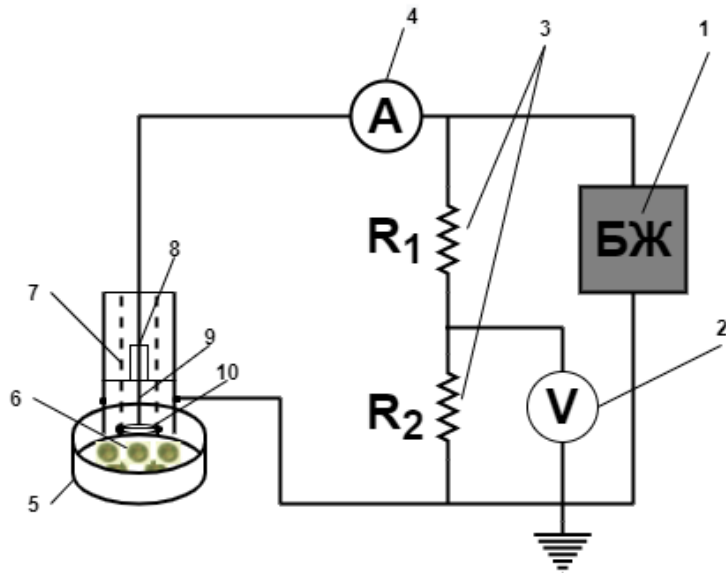


Рис.3.1 Схема експериментальної установки коронного розряду

Вище наведено схему експериментальної установки, яка призначена для обробки біологічних об'єктів коронним розрядом. В основі ізолюваної трубки знаходиться вольфрамовий дріт довжиною 30 мм з діаметром 0,15 мм виступає катодом (9) та металеве кільце з нержавіючої сталі діаметром 12 мм – анод (10) який є заземленим електродом. У чашку Петрі (5) поміщуються експериментальні зразки (6) на відстані 0,13-0,5 см. Для підтримання коронного заряду в схемі присутній блок живлення (1), забезпечуючи до 15 кВ. Амперметр (4) вимірює струм, а вольтметр вимірює напругу на резисторі R_2 . Опори на резисторах (3) сталі й опори їх дорівнюють для $R_1 = 1,5$ Гом, для $R_2 = 1,5$ кОм

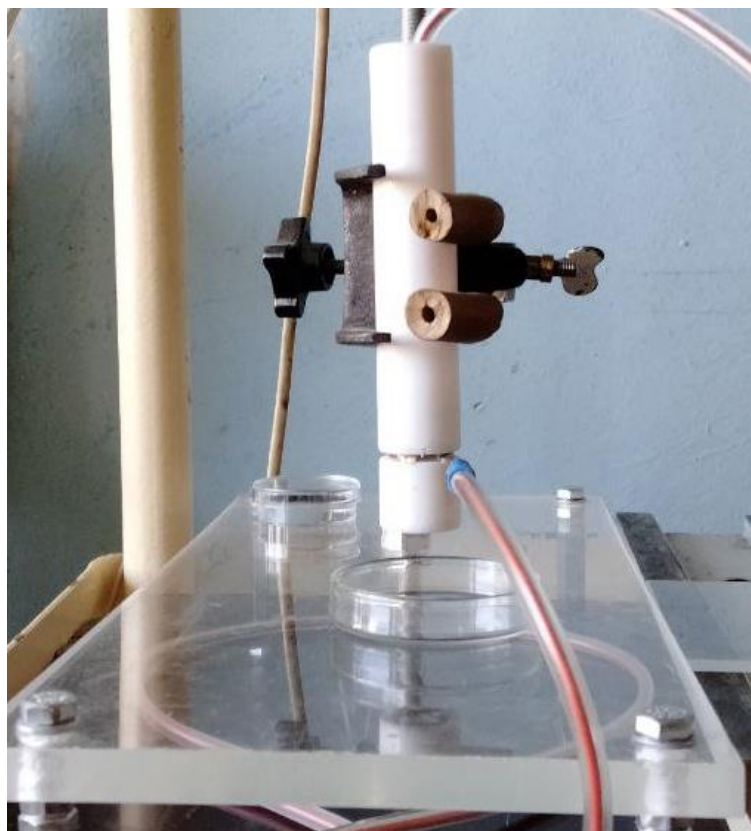


Рис.3.2 Фото експериментальної установки для коронного розряду

Робочі струм та напруга становили $I \approx 5 - 50$ мкА, $U \approx 3 - 7$ кВ. Потужність $P \approx 20 - 200$ мВт. Об'єкти досліджень були оброблені на двох відстанях 5, 13 мм. Відстань до зразка регулювалась за допомогою фіксації кронштейном трубки.

Для установки коронного заряду було проведено розрахунок потужностей для нашого апарату при зміні струму

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9
I, мкА	5,5	10,2	15,1	20,3	25	30	35	40	45
U, кВ	3,4	4	4,4	4,8	5,1	5,3	5,6	5,9	6,1
P, мВт	18,7	40,8	66,44	97,44	127,5	159	196	236	274,5

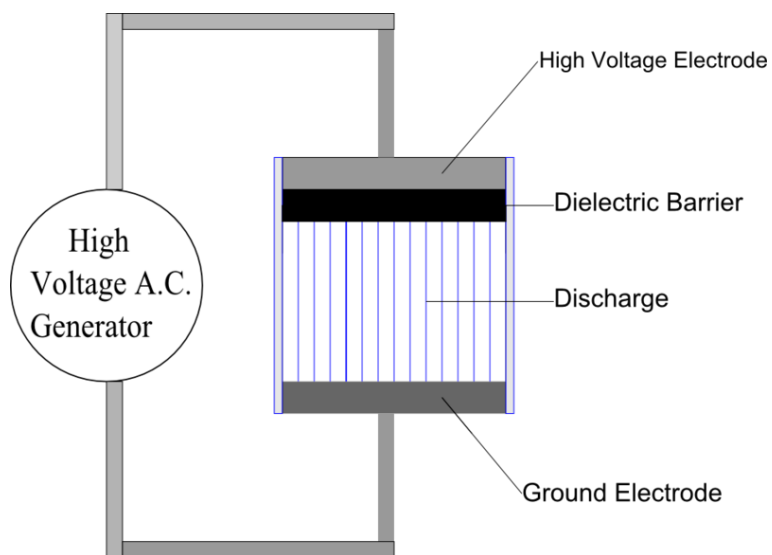


Рис.3.3 Схема експериментальної установки для DBD розряду

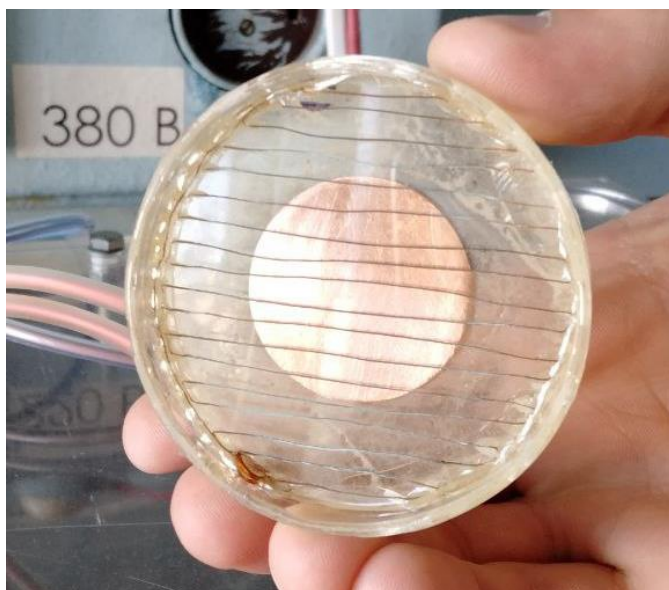


Рис.3.4 Фото системи електродів DBD розряду

На Рис.3.4 Ми бачимо розташування електродів. Круглий мідний електрод діаметром 30 мм, відділений діелектриком від іншого електрода зроблений з тонкого мідного дроту діаметром 0,5 мм. Шар діелектрику виступає як запобіжник дугового заряду між електродами, обмежника струму що виникає між електродами. Робочі струм та напруга становили $I \approx 0,1 - 1$ А, $U \approx 1,5 - 6$ В. Потужність $P \approx 0,1 - 5,4$ Вт.

Аналогічні вимірювання були проведені для DBD установки

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9
I, A	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
U, B	1	2	2,3	3	3,5	4,2	5	5,8	6
P, Вт	0,1	0,4	0,69	1,2	1,75	2,52	3,5	4,64	5,4

У чашку Петрі наливали по 10 мл дистиллятора й додавалось по 0,5 мг тонеру. Був додатково залишений контрольний зразок щоб переконатись в тому що тонер не розпливається по поверхні без впливу на нього зовнішніх факторів. Обробка коронним й DBD розрядом у всіх дослідах тривала протягом 3, 5 та 10 хв. Потужність при цьому була 0,1 Вт, 0,15 Вт, 0,2 Вт. Для DBD була проведена для мінімально й максимально можливої потужностей. При цьому відстань від голки до поверхні води становила 6 мм.

Таблиця з результатами обробки зразків коронним розрядом:

Час\потужність	0,1 Вт	0,15 Вт	0,2 Вт
3 хв	Спостерігається відокремлення маленьких частинок	Частинки заряджаються й починають розштовхувати одна одну, площа змінилась на 10%	Частинки сформували маленькі групки, площа змінилась на 97%
5 хв	Відокремилось ще 3 частинки	Сформувались маленькі групки	Частинки рівномірно розподілились по поверхні води
10 хв	Площа плями зменшилась на 75%	Найбільша пляма складає 35,75%	—

Також спостерігається що чим більше «вільного» простору між бактеріями чи якщо пляма не округлої форми тим сильніше вплив розряду на них.

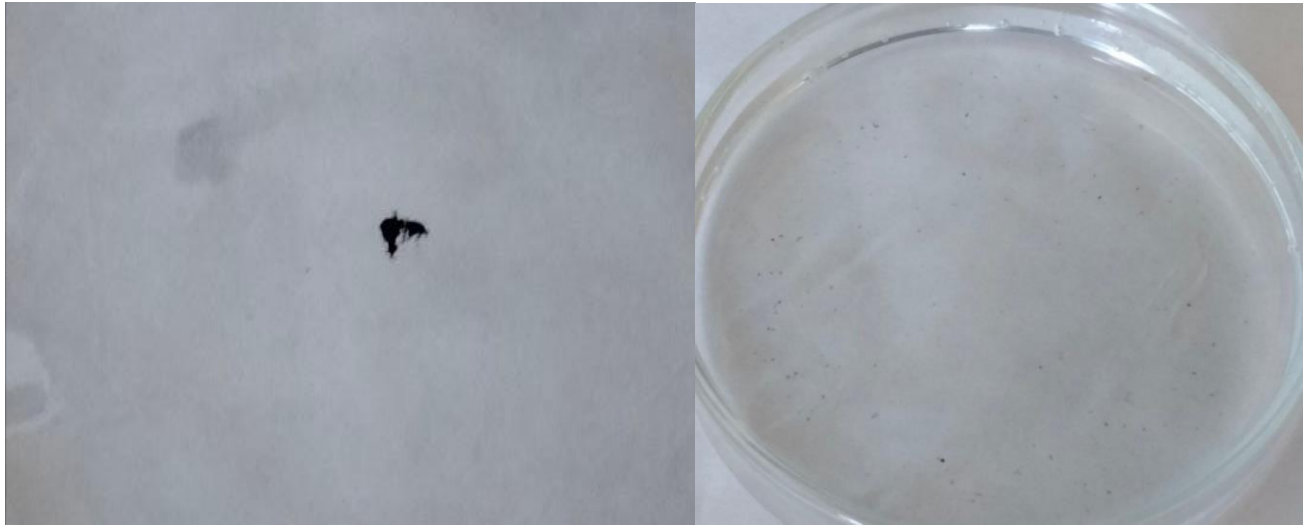


Рис.4.1 Зліва необроблений зразок, а справа оброблений коронним розрядом

Якщо ми обробляємо DBD розрядом такий ж самий зразок вагою 0,5 мг що знаходиться в 10 мл дистиллятора. На установці ми працювали при частоті 4кГц. Перед обробкою зразок був 2 мм х 2,2 мм.

Час обробки\потужність	0,2 Вт	5 Вт
3 хв	2,5 мм х 2 мм, площа змінилась на 88%	2 мм х 1,8 мм, площа змінилась на 122%
5 хв	2мм х 2 мм, площа змінилась на 110%	2 мм х 2,5 мм, площа змінилась на 88%
10 хв	2мм х 2 мм, площа змінилась на 110% від початкової, але не змінилась порівняно з 5хв	2мм х 2,5 мм, площа змінилась на 88% від початкової, але не змінилась порівняно з 5хв



Рис.4.2 Зліва необроблений зразок, а справа оброблений DBD розрядом

Як можна помітити коронний розряд набагато краще впорався з електризацією частинок тонера, аніж DBD хоч потужність в нього була більшою. Це можна пов'язати з тим що в експериментальній установці DBD розряду електроди знаходяться на малій відстані один від одного й генероване поле недостатньо сильне щоб вплинути на досліджуваний зразок. Коронний розряд показав непогані результати й для них ми можемо обрахувати приблизну кількість частинок які наелектризувались й відокремились. Підрахунок вівся за наступною формулою: $N = (S_2 - S_1) \div S_0$ де S_2 – початкова площа, S_1 – площа частинок що відокремились, S_0 – площу частинки тонеру (з діаметром 5мк). Якщо кількість частинок помножити на об'єм кулі отримаємо площу яку залишилось наелектризувати.

	0,1 Вт	0,15 Вт	0.2 Вт
3 хвилини	7,85 мм ²	7,2 мм ²	0,24 мм ²
5 хвилин	7,69 мм ²	–	0 мм ²
10 хвилин	2,00175 мм ²	5,14175 мм ²	–

Данна таблицка з результатами демонструє наскільки потужність та час обробки впливають на тонер. Можна помітити що чим більше потужність подається

на плазму й чим довше триває обробка зразка тим менше залишається площа незаряджених частинок.

Висновки

В даній роботі проведено аналіз впливу НТП на поверхню бактерій. Метою проведення експерименту з тонером було перевірити вплив заряджених частинок на оболонку досліджуваних зразків, ігноруючи хімічні чинники які виникають при контакті активних форм кисню з мембраною бактерій.

З результатів дослід з оглядової літератури зроблено висновок що буферний газ не впливає на обробку бактерій, а головними чинниками є потужність й час обробки. Важливість потужності: плазми надходить більше енергії, реакційноздатні речовини, відповідальні за стерилізацію, виробляються ефективніше та у вищих концентраціях Час обробки відповідає за загальну кількість радикалів, залучених до процесу стерилізації.

Поверхневий потенціал який розрахований в іншій оглядовій роботі може на практичному застосуванні бути недостатнім або щільність бактерій збільшить загальну площу поверхні що перевищуватиме мінімум поверхневого потенціалу, тобто досліджувані зразки можуть й не розірватись під впливом НТП.

Список використаних джерел

1. Nevena Puač*, Maja Miletić, Miloš Mojović, Ana Popović-Bijelić “Sterilization of bacteria suspensions and identification of radicals deposited during plasma treatment” , 2015, DOI: 10.1515/chem-2015-0041
2. Puač N. et al., J. Phys. D. Appl. Phys., 2006, 39, 3514
3. Malović G., Puač N., Lazović S., Petrović Z., Plasma Sources Sci.T., 2010, 19, 034014
4. U. Martens, H C Thejaswini, A Majumdar and Rainer Hippler, Deposition of Amorphous Carbon Nitride films with a Dielectric Barrier Discharge. Plasma Process and Polymers, 5 MAR 2012
5. Дипломна робота Бублікова К.І “Електростатичне руйнування мембран бактерій плазмою атмосферного тиску”, 2021
6. Plasma interaction with microbes / M. Laroussi, D. A. Mendis and M. Rosenberg. – 2003. *New Journal of Physics* 5 (2003) 41.1–41.10
7. Non-thermal plasma kills bacteria / O. Lunov, O. Churpita, V. Zablotskii et. al. – 2015. Scanning electron microscopy observations, Applied Physics Letters 106, 053703
8. Ulrike Martens, H. C. Thejaswini, Abhijit Majumdar, and Rainer Hippler, “Deposition of Amorphous Hydrogenated Carbon Nitride Films with a Dielectric Barrier Discharge” Plasma Processes and Polymers, 2012, DOI: 10.1002/ppap.201100185
9. Hiroyuki Eto, Yoshihito Ono, Akihisa Ogino, and Masaaki Nagatsu, “Low Temperature Internal Sterilization of Medical Plastic Tubes Using a Linear Dielectric Barrier Discharge”
10. Ilhan, S. and Ozdemir, Aydogan. // Dielectrics and Electrical Insulation, IEEE Transactions on. — 2011. — Vol. 18 (05). — P. 408 - 417. — DOI:10.1109/TDEI.2011.5739444.
11. Getting Charged Up--The Corona Way, Thompson, Frank //Physics Education, v54 n6 Article 065005 Nov 2019
12. Gregory Loraine, Georges Chahine, Chao-Tsung Hsiao “Disinfection of gram-negative and gram-positive bacteria using DynaJets® hydrodynamic cavitating jets” PMID: 22079473 DOI: 10.1016/j.ultsonch.2011.10.011
13. https://frederick.cancer.gov/sites/default/files/2022-04/Preparation_of_a_Gram_Stain_Manual_Method.pdf