

Université de Montréal

**CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE L'INACTIVATION
DE MICRO-ORGANISMES PAR PLASMA**

par

Mustafa-Karim Benhacene-Boudam

Département de physique

Faculté des arts et des sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Philosophiæ Doctor (Ph.D.)

(Physique)

Août 2007

© Mustafa-Karim Benhacene-Boudam

Université de Montréal



QC

3

UB4

2008

v.002

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Faculté des études supérieures

Cette thèse est intitulée :

Contribution à l'étude de l'inactivation de micro-organismes par plasma

par

Mustafa-Karim Benhacene-Boudam

a été évaluée par le jury des personnes suivantes :

Joëlle Margot

Présidente du jury

Michel Moisan

Directeur de recherche

L'Hocine Yahia

Membre du jury

Jacques Pelletier

Examineur externe

Thèse acceptée le :

Sommaire

Ce travail de thèse constitue un approfondissement de quelques volets de recherche engagés et poursuivis par l'"équipe stérilisation" du Groupe de physique des plasmas qui, depuis maintenant près de 10 ans, s'intéresse à la stérilisation de dispositifs médicaux à l'aide de plasmas gazeux.

Initialement, cette étude devait porter sur la stérilisation de spores à la pression atmosphérique (PA) et visait à vérifier, s'il était possible, à cette pression, d'obtenir une inactivation fondée sur la seule action des UV, tant pour éviter les dommages aux matériaux que pour obtenir un meilleur contrôle du procédé qui en découlerait. Si nous avons réussi à montrer le bien-fondé de cette hypothèse d'une inactivation par UV, la faible efficacité et la difficulté de mise en pratique du système à la PA nous a fait réorienter notre recherche vers l'optimisation d'un système de stérilisation basé sur l'utilisation d'une post-décharge d'un plasma fonctionnant à pression réduite.

Dans cette optique, nous avons tout d'abord caractérisé la post-décharge d'un plasma N_2-O_2 à basse pression, ce qui nous a permis de mettre en évidence la présence d'une proche et d'une lointaine post-décharge dans l'enceinte de stérilisation. Nous avons montré que la proche post-décharge est responsable de dommages importants aux polymères traités et qu'il est possible de réduire son influence par l'ajout d'oxygène et par l'éloignement de la source de plasma de l'entrée de la chambre de stérilisation.

Dans un second temps, nous avons étudié les effets combinés du traitement plasma et du chauffage du Petri contenant les spores à inactiver sur la cinétique d'inactivation de spores *B. atrophaeus*. Nous avons montré qu'il existe un effet de synergie uniquement présent lorsque les deux traitements sont effectués simultanément, que cet effet est conservé quel que soit le flux de photons UV et que, finalement, il est possible de le modéliser en faisant appel à l'énergie d'activation tirée de la relation d'Arrhenius.

Mots clefs : stérilisation, plasma, pression atmosphérique, basse pression, photons UV, spore bactérienne, courbe de survie, synergie UV – chauffage.

Abstract

The present work is a deepening of some specific research aspects concerning medical device sterilization by ionized gases, that were initiated almost ten years ago and pursued since then by the "Sterilization team" of the Groupe de physique des plasmas.

Initially, the thesis was directed at spore inactivation by atmospheric-pressure plasmas with the intent of showing that it was possible to reach sterility mainly by the action of UV photons, therefore minimizing damage to materials (in contrast to using chemically reactive species from the plasma) and, at the same time, achieving a greater control of the process through its better understanding. We actually succeeded in demonstrating the possibility of spore inactivation based on the dominant action of UV photons issued from an atmospheric-pressure plasma. However, the low inactivation efficiency and the practical difficulty of the atmospheric-pressure plasma used made us turn to low-pressure post-discharge sterilization systems.

To comply with this new goal, we first characterized, essentially through emission spectroscopy, the flowing afterglow of a N₂-O₂ low-pressure discharge, concentrating on the properties and effects of the early and late post-discharges as far as sterilization is concerned. We demonstrated that the early afterglow is responsible for heavy damage to processed polymers but that it is possible to reduce its influence provided a minimum percentage of O₂ is added in the N₂-O₂ mixture and also by moving away the plasma source from the sterilization chamber entrance. We then studied the combined effects, on the kinetics of spore inactivation, of the species (UV photons, radicals) issued from the plasma and of the heating of the petri dish, using *B. atrophaeus* spores as reference microorganisms. We clearly proved the existence of synergy between UV photons and heating in inactivating spores, provided UV photons and heating act simultaneously. Whatever the O₂% in the mixture, and thus the UV intensity, the inactivation rate was also found to obey a fluence law and its dependence on temperature could be modeled by the Arrhenius relation.

Keywords: sterilization, atmospheric-pressure plasma, low-pressure plasma, UV photons, bacterial spores, survival curves, UV and heating synergy.

Table des matières

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE 1 GÉNÉRALITÉS SUR LES MÉTHODES DE STÉRILISATION CONVENTIONNELLES ET CARACTÉRISTIQUES PARTICULIÈRES DE LA STÉRILISATION PAR PLASMA	4
1.1 INTRODUCTION.....	4
1.1.1.1 La stérilisation.....	4
1.1.2 <i>Les indicateurs biologiques</i>	5
1.1.3 <i>Les courbes de survie</i>	7
1.2 LES TECHNIQUES CONVENTIONNELLES DE STÉRILISATION	9
1.2.1 <i>Techniques utilisant des procédés physiques</i>	9
1.2.1.1 Stérilisation par la chaleur humide (autoclave).....	9
1.2.1.2 Stérilisation par la chaleur sèche (Poupinel).....	10
1.2.1.3 Radiations gamma	10
1.2.2 <i>Techniques utilisant des agents chimiques</i>	11
1.2.2.1 L'oxyde d'éthylène ((CH ₂) ₂ O).....	11
1.2.2.2 L'ozone (stérilisateur TSO ₃ [®]).....	12
1.2.2.3 Le peroxyde d'hydrogène H ₂ -O ₂ (stérilisateur Sterrad [®]).....	12
1.2.3 <i>Caractéristiques des stérilisateurs conventionnels et du stérilisateur idéal</i>	13
1.2.3.1 Stérilisateurs conventionnels.....	13
1.2.3.2 Stérilisateur idéal.....	14
1.3 LA STÉRILISATION PAR PLASMA	14
1.3.1 <i>Le plasma</i>	15
1.3.1.1 Définition	15
1.3.1.2 Décharge et post-décharge	16
1.3.2 <i>Mécanismes d'inactivation UV-induits</i>	17
1.3.2.1 Destruction par les UV.....	17
1.3.3 <i>Interaction phase solide / phase gazeuse</i>	24

1.3.3.1	Caractéristiques des surfaces.....	24
1.3.3.2	Réactions phase solide /phase gazeuse.....	24
1.3.3.3	Interaction radicaux/polymères	26
1.3.3.4	Le cas des spores <i>B. atrophaeus</i>	28
1.4	CONCLUSION.....	29

CHAPITRE 2 INACTIVATION DE SPORES BACTÉRIENNES, EN PRÉSENCE OU EN ABSENCE DE PHOTONS UV, PAR UN PLASMA À LA PRESSION ATMOSPHERIQUE OBTENU AVEC LE MÊME MÉLANGE GAZEUX 34

2.1	INTRODUCTION.....	38
2.2	REVIEW OF THE LITERATURE ON THE INACTIVATION MECHANISMS OF MICROORGANISMS BY ATMOSPHERIC-PRESSURE PLASMAS	39
2.2.1	<i>Possible inactivation processes</i>	39
2.2.2	<i>Survival curves as a means of characterizing the inactivation efficiency</i>	40
2.2.3	<i>Review of the literature</i>	40
2.3	EXPERIMENTAL RESULTS FROM OUR LABORATORY.....	51
2.3.1	<i>Operating conditions for an efficient spore inactivation by UV radiation in a reduced-pressure N₂-O₂ afterglow: a lead to our atmospheric-pressure work</i>	52
2.3.1.1	UV emission in the flowing afterglow of an N ₂ -O ₂ discharge	52
2.3.1.2	Survival curves in the flowing afterglow of an N ₂ -O ₂ discharge ...	54
2.3.2	<i>Spore inactivation from direct exposure to an atmospheric-pressure discharge in an N₂-N₂O gas mixture under UV and no UV radiation</i>	55
2.3.2.1	Experimental arrangement.	55
2.3.2.2	Setting of operating conditions for maximum UV intensity	58
2.3.2.3	Survival curves	62
2.3.3	<i>Low external damage to spores</i>	64
2.4	CONCLUSION.....	66

CHAPITRE 3	CARACTÉRISATION DE LA POST-DÉCHARGE D'UN	
	PLASMA DE N₂-O₂ À BASSE PRESSION : AJUSTEMENT DES CONDITIONS	
	OPÉRATOIRES AFIN D'OBTENIR UNE LOINTAINE POST-DÉCHARGE ET	
	CORRÉLATION DES VARIATIONS DES DENSITÉS DES ATOMES N ET O	
	AVEC L'INTENSITÉ D'ÉMISSION DE LA BANDE NO_B.....	75
3.1	INTRODUCTION.....	80
3.2	EXPERIMENTAL ARRANGEMENT.....	82
3.3	DESCRIPTION AND CHARACTERIZATION OF THE EARLY AND LATE	
	AFTERGLOWS.....	85
3.3.1	<i>Identification and characterization of the early afterglow with respect to</i>	
	<i>the discharge.....</i>	<i>85</i>
3.3.1.1	Low gas pressure case (0.6 torr).....	85
3.3.1.2	Higher gas pressure case (2 torr).....	89
3.3.2	<i>Contribution of the early afterglow in a late afterglow environment... 90</i>	
3.3.2.1	Abacus representation of the N ₂ (B, v') state densities as a means of	
	determining the relative contribution of the early and late afterglows.	91
3.3.2.2	Operating parameters affecting the characteristic species of the	
	early afterglow.	93
3.4	DENSITY OF N AND O ATOMS.....	100
3.4.1	<i>Concentration of N atoms in a late afterglow environment (Bockel's</i>	
	<i>method).....</i>	<i>101</i>
3.4.2	<i>Determination of the density (absolute value) of N and O atoms in the</i>	
	<i>afterglow through NO titration.....</i>	<i>105</i>
3.4.2.1	Relation yielding the N atom density in an N ₂ afterglow.	105
3.4.2.2	Relation yielding the O atom density in an N ₂ -O ₂ mixture.	107
3.4.2.3	Measured values of N and O atom densities as functions of O ₂ %.....	
	108
3.4.2.4	Limitations of the titration method.....	110
3.4.3	<i>Correlation between UV emission intensity and N and O atom densities</i>	
	<i>in the chamber.....</i>	<i>110</i>
3.5	DETERMINATION OF THE DENSITY (RELATIVE VALUE) OF N AND O ATOMS IN	
	THE DISCHARGE THROUGH ACTINOMETRY.....	113

3.5.1	<i>Summary of actinometry requirements and presentation of the measurement results</i>	113
3.5.2	<i>Comparison of the N and O atom densities obtained in the discharge (actinometry) and in the afterglow (titration)</i>	116
3.6	DAMAGE TO POLYMERS EXPOSED TO AN N ₂ -O ₂ AFTERGLOW	118
3.6.1	<i>Erosion on and off axis</i>	118
3.6.2	<i>Erosion as a function of O₂%</i>	120
3.7	SUMMARY AND CONCLUSION	121

CHAPITRE 4 ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE SUR LA CINÉTIQUE D'INACTIVATION DE SPORES TRAITÉES PAR PLASMA..... 133

4.1	INTRODUCTION.....	133
4.2	REVUE BIBLIOGRAPHIQUE : EFFET DE LA TEMPÉRATURE SUR L'INACTIVATION DE MICRO-ORGANISMES TRAITÉS PAR PLASMA ET PAR LAMPE UV	134
4.2.1	<i>Effet de la température sur l'efficacité de l'inactivation par plasma</i> .	135
4.2.2	<i>Effet de la température sur l'efficacité de l'inactivation par lampe UV...</i>	138
4.3	DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL ET PROTOCOLE	140
4.3.1	<i>Source de plasma</i>	140
4.3.2	<i>Chambre de stérilisation</i>	142
4.3.3	<i>Système de pompage</i>	142
4.3.4	<i>Contrôle de la température des échantillons</i>	143
4.3.5	<i>Le protocole de stérilisation</i>	144
4.3.5.1	<i>Préparation des échantillons</i>	144
4.3.5.2	<i>Exposition au plasma</i>	145
4.3.5.3	<i>Évaluation du nombre de spores survivantes</i>	146
4.4	RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX	147
4.4.1	<i>Effet de la température sur la cinétique d'inactivation dans des conditions d'émission UV optimales</i>	147

4.4.1.1	Effet thermique seul sur la survie des spores dans une plage de températures allant de 12 à 68 °C	147
4.4.1.2	Traitement plasma/température dans des conditions optimales d'émission UV	148
4.4.1.3	Inactivation plasma/température dans des conditions optimales d'émission UV en présence du filtre CaF ₂	152
4.4.1.4	Inactivation avec et sans filtre, et synergie UV/température	154
4.4.2	<i>Traitement plasma/température hors conditions UV optimale, soit 1% et 10%O₂</i>	155
4.4.2.1	Traitement plasma/température dans une post-décharge N ₂ – 1%O ₂	156
4.4.2.2	Traitement plasma/température dans une post-décharge N ₂ – 10%O ₂	156
4.4.2.3	Synergie UV/température à 0,3% et 10%O ₂ : comparaison	158
4.4.2.4	Érosion des spores traitées par plasma à différentes températures	159
4.4.3	<i>Vitesse d'inactivation des spores et énergie d'activation par apport thermique : hypothèse explicative de l'action de la température</i>	161
4.4.3.1	Processus photochimiques entrant dans la formation de photoproduits	161
4.4.3.2	Modèle d'Arrhenius et calcul de l'énergie d'activation	163
4.5	PRISE EN COMPTE DE L'EFFET THERMIQUE SUR LA CINÉTIQUE D'INACTIVATION PAR PLASMA	166
4.5.1	<i>Modélisation de la cinétique d'inactivation par photons UV seuls</i>	166
4.5.2	<i>Prise en compte de l'effet de la température</i>	168
4.5.3	<i>Modélisation des effets combinés des UV et du chauffage</i>	169
4.6	CONCLUSION	171
	CONCLUSION GÉNÉRALE	174
	ANNEXE	177

Liste des tableaux

Tableau 1-1. Indicateurs biologiques utilisés lors de la validation de différentes méthodes de stérilisation (le terme ATCC renvoie à la nomenclature américaine des micro-organismes).	5
Tableau 1-2 Avantages et inconvénients des techniques traditionnelles de stérilisation.....	13
Tableau 1-3 Caractéristiques d'un stérilisateur idéal (d'après Rutala et Weber 1996).....	14
Tableau 1-4 Tableau faisant correspondre les vitesses de gravure des spores <i>B. atrophaeus</i> , traitées à l'aide d'une post-décharge N ₂ O ₂ (10% O ₂), aux différentes couches formant le manteau de la spore (Crevier 2003).	29
Table 2-1. D ₁ values and UV intensities taken from Figure 2-11 and Figure 2-8, respectively, showing that the product D ₁ x I _{UV} (lethal dose for one decade) is approximately constant when there is UV radiation.....	64
Table 3-1. Emission intensity ratio <i>r</i> of the N ₂ ⁺ 391.4 nm band head to that of the N ₂ 2 nd positive system at 394.3 nm as a function of the percentage <i>y</i> of O ₂ added to 2 slm N ₂ and at 100 W, as measured in the discharge tube (DT) at 1 cm from the surfatron launching gap and in the early afterglow (EA) at <i>x</i> = 1.5 cm and <i>z</i> = 0 in the chamber.	89
Table 3-2. Polystyrene microsphere diameter after exposure to the afterglow under conditions of Figure 3-19 (statistics on 15 to 20 microspheres).	119
Tableau 4-1: valeurs de E _a déterminées pour 4 différentes conditions d'exposition. Noter la relative constance de la valeur de E _a	165

Liste des figures

- Figure 1-1. Micrographie d'une spore de *B. atrophaeus* sur laquelle les différentes tuniques protectrices du matériel génétique contenu dans le cœur sont identifiées. TE: Tunique Externe; TI: Tunique Interne; MP: Membrane Plasmatique; Cx: Cortex; Co: Cœur (Driks 1999). 6
- Figure 1-2. Exemple de courbe de survie présentant 3 cinétiques différentes d'inactivation. À droite de la courbe, on présente les portions dénombrables à l'aide des méthodes de numération directe et de filtration sur membrane (zone hachurée)..... 7
- Figure 1-3. Forme développée de la molécule d'oxyde d'éthylène..... 11
- Figure 1-4. Forme développée de la molécule d'ozone..... 12
- Figure 1-5. Représentation schématique de l'excitation d'une molécule d'azote par collision électronique, suivie de sa désexcitation vers un niveau inférieur par émission d'un photon (Moisan *et al* 2002). 15
- Figure 1-6. Représentation schématique d'un système de stérilisation en post-décharge, mis au point dans le laboratoire du groupe de physique des plasmas (Université de Montréal)..... 16
- Figure 1-7. Spectre UV selon les physiciens et les photo-biologistes, les physiciens distinguant principalement les UV et les UVV, les photo-biologistes les UV-A, UV-B et UV-C. 17
- Figure 1-8. Schéma du mécanisme de formation de dimères thymines T-T provoqué par irradiation UV. 18
- Figure 1-9. Formation d'un photoproduit de spores (SP) à partir de bases de type thymine. 18
- Figure 1-10. Spectre d'action de spores *B. atrophaeus* (Munakata *et al* 1991) et spectre d'absorption de l'ADN isolé (Inagaki *et al* 1974) en fonction de la longueur d'onde.. 19
- Figure 1-11. Comparaison des coefficients relatifs d'absorption de l'ADN et des protéines en fonction de la longueur d'onde (Coohill 2002). 20
- Figure 1-12. Courbes de survie de 10^6 spores *B. atrophaeus* exposées à une lampe germicide à mercure (basse pression, 254 nm) avec, le cas échéant, des filtres absorbants pour réduire l'intensité (Moisan *et al* 2003). 22
- Figure 1-13. Fraction de survivants de spores *B. subtilis*, en fonction de la fluence reçue, pour 3 conditions de flux différents (Rice et Ewell 2001). 22

- Figure 1-14. Micrographies au MEB d'un dépôt de spores après séchage. Zone en périphérie du dépôt sur le Petri: a) vue d'ensemble et b) agrandissement montrant des spores empilées. Spores au centre du dépôt : c) vue d'ensemble et d) agrandissement montrant des spores isolées (Crevier 2003)..... 23
- Figure 1-15. Schéma simplifié des réactions de physisorption et de chimisorption (adapté de Sullivan 1993)..... 25
- Figure 1-16 Représentation de différents processus pouvant avoir lieu à l'interface phase solide / phase gazeuse. 26
- Figure 1-17 Schéma simplifié de l'oxydation et de la gravure d'une surface de polyéthylène par un plasma d'oxygène (Crevier 2003)..... 27
- Figure 1-18 Comparaison des cinétiques de gravure de spores *B. atrophaeus* et de microsphères en polystyrène (PS) en fonction du temps, dans une post-décharge de N_2O_2 (10% de O_2) (Crevier 2002)..... 29
- Figure 2-1. a) UV spectrum recorded at atmospheric pressure in a supposedly pure N_2 DBD (filamentary mode) (Heise *et al* 2004); b) spectrum recorded by us at atmospheric pressure also in a DBD (uniform Townsend mode) operated in an N_2 - N_2O mixture with 40 ppm of N_2O (concentration value for maximum UV intensity and highest inactivation rate: see section 2.2) with identification of the various lines (actually band heads). Comparison with our spectrum shows that in (a) the contribution below 290 nm is due to the NO_γ band (and not to the NO_β band as mentioned by the authors: see Appendix A). The intensity level of their UV emission seems to be sufficient to inactivate micro-organisms: compare the NO line intensities in (a) and (b) with, as a reference, the corresponding 315.9 nm N_2 line intensity. 44
- Figure 2-2. Emitted light intensity as a function of the ratio of O_2 concentration to that of N_2 of: the NO_γ 248 nm line, the 320.7 nm NO_β line and the 557 nm line from the $O(^1S) N_2-O(^1D) N_2$ transition. After Pointu *et al* (2005). The vertical dotted and dashed lines that we have added are for a concentration of O_2 in N_2 of 25 and 250 ppm, respectively. 48
- Figure 2-3. Emission spectrum recorded in the flowing afterglow of a reduced-pressure (8 torr) N_2 - O_2 microwave discharge with 0.2% O_2 added to N_2 (flow rate 2 slm). Line identification shows NO_β and NO_γ molecular bands whereas, in a DBD at atmospheric pressure, the NO_β band is generally not observed (Figure 2-1 (b)). 53

- Figure 2-4. Emission intensity of the 303.9 nm line (actually band head) of the NO_β system recorded in the flowing afterglow of an $\text{N}_2\text{-O}_2$ discharge operated at 2450 MHz as a function of the O_2 % added to N_2 , at various total gas pressures..... 54
- Figure 2-5. Survival curves for *B. subtilis* spores observed in the flowing afterglow of an $\text{N}_2\text{-O}_2$ discharge. Operating conditions: microwave-discharge power of 100 W at 2450 MHz feeding a 20 L afterglow-chamber at a flow rate of 1 slm of $\text{N}_2 + x\text{O}_2\%$ under a pressure of 5 torr. 55
- Figure 2-6. (a) Exploded view of the dielectric barrier discharge (DBD) used. Dimensions of the metal square electrodes 1 and 2 are 32 mm by 32 mm; (b) assembled DBD system (without its aluminium enclosure) showing the gas entering the discharge area (and exiting in the same way on the other side); the discharge emitted light is focused by a lens assembly on an optical fiber leading to the spectrophotometer..... 57
- Figure 2-7 Detailed view, completing Figure 2-6 (a), that shows the location of the Petri plate with respect to the DBD metal electrodes that define the discharge area: part of the Petri plate lies outside it. 58
- Figure 2-8. Recorded emission intensity integrated over the 200-285 nm range of the NO_γ system at atmospheric pressure and that of a representative line (303.9 nm) of the NO_β system in the case of reduced-pressure operation, as functions of the percentage of the oxygen-containing molecule (N_2O at atmospheric pressure and O_2 at reduced pressure) added to N_2 . At atmospheric pressure, the maximum of UV intensity, normalized to unity, is attained around 40 ppm of N_2O in N_2 , the carrier gas; at 220 ppm, the UV intensity is 0.35 of its peak value; at 0% N_2O , the spectrum recorded is that of the NO_γ system and the corresponding UV intensity is 0.12 of the 40 ppm peak value, due to discharge gas contamination (see Figure 2-10 (a) and also Figure 2-1 (a))..... 60
- Figure 2-9. Emission intensity of the NO excited molecule as a function of the partial pressure of the oxygen-containing molecule (O_2 at reduced pressure and N_2O at atmospheric pressure) in the mixture. The partial pressure of the oxygen-containing molecule yielding the maximum intensity of UV radiation does not depend significantly on the actual total gas pressure..... 60
- Figure 2-10. APTD emission spectra recorded at four different N_2O concentration values: 0, 40, 220 and 1000 ppm. The 40 ppm N_2O concentration yields the maximum intensity from the NO_γ system (200-285 nm) while the intensity at 220 ppm is 0.35 of the peak

- value. The 0 ppm spectrum was not recorded above 325 nm. At 1000 ppm and above, there is no UV emission in the range 200-290 nm..... 61
- Figure 2-11. Survival curves obtained with *B. subtilis* in direct contact with the DBD at atmospheric pressure (APTD mode) at different percentages of N₂O added to N₂ in an N₂-N₂O mixture..... 62
- Figure 2-12 SEMmicrographs of *B. subtilis* spores : (a) untreated spores for reference; (b), (c) and (d) spores subjected directly to an APTD operated in an N₂-N₂O mixture with 40, 220 and 1000 ppm, respectively, of N₂O molecules added to N₂. 65
- Figure 2-13. Measured inactivation rate, D_1^{-1} , of 10^6 *B. subtilis* spores as a function of the (relative) UV intensity, I_{UV} , of a Hg lamp (254 nm). The lamp full UV output power is reduced at calibrated intensity levels by using optical attenuators (neutral filters). The inactivation rate is observed to vary linearly with the UV intensity, as should be expected when only UV photons are participating in the inactivation process. 69
- Figure 3-1. (a) Schematic representation of the basic flowing-afterglow system as used for plasma sterilization purposes. It is comprised of the microwave-sustained plasma source, operated at 2450 MHz, and of a 50 L afterglow chamber (sterilizer). The discharge tube of 6/8 mm i.d./o.d. connects to a larger 26/30 mm i.d./o.d. tube. The NO titration gas is introduced perpendicularly to the main gas flow into the larger diameter tube. (b) Configuration and dimensions of the tube linking the discharge region to the afterglow chamber where x_0 is fixed and x_1 varied between 3 and 10 cm (the NO injection inlet is not shown). 84
- Figure 3-2. Observed emission spectra in the N₂-0.2%O₂ early afterglow at 0.6 torr, 2 slm N₂ and 100 W: a) 300–400 nm spectral range with identification of the characteristic band head of the N₂⁺ 1st negative system (391.4 nm), of the band heads of the N₂ 2nd positive system and of some of the NO_β system; b) 550–600 nm spectral range: the N₂ 1st positive-system band heads are identified by their upper and lower-level vibrational quantum numbers, v' and v'' . The spectral resolution is 0.2 nm and the collimator aims at the chamber at $x = 1.5$ cm from its entrance plane and at $z = 0$, the plasma source axis. 87
- Figure 3-3. Observed emission spectra from the N₂-0.2%O₂ discharge itself at 2 cm from the launching gap, for the same two spectral domains ((a) and (b)) and otherwise under the same operating conditions as in Figure 3-2..... 88

- Figure 3-4. Emission spectra in the N_2 -0.2% O_2 early afterglow at 2 torr: a) 300–400 nm spectral range; b) 550–600 nm spectral range. The collimator aims at the chamber at $x = 1.5$ cm from its entrance plane and at $z = 0$, the plasma source axis. The relative units appearing in Figure 3-2(a), Figure 3-3(a) and Figure 3-4(a) are the same, and thus can be compared, and similarly as concerns Figure 3-2(b), Figure 3-3(b) and Figure 3-4(b). 90
- Figure 3-5. Plot of $R_{B,v'}$, the normalized density distribution of the v' vibrational level, as a function of v' , for the $N_2(B^3\Pi_g)$ electronic state, the upper level of the N_2 1st positive system (from Bockel *et al* 1995). This abacus is obtained by combining linearly the experimental density distribution from a pure early-afterglow ($a = 0$) and that from a pure late-afterglow ($a = 1$), using expression (3.2). 92
- Figure 3-6. (a) Intensity variation of the 391.4 nm band head recorded in the 30 mm tube at $x_0/2$ (NO injection inlet) for a surfatron position $x_1 = 3$ cm, N_2 gas without added O_2 . Other conditions as in Figure 3-2; (b) Emission intensity, at the same observation position as in Figure (a), from the 1st positive system ($N_2(B)$ to $N_2(A)$ electronic transition) in the 560–600 nm range showing the evolution of a few ro-vibrational transitions at three different pressures. The spectra are normalized at the $v' = 11$, $v'' = 7$ transition. The parameter a in the abacus is 0 for 2 and 5 torr, 0.1 for 10 torr. 94
- Figure 3-7. (a) Emission intensity of the first negative system at the 391.4 nm band head in the chamber at the tube axis ($z = 0$) and at axial position $x = 1.5$ cm, at 2 torr with $x_1 = 3$ cm, under different percentages of added O_2 ; (b) emission intensity from the 1st positive system ($N_2(B)$ to $N_2(A)$ transition) under different percentages of added O_2 , other conditions as in Figure 3-7(a). The abacus in Figure 3-5 approximately yields $a = 0.2$ at 0% O_2 , 0.6 at 0.2% O_2 and reaches almost 1 at 1% O_2 , indicating in this last case a really dominant late afterglow. 96
- Figure 3-8. Transverse variation, with respect to the discharge tube axis ($z = 0$), of the emission intensity of the main band head (391.4 nm) of the 1st negative system at a fixed axial position $x = 1.5$ cm in the chamber, at 2 torr and with no added O_2 , for three different positions x_1 of the surfatron. 97
- Figure 3-9. Emission intensity variation of the 391.4 nm band head of the 1st negative system in the 30 mm o.d. tube at mid-position ($x_0/2$: NO injection inlet), at 2 torr and with no added O_2 , for surfatron positions x_1 of 3 cm and 10 cm. 98

- Figure 3-10. (a) Emission intensity from the 1st positive system ($N_2(B)$ to $N_2(A)$ transition) in the 560–600 nm range in the chamber at the axis ($z = 0$) and for a fixed axial position $x = 1.5$ cm, at 2 torr and with no added O_2 , with surfatron positions $x_1 = 3$ cm and 10 cm; (b) The two spectra in Figure 3-10(a) have been normalized at the intensity of the $v' = 11, v'' = 7$ transition at $x_1 = 3$ cm for an easier comparison. The parameter a is approximately 0.2 at $x_1 = 3$ cm while it is 0.6 at $x_1 = 10$ cm. 99
- Figure 3-11. Relative density of N atoms (obtained through $I(N_2)$) as a function of added O_2 percentage for $x_1 = 10$ cm, as recorded at different axial and transverse positions for different pressures: (a) 2, (b) 5 and (c) 10 torr. Recall that the 50 L chamber length is 60 cm and its height 28 cm. 103
- Figure 3-12. Relative density of N atoms (obtained through $I(N_2)$) at a fixed position ($x = 50$ cm, $z = 0$) as a function of the percentage of added O_2 , at a pressure of 2 torr, for two different positions x_1 of the surfatron..... 104
- Figure 3-13. NO_2^* emission intensity recorded at 560 nm ($x = 50$ cm, $z = 0$) as a function of the Ar-1.5% NO_{cxt} flow rate, at different percentages of O_2 admixed to N_2 with $Q(N_2) = 2$ slm. Pressure is 2 torr (prior to introducing NO_{cxt}). A straight line can be fitted to the data points corresponding to any given percentage of added O_2 : the slope obtained when no O_2 is added yields the value of r_1 while the set of points for a given percentage of O_2 provides the value of r_i . Each set of data points was recorded three times and their slope values averaged. 108
- Figure 3-14. Measured N and O atom densities obtained from the titration method as functions of the percentage of added O_2 at 2 torr for surfatron positions x_1 : (a) 3 cm and (b) 10 cm. 109
- Figure 3-15. Density of N and O atoms obtained from the titration method (Figure 3-14) compared with the UV emission intensity from the NO_β system (UV intensity normalized at the maximum of N atom density) as functions of the percentage of added O_2 , recorded at $x = 50$ cm, $z = 0$. Operating conditions: surfatron position $x_1 = 10$ cm, pressure at 2 torr and N_2 flow rate at 2 slm..... 111
- Figure 3-16. (a) Variation, as a function of $O_2\%$, of the N atom density obtained from titration, at $x_0/2$, with that inferred from the $I(N_2)$ emission intensity (both sets of values normalized at 0% O_2); (b) variation, as a function of $O_2\%$, of the N atoms used up compared with the amount of N atoms assumed to be involved in the formation of

- the NO(B) molecules. Both curves are normalized arbitrarily to unity at their maximum value. Operating conditions as in Figure 3-15. 112
- Figure 3-17. Variation of the I_N/I_{Ar} and I_O/I_{Ar} ratios in the discharge as functions of the added O₂ percentage. Operating conditions: 2 slm of N₂, 0.1 slm of argon and a variable percentage of added O₂; pressure in the chamber is 2 torr before the addition of O₂. 115
- Figure 3-18. Variation of the (a) N atom density and (b) O atom density as functions of O₂% obtained by actinometry in the plasma and by NO titration in the afterglow. The normalization of the N atom densities is effected at zero percent O₂ while the O atom densities from actinometry are calibrated with those of titration, taking the actinometry value at 0.05 %O₂ (the lowest O₂% value for which there are data points from both methods) to be equal to that obtained by titration. Plasma conditions as in Figure 3-17. 117
- Figure 3-19. Scanning electron microscope (SEM) micrographs of microspheres, deposited on glass plates, located at the discharge axis ($x = 1.5$ cm, $z = 0$) and below it ($x = 1.5$ cm, $z = 5$ cm) subjected for 2 hours to an N₂-O₂ afterglow with surfatron positions $x_1 = 3$ and 10 cm (see Figure 3-1(b) for coordinates). Gas pressure is 2 torr with an N₂ gas flow of 2 slm and 1% of added O₂ for maximum UV intensity at this pressure and gas flow. 119
- Figure 3-20. Eroded thickness of polystyrene microspheres as a function of the percentage of O₂ added to N₂, at two different spatial positions ($x = 1.5$ cm, $z = 0$ and $x = 1.5$ cm, $z = -5$ cm). Surfatron position $x_1 = 10$ cm, exposure time is 2 hours at 2 torr, other conditions as in Figure 3-19. 121
- Figure 4-1 Profils d'inactivation obtenus selon que : (1) la dose est augmentée en commençant alors que les électrodes sont à la température ambiante, leur température s'accroissant progressivement avec le temps ; (2) la dose est diminuée en partant d'une température déjà élevée et continuant à croître (Figure 4-2) (figure adaptée de Trompeter *et al* (2002)). 136
- Figure 4-2. Évolution estimée de la température des électrodes de la DBD de Trompeter *et al* (2002) en fonction de l'ordre des traitements tel que présenté à la Figure 4-1, en supposant une progression constante de la température d'un traitement à l'autre. 136

- Figure 4-3. Composantes de la source de plasma utilisées lors de nos expériences. Celle-ci est constituée d'un générateur micro-ondes ; d'un circulateur couplé à une charge adaptée ; d'une ligne bidirectionnelle permettant la mesure des puissances incidente et réfléchie; d'un système séparant la puissance micro-ondes en deux parts égales (diviseur 3 dB) et, de deux surfatrons permettant le lancement d'ondes de surface le long des tubes à décharge situés de part et d'autre de l'enceinte de stérilisation (Figure 4-4). 141
- Figure 4-4. Vue latérale de la chambre de stérilisation. Volume de 50 L (dimensions internes 61 x 26 x 30 cm³); tubes à décharge 26 d.i. 30 d.e. ; fréquence d'excitation 915 MHz. 142
- Figure 4-5. Évolution à partir de la température ambiante de la température du Petri en fonction du temps, à deux valeurs de la température de consigne de la console de chauffage : a) 10 °C ; b) 80 °C..... 143
- Figure 4-6 Évolution de l'écart entre la température de consigne variant de 2 à 80°C, et celle mesurée du Petri..... 144
- Figure 4-7 Évolution du nombre de spores survivantes en fonction du temps après traitement par chauffage seul à 12 °C, 52 °C et 68 °C dans un flux de 1 Lsm (par tube) de N₂-0,3%O₂ à 5 torr. 148
- Figure 4-8. Courbes de survie de spores *B. atrophaeus* obtenues pour des températures de 12, 28, 52, et 68 °C. Conditions plasma : 1L standard de N₂/ min (par tube à décharge), 0,3%O₂, 5 torr, 250 W par tube (915 MHz). 149
- Figure 4-9 Évolution du temps D₁ en fonction de la température du Petri obtenue dans des conditions d'émission UV optimales (0,3%O₂). 150
- Figure 4-10 Évolution du nombre de spores survivantes après 30 min de traitement (10⁷ spores au départ) en fonction de la température du Petri dans des conditions d'émission UV optimales (0,3%O₂). On passe, en moyenne, de 800 spores à 10 °C à 20 spores à 68 °C. 150
- Figure 4-11. Évolution du nombre de survivants en fonction du temps de traitement pour 4 protocoles différents : i) chauffage (52 °C) et traitement par plasma simultanés, ii) chauffage (12 °C) et traitement par plasma simultanés, iii) chauffage à 52 °C puis traitement par plasma à 12 °C, iv) traitement par plasma à 12 °C puis chauffage à 52 °C. Le cas échéant dans des conditions d'émission UV optimales (0,3%O₂). 151

- Figure 4-12. Courbes de survie de spores *B. atrophaeus* obtenues pour des températures du Petri de 12, 28, 52 et 68 °C. Conditions plasma : 1L N₂ (par tube à décharge), 0,3%O₂, avec filtre CaF₂, 5 torr, 250 W par tube (915MHz). 153
- Figure 4-13. Comparaison des courbes de survie obtenues à deux températures (12 et 52 °C) avec et sans filtre CaF₂, dans des conditions d'émission UV optimales (0,3%O₂). La comparaison a été effectuée en supposant que le filtre CaF₂ atténue le flux de photons d'un facteur 2 : les temps d'inactivation sans filtre sont alors multipliés par 2..... 154
- Figure 4-14. Évolution de l'émission UV entre 200 et 300 nm, en fonction du pourcentage de O₂ dans le mélange N₂ - %O₂. 155
- Figure 4-15 Courbes de survie de spores *B. atrophaeus* obtenues pour des températures de 12, 28, 52 et 68 °C. Conditions plasma : 1L N₂ (par tube à décharge), 1%O₂, 5 torr, 250 W par tube (915 MHz). 156
- Figure 4-16. Courbes de survie de spores *B. atrophaeus* obtenues pour des températures de 12, 28, 52 et 68 °C. Conditions plasma : 1L N₂ (par tube à décharge), 10%O₂, 5 torr, 250 W par tube (915 MHz). 157
- Figure 4-17. Comparaison des courbes de survie (première phase) obtenues à 4 températures (12, 28, 52 et 68 °C) pour 0,3% de O₂ et 10% de O₂. La comparaison a été effectuée en supposant que le passage de 0.3% à 10%O₂ a comme conséquence une diminution du flux de photons d'un facteur 38, facteur obtenu en superposant la première pente de la courbe de survie à 0,3%O₂ à celle à 10% et 28 °C (conservation de la fluence). Ce même facteur multiplicatif est appliqué aux courbes de survie (a), (c) et (d)..... 159
- Figure 4-18. Micrographies de MEB de spores traitées pendant 30 min à 10%O₂, à 3 températures du Petri : (a) 28 °C (b) 45 °C, (c) 68 °C. 160
- Figure 4-19. Schéma simplifié des transitions en énergie et des processus photochimiques pouvant avoir lieu lors de l'absorption d'un photon par une molécule (cas d'un état fondamental de multiplicité singulet (S = 0) l'autre état étant alors un triplet (S = 1)) (Larson et Berenbaum 1988)..... 163
- Figure 4-20. Diagramme d'Arrhenius des variations du logarithme de la vitesse (fréquence) d'inactivation de 10⁷ spores (première phase) dans une post-décharge de N₂-O₂ pour 0,3%O₂, 1%O₂, 10%O₂, et 0.3%O₂ avec filtre CaF₂: le log (1/D₁) (où D₁ est le temps nécessaire pour inactiver 1 log de spores) est linéaire en 1/T, avec une pente donnée par $\tau = -E_a/R$ 165

- Figure 4-21. Micrographie d'un dépôt de spores non traitées présentant des empilements de celles-ci. 167
- Figure 4-22. Lissage à l'aide de la relation 4.8 des points expérimentaux correspondant aux conditions expérimentales : 0,3%O₂, 28 °C. À comparer avec la Figure 4-8 où les courbes présentées résultent de régressions linéaires et non du modèle comme dans le cas présent. 168
- Figure 4-23. Comparaison des courbes calculées à l'aide de l'équation 4.13 avec les points expérimentaux tels qu'obtenues pour des températures de 12, 28, 52 et 68 °C, et pour une émission UV optimale (0,3%O₂). 170
- Figure 4-24. Comparaison du nombre de spores survivantes après 30 min de traitement, calculé à l'aide de la relation 4.13 avec les valeurs expérimentales obtenues pour les températures de 12, 28, 52 et 68 °C, et pour une émission UV optimale (0,3%O₂)... 171

Liste des notations et symboles

Acronymes :

AND	Acide désoxyribonucléique
APG	Atmospheric Pressure Glow
APPJ	Atmospheric Pressure Plasma Jet
APTD	Atmospheric Pressure Townsend Discharge
ATCC	American Type Culture Collection
CCD	Charge Coupled Device
CPE	Capillary Plasma Electrode
DBD	Décharge à Barrière Diélectrique
DC	Direct Current (courant continu)
DM	Dispositif médical
DNA	Deoxyribonucleic acid
EUt	Oxyde d'éthylène
Lsm	Litre Standard par Minute
MD	Medical Device
MEB	Microscope à balayage électronique
NAS	Niveau d'assurance de stérilité
O.S.	Onde de surface
PE	Porte-échantillon
RDB	Resistive Barrier Discharge
RF	Radio Frequency (fréquences radio)
SASP	Small Acid-Soluble Proteins
SEM	Scanning Electron Microscope
SP	Spore Photoproduct
TSA	Tryptic Soy Agar (Gélose)
TSB	Tryptic Soy Broth (bouillon)
T-T	Dimère thymine-thymine
UV	Ultraviolet

VUV Ultraviolet du vide

Abréviation :

B. atrophaeus *Bacillus atrophaeus* (anciennement *Bacillus subtilis*)

E. coli *Escherichia coli*

A. Niger *Aspergillus niger*

Petri Boîte de Petri

Notations moléculaire et spectroscopique :

$N_2(A)$ Premier niveau métastable de l'azote moléculaire

$N_2(C)$ Niveau excité de la molécule de N_2 ; sa désexcitation vers le niveau fondamental $N_2(X)$ est à l'origine de l'émission du premier système positif

$N_2^+(B)$ Premier niveau excité de la molécule ionisée de N_2 ; sa désexcitation vers le niveau $N_2^+(X)$ est à l'origine de l'émission du premier système négatif

$NO(A)$ Niveau supérieur de la transition vers $NO(X)$ donnant naissance au système NO_γ

$NO(B)$ Niveau supérieur de la transition vers $NO(X)$ donnant naissance au système NO_β

Symboles latins :

D Temps (ou dose) nécessaire pour réduire une population de micro-organismes d'une décade (réduction décimale) caractérisant une courbe de survie

D_0 Temps de réduction décimale correspondant à la phase de latence (épaule) de la courbe de survie

D_1 Temps de réduction décimale correspondant à la première phase de la courbe de survie

D_2 Temps de réduction décimale correspondant à la seconde phase de la courbe de survie

E_a Énergie d'activation

I Intensité

I_{UV}	Intensité de l'émission ultraviolet
\mathcal{N}	Nombre de spores survivantes
\mathcal{N}_0	Nombre de spores au temps $t = 0$
\mathcal{N}_{0-1}	Nombre de spores isolées
\mathcal{N}_{0-2}	Nombre de spores empilées
P	Puissance micro-ondes
P_{inc}	Puissance incidente
$P_{réf}$	Puissance réfléchie
ppm	Partie par million.
R	Constante molaire des gaz.
S	Spin électronique total.
T	Temps
T	Température.
x	Position axiale dans l'enceinte de post-décharge
x_1	Distance de l'interstice de lancement du surfatron à l'élargissement du tube à décharge
z	Position transversale dans l'enceinte de post-décharge

Symboles grecs :

α_1	Coefficient relié à la première phase de la courbe de survie
α_2	Coefficient relié à la seconde phase de la courbe de survie
λ	Longueur d'onde
φ	Flux de photons UV
Φ	Fluence
τ	Pente du diagramme d'Arrhenius.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, le professeur Michel Moisan. Votre confiance, votre soutien constant, ainsi que les nombreux conseils que vous m'avez prodigués tout au long de mon parcours m'ont été d'une aide inestimable.

Je souhaite également exprimer ma grande reconnaissance à l'attaché de recherche du Groupe de physique des plasmas, Bachir Saoudi, pour son assistance scientifique précieuse tout au long de mon doctorat ainsi que pour son aide inestimable lors de la rédaction de ma thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Danielle Kéroack, notre TGAR adorée, pour son soutien moral et technique de tous les instants. Merci Dada!

J'aimerais sincèrement remercier la professeure Joëlle Margot pour les discussions partagées, les conseils prodigués, ainsi que pour avoir accepté de présider le jury de ma thèse.

J'aimerais remercier les professeurs Jacques Pelletier et L'Hocine Yahia d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens à remercier le professeur Jean Barbeau pour sa collaboration ainsi que pour ses précieux conseils en microbiologie.

Je souhaite également souligner l'apport technique extrêmement précieux de Jacynthe Séguin, Annie Leduc et Jean-Sébastien Mayer tout au long de mon projet de recherche.

Merci à mes collègues présents et passés du Groupe de physique des plasmas : Thomas Fleisch, Eduardo Castaños-Martinez, Jérôme Saussac, Jérôme Pollak, Ahlem

Mahfoud, Mohammed Soltani, Yassine Kabouzi, Karl Giroux, Valérie Baslon, Jean-Sébastien Poirier, Antoine Quintal-Leonard, Martin Nantel-Valiquette le meilleur collègue de bureau du monde, Pierre-Marc Bérubé...t'es pas mal non plus, Luc Stafford ... alias Luc le retour, et tous ceux que j'ai oubliés.

Je tiens à sincèrement remercier le père Réal Michaud pour sa présence qui a été d'un grand réconfort depuis mon arrivée à Montréal, et Mimi pour sa gentillesse ainsi que pour tous ses bons plats; le hachis Parmentier m'a sauvé la vie.

J'exprime ma profonde gratitude à Véronique Dagenais-Desmarais pour son soutien, ses encouragements, sa patience et sa tendresse au cours de ces derniers mois.

Finalement un immense merci à Pierre, mes frères et sœurs : Abla, Ali, Anna, Yasid et à ma maman, sans lesquels rien n'aurait été possible. Je vous aime.

À ma maman Mouna Boudam, à Marie

Introduction générale

Depuis quelques années, les techniques classiques de stérilisation, telles que l'autoclave ou le traitement par oxyde d'éthylène (OEt), sont confrontées à de nouveaux défis. Parmi ceux-ci, on retrouve :

- la stérilisation de dispositifs médicaux (DM) à base de polymères (matériaux thermo-sensibles) qui ne peuvent être traités qu'à des températures inférieures à 60 °C;
- la stérilisation de tubes creux de quelques mm de diamètre et de longueur supérieure au mètre (cathéters, endoscopes);
- l'inactivation de nouveaux agents pathogènes tels que les prions, protéines responsables chez l'homme de la maladie de Creutzfeldt-Jakob;
- l'élimination de biofilms : communautés de bactéries, agrégées en microcolonies et adhérant à une surface inerte ou biologique.

Pour faire face à ces nouvelles exigences, quelques techniques de stérilisation ont été récemment mises sur le marché : on dénombre, entre autres, Sterrad (Johnson & Johnson ASP), basé sur un procédé chimique à basse température (55 °C) utilisant le peroxyde d'hydrogène (H_2-O_2), ou, plus récemment encore, un stérilisateur par ozone (TSO3) opérant à basse température. Cependant, ces deux techniques comportent elles aussi des limitations tant sur le plan économique et écologique (temps de traitement et d'aération importants) qu'en termes d'efficacité (impossibilité de stériliser les endoscopes ou d'inactiver les prions et biofilms). Ainsi, la mise au point de nouveaux procédés demeure nécessaire.

Du fait de ses performances (fiabilité et rapidité), de sa grande versatilité (possibilité de traiter des dispositifs à géométrie complexe et de différentes natures (polymères métaux,...)), ainsi que de son adaptabilité à des besoins spécifiques, la stérilisation à base de plasma (gaz ionisé) pourrait se révéler être une alternative prometteuse aux techniques conventionnelles de stérilisation. Cette méthode opère selon des processus physico-chimiques spécifiques, que nous aborderons dans les prochains chapitres, qui sont reliés à la nature des espèces produites par le plasma (photons et espèces chimiquement réactives).

Principaux objectifs de la thèse

Ce travail s'inscrit dans la continuité des travaux, effectués depuis près de 10 ans par notre groupe de recherche, portant sur l'utilisation de gaz ionisés en vue d'inactiver des micro-organismes et, à terme, de développer un stérilisateur par plasma de DM. Nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- établir l'importance de l'action des photons ultraviolet (UV) dans les processus d'inactivation de micro-organismes traités par une décharge à la pression atmosphérique (PA);
- minimiser les dommages aux polymères traités dans une post-décharge d'un plasma N_2-O_2 à basse pression;
- examiner l'influence de la température sur la cinétique d'inactivation de spores *Bacillus atrophaeus* traitées dans une post-décharge d'un plasma N_2-O_2 à basse pression. Et, plus particulièrement, examiner l'hypothèse que cette influence thermique puisse agir en synergie avec les photons UV émis dans ce type de post-décharge ou avec les radicaux qui y sont présents.

Organisation de la thèse

Le chapitre 1 est conçu comme une introduction abordant différents aspects du domaine de la stérilisation d'objets médicaux (généralités), mais traitant aussi de manière plus détaillée certaines notions inhérentes à la stérilisation par plasma telles que l'action des UV sur les micro-organismes : dommages induits et notions de flux et de fluence; ainsi que les interactions phase gazeuse / phase solide qui se produisent, par exemple, à l'interface matériaux / post-décharge d'un plasma. Notre étude proprement dite se décompose en trois parties :

Dans le chapitre 2, nous nous intéressons au rôle des photons UV dans l'inactivation de micro-organismes traités par une décharge à la pression atmosphérique : certains l'estiment négligeable tandis que d'autres suggèrent que les photons UV sont responsables de l'inactivation. Cependant, dans les deux cas, peu de résultats expérimentaux probants avaient été présentés jusqu'ici. Afin d'éclaircir ce point, nous rapportons nos résultats expérimentaux sur l'inactivation de micro-organismes par une décharge à barrière diélectrique (DBD) dans des conditions expérimentales permettant l'obtention d'une émission UV relativement importante ou, au contraire, négligeable tout en conservant le même mélange de gaz, i.e., N_2-N_2O . Nous utilisons la technique de spectroscopie optique d'émission afin d'établir l'évolution de l'émission UV entre 200 nm et 300 nm en fonction de la quantité de N_2O ajouté dans la décharge; les conditions de forte et faible intensité UV sont alors clairement définies.

Dans le chapitre 3, nous caractérisons de manière détaillée la post-décharge d'un plasma de N_2-O_2 à l'aide de la technique de spectroscopie optique d'émission, ce qui nous permettra de mettre en évidence la présence d'une proche et d'une lointaine post-décharge dans l'enceinte de stérilisation. Ayant observé que la proche post-décharge était responsable des dommages importants aux polymères déposés non loin de l'axe de la chambre, nous examinerons l'influence des conditions opératoires (pression, pourcentage de O_2 dans le mélange, distance de la source à l'entrée de la chambre) dans le but d'obtenir une lointaine post-décharge dominante dans l'enceinte de stérilisation et ainsi éviter l'endommagement des matériaux. Par la suite, en utilisant les techniques de titrage et d'actinométrie, nous étudierons l'évolution des densités des atomes N et O en post-décharge en fonction du pourcentage de O_2 dans le mélange. Puis nous chercherons à établir un lien, s'il existe, entre l'évolution de l'intensité UV et les densités de N et de O, toujours dans l'enceinte de post-décharge.

Finalement, dans le chapitre 4, nous considérerons les effets combinés de la température et de l'action d'une post-décharge d'un plasma N_2-O_2 à basse pression sur les cinétiques d'inactivation de spores *B. atrophaeus* et introduirons un modèle simple reproduisant nos résultats expérimentaux.

Chapitre 1

Généralités sur les méthodes de stérilisation conventionnelles et caractéristiques particulières de la stérilisation par plasma

1.1 Introduction

Dans ce chapitre, nous allons présenter au préalable les différents moyens de contrôle de la stérilité, puis nous passerons en revue les principales techniques de stérilisation conventionnelles, en distinguant les procédés physiques et les procédés chimiques. Par la suite, nous nous intéresserons à la stérilisation par plasma qui peut faire appel à des mécanismes d'inactivation basés de façon prédominante soit sur l'action des radicaux, soit sur celle des photons UV, soit encore sur la combinaison de ces deux espèces actives. De ce fait, et afin de faciliter la compréhension des différents mécanismes mis en jeu, nous introduirons les concepts de fluence et d'effet d'ombrage, ce dernier pouvant être un des facteurs limitant les possibilités de la technique. Enfin, dans le but de mieux comprendre et, par là, de contrôler le processus d'érosion pouvant intervenir dans notre procédé, nous nous intéresserons aux interactions entre les radicaux et les polymères (et aussi des spores), en mettant l'accent sur les processus se produisant à l'interface surface/gaz.

1.1.1.1 La stérilisation

La stérilisation est définie comme l'élimination complète de toute forme de vie, la stérilité étant atteinte lorsque l'objet ou la solution traitée est exempt de tout micro-organisme vivant. Toutefois, en pratique, seule la notion de probabilité de stérilité est utilisée afin d'évaluer si une technique est fiable ou non : on fait appel alors au concept de niveau d'assurance de stérilité (NAS). Selon les pharmacopées européennes et américaines, une procédure est validée comme procédure de stérilisation si sur un million d'échantillons traités, un seul, au plus, est non stérile; on parle alors d'un NAS de 10^{-6} (Block 2002).

Afin de contrôler et d'optimiser les différentes techniques de stérilisation, deux outils sont utilisés : i) les indicateurs biologiques; ii) les courbes de survie.

1.1.2 Les indicateurs biologiques

Le moyen le plus sûr de contrôler l'efficacité d'un cycle de stérilisation consiste à vérifier que les micro-organismes les plus résistants à la méthode de stérilisation utilisée, et introduits à l'endroit où la stérilisation est la plus difficile, ont été inactivés. À cette fin, on utilise différents indicateurs biologiques, dépendamment de l'agent stérilisant employé. Le Tableau 1-1 présente les indicateurs les plus fréquemment utilisés pour la validation des techniques conventionnelles de stérilisation décrites dans la prochaine section. Chacun de ces indicateurs présente une grande résistance aux espèces actives de la méthode à valider.

Indicateur biologique	Méthode de stérilisation
<i>Bacillus atropheus</i> ATCC [®] 9372	Chaleur sèche Oxyde d'éthylène
<i>G. stearothermophilus</i> ATCC [®] 7953	Chaleur humide Oxyde d'éthylène
<i>Bacillus pumilus</i> ATCC [®] 27142	Irradiation gamma

Tableau 1-1. Indicateurs biologiques utilisés lors de la validation de différentes méthodes de stérilisation (le terme ATCC renvoie à la nomenclature américaine des micro-organismes).

En ce qui concerne la méthode de stérilisation par plasma, notre choix s'est porté sur la spore *B. atropheus* comme indicateur biologique. Elle est composée, de l'extérieur vers l'intérieur, des tuniques externe et interne, du cortex, de la membrane plasmique et enfin du noyau contenant les acides nucléiques et les protéines nécessaires à la germination (Figure 1-1). Ce sont ces différentes couches qui lui confèrent une grande résistance aux attaques des enzymes et des agents chimiques (Setlow 2007). La tunique externe a une épaisseur variant de 70 à 200 nm et est constituée de protéines alcalino-résistantes, riches en cystine et en ponts disulfures. La tunique interne, de structure laminaire et possédant une épaisseur d'environ 75 nm (Driks 1999), est constituée de protéines acides alcalino-solubles. Le cortex est constitué d'un peptidoglycane et est caractérisé par une structure compacte qui

assure le maintien de la déshydratation et de la minéralisation du "cœur" de la spore, contenant l'ADN et les protéines nécessaires à la germination. La membrane plasmique est caractérisée par une faible perméabilité aux petites molécules et est un des facteurs de la résistance des spores aux agents chimiques (Setlow 2007). En plus de la protection de ces différentes couches, le matériel génétique est protégé par des protéines spécifiques qui recouvrent l'ADN¹: les SASP (small acid-soluble proteins). Ces protéines confèrent à la spore une résistance accrue aux UV et à la chaleur. Comme nous le verrons plus loin, les mécanismes d'inactivation par plasma mettent en jeu différents agents parmi lesquels on retrouve les photons UV et les radicaux. Ainsi, les spores *B. atrophaeus*, du fait de leur résistance marquée à ces deux types d'agents, sont un candidat idéal comme indicateur biologique pour la technique de stérilisation par plasma.

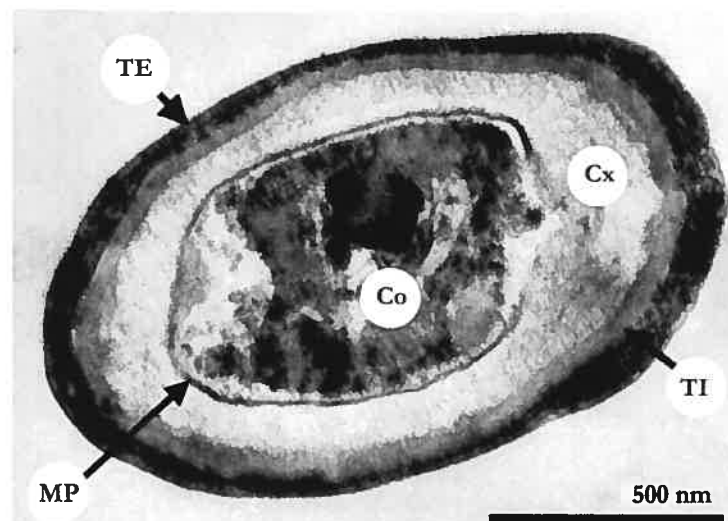


Figure 1-1. Micrographie d'une spore de *B. atrophaeus* sur laquelle les différentes tuniques protectrices du matériel génétique contenu dans le cœur sont identifiées. TE: Tunique Externe; TI: Tunique Interne; MP: Membrane Plasmique; Cx: Cortex; Co: Cœur (Driks 1999).

¹ L'acide désoxyribonucléique (ADN) est constitué d'une double chaîne organisée en double hélice dont le maillon est le nucléotide constitué d'un groupement phosphate et d'un sucre désoxyribose sur lequel est greffé une base azotée (adénine, guanine, cytosine, thymine).

1.1.3 Les courbes de survie

Une courbe de survie, telle que montrée en Figure 1-2, représente le nombre sous forme logarithmique de micro-organismes survivants après traitement en fonction du temps ou de la dose d'agents actifs. Afin de construire cette courbe, on a recours à deux méthodes²: i) la méthode de numération directe, utilisée lorsque le nombre de survivants est assez élevé (supérieur à 100) et qui consiste à étaler sur un milieu de culture solide la charge microbienne récupérée après traitement, et d'en effectuer le décompte après incubation, chaque colonie correspondant à une bactérie viable; ii) la méthode de filtration sur membrane utilisée (avantageusement, parce que beaucoup plus précise) lorsque la population de survivants est inférieure à 100, et qui consiste à filtrer la totalité de la suspension de récupération à travers une membrane dont la porosité retient les micro-organismes. La membrane est ensuite déposée sur un milieu de culture solide et un décompte est effectué après incubation.

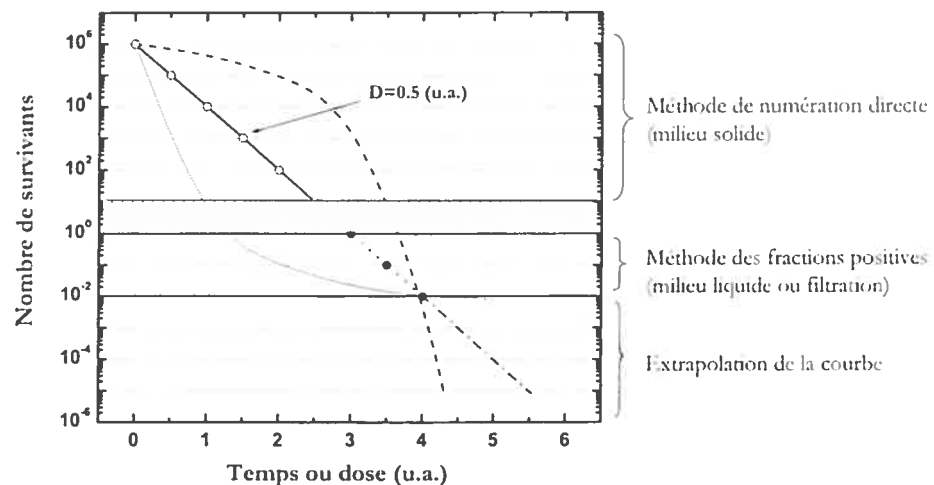


Figure 1-2. Exemple de courbe de survie présentant 3 cinétiques différentes d'inactivation. À droite de la courbe, on présente les portions dénombrables à l'aide des méthodes de numération directe et de filtration sur membrane (zone hachurée).

² La procédure complète de préparation des spores, dépôt, récupération et comptage est décrite au Chapitre 4.

Afin d'analyser les courbes de survie ainsi obtenues, une méthode de régression peut être utilisée. En effet, lorsque la courbe d'inactivation est linéaire en échelle semi-logarithmique, la décroissance du nombre de survivants peut s'écrire comme :

$$\frac{d\mathcal{N}}{dx} = -\alpha\mathcal{N}(x) \quad (1.1)$$

où $\mathcal{N}(x)$ est le nombre de survivants, x le temps ou la dose et α un coefficient de réaction.

En intégrant cette équation, on obtient:

$$\mathcal{N}(x) = \mathcal{N}_0 \exp(-\alpha x) \quad (1.2)$$

où \mathcal{N}_0 est le nombre initial de microorganismes.

Finalement, en passant au logarithme de base 10, on peut écrire :

$$\log \frac{\mathcal{N}(x)}{\mathcal{N}_0} = -\frac{x}{D} \quad (1.3)$$

où D représente le temps ou la dose nécessaire pour obtenir une réduction d'une décade de la population des micro-organismes.

Nous verrons dans les prochains chapitres que les courbes de survie sont un outil indispensable afin d'identifier les espèces actives et d'en comprendre les mécanismes d'action. Ainsi, en se plaçant dans différentes conditions opératoires et en analysant les courbes de survie obtenues, il est possible de déduire les contributions respectives des différents processus physico-chimiques responsables de l'inactivation observée. De plus, les méthodes de régression utilisées permettent, dans certaines conditions, d'extrapoler les courbes de survie afin de prédire la probabilité de survie des micro-organismes pour un temps prolongé de traitement ou une dose plus importante.

Après avoir effectué un rappel des notions de stérilité, d'indicateur biologique et de courbes de survie, nous passons en revue les différentes techniques conventionnelles de stérilisation puis nous résumons les caractéristiques d'un stérilisateur idéal.

1.2 Les techniques conventionnelles de stérilisation

On peut classer les techniques conventionnelles de stérilisation en deux catégories selon que leur type d'action est physique ou chimique. Il est cependant important de remarquer qu'il n'existe pas de limite claire entre agents physiques et chimiques, un agent physique pouvant induire la mort du micro-organisme traité par formation d'espèces chimiques létales (p.ex. rayonnements ionisants produisant du OH).

1.2.1 Techniques utilisant des procédés physiques

Parmi les processus physiques, on rencontre la stérilisation par chaleur humide (autoclave) ou sèche (Poupinel) ainsi que la stérilisation par irradiation gamma.

1.2.1.1 Stérilisation par la chaleur humide (autoclave)

La stérilisation par chaleur humide est la méthode la plus ancienne (1880), et aussi la plus répandue. Elle est généralement utilisée pour la stérilisation de liquides ou d'objets non oxydables et possédant une bonne stabilité thermique, tels que le linge, les instruments chirurgicaux métalliques non oxydables ou certains caoutchoucs. Elle consiste à soumettre l'objet à stériliser, placé dans une enceinte étanche, à l'action de la vapeur d'eau saturée sous pression pendant un temps déterminé. Les conditions standards³ d'utilisation sont : exposition de 15 minutes à une température de 121 °C, et à une pression d'environ 2 barr.

Malgré l'ancienneté d'utilisation de cette technique, les mécanismes d'inactivation ne sont pas clairement identifiés : Setlow (1995) avance l'hypothèse que, dans le cas des spores, l'action de la chaleur humide n'induit pas de dommages sur l'ADN, mais provoque des altérations dans les protéines du métabolisme et celles des tuniques. Il est à noter que différents facteurs tels que la présence de protéines SASP (small acid-soluble proteins) autour de l'ADN, la concentration en minéraux (Ca^{2+} , Mn^{2+}) dans le noyau (Murrell 1967),

³ Un cycle spécial à 138 °C pendant 18 min est utilisé afin d'inactiver les prions.

ou le taux de déshydratation du noyau de la cellule, peuvent avoir un impact sur la résistance des spores à la chaleur humide (Nicholson *et al* 2000).

Lorsque les objets à stériliser sont sensibles à l'humidité mais non à la chaleur, comme c'est le cas de matériaux nickelés, une variante de cette technique basée sur l'utilisation de la chaleur sèche est utilisée.

1.2.1.2 Stérilisation par la chaleur sèche (Poupinel)

Cette technique consiste à soumettre l'objet à stériliser à une température de 160°C pendant 2 heures ou de 170 °C pendant 1 heure.

L'inactivation est probablement obtenue par endommagement de l'ADN. En effet, il a été observé que l'ADN des spores exposées à la chaleur sèche présente des lésions ainsi que des mutations (Chaigneau 1977, Nicholson *et al* 2000). Dans ces conditions, comme la cible principale est l'ADN lui-même, les capacités de réparation de l'ADN jouent un rôle très important dans la résistance des micro-organismes à la chaleur sèche. Notons que d'autres facteurs tels que la présence de SASP autour de l'ADN et le taux de minéraux dans le noyau jouent aussi un rôle dans la résistance des spores à la chaleur sèche.

De nombreux objets et outils médicaux sont sensibles à la chaleur et à l'humidité, ce qui rend impossible l'utilisation des techniques présentées précédemment. Dans ces cas particuliers, on peut, entre autres, faire appel aux techniques de stérilisation par irradiation gamma.

1.2.1.3 Radiations gamma

Le spectre des radiations électromagnétiques peut être subdivisé en différentes gammes de longueurs d'ondes, allant des radiations gamma et rayons X, aux ondes radios, en passant par les ultraviolets (UV), le visible et l'infrarouge; chacune de ces radiations ayant des effets propres sur les organismes vivants, plus ou moins néfastes à long terme. Les radiations gamma sont des ondes électromagnétiques de longueur d'onde comprise entre 10^{-10} m et 10^{-14} m. Elles sont obtenues à l'aide de sources isotopiques tel que le Cobalt 60 (^{60}Cs) qui émet deux rayonnements gamma de 1.17 Mev et 1.33 Mev.

La technique de stérilisation par irradiation gamma, consiste à irradier l'objet avec une dose de 25000 gray. Son mécanisme d'inactivation est basé sur l'endommagement de l'ADN, soit directement, par absorption de l'énergie du rayonnement provoquant, entre autres, des cassures aux brins de l'ADN, soit indirectement, par l'action des espèces

hydroxyles OH^* (formées par la radiolyse de l'eau) qui réagissent par la suite avec les sucres-phosphates de la chaîne d'ADN (Moseley 1999). Ces dommages à l'ADN ont pour conséquence la perte des capacités de réplication des micro-organismes.

Bien que très efficace pour la destruction des micro-organismes, cette méthode a comme désavantage de provoquer des dommages irréversibles (réticulation et scission des chaînes carbonées) aux polymères traités, résultant en des modifications importantes de leurs propriétés physico-chimiques (Goldman *et al* 1998, Herring *et al* 1993). De plus, c'est une méthode coûteuse et nécessitant des installations lourdes et dangereuses.

1.2.2 Techniques utilisant des agents chimiques

Parmi les processus chimiques, on retrouve la stérilisation par oxyde d'éthylène, par ozone et par peroxyde d'hydrogène.

1.2.2.1 L'oxyde d'éthylène ($(\text{CH}_2)_2\text{O}$)

La stérilisation par OEt (Figure 1-3), utilisée depuis une cinquantaine d'années dans les hôpitaux (Chaigneau 1977), est devenue une des principales méthodes de stérilisation de matériaux prothétiques et d'articles médicaux thermo-sensibles. Le cycle de stérilisation est de 3 à 6 heures, pour une concentration d'OEt comprise entre 10 à 20% (80 à 90% de CO_2), une température de 38 °C à 54 °C et une humidité de 40 à 50%.

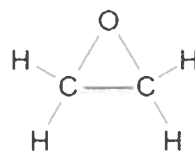


Figure 1-3. Forme développée de la molécule d'oxyde d'éthylène.

Son mécanisme d'action consiste en l'estérification des groupements carboxyles des protéines cellulaires ainsi que l'alkylation des acides aminés et nucléiques ($\text{H-X} \rightarrow \text{R-X}$ l'élément hydrogène est transformé en un groupement R, généralement de type CH_2) (Prescott *et al* 1995). C'est une technique efficace et peu dégradante pour les matériaux traités. Cependant, l'oxyde d'éthylène est un gaz toxique et inflammable. De plus, du fait de sa forte adsorption sur les surfaces, notamment polymères, il est nécessaire de procéder à de

longues périodes d'aération (11 à 30 heures). En effet, des propriétés cancérigènes, mutagènes, peuvent se manifester si le DM ainsi stérilisé entre en contact avec les tissus du patient, avec un taux donné d'OEt et de ses dérivés adsorbés.

1.2.2.2 L'ozone (stérilisateur TSO3®)

Les propriétés stérilisantes de l'ozone (Figure 1-4) sont connues depuis longtemps, mais ce n'est qu'en 2002 qu'est apparu sur le marché le premier stérilisateur à l'ozone commercialisé par la société québécoise TSO3®. Son cycle de stérilisation est d'environ 4 heures et sa température d'utilisation d'environ 36 °C. Les mécanismes impliqués dans l'inactivation de micro-organismes par ozone ne sont que partiellement connus (Youg et Setlow 2004); cependant, il se dégage un consensus sur les cibles d'oxydation les plus probables : i) lipides des membranes par la formation de peroxyde d'acide gras insaturés ; ii) protéines, par l'oxydation de certains amino-acides (formation de 2-oxohistidine). Selon certains auteurs (Loshon *et al* 2001, Genest *et al* 2002), le mécanisme d'action consisterait en l'oxydation de la membrane interne des micro-organismes traités, de multiples oxydations provoquant une fragilisation (destruction) de la membrane, empêchant la spore de germer par la suite.

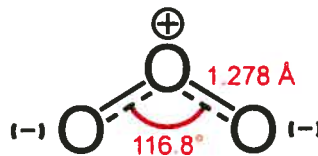


Figure 1-4. Forme développée de la molécule d'ozone.

1.2.2.3 Le peroxyde d'hydrogène H₂-O₂ (stérilisateur Sterrad®)

La société Johnson & Johnson a récemment mis au point un stérilisateur employant une phase "plasma". Il est cependant important de remarquer que le plasma, utilisé en fin de cycle, ne sert qu'à mettre fin à l'action oxydante de H₂O₂ (Krebs *et al* 1998). Le cycle de stérilisation est d'environ 75 minutes à une température d'environ 55 °C. Le mécanisme d'action du H₂O₂ serait identique à celui de l'ozone (Khadre et Yousef 2001). L'utilisation du Sterrad® n'est pas recommandée pour le traitement de polymères hydrophiles et de certains matériaux métalliques.

1.2.3 Caractéristiques des stérilisateurs conventionnels et du stérilisateur idéal

Nous résumons ici les caractéristiques des différents stérilisateurs passés en revue puis nous présentons les caractéristiques d'un stérilisateur idéal.

1.2.3.1 Stérilisateurs conventionnels

Le Tableau 1-2 présente un résumé des caractéristiques des stérilisateurs passés en revue dans la section précédente. Nous constatons ainsi qu'il n'existe pas sur le marché de méthode idéale de stérilisation permettant de relever l'ensemble des défis énumérés dans l'introduction générale.

Technique	Date	Avantages	Inconvénients
Autoclave	1884	Peu coûteux Efficace Cycle "prion" possible	Température élevée Humidité élevée
Chaleur sèche	1880	Peu coûteux Non corrosif	Température élevée Efficacité variable
Irradiation gamma	≈ 1970	Basse température Efficace	Modifications volumiques et surfaciques des polymères. Coûteux
OEt	1949	Basse température Efficace	Toxique Cancérigène Longue période d'aération
Ozone	2005	Basse température Efficace	Longue Durée de cycle (4 h) Érosion importante
H ₂ O ₂	2002	Basse température	Non recommandé pour le traitement de polymères hydrophiles et de certains matériaux métalliques.

Tableau 1-2 Avantages et inconvénients des techniques traditionnelles de stérilisation.

1.2.3.2 Stérilisateur idéal

Un stérilisateur idéal devrait pouvoir répondre aux critères explicités dans le tableau ci-dessous :

Température	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Basse température (inférieure à 60°C)
Efficacité	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Capacité de détruire tout micro-organisme, biofilms et prions
Sécurité	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Non toxique pour l'environnement, le personnel et les patients (absence de résidus toxiques ou irritants)
Rapidité	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Cycle rapide (temps total de traitement souhaité \leq 1 heure)
Fonctionnalité	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Large éventail d'utilisation (type de matériaux, taille et géométrie des instruments) ▪ Facilité d'utilisation ▪ Système d'emballage des instruments à traiter disponible
Contrôle	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Indicateurs (biologiques, physiques ou chimiques)
Maîtrise du procédé	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Connaissance du mécanisme et de la cinétique d'inactivation ▪ Absence de dommages aux matériaux

Tableau 1-3 Caractéristiques d'un stérilisateur idéal (d'après Rutala et Weber 1996).

La stérilisation par plasma, du fait de sa polyvalence et de son adaptabilité, pourrait à terme répondre à une grande partie de ces exigences.

1.3 La stérilisation par plasma

La stérilisation par plasma peut être définie comme l'inactivation de micro-organismes, à l'aide d'espèces actives créées par le passage d'un gaz, n'ayant par lui-même aucune action bactéricide (par exemple N₂, O₂), dans un champ électrique suffisamment intense pour en faire un gaz ionisé (Moisan *et al* 2002).

Dans cette section, nous allons brièvement définir ce qu'est un plasma; discuter des différentes configurations (décharges et post-décharges) pouvant être utilisées en stérilisation; introduire le concept de fluence relié à l'inactivation de micro-organismes par

radiations UV; et finalement, décrire les interactions phase solide/phase gazeuse pouvant se produire lors de l'introduction de matériaux dans une décharge / post-décharge.

1.3.1 Le plasma

1.3.1.1 Définition

Le plasma est défini comme le quatrième état de la matière, par ordre croissant d'énergie, après les états solide, liquide et gazeux. Formé d'ions et d'électrons, particules libres électriquement chargées, il est électriquement neutre. Les plasmas produits en laboratoire, généralement par claquage d'un gaz à l'aide d'un champ électrique, soit constant, soit alternatif (de quelques hertz à quelques GHz) (Moisan et Zarkrewski 1991), devraient être définis comme gaz ionisés. Ils sont, en effet, constitués d'ions et d'électrons, mais aussi d'espèces neutres atomiques (moléculaires) excitées ou non, créées lors des nombreuses réactions parmi lesquelles on retrouve les réactions d'excitation (ou ionisation) par impact électronique, les transferts d'énergie, entre autres, vibrationnels et rotationnels et les désexcitations radiatives. La Figure 1-5 présente le schéma de l'excitation d'une molécule d'azote par collision électronique, suivie de sa désexcitation vers un niveau inférieur par émission d'un photon.

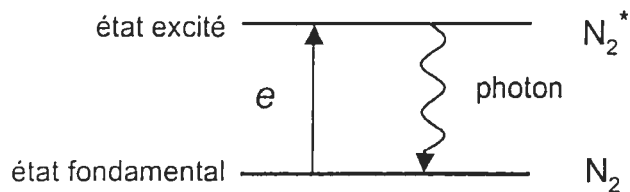


Figure 1-5. Représentation schématique de l'excitation d'une molécule d'azote par collision électronique, suivie de sa désexcitation vers un niveau inférieur par émission d'un photon (Moisan *et al* 2002).

Dans le cas de la stérilisation par plasma, le plasma utilisé est dit froid du fait de la température de ses espèces lourdes (neutres et ions), généralement de 100 à 1000 fois plus faible, comparée à la température des électrons. Par exemple, dans les décharges produites à des pressions de quelques torr, les électrons ont des températures de quelques électron-volt ($1 \text{ eV} = 11600 \text{ K}$) alors que les espèces lourdes possèdent des températures proches de 300 K.

1.3.1.2 Décharge et post-décharge

Outre le choix de la source de plasma (continue ou périodique), de la pression de travail (de quelques mtorr à la pression atmosphérique) et de la nature des gaz utilisés, deux types de configuration sont rencontrés en stérilisation : i) stérilisation en décharge lorsque les micro-organismes se trouvent en contact direct avec le plasma; ii) stérilisation en post-décharge lorsque les micro-organismes sont en contact avec les effluents du plasma, transportés par le flux gazeux dans une zone sans champ électrique. Ces deux configurations possèdent chacune des avantages et des inconvénients. La stérilisation en contact direct nécessite l'utilisation de décharges soit à faible densité électronique, soit en mode impulsionnel ou encore à très faible pression afin de limiter la température des espèces lourdes du plasma au plus à 60°C. Elle a comme avantage de permettre des temps d'inactivation très courts (~min), mais la présence d'ions peut causer des dommages importants aux matériaux, et le champ électrique présent dans la décharge peut provoquer l'échauffement des objets non diélectriques. De plus, la production de plasmas atteignant un grand volume utile peut poser des problèmes, surtout pour les pressions élevées. La stérilisation en post-décharge, dont une configuration possible (utilisée au chapitre 4) est schématisée en Figure 1-6, permet de s'affranchir des problèmes causés par la présence d'espèces chargées et du champ électrique. Elle a aussi comme avantage de permettre la production de systèmes de stérilisation de grands volumes utiles, en particulier à basse pression. Cependant, elle a comme inconvénient d'imposer des temps de stérilisation beaucoup plus longs que dans le cas de la stérilisation en contact direct (plusieurs dizaines de minutes).

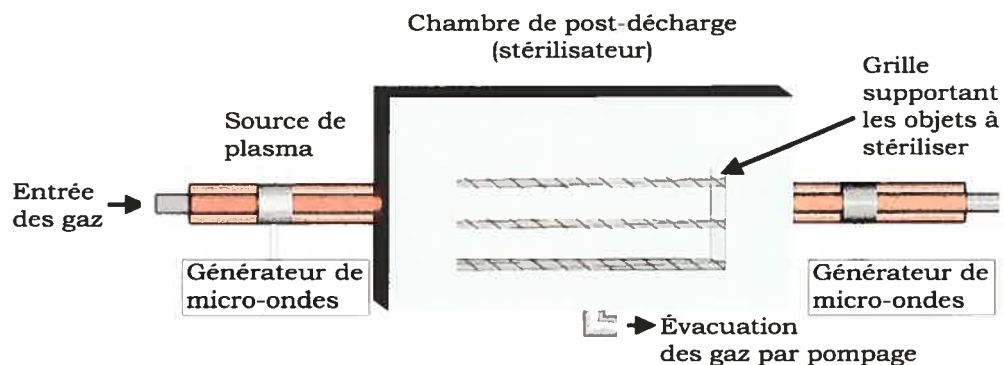


Figure 1-6. Représentation schématique d'un système de stérilisation en post-décharge, mis au point dans le laboratoire du groupe de physique des plasmas (Université de Montréal).

1.3.2 Mécanismes d'inactivation UV-induits

Dans cette section, nous allons nous pencher sur l'inactivation de micro-organismes par irradiation UV, en nous intéressant tout d'abord aux dommages induits par les photons UV, puis aux concepts de fluence et d'effet d'ombrage.

1.3.2.1 Destruction par les UV

La gamme de longueurs d'onde des radiations UV s'étend de 10 nm à 380 nm. Elle est généralement subdivisée par les physiciens en deux grandes plages: ultraviolet du vide (UUV), s'étendant de 10 nm à 190 nm (absorbés par l'air et l'eau), et le rayonnement UV s'étendant de 190 nm à 380 nm. Les photo-biologistes, quant à eux, distinguent trois zones : les UV-A, UV-B et le UV-C, tel que présenté à la Figure 1-7.

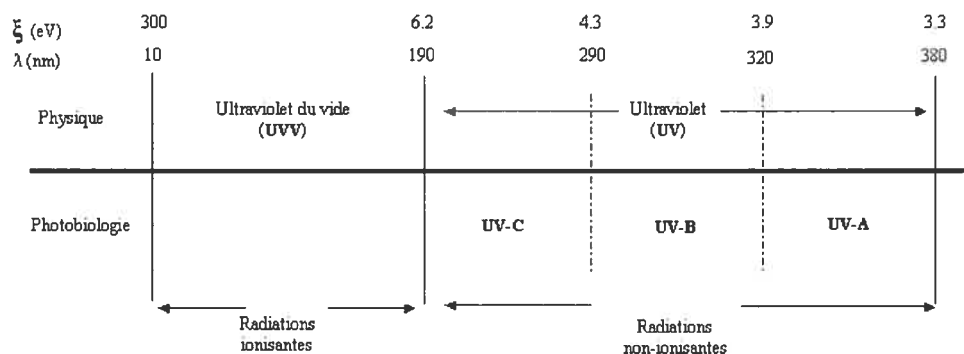


Figure 1-7. Spectre UV selon les physiciens et les photo-biologistes, les physiciens distinguant principalement les UV et les UUV, les photo-biologistes les UV-A, UV-B et UV-C.

L'effet germicide des UV est connu depuis le début du siècle dernier, leur cible principale étant le matériel génétique (ADN) du micro-organisme. Différentes lésions sont induites lors de l'interaction des photons UV avec l'ADN. Ainsi, pour les bactéries végétatives, les lésions induites consistent principalement en la formation de dimères entre les bases pyrimidiques adjacentes de l'ADN et principalement entre les thymines (noté T-T) tel que présenté à la Figure 1-8.

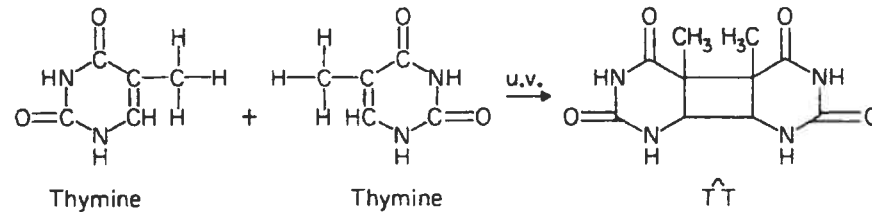


Figure 1-8. Schéma du mécanisme de formation de dimères thymines T-T provoqué par irradiation UV.

Dans le cas des spores, le photo-produit T-T est aussi généré mais en plus faible quantité, tandis que le photo-produit majoritaire est le 5-thyminyl-5,6-dihydrothymine (Figure 1-9). Deux facteurs possibles peuvent expliquer la production de ce nouveau photo-produit : i) la déshydratation du "cœur" de la spore qui provoque un changement de conformation de l'ADN (Setlow 2001); ii) la présence de protéines SASP (synthétisées durant la sporulation) qui recouvrent l'ADN.

Finalement, un autre effet possible des photons UV sur l'ADN est celui d'induire des cassures sur l'un (ou les deux) brins. Il est à noter que, du fait des mécanismes de réparation de l'ADN, un nombre suffisant de lésions irréversibles (800 à 1000 selon Tyrrell (1978) pour une bactérie végétative) est nécessaire pour induire la mort du micro-organisme.

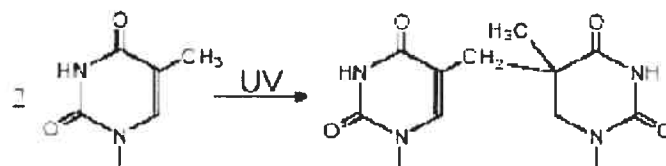


Figure 1-9. Formation d'un photoproduit de spores (SP) à partir de bases de type thymine.

L'efficacité de l'effet germicide des UV sur les micro-organismes dépend fortement de la gamme de longueur d'onde. Cet effet peut être expliqué à l'aide de la Figure 1-10 qui présente un spectre d'efficacité d'inactivation pour des spores *B. atrophaeus*, superposé au spectre d'absorption de l'ADN, en fonction de la longueur d'onde. Nous remarquons que les spectres d'absorption de l'ADN et les taux d'inactivation présentent des évolutions

comparables⁴ (bien que décalées) entre 220 et 300 nm, ce qui appuie l'hypothèse que l'ADN est bien la cible privilégiée des UV. Nous remarquons aussi que deux zones de faible inactivation des spores à 90 nm et 190 nm correspondent paradoxalement à deux zones d'absorption importante de l'ADN. Ce paradoxe peut s'expliquer, en partie, par la présence des protéines SASP qui recouvrent la chaîne d'ADN comme nous l'avons mentionné plus haut. En effet, ces protéines absorbent les UV de faible longueur d'onde, comme nous pouvons voir en partie à la Figure 1-11, qui compare les coefficients d'absorption relatifs de l'ADN et des protéines en fonction de la longueur d'onde ($\lambda > 180$ nm). Une autre explication est que plus les longueurs d'onde des photons sont faibles et moins celles-ci parviennent à pénétrer à l'intérieur des spores. Le coefficient d'absorption dépend de l'énergie du photon.

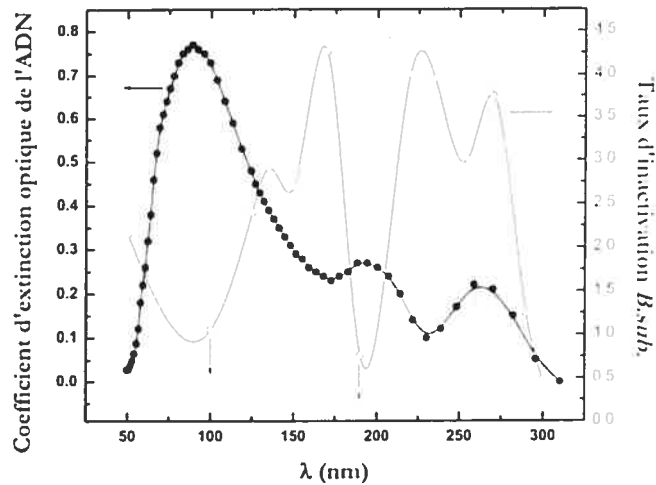


Figure 1-10. Spectre d'action de spores *B. atrophaeus* (Munakata *et al* 1991) et spectre d'absorption de l'ADN isolé (Inagaki *et al* 1974) en fonction de la longueur d'onde.

⁴ Il est important de noter que la résolution du spectre d'inactivation de Munaka *et al* (1991) est assez faible, ce qui limite la portée de cette interprétation.

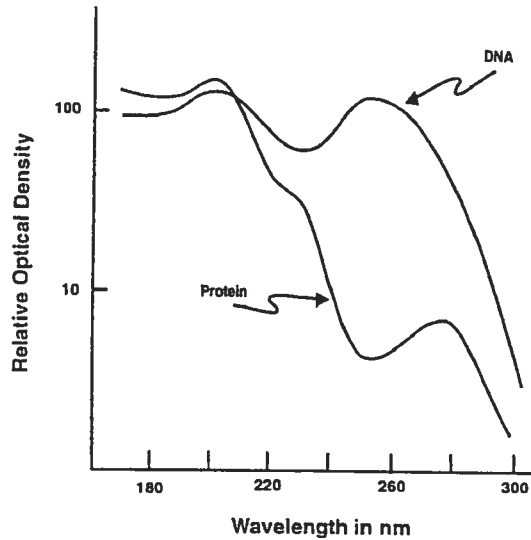


Figure 1-11. Comparaison des coefficients relatifs d'absorption de l'ADN et des protéines en fonction de la longueur d'onde (Coohill 2002).

Nous avons introduit plus haut la notion de nombre minimum de lésions permettant d'inactiver une spore, ainsi que la notion de flux de photons atteignant l'ADN du micro-organisme. Ces deux notions peuvent être reliées à l'aide du concept de fluence que nous allons aborder plus en détail.

1.3.2.1.1 Notions de flux et de fluence

Soit $\varphi(x)$ le flux de photons pénétrant à une distance x dans la matière, nous pouvons écrire:

$$\varphi(x) = \varphi(0) \exp(-k_A x), \quad (1.4)$$

où k_A , le coefficient d'absorption du milieu, dépend de la longueur d'onde et $\varphi(0)$ est le flux de photons à la surface des spores. La fluence qui représente la quantité de photons qui atteint la cible située à une distance d dans la matière pendant un laps de temps t est donnée par :

$$\Phi(d) = \varphi(d)t = \varphi(0) \exp(-k_A d)t. \quad (1.5)$$

Nous remarquons d'après cette équation que pour un flux de photons faible, un temps d'inactivation t plus important sera nécessaire pour atteindre la même dose. Ainsi, si un nombre minimum de lésions est nécessaire afin d'inactiver une spore, une dose d'UV minimum sera nécessaire pour inactiver cette même spore. Cet effet, rapporté pour de très nombreux cas dans la littérature scientifique, a été observé (Moisan *et al* 2003) lors de l'inactivation de spores *B. atrophaeus* par une lampe germicide de mercure (basse pression, 254 nm) en utilisant différents filtres permettant de faire varier le flux $\varphi(0)$ atteignant les spores (Figure 1-12). Nous remarquons que si le flux $\varphi(0)$ est trop faible (cas à 11% et à 37% d'intensité UV nominale), un épaulement (D_0 très grand) apparaît avant que l'inactivation ne commence. Celui-ci indique qu'une faible fraction des spores est inactivée de fait. De plus, nous remarquons que moins $\varphi(0)$ est élevé et plus le temps D_1 est important. Ceci montre bien que plus le flux de photons UV est faible, plus le temps pour obtenir l'inactivation d'un nombre donné de spores est important, en accord avec le concept de fluence ou de dose.

Des évolutions comparables des temps d'inactivation et du flux $\varphi(0)$ ont aussi été observées par Rice et Ewell (2001) lors de l'utilisation d'un laser excimère impulsionnel émettant à 248 nm et d'une lampe germicide basse pression émettant à 254 nm dans le traitement des spores *B. atrophaeus*. Les irradiances du laser utilisées dans cette expérience sont de $2,5 \cdot 10^9$ et $1,8 \cdot 10^{10}$ W/m² de puissance par impulsion (crête), tandis que celle de la lampe est de 90 W/m² (continue). Ainsi, tandis qu'il faut 3 heures à la lampe pour délivrer une fluence de 10 J/m², il ne faut que 40 s au laser pour accumuler la même fluence lorsqu'il fonctionne à 10 Hz. Les résultats obtenus sont présentés à la Figure 1-13 qui montre les taux d'inactivation des spores en fonction de la fluence utilisée. On observe que le facteur déterminant pour inactiver les spores n'est pas le flux, mais le nombre total de photons reçus pendant un temps t , c'est-à-dire la fluence (cumulée). En effet, il y a une quasi superposition des points expérimentaux obtenus séparément dans chaque cas considéré. Les écarts observés (surtout pour la 2ième phase) peuvent être dus au fait que les longueurs d'onde utilisées ne sont pas identiques ou tout simplement à la dispersion des points.

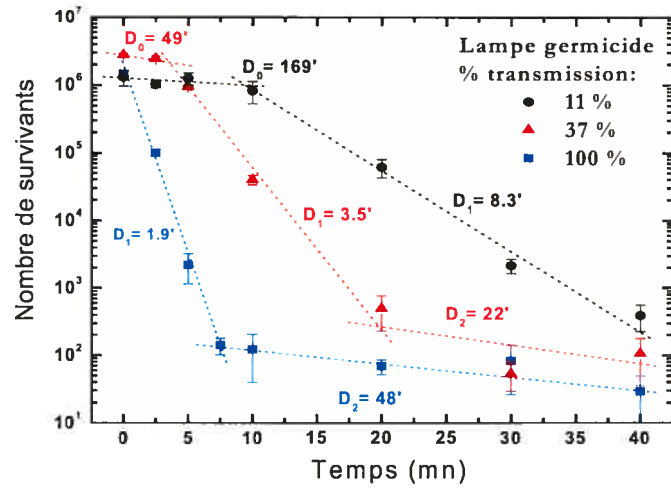


Figure 1-12. Courbes de survie de 10^6 spores *B. atrophaeus* exposées à une lampe germicide à mercure (basse pression, 254 nm) avec, le cas échéant, des filtres absorbants pour réduire l'intensité (Moisan *et al* 2003).

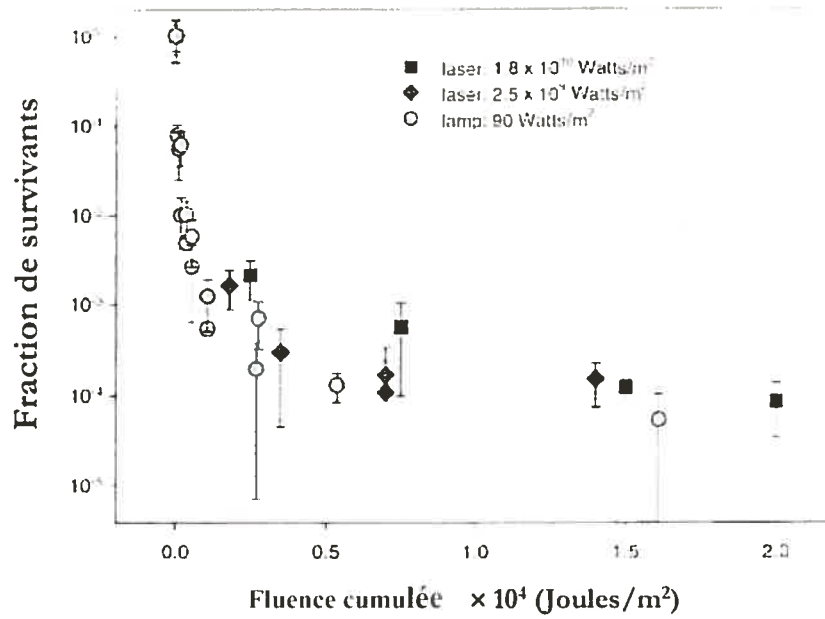


Figure 1-13. Fraction de survivants de spores *B. subtilis*, en fonction de la fluence reçue, pour 3 conditions de flux différents $1,8 \times 10^{10}$ Watts/m² (crête), $2,5 \times 10^9$ Watts/m² (crête), et 90 Watts/m² (continu) (Rice et Ewell 2001).

1.3.2.1.2 Effet d'ombrage

Nous avons vu précédemment que pour inactiver une spore, une dose Φ était nécessaire; pour inactiver \mathcal{N} spores, une dose $\mathcal{N} \cdot \Phi$ sera nécessaire. Ce concept de fluence s'avère utile pour expliquer l'apparition de phases multiples dans les courbes d'inactivation. Nous remarquons à la Figure 1-12 que même lorsque le flux de photons est suffisant pour éliminer le temps de latence, caractérisé par D_0 , une deuxième phase caractérisée par D_2 peut être observée. Celle-ci est due au phénomène d'ombrage provoqué par l'empilement de spores. La Figure 1-14 présente des micrographies, prises avec un microscope électronique à balayage (MEB), d'un dépôt de spores après séchage semblable à ceux utilisés par nous afin d'obtenir les courbes de survie (exemple la Figure 1-12). Ces micrographies montrent que l'empilement de spores se forme en particulier à la périphérie du dépôt.

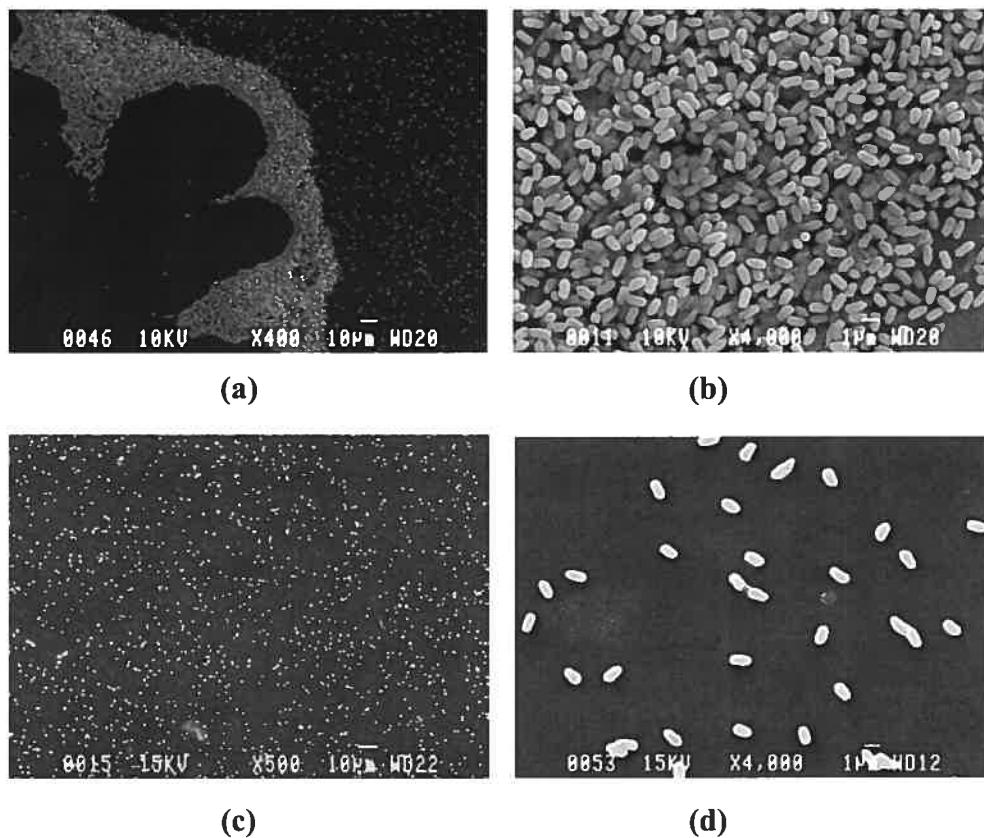


Figure 1-14. Micrographies au MEB d'un dépôt de spores après séchage. Zone en périphérie du dépôt sur le Petri: a) vue d'ensemble et b) agrandissement montrant des spores empilées. Spores au centre du dépôt : c) vue d'ensemble et d) agrandissement montrant des spores isolées (Crevier 2003).

L'apparition d'une deuxième phase, caractérisée par une cinétique d'inactivation plus lente, peut être expliquée par l'existence de ces empilements. En effet, nous savons que la fluence reçue par le noyau d'une spore décroît en $\exp(-kx)$ (où x représente la distance que le photon a à traverser avant d'atteindre l'ADN). Ainsi, les spores recouvertes par d'autres spores (empilement) recevront une fluence moindre (effet d'ombrage) par rapport aux spores isolées; elles nécessiteront donc un temps d'exposition plus important que les spores isolées pour obtenir la même dose de photons UV, d'où l'allongement du temps D_2 .

1.3.3 Interaction phase solide / phase gazeuse

Afin de comprendre et d'ainsi contrôler les effets des espèces réactives du plasma sur les micro-organismes et les matériaux traités, il est nécessaire de se pencher sur les interactions se produisant à l'interface phase gazeuse / phase solide.

1.3.3.1 Caractéristiques des surfaces

Selon Kim et Boudard (1991) une surface peut être décrite comme un ensemble de sites caractérisés par leur énergie de liaison. Les sites possédant une faible énergie (de type van der Waals, environ 0,5 eV) sont appelés sites de physisorption, et permettent une attraction réversible des atomes de la phase gazeuse. Les sites d'énergie élevée sont appelés sites de chimisorption et permettent de créer des liaisons fortes (de type covalent < 10 eV) entre la surface et un atome de la phase gazeuse. La Figure 1-15 présente un schéma simplifié des deux types d'interaction pouvant avoir lieu entre une particule de la phase gazeuse et les deux types de sites de la surface.

1.3.3.2 Réactions phase solide /phase gazeuse

Différents types de processus peuvent se produire au niveau de cette interface (Figure 1-16). Parmi ceux-ci, on retrouve *les processus primaires* suivants:

- *réflexion élastique* lorsqu'un atome de la phase gazeuse entre en collision avec la surface et se réfléchit sans interaction ;
- *physisorption* lorsqu'un atome de la phase gazeuse entre en collision avec la surface et interagit avec un site de physisorption avec lequel il se lie faiblement (Figure 1-15);

- *chimisorption* lorsqu'un atome de la phase gazeuse entre en collision avec la surface et interagit avec un site de chimisorption avec lequel il se lie fortement (Figure 1-15);
- *diffusion* lorsqu'un atome physisorbé se déplace sur la surface ;
- *passage en solution* lorsqu'un atome diffuse en volume.

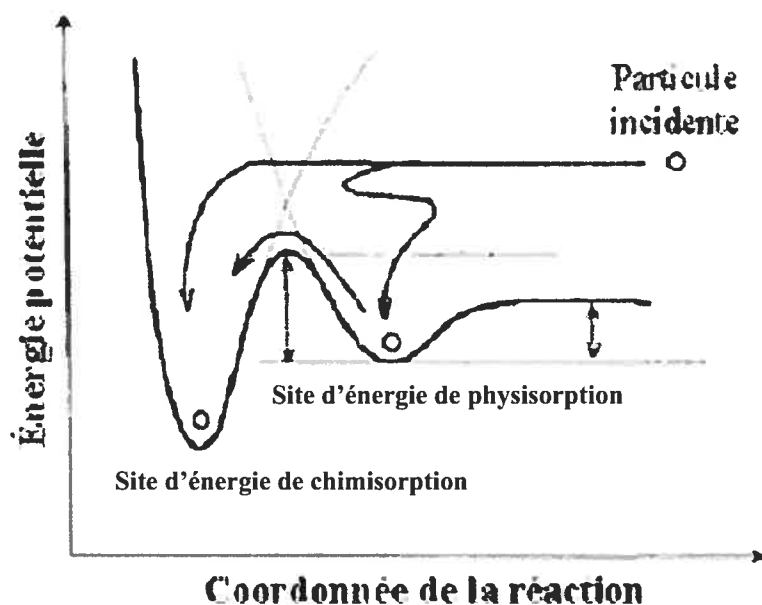


Figure 1-15. Schéma simplifié des réactions de physisorption et de chimisorption (adapté de Sullivan 1993).

Ces différents processus primaires peuvent donner naissance à deux principaux mécanismes qui mettent alors en jeu les atomes (molécules) préalablement chimisorbés :

- *catalyse hétérogène* : lorsque le produit de la réaction est constitué de deux atomes (molécules) de la phase gazeuse dont un était préalablement chimisorbé. Un exemple typique en est la recombinaison en surface, réaction exothermique responsable de l'échauffement des matériaux ;
- *réaction chimique de surface* : lorsque le produit de la réaction est formé d'un atome de la phase gazeuse préalablement chimisorbé et d'un atome de la phase solide ; c'est le cas de l'*oxydation de surface* et de la *gravure chimique*.

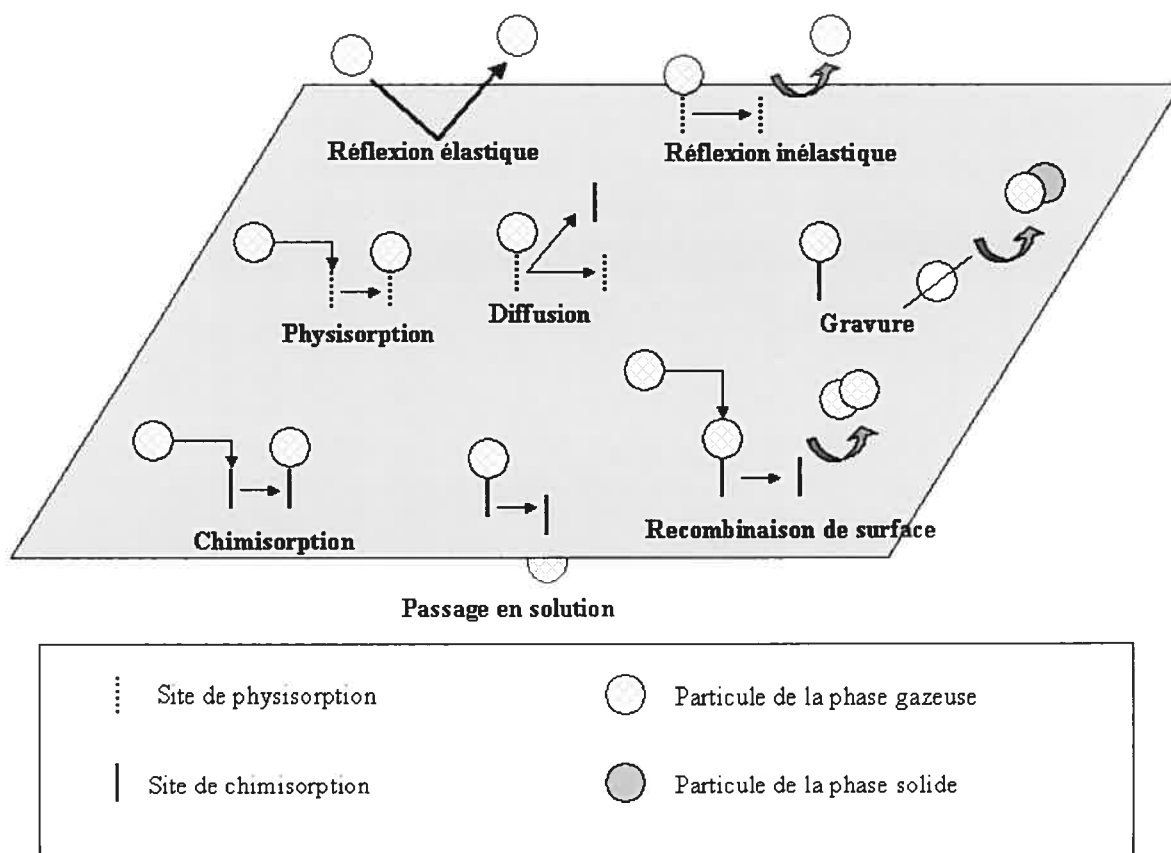


Figure 1-16 Représentation de différents processus pouvant avoir lieu à l'interface phase solide / phase gazeuse.

1.3.3.3 Interaction radicaux/polymères

L'approche consistant à mettre en parallèle les interactions plasma/micro-organismes et plasma/polymères a fait l'objet d'un travail original de Pelletier (1993) dans le domaine de la stérilisation par plasma. Cette approche est justifiable du fait que les micro-organismes sont formés de chaînes carbonées, d'azote, d'oxygène et de phosphore, et peuvent donc en première approximation être considérés comme des polymères. Ainsi, en étudiant les mécanismes se produisant à l'interface plasma/polymère, il est possible d'extrapoler et de comprendre ceux qui se produisent dans le cas de micro-organismes. Cette approche pourrait s'avérer valide pour le cas des plasmas où les radicaux sont l'espèce active principale; cependant, elle ne peut s'appliquer directement à notre cas puisque notre procédé fait plutôt appel à l'action prédominante des photons UV, les radicaux ne jouant qu'un rôle secondaire. Nous allons aborder ce type d'interaction, c'est-à-dire radicaux/surface, du fait de la présence d'une concentration non négligeable d'oxygène atomique en post-décharge

(10^{14} atomes/cm³), même dans les conditions optimales d'émission UV, et donc d'une érosion concomitante.

Oxydation. Les oxydations en surface des polymères se traduisent, entre autres, par la formation de groupements carbonyles (C=O), de groupements hydroxyles (OH) ainsi que de réticulations:



La Figure 1-17 présente un exemple d'oxydation de surface du polyéthylène (PET) par un plasma d'oxygène.

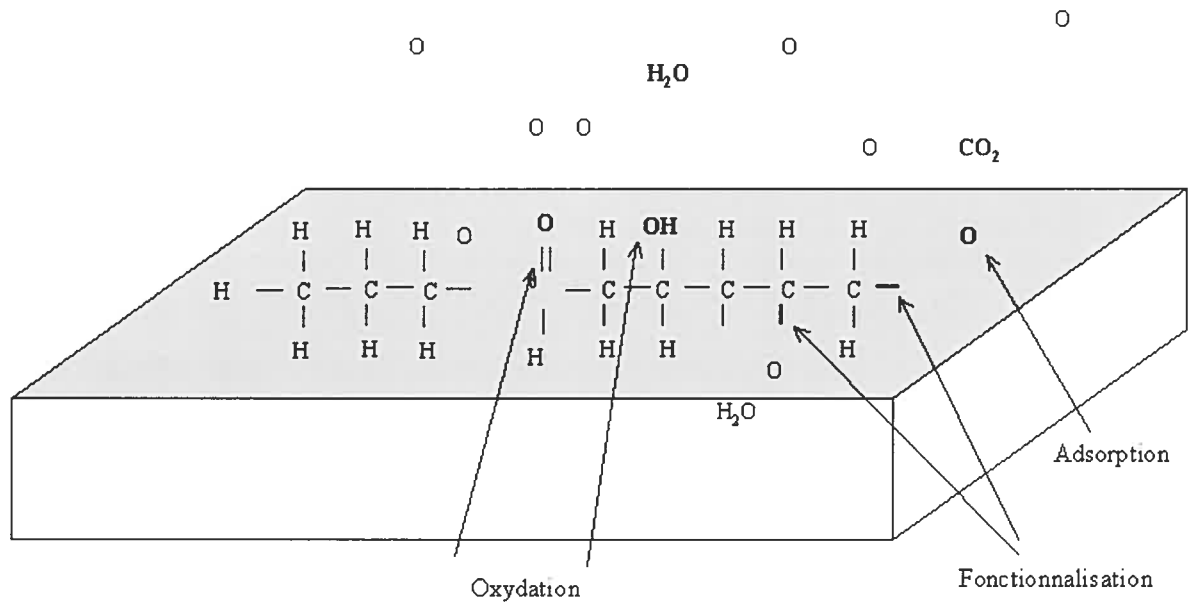


Figure 1-17 Schéma simplifié de l'oxydation et de la gravure d'une surface de polyéthylène par un plasma d'oxygène (Crevier 2003)

Phénomène d'érosion. Lorsque l'oxydation s'accompagne de la désorption du produit formé, on parle alors de gravure chimique. La cinétique de la gravure chimique peut s'écrire (Whitaker et Jang 1993) sous la forme suivante :

$$\frac{1}{A} \frac{dm}{dt} = \frac{\delta m}{\delta \varepsilon} \times \frac{n_v V_0}{4} \times H e^{-E_a / RT} \quad (1.8)$$

où A est la surface considérée, $\frac{dm}{dt}$ le taux de perte de matière, $\frac{\delta m}{\delta \varepsilon}$ la perte de matière par événement, V_0 la vitesse du radical considéré, n_v le nombre de radicaux par unité de volume, H une constante, E_a l'énergie d'activation de la réaction, R la constante des gaz parfaits et T la température de la surface.

On voit d'après l'équation 1.8 que la vitesse de gravure dépend de la concentration de l'oxydant mais aussi des propriétés de la couche gravée, par la prise en compte notamment de l'énergie d'activation de la surface considérée.

1.3.3.4 Le cas des spores *B. atrophaeus*

Cet effet des propriétés du matériau gravé a été étudié sur des spores *B. atrophaeus* et des microsphères de polystyrène traitées dans une post-décharge de N_2 -10% O_2 (Crevier 2003). La Figure 1-18 présente les résultats obtenus. On observe que dans le cas des microsphères, l'érosion est linéaire, alors que dans le cas des spores, trois phases de gravure sont présentes. La première et la troisième phase sont caractérisées par des taux de gravure beaucoup plus faibles que dans la seconde phase. Ces vitesses d'érosion peuvent être reliées aux propriétés des différentes couches de la spore. Ainsi, le Tableau 1-4 fait correspondre les vitesses de gravure des spores *B. atrophaeus*, traitées à l'aide d'une post-décharge N_2 -10% O_2 , aux différentes couches formant le manteau de la spore. Les taux de gravure faibles correspondent à la tunique externe (couche dense) et à la membrane interne qui est formée de peptidoglycanes, "biopolymères" fortement réticulés.

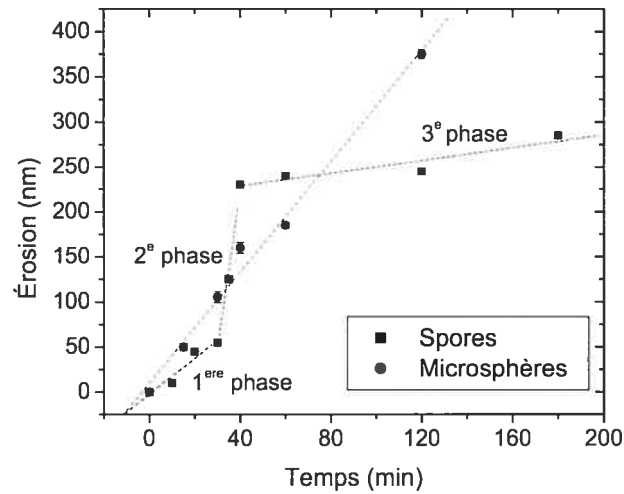


Figure 1-18 Comparaison des cinétiques de gravure de spores *B. atrophaeus* et de microsphères en polystyrène (PS) en fonction du temps, dans une post-décharge de N_2O_2 (10% de O_2) (Crevier 2002).

Phase	Temps (min)	Épaisseur érodée (nm)	Taux d'érosion (nm/min)	Couches composants les spores	Épaisseur nm
1	0 – 30	55	2	Tunique externe	40-90
2	30 – 40	105 – 175	10,5 – 17,5	Tunique interne	20-40
				Cortex	80- 150
3	40 et +	40 et +	0,2	Membrane interne	≈ 10

Tableau 1-4 Tableau faisant correspondre les vitesses de gravure des spores *B. atrophaeus*, traitées à l'aide d'une post-décharge N_2O_2 (10% O_2), aux différentes couches formant le manteau de la spore (Crevier 2003).

1.4 Conclusion

Dans ce qui précède, nous avons vu qu'il n'existe pas de technique de stérilisation universelle qui permette de traiter tous les DM existants, de nature (polymères, métaux, etc.), et de fonctionnalité (cathéters, scalpels,...) différentes. En effet, il est apparu que chaque méthode conventionnelle de stérilisation présente des limitations inhérentes au type et aux caractéristiques de l'agent stérilisant (p.ex., polymères pour chaleur humide et irradiation gamma). Dans ce contexte, la stérilisation par plasma pourrait se révéler être une

méthode d'avenir dotée d'intéressantes caractéristiques (opération à faible température, versatilité de traitement) et ce du fait qu'elle peut faire appel concomitamment à deux types d'espèces actives très distinctes que sont les UV et les radicaux. À cet effet, nous avons vu que les UV ont pour cible privilégiée l'ADN auquel ils infligent un certain nombre de lésions irréversibles qui peuvent, lorsqu'ils atteignent un nombre suffisant, devenir létales; d'autre part, les radicaux peuvent selon les cas être à l'origine de l'inactivation ou générer un phénomène de gravure qui peut être dommageable pour les matériaux traités. Le contrôle de ces différents processus et leur utilisation dans la stérilisation nécessitent une caractérisation approfondie du plasma (espèces actives, leurs densités respectives, etc.). Nous avons vu aussi que la méthode plasma peut être mise en œuvre selon différentes configurations (pression atmosphérique, pression réduite, décharge, post-décharge) dans lesquels les mécanismes d'inactivation en jeu peuvent être en partie contrôlés par l'opérateur. Nous aurons l'occasion d'illustrer ces différentes caractéristiques dans les prochains chapitres : ainsi le chapitre 2 traitera du cas de la stérilisation à la PA tandis que les chapitres 3 et 4 seront consacrés à la caractérisation du plasma de post-décharge à pression réduite, et son utilisation pour l'inactivation de micro-organismes.

Références

- Block S S 2002** Disinfection, sterilization and preservation *Block* (5^{ième} édition), *Lea & Febiger (Ed), Philadelphia.*
- Chaigneau M 1977** *Stérilisation et désinfection par les gaz, Maisonneuve editeur, Moulins-les-Metz, France 343.*
- Coohill T P 2002** Uses and effects of ultraviolet radiation on cells and tissues chapitre 4 *Waynant RW, eds. Lasers in Medicine. London: CRC Press.*
- Crevier M C, Moisan M, Yahia L, Saoudi B 2002** Cold plasma effects on spores and polymers. *Proc. of the International symposium on advanced materials for biomedical applications (SAMBA) (Montréal, Québec) 365-374.*
- Crevier M C 2003** Effets de la stérilisation par plasma N₂-O₂ en post-décharge sur des spores de *B. subtilis* et surfaces de biopolymères. *Mémoire de maîtrise, Université de Montréal.*
- Driks A 1999** *Bacillus subtilis* spore coat. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63** 1-20.
- Genest P C, Setlow B, Melly M, Setlow P 2002** Killing of spores of *Bacillus subtilis* by peroxyntirite appears to be caused by membrane damage *Microbiology* **148** 307-314.
- Goldman M, Pruitt L 1998** Comparison of the effects of gamma radiation and low temperature hydrogen peroxide gas plasma sterilisation on the molecular structure, fatigue resistance, and wear behaviour of UHMWPE *J. Biomed Mater Res.* **40** 378-384.
- Herring G M, Saylor M C 1993** Sterilisation with radioisotopes *Sterilisation Technologie: A practical guide for manufacturers and users of health care products, R. F. Morrissey & G. Briggs Philips, New York 196-217.*
- Inagaki T, Hamm R N, Arawaka E T, Birkhoff R D 1974** Optical and dielectric properties of DNA in the extreme ultraviolet *J. chem. Phys.* **61** 177-183.
- Khadre M A, Yousef A E 2001** Sporicidal action of ozone and hydrogen peroxide: a comparative study, *International Journal of Food Microbiology* **71** 131-138.
- Kim Y C, Boudard M 1991** Recombination of O, N and H atoms on silica : Kinetics and Mechanism *Langmuir* **7** 2999-3005.

- Krebs MC, Bécasse P, Verjat D, Darbord JC 1998** Gas-plasma sterilization: Relative efficacy of the hydrogen peroxide phase compared with that of the plasma phase. *Int. J. Pharm.* **160** 75–81.
- Loshon C, Melly E, Setlow P 2001** Analysis of the killing of spores of *Bacillus subtilis* by a new disinfectant, Sterilox[®]. *Journal of Applied Microbiology* **91** 1051-1058.
- Moisan M, Zarkrewski Z 1991** Plasma sources based on the propagation of electromagnetic surface waves *J. Phys. D: Appl. Phys.* **24** 1025-1048.
- Moisan M, Barbeau J, Pelletier P, Saoudi B 2002** La stérilisation par plasma froide à pression très inférieure à la pression atmosphérique *Le Vide* **303** 71-84.
- Moisan M, Saoudi B, Crevier M C, Philip N, Fafard E, Barbeau, Pelletier J 2003** Recent development in the application of microwave discharges to the sterilization of medical devices *Proc. 5th Int. Workshop on Microwave Discharges (Zinnowitz, Greifswald, Germany)*
- Moseley B E B 1989** Ionizing irradiation: action and repair *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures ed. Gould, G.W. London: Elsevier Applied Science* 43-70.
- Munakata N, Saito M, Hieda K 1991** Inactivation action spectra of *Bacillus subtilis* spores in extended ultraviolet wavelengths (50-300 nm) obtained with synchrotron radiation *Photochemistry and Photobiology* **54** 761-768.
- Murrell W G 1967** The biochemistry of the bacterial endospore *Adv. Microb. Physio.* **1** 133-251.
- Nicholson W L, Munakata N, Horneck G, Melosh H J, Setlow P 2000** Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64** 548-572.
- Pelletier J 1992** La stérilisation par procédé plasma *Agressologie* **33** 105-110.
- Prescott L, Harley J P, Klein D.A. 1995** Le contrôle des microorganismes par les agents physiques et chimiques *Microbiologie (4^{ième} édition), De Boeck-Université, Bruxelles.*
- Rice J K, Ewell M 2001** Examination of peak power dependence in the UV inactivation of bacterial spores *Applied and Environmental Microbiology* **67** 5830-5832.
- Rutala W A, Weber D J 1996** Low temperature sterilization: do we need to redefine "sterilization"? *Infection Control and Hospital Epidemiology* **17** 87-91.
- Setlow P 1995** Mechanisms for the prevention of damage to DNA in spore of *Bacillus subtilis* species. *Annual Review of Microbiology* **49** 29-54.

Setlow P 2001 Resistance of Spores of Bacillus species to ultraviolet light. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **38** 97-104.

Setlow P 2007 I will survive: DNA protection in bacterial spores. *TRENDS in Microbiology* **15** 172-180.

Sullivan D J D, Flaum H C, Kummel A K, 1993 Precursor and direct activated chemisorption of chlorine molecules onto Si(111) (7×7) and Si(100) (2×1) surfaces *J. Phys. Chem.* **97** 12051-60.

Tyrrell R M 1978 Solar dosimetry with repair deficient bacterial spores: action spectra, photoproduct measurements and comparison with other biological systems *Photochemistry and Photobiology* **27** 571-579.

Chapitre 2

Inactivation de spores bactériennes, en présence ou en absence de photons UV, par un plasma à la pression atmosphérique obtenu avec le même mélange gazeux

(Article publié dans : J. Phys. D :Appl. Phys. 39, 3494 (2006))

Mise en contexte

Les objectifs assignés à cette étude, portant sur l'inactivation de micro-organismes avec une décharge entretenue à la pression atmosphérique (PA), peuvent être répartis en deux volets : i) aspect fondamental : compréhension des mécanismes impliqués dans ce processus de stérilisation à la PA; ii) aspect pratique (applications) : mise en œuvre de la stérilisation par plasma à la PA, du fait de la réduction des coûts et de la commodité de type de configuration. Il est bien évident qu'une mise en œuvre optimale et efficace nécessite une bonne compréhension des processus mis en jeu dans ce procédé.

En ce qui relève de l'aspect mécanistique, les travaux publiés jusqu'ici sur l'inactivation par plasma font état d'une inactivation essentiellement induite par les espèces radicalaires, impliquant divers processus physico-chimiques (voir section 2.2). Très peu d'auteurs suggèrent la possibilité d'une inactivation due aux photons UV; lorsque c'est le cas, les données expérimentales rapportées ne sont pas suffisamment solides pour étayer l'existence d'un tel mécanisme. Dans ce contexte, notre groupe de recherche avait déjà démontré avec force détails que la stérilisation par plasma en post-décharge et à pression réduite peut s'obtenir essentiellement par l'action des photons UV seuls. Sur ce principe de l'inactivation/stérilisation par UV, nous avons mis au point des stérilisateur prototypes (modèles) fonctionnels à pression réduite. De là, nous nous sommes posés la question de savoir si ce principe de stérilisation UV-induite pouvait être étendu au cas de la stérilisation à la PA. Dans ce cas, la mise au point de cette expérimentation nécessite de choisir la source de plasma appropriée, et particulièrement le mélange gazeux qui doit être subtilement dosé (natures des gaz vecteur et oxydant) afin d'obtenir une intensité UV suffisante. Il faut aussi,

le plus possible, minimiser les dommages aux matériaux traités car la mise en contact de ces derniers avec le plasma y induit des altérations importantes ainsi que le montre la littérature scientifique.

Pour le côté applications, l'intérêt d'opérer à la PA est, d'une part, de nous affranchir du système de pompage, et d'autre part, de pouvoir obtenir des temps d'inactivation beaucoup plus courts. En effet, le système de pompage compte pour au moins 20% du coût total de l'installation (stérilisateur à basse pression) et rend moins commode le procédé.

C'est dans cette perspective que nous nous sommes intéressés à ce secteur du domaine de la stérilisation par plasma, et avons pris contact avec l'équipe de Françoise Massines du Laboratoire de Génie Electrique de l'Université Paul Sabatier (Toulouse, France), spécialisée dans la production de plasmas à la PA par le moyen d'un système à barrière diélectrique.

Bacterial spore inactivation by atmospheric-pressure plasmas in the presence or absence of UV photons as obtained with the same gas mixture

M. K. Boudam

Groupe de physique des plasmas, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale
Centre-Ville, Montréal, Québec H3C 3J7

M. Moisan

Groupe de physique des plasmas, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale
Centre-Ville, Montréal, Québec H3C 3J7

B. Saoudi

Groupe de physique des plasmas, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale
Centre-Ville, Montréal, Québec H3C 3J7

C. Popovici

Groupe de physique des plasmas, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale
Centre-Ville, Montréal, Québec H3C 3J7

N. Gherardi

Laboratoire de Génie Electrique de Toulouse, Université Paul Sabatier, 118 route de
Narbonne, 31062 Toulouse Cedex, France

F. Massines

Laboratoire de Génie Electrique de Toulouse, Université Paul Sabatier, 118 route de
Narbonne, 31062 Toulouse Cedex, France

Abstract

This paper comprises two main parts: a review of the literature on atmospheric-pressure discharges used for micro-organism inactivation, focussed on the inactivation mechanisms, and a presentation of our research results showing, in particular, that UV photons can be the dominant species in the inactivation process.

The possibility of achieving spore inactivation through UV radiation using an atmospheric-pressure discharge or its flowing afterglow is the object of a continuing controversy. In fact, the review of the literature that we present shows that a majority of researchers have come to the conclusion that, at atmospheric pressure, chemically reactive species such as free radicals, metastable atoms and molecules always control the inactivation process, while UV photons play only a minor role or no role at all. In contrast, only a few articles suggest or claim that UV photons coming from atmospheric-pressure discharges can, in some cases, inactivate micro-organisms, but the experimental data presented and the supporting arguments brought forward in that respect are relatively incomplete.

Using a dielectric-barrier discharge (DBD) operated at atmospheric pressure in an N_2 - N_2O mixture, we present, for the first time, experiments where microorganisms are subjected to plasma conditions such that, on the one hand, UV radiation is strong or, on the other hand, there is no UV radiation, these two different situations being obtained with the same experimental arrangement, including the same gas mixture, N_2 - N_2O . To achieve maximum UV radiation, the concentration of the oxidant molecule (N_2O) added to N_2 needs to be tuned carefully, resulting then in the fastest inactivation rate. The concentration range of the oxidant molecule in the mixture for which the UV intensity is significant is extremely narrow, a fact that possibly explains why such a mode of plasma sterilization was not readily observed. The survival curves obtained under dominant UV radiation conditions are, as we show, akin to those recorded at reduced pressure. Relatively fast spore inactivation can also be obtained under no UV radiation as a result of radicals diffusing deeply inside the spores, leading to oxidative lethal damage.

2.1 Introduction

So far, the great majority of papers published on the inactivation of micro-organisms by atmospheric-pressure plasmas underlines the dominant role of chemically reactive species, concluding that the contribution of UV radiation to the inactivation process is not important, when not at all irrelevant. As for the articles mentioning the possible role of UV photons, the arguments brought forward are quite often not fully convincing or complete. The experimental results that we have gathered will show that UV photons, under specific operating conditions, can be the dominant inactivation species. We will also examine microorganism inactivation kinetics under no UV radiation condition. To the best of our knowledge, it is the first time that experiments are presented where the microorganisms are subjected to plasma conditions such that, on the one hand, UV radiation is strong or, on the other hand, there is no UV radiation, these two different situations being obtained with the same experimental arrangement, including the same gas mixture, N_2-N_2O , by simply varying the percentage of the oxygen-containing molecule (N_2O) added to N_2 . Taking advantage of the possibility of switching from UV to no UV radiation conditions, with the same experimental arrangement, offers the possibility of promoting one or the other inactivation mechanism by properly choosing the operating conditions; this should help putting an end to the controversy as to whether or not UV radiation from atmospheric-pressure discharges can inactivate micro-organisms.

This paper is comprised of two main parts : a review, centred on the inactivation mechanisms, of the literature on atmospheric-pressure discharges used for micro-organism inactivation and a presentation of our research results. To show the interest of our approach and the importance of the results obtained, it is indeed necessary to provide the reader with a comprehensive picture of the current status of the research work in plasma sterilization at atmospheric pressure.

2.2 Review of the literature on the inactivation mechanisms of microorganisms by atmospheric-pressure plasmas

Before dealing with the review itself, we present a summary of the plasma inactivation mechanisms observed or suggested to date. We also give indications on survival curves, which are used as a means of characterizing the inactivation mechanisms and efficiency. We need to stress, from the start, that the term sterilization is not synonymous with that of inactivation: it should be used when and only when all initial micro-organisms have been inactivated.

2.2.1 Possible inactivation processes

A list of possible inactivation mechanisms by plasma was provided and commented in the review paper by Moisan *et al* (2001), which included: (1) lethal damage to the micro-organism genetic material by UV irradiation, which requires a minimum number, statistically speaking, of lesions to the DNA strand. It is commonly agreed that the UV spectrum domain for efficient spore lethality is below 300 nm; (2) erosion of the micro-organisms, atom by atom, through intrinsic photodesorption. The photon-induced desorption results from UV photons breaking chemical bonds in the micro-organism material, allowing atoms pertaining to the micro-organism to form volatile compounds; (3) erosion of the micro-organisms, atom by atom, through an etching process by reactive species, where species from the gas phase get adsorbed on the micro-organism surface and react with some atoms of it to form a volatile compound. Taking into account more recent works on low-temperature plasma inactivation at atmospheric pressure, we should add to this list the following inactivation mechanisms: (4) the diffusion of oxygen atoms and, more generally, of oxygenated species (e.g. OH) through the spore material with ensuing local damage possibly by oxidation to the cytoplasmic membrane, proteins and DNA material; (5) lysis of the bacterium as a result of the rupture of its membrane due to the electrostatic force exerted on it by accumulation of charged particles coming from the plasma (demonstrated to date only for Gram-negative vegetative bacteria). It is to be noted that synergistical effects involving UV radiation could enhance some of the above processes.

2.2.2 Survival curves as a means of characterizing the inactivation efficiency

Insight into the micro-organism inactivation mechanisms by plasma can be inferred from survival curves, a plot of the logarithm of the number of still living micro-organisms as a function of exposure time to the sterilizing agent. This approach requires analysing such curves obtained under different discharge conditions (density of active species, UV radiation) and micro-biological conditions (type and number of microorganisms). Inactivation by plasma exposure usually yields survival curves with two linear segments (bi-phasic survival curves) whereas with conventional sterilizers such as the autoclave, the survival curve is comprised of a single straight line. The slope of a given linear segment is an indication of the inactivation rate: the steeper it is, the shorter is the inactivation time required to decrease the micro-organism population by a decade; this characteristic time is called the decimal time. Decimal times are noted D_1 and D_2 for the first and second phase respectively, whenever survival curves are bi-phasic.

2.2.3 Review of the literature

Our review considers the great majority of the published works since 1999 that discuss or simply mention the possible inactivation mechanisms of atmospheric-pressure plasmas (papers published before 1999 are reviewed in Moisan *et al* 2001). We report in a concise and precise way the experimental conditions considered by the authors, their inactivation results and their characterization of the gaseous phase (reactive species, UV radiation when present), underlining the inactivation mechanisms mentioned or suggested. The review of some of these articles is accompanied by critical comments from us. Finally, at the end of the whole review, we have added general comments on some specific issues. The topical review that now follows is divided in two parts, according to whether or not UV radiation is considered to participate in the inactivation process:

UV radiation plays some role in the inactivation process.

Trompeter *et al* (2002) operate their dielectric barrier discharge (DBD: see section 2.3.2.1 for an example) in the filamentary mode (non uniform discharge as opposed to the uniform glow in the DBD diffusive mode) achieving a discharge gas temperature slightly above ambient temperature. From the start, they state that direct exposure of spores to such a discharge simultaneously provides the possible following germicidal mechanisms: (1) UV

radiation (including radiation from the vacuum UV (VUV) range); (2) a localized, periodical and short term warming of the germs; (3) the production of (short-lived) chemically reactive radicals. These different mechanisms can interact and synergistical effects could enhance inactivation. *B. subtilis* (now called *B. atrophaeus*) and *A. niger* are used as test spores, which are spread on polyethylene (PET) foils and glass plates at an average density of 20 000 germs/cm² (total of 10⁶ spores on a 7 cm x 7 cm surface), a spore-density deposit approximately 10 times lower than usual (Deng *et al* 2005). The following gases or mixtures of gases are used: Ar, synthetic dry and moistened air, a mixture of O₂ and O₃, N₂ and N₂ with 1% added H₂. They conclude that the action of the argon discharge, which they find to be the most efficient gas in terms of spore inactivation, is purely due to UV radiation since Ar is chemically inactive. In contrast, the oxygen-ozone mixture is the less efficient discharge gas; in this case, the induced inactivation is the result of the high chemical activity of either oxygen radicals or ozone, since it does not emit UV radiation. We observe that the chemical activity of O and O₃ does not lead to inactivation as rapidly as does UV radiation from argon gas. This difference could be attributed to the relatively long penetration time of O and O₃ for lesions to take place within the micro-organism. They mention that increasing the gas temperature (by increasing energy input to the DBD) shortens the inactivation time. Additional experiments are made with (DBD) excimer lamps with the purpose of determining the most efficient UV wavelengths for spore inactivation: the UV source with the shortest wavelength (highest photon energy) appears to have the strongest germicidal effect. However, this interpretation does not consider the possibility that the various UV lamps could have different emission intensities. The observed survival curves are bi-phasic with a D₁ time shorter than D₂. More on this experiment under Heise *et al* (2004) below.

Park *et al* (2003) designed an argon discharge at atmospheric pressure that comes out as a few cm long plasma torch fully confined within a fused silica tube; the gas is entrained at 100 standard liter/min (slm). Filter papers inoculated with bacteria or fungi are subjected to the exiting gas at a non specified distance but such that the substrate temperature reaches 130 °C after 30 seconds. The UV intensity was measured at 254 nm, even though there is no argon-line emission at 254 nm: either impurities are present or there is some argon continuum emission, from Ar₂⁺ for example. An initial load of 10⁷ *B. subtilis* spores is sterilized in 20 s. Scanning electron microscope (SEM) micrographs reveal that

spores are reduced to microscopic debris after the 20 s treatment time. The authors claim that UV radiation is involved in the inactivation of the micro-organisms although, in the end, they conclude that the strong etching process observed (based on the SEM micrographs, it looks to us more like a disruption mechanism) is actually responsible for sterilization. No explanations are given as to the origin of such a strong "erosion" of the spores.

Using the same plasma source as Park *et al* (2003), Lee *et al* (2005), from the same group, treated later on *Escherichia coli* (Gram negative bacterium) and methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* (Gram positive bacterium). As mentioned in the Park *et al* (2003) paper, a relatively high level of UV emission is generated by their microwave argon plasma. Nonetheless, the SEM micrographs presented show, in the case of *E. coli*, punctured, eroded and morphologically transformed bacteria while for *S. aureus*, the bacteria are ruptured with their cellular contents released on the substrate surface. This, according to the authors, demonstrates that a strong etching process is responsible for the observed micro-organism inactivation.

Heise *et al* (2004), from the same group as Trompeter *et al* (2002), subjected spores, in the direct exposure mode, to classical DBDs in argon, nitrogen (unintentionally slightly affected by oxygen impurities) and synthetic air. In their abstract, they claim that the degree of efficiency of spore reduction in these gases can be related to their UV spectrum. To move in that direction, they first compare the survival curves for *B. subtilis* obtained with a DBD in each of these 3 gases, which designates argon as the most efficient gas. Then, comparing the recorded spectra (>200 nm) from the discharges in these 3 gases, they observe, indeed, that the argon discharge has a relatively strong intensity UV line at 308 nm (from ArO*): the presence of the ArO* line is clearly due to contamination. However, because they claim that UV emission at 308 nm is quite inefficient for spore inactivation, they turn to the possibility that a still shorter wavelength UV emission, thus more efficient according to them, could come from the (not recorded) excited dimer Ar₂* (126 nm). In the case of the N₂ discharge, because of the oxygen impurities it contains, the 200-300 nm region spectrum shows NO_γ molecular-band emission from the NO(A) state, and not NO_β from the NO(B) state as claimed by the authors (see Figure 2-1 and also Appendix A). By comparing their spectrum with ours in Figure 2-1, we note that their observed emission intensity from the NO(A) state is close to the maximum value obtainable for such a mixture. In the case of

synthetic-air discharge, since no UV emission is recorded between 200 and 300 nm, they conclude that oxidative effects are responsible for inactivation. Even though their experiments are not fully controlled in terms of gas purity, they manage to conclude that for a plasma system to be efficient on various types of micro-organisms, both UV radiation and reactive particles are needed. In a second set of experiments destined to further probe the influence of the intensity and wavelength of the UV radiation, they combine the classical operation of the DBD (in contact with the spores) with additional UV radiation coming from excimer "lamps" (Xe₂, XeBr, XeCl). In this case, the D₁ time is shorter than without the "auxiliary" lamp, but the D₂ time remains as long, which they interpret, correctly in our opinion, as resulting from the shadowing effect due to stacked spores. In fact, when using an auxiliary lamp as they do, even though the first inactivation phase is faster, there will always remain the problem of the second phase: photons from the lamp are emitted within a limited solid angle, which reduces their access, for example, to spores located within crevices or to underlying spores when two or more of them are stacked.

Sharma *et al* (2005) and Rahul *et al* (2005) operate an RF sustained discharge (at frequencies from 4 to 60 MHz) where the powered electrode is wedge shaped and faces a hollow slot made within a grounded electrode. A mixture of argon and oxygen (32 slm and 6 standard cm³/min (sccm), respectively) flowing through the slot provides an afterglow plume past the other end of the slot in ambient air, the Petri dish being located from 1 to 8 mm away from the plume end. They claim straightforwardly that the micro-organisms are inactivated by the UV photons arising from the discharge and by the highly reactive radicals present in the plasma afterglow (measured oxygen-atom fluence of 10¹⁷ cm⁻²).

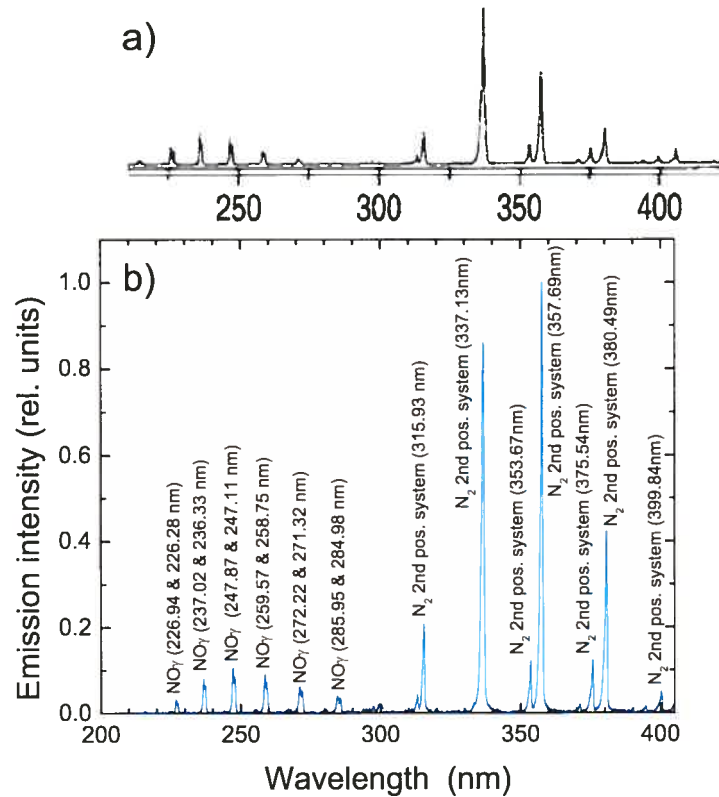


Figure 2-1. a) UV spectrum recorded at atmospheric pressure in a supposedly pure N $_2$ DBD (filamentary mode) (Heise *et al* 2004); b) spectrum recorded by us at atmospheric pressure also in a DBD (uniform Townsend mode) operated in an N $_2$ -N $_2$ O mixture with 40 ppm of N $_2$ O (concentration value for maximum UV intensity and highest inactivation rate: see section 2.2) with identification of the various lines (actually band heads). Comparison with our spectrum shows that in (a) the contribution below 290 nm is due to the NO γ band (and not to the NO β band as mentioned by the authors: see Appendix A). The intensity level of their UV emission seems to be sufficient to inactivate micro-organisms: compare the NO line intensities in (a) and (b) with, as a reference, the corresponding 315.9 nm N $_2$ line intensity.

Negligible or no role of UV radiation

Herrmann *et al* (1999) utilize the atmospheric-pressure plasma jet (APPJ), a device made of two coaxial electrodes (one supplied at 13 MHz and the other grounded) between which a feed gas flows at high rate (43 m/s). Stable operation of the APPJ requires the use of a carrier feedgas such as helium to avoid arcing and to produce a homogeneous discharge. Molecular oxygen is added (typically 3%O $_2$) to the carrier gas. The biological samples are exposed to the afterglow of the APPJ. These authors consider that, owing to the very high gas-flow rate, the (reactive) O atoms, even though they are short-lived species,

and the long-lived (metastable) O_2 and O_3 molecules can reach the micro-organisms, being then responsible for their observed inactivation. However, they do not specify which of these species plays the main role.

Kuzmichev *et al* (2000) in a comprehensive paper examine the inactivation of *B. stearothersophilus* deposited on steel samples, using three types of low-density pulse-regime atmospheric-pressure discharges: the streamerless (uniform) corona, the streamer-spark corona and the DBD. The discharge gases are either moistened or dry, and they include air, O_2 , N_2 and Ar. Shielding the samples from UV radiation (no details given), they conclude that the UV radiation is not essential in the sterilization process, the main role being performed by chemically active particles. Moistening the gas enhances the inactivation effect. The specific active species depend on the type of discharge used: O in the spark corona, O_3 and OH in the DBD and all three species in the corona. The highest sterilization efficiency is achieved with a DBD in moistened air.

Birmingham and Hammerstrom (2000) use a corona discharge in flowing air at atmospheric pressure to inactivate T-2 mycotoxins and *B. globigi* spores. They claim that their air plasma produces UV light (no spectrum is shown), active oxygen molecules and other radical species. SEM micrographs of the treated spores show that their cell walls are breached, exposing the cellular contents, while their remaining surface appears folded and mottled. A pure argon corona discharge was equally effective for decontamination. They nonetheless conclude that UV light processes are too slow to achieve a quick inactivation and they give no explanation as to why the spores are so heavily damaged and how inactivation is performed.

Efremov *et al* (2000), using an atmospheric-pressure DC-glow discharge in air, subjected the micro-organism samples either to the effluents coming out from the discharge chamber or to the direct action of the discharge under no gas flow condition. They conclude that in dry air, ozone is responsible for the observed inactivation.

Montie *et al* (2000) operate a variant of the DBD in air at atmospheric pressure to inactivate various types of micro-organisms. They observe that there is no significant difference in the time needed to inactivate micro-organisms on polypropylene samples, whether exposed directly or sealed in bags. They infer from this that UV photons are not one of the major antimicrobial active species, since the opaque bag would have blocked much of the UV light. They suggest that diffusion, up to the spore cytoplasmic membrane,

of reactive oxygen species (including oxygen radicals but not ozone) and the ensuing irreversible damage to this membrane are responsible for the observed inactivation.

In a review article, Laroussi (2002) discusses the level of inactivation of micro-organisms achieved with four different atmospheric-pressure cold plasmas: the corona discharge, the DBD in a diffuse-glow mode (uniform discharge as opposed to its filamentary mode), the resistive barrier discharge (RBD, a variant of the DBD where one of the dielectric plates is replaced by a high-resistivity material), and the APPJ. In general, for stability reasons, these plasmas use helium as the carrier gas. Laroussi notes that most gas mixtures utilized in atmospheric-pressure cold-plasma experiments simply do not provide any appreciable dose of UV radiation at the germicidal wavelengths. He actually claims from the results examined in his review that the addition to the gas carrier of small amounts of oxygen, humidity, or hydrogen peroxide in the decontamination chamber accounts for a rapid and effective inactivation process. It leads him to conclude that it is the reactive species generated by the plasma that always play the major role in the inactivation of micro-organisms.

Laroussi, Mendis and Rosenberg (2003) use the RBD mentioned above. It allows operation of the discharge at frequencies as low as 60 Hz. The plasma generated by the RBD is a source of charged particles, free radicals and radiation (IR, visible and UV). The main intent of their article is to show that the observed lysis of the Gram-negative bacteria *E. coli* results from the charging up of the bacterium and the subsequent disruption of its outer cell membrane due to electrostatic forces. This phenomenon does not occur with Gram-positive bacterium *B. subtilis* (no sign of morphological change), because of its thicker protecting layer.

Akitsu *et al* (2004) use a discharge that appears to be a variant of the DBD, the atmospheric plasma glow (APG), which they operate in the pulse mode at 100 kHz, 13.56 or 27.12 MHz. It uses helium to ensure plasma homogeneity (most probably because of the large mean free-path of electrons in this gas) to which water vapor is added to generate OH radicals; small % of O₂ is added to He to generate O-atoms. They claim in their introduction that it is the oxygen radicals that react with the cell wall of the micro-organism, and destroy its double helix structure of DNA: this matter is not taken up further in the text. Minimum sterilization time is attained with 1.5 slm of He and 0.06 % O₂, this percentage corresponding to the highest yield of oxygen atoms.

Laroussi and Leipold (2004) use the flowing afterglow of a DBD in air at atmospheric pressure to inactivate some unspecified spores of the *Bacillus* genus. Collecting the light emitted from the discharge with a monochromator, they observe no significant UV emission in the range 200-285 nm. The monochromator was also employed to measure the relative concentration of O-atoms and hydroxyl radicals OH (they assume that H₂O is initially present). Calibrated gas detectors were used to measure the concentration of O₃ and N₂O. They claim that highly reactive oxygen species such as O, NO₂ and OH play the crucial role in inactivating the key elements (outermost membranes (lipids), proteins) of micro-organisms. As for heat and UV radiation, they are expected to play a secondary role, either minimal or indirect (e.g., photo-assisted chemical reactions in contrast to direct damage to the DNA).

Birmingham (2004) tests what he calls a plasma blanket, a flexible micro-machined structure providing small corona discharge spots, which can be wrapped around the object to be sterilized. The system is operated in ambient air. SEM micrographs show that, after plasma treatment, the cell walls of *B. cereus* spores are breached, exposing the cellular contents while the remaining surface appears folded and mottled. The author states that not enough photons of the appropriate wavelength (no mention of what should be that wavelength range) are generated for the observed efficient spore inactivation which, he concludes, therefore results from the interaction of the ionized gas with the biological material.

Pointu *et al* (2005) turn to the afterglow of an N₂-O₂ corona discharge (mean power 15 W) flowing at 40 slm in a 6 mm inner diameter tube opening to ambient air. Using optical spectroscopy, they record the emission intensity, at a given representative wavelength, of both the NO_β and NO_γ bands and also obtain the (relative) concentration of the O(¹S) metastable atoms (from the relative intensity of the 557 nm line), as functions of the relative concentration of O₂ to N₂ in the discharge. Figure 2-2 shows the corresponding data. The relative density of the O(¹S) metastable atoms and the intensity of the NO_γ band go through a maximum at values of 25 ppm and 250 ppm of O₂ in N₂, respectively. Then, at the point along this tube where the spectroscopic measurements were made (10 cm away from the plasma source), the 6 mm diameter tube is replaced by a 250 cm³ box containing the spores to be subjected to the afterglow. Spore counts were effected at 15 and 30 min using pure N₂, and N₂-O₂ mixtures with values of O₂ concentration in N₂ of 25 ppm and 250

ppm. After a 30-minute exposure of 20 000 spores, inactivation at 25 ppm of O₂ to N₂ (the setting for maximum density of metastable oxygen atoms) appears to be the most efficient with approximately 100 spores remaining compared to 250 at maximum UV intensity and 600 with pure N₂. From this, they conclude that the O(¹S) atoms are more efficient than the UV photons to inactivate *B. stearothermophilus*.

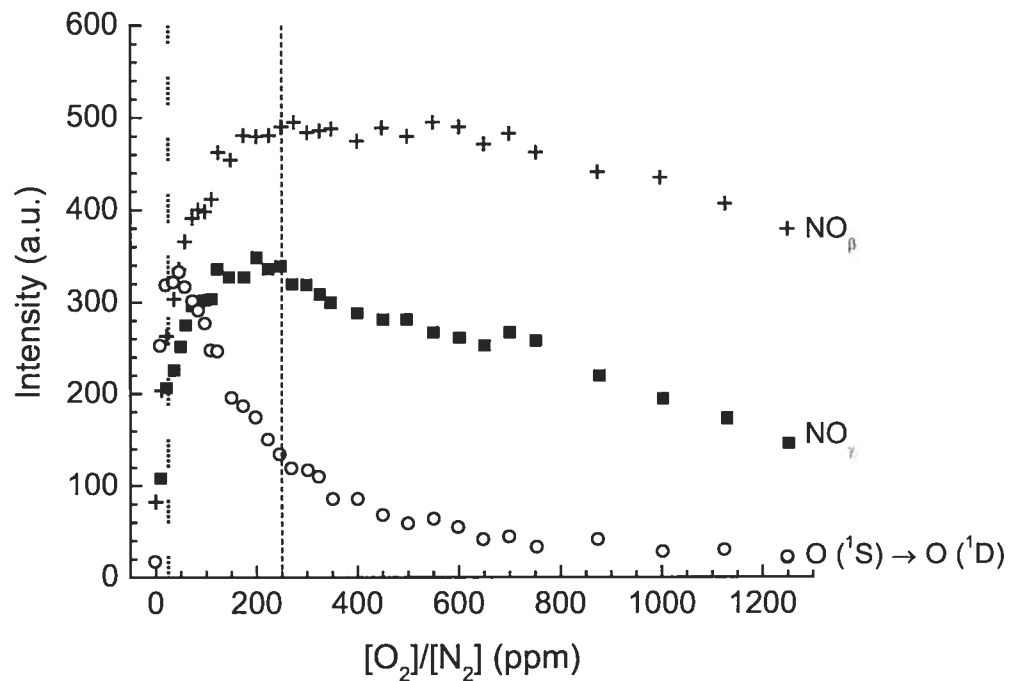


Figure 2-2. Emitted light intensity as a function of the ratio of O₂ concentration to that of N₂ of: the NO_γ 248 nm line, the 320.7 nm NO_β line and the 557 nm line from the O(¹S) N₂-O(¹D) N₂ transition. After Pointu *et al* (2005). The vertical dotted and dashed lines that we have added are for a concentration of O₂ in N₂ of 25 and 250 ppm, respectively.

Bankupalli et al (2005) use the flowing afterglow of a small RF-plasma torch with argon as the carrier gas to which O₂ is added. They report that UV radiation does not play an important role. To demonstrate this, they put a fused silica plate atop the Petri dish, preventing the afterglow particles to reach the spores and, therefore, allowing only the UV photons emitted above the plate to pass through it. Since inactivation was observed to be much lower, they conclude that UV radiation is not the main active species. Their SEM micrographs show that the bacteria exposed to plasma for only 0.25 s are heavily damaged.

In an interesting review article, Laroussi (2005), based on Laroussi and Leipold (2004), specifically concludes that UV radiation does not play a significant role when using air plasmas. This statement is in agreement with the results that we will be presenting below (section 2.2) on plasma inactivation in a DBD at atmospheric pressure in an N₂-N₂O gas mixture: at concentrations of the N₂O molecule exceeding only 400 ppm, the UV intensity has become so small that UV radiation can no longer be the dominant inactivation mechanism. Laroussi also mentions that "when UV does not play a role, such as in the case of an air plasma, single phase survivor curves [are] mainly observed. However, in some cases, multi-slope curves have also been reported".

In order to decontaminate surfaces, Becker *et al* (2005) call on microplasmas (characteristic dimensions below 1 mm). They use one such set of microplasmas called the Capillary Plasma Electrode (CPE) discharge (Kunhardt and Becker 1999), where dielectric capillaries cover one or both electrodes of a discharge device (in many aspects, the CPE discharge looks similar to a conventional DBD). Each capillary serves as a plasma source and these produce jets of high-intensity plasma that merge to form a uniform plasma which, in contrast to many atmospheric-pressure plasmas, do not suffer from filamentation and transition to the arc regime. They have used He, He-N₂, He-air (humid and dry) as discharge gases to inactivate *B. subtilis* and *B. stearothermophilus* spores as well as bacterial biofilms. With spores, they observe single-phase survival curves, which they attribute, as a result of their specific operating conditions at atmospheric pressure, either to the dominance of a single cell killing mechanism or to various cell killing mechanisms acting with similar time constants, but these mechanisms are not identified.

Choi *et al* (2006) subject their microbiological samples, by direct exposure, to a DBD (to have a low-temperature discharge gas) operated in air at atmospheric pressure. The optical spectrum presented shows no UV radiation below 290 nm: this could be expected since the concentration of O₂ in air is too large to yield the NO_β and NO_γ bands (see section 2.3.2). They conclude that inactivation is due to both chemical damage (by ozone and atomic oxygen) and physical damage (by ions in the streamer discharge).

General comments on topics related to the reviewed papers are as follow.

(1) *Gases used.* Our survey shows that, in all the previous works, to achieve experiments where UV radiation is present or absent, the authors employed in each case a different gas,

in contrast to our work that uses the same mixture (N_2 - N_2O). In fact, in our experiments, the presence and absence of UV radiation is obtained by simply varying the percentage of the N_2O molecules added to N_2 : the percentage of N_2O can be tuned to maximize the UV radiation intensity or to have no detectable UV radiation.

Argon is the main single gas (i.e. excluding mixtures) emitting UV in atmospheric-pressure discharge, but it is not the only one: nitrogen has also been reported as emitting UV radiation (Heise *et al* 2004), Figure 2-1). In the cases where experiments are presented as being performed with a pure feed gas (N_2 , Ar), there nonetheless appears to be impurities in the discharge (see Figure 2-1): these impurities can either be already present in the gas bottle, be due to leaks in the feeding circuitry (including wall desorption), or to back streaming from the ambient atmosphere (the higher the flow rate of the carrier gas, the less important it is). This is particularly the case when using N_2 as the carrier gas, where a very low-level contamination by O_2 can lead to significant UV radiation (Figure 2-1) whereas a really pure N_2 discharge does not emit UV photons in the 200-290 nm range. In contrast, for example in argon gas, contamination could strongly reduce the UV emission (as a result of the quenching of the metastable argon atoms) otherwise expected from such a pure gas.

(2) *Assessment of the relative role of UV radiation on inactivation in a given experiment.*

Two types of arrangements have been used in the literature to tentatively rule out the action of UV radiation, when present, on micro-organisms: (i) a UV-transparent plate is placed atop the Petri dish to allow UV photons to go through it and then penetrate the micro-organisms, but this plate prevents the particles (including excited species and radicals) from flowing up to the micro-organisms; (ii) a deflector is placed ahead of the chamber where the Petri dish is located that prevents the photons from the discharge (travelling along a straight path) to enter it, but allows the various types of the discharge particles to flow in. The interpretation of these experiments, with and without the "trap", omit to take into account certain phenomena that need to be mentioned since they cannot always be neglected.

Consider case (i). When it is observed that sterilization time is substantially increased because of the presence of the plate (UV transparent), the authors tend to conclude that the higher inactivation rate observed without the plate was due to particles. It must be however noted that in such a case excited atoms and molecules, which can ultimately be UV emitters, are not permitted to enter the Petri, hence a partial loss of UV activity; more importantly, photons "carried" by excited particles can be emitted in the immediate vicinity

of the micro-organisms, accessing regions that "externally" emitted photons cannot reach (shadowing effect in particular with stacked spores). The loss of these "locally" emitted UV photons because of the shadowing effect could increase the D_2 time, but the actual contribution of this effect would need to be investigated. In case ii) excited atoms and molecules are allowed to enter the petri dish and therefore can emit UV photons within the "trap". The contribution of this effect could be more important than that in case (i).

(3) *UV emission in an air discharge.* As discussed in the review (section 2.2), there is no UV radiation in the 200-285 nm range in a dry-air cold plasma at atmospheric pressure (for photons with wavelengths below 180 nm, we use the term VUV photons). Therefore, one should not expect UV photons to take part in the inactivation of micro-organisms when using an air plasma ($\approx 20\%$ O_2 in the N_2 - O_2 mixture) under either direct or remote exposure.

2.3 Experimental results from our laboratory

The procedure that we have followed to achieve the inactivation of bacteria with UV radiation at atmospheric pressure comes out from our work at reduced pressure, in the flowing afterglow of an N_2 - O_2 gas discharge (Philip *et al* 2002). It is thus interesting to recall the main results from such a study since, as will be shown, there are common points between these two pressure regimes. For instance, the concentration range of the oxidant added to N_2 corresponds approximately to the same partial pressure of oxidant in the mixture for both pressure ranges. Furthermore, the comparison between these two sets of results (discharge characterization, survival curves) throws some more light on the inactivation mechanisms at atmospheric pressure. This second part is comprised of two main topics: the search for maximum UV intensity at atmospheric pressure and a presentation of our results at atmospheric pressure using a dielectric-barrier discharge (DBD).

2.3.1 Operating conditions for an efficient spore inactivation by UV radiation in a reduced-pressure N₂-O₂ afterglow: a lead to our atmospheric-pressure work

To clearly show that inactivation by UV photons is dominating when other inactivation mechanisms are at play, we need to have operating conditions such that the UV intensity is substantially high. Increasing and maximizing the UV radiation flux as a function of operating conditions can be achieved essentially by optimising the respective concentrations of the gas components in a mixture (Moisan *et al* 1999). The corresponding operating conditions for reaching such a maximum of UV intensity are, in the case considered (N₂-O₂), narrow and they thus require one to closely monitor the UV intensity, for example, with a spectrophotometer. Actually, the maximum intensity of UV emission achievable with a given gas mixture, provided the UV flux is high enough, corresponds to the minimum time required to reach sterility (Moisan *et al* 1999, 2002). Details for the specific case of the N₂-O₂ afterglow can be found in Philip *et al* (2002). Note that with mixtures containing oxygen, even though the shortest sterilization time is obtained under maximum UV intensity conditions, this does not rule out synergistical effects between UV photons and oxygen atoms.

2.3.1.1 UV emission in the flowing afterglow of an N₂-O₂ discharge

Consider the flowing afterglow of a microwave discharge in an N₂-O₂ mixture: as a result of the dissociation in the discharge of the N₂ and O₂ molecules, the N and O atoms present in the afterglow can collide (in the presence of a third body, say O₂ or N₂) to yield excited NO molecules. Figure 2-3 shows the emission spectrum of this molecule, which is broad as it covers the UV domain from 200 (the lower wavelength limit of our spectrophotometer) to 380 nm. As it can be seen from the figure, it is composed of the so-called NO_β and NO_γ molecular spectra stemming, respectively, from the NO(B) and NO(A) upper excited levels of the NO molecule (see Appendix A for details).

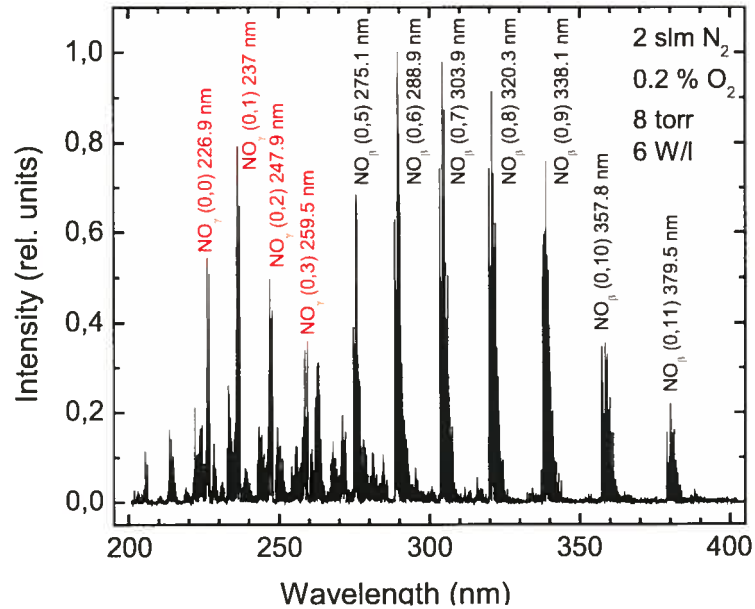


Figure 2-3. Emission spectrum recorded in the flowing afterglow of a reduced-pressure (8 torr) N₂-O₂ microwave discharge with 0.2% O₂ added to N₂ (flow rate 2 slm). Line identification shows NO_β and NO_γ molecular bands whereas, in a DBD at atmospheric pressure, the NO_β band is generally not observed (Figure 2-1 (b)).

The UV emission intensity of the NO molecule, in the present case, is maximized by tuning the percentage of O₂ added to N₂. Figure 2-4 shows the intensity of a given line of the NO_β band as a function of the percentage of added O₂ (the 303.9 nm line chosen, see Figure 2-3, has been checked to be representative of the intensity variation of all lines of the NO_β system as functions of operating conditions). The emitted line intensity goes through a well-defined maximum, situated between 0.2 % and 1.5 % O₂ depending on the gas pressure. The highest peak value is obtained around 4 to 8 torr (Figure 2-4).

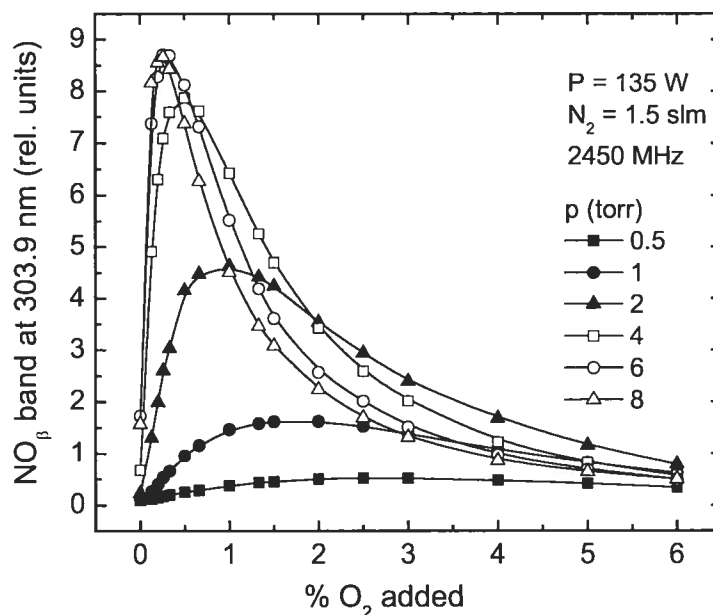


Figure 2-4. Emission intensity of the 303.9 nm line (actually band head) of the NO_β system recorded in the flowing afterglow of an N_2 - O_2 discharge operated at 2450 MHz as a function of the O_2 % added to N_2 , at various total gas pressures.

2.3.1.2 Survival curves in the flowing afterglow of an N_2 - O_2 discharge

Figure 2-5 shows three survival curves obtained with *B. subtilis* spores in the afterglow of an N_2 - O_2 discharge at three different percentages of O_2 added to N_2 , namely 0.7 %, 4% and 10%, with an initial number of spores deposited on the Petri dish of approximately 10^6 from a 100 μL suspension. These data points (each from four independent experiments) have been obtained in a 20 liter-cylindrical-Pyrex afterglow chamber under a discharge microwave power of 100 W (2450 MHz). This discharge power translates into a power density of 5W/L when referring it to the volume of the afterglow chamber, determining in this way the scale-up power density of this afterglow sterilizer. We note that the three survival curve are bi-phasic. The UV intensity in the present operating conditions is maximum at 0.7% added O_2 and it yields the shortest sterilization time, sterility being attained after 40 min; in contrast, at 4% O_2 (10 times less UV intensity than at peak value) and 10% (negligible UV intensity), it requires approximately 3 hours. The present results clearly show that spore inactivation can be achieved under negligible UV emission intensity, but at a much lower rate, as a result of the sole action of oxygen atoms. In fact, the density of oxygen atoms is found to be close to 10^{15} O-atoms/ cm^3 , this density slightly increasing with increasing O_2 percentage in the mixture (Ricard *et al* 2001).

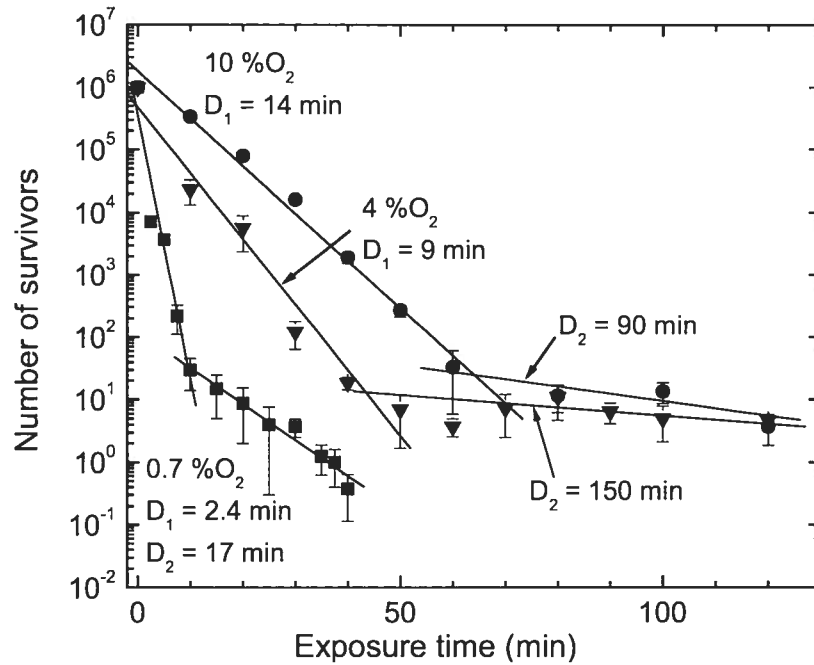


Figure 2-5. Survival curves for *B. subtilis* spores observed in the flowing afterglow of an N_2 - O_2 discharge. Operating conditions: microwave-discharge power of 100 W at 2450 MHz feeding a 20 L afterglow-chamber at a flow rate of 1 slm of $N_2 + xO_2\%$ under a pressure of 5 torr.

Having recalled the procedure used previously at reduced pressure to achieve a high rate of spore inactivation by UV radiation, we now turn to the case of atmospheric pressure sterilization with N_2O molecules added to N_2 , this time subjecting the *B. subtilis* spores directly to the discharge.

2.3.2 Spore inactivation from direct exposure to an atmospheric-pressure discharge in an N_2 - N_2O gas mixture under UV and no UV radiation

In what follows, we consider successively the description of the experimental arrangement, the setting of the operating conditions to obtain the highest UV emission intensity, the presentation of the corresponding survival curves and the damage suffered by the exposed spores.

2.3.2.1 Experimental arrangement.

Figure 2-6 (a) shows an exploded view of the DBD employed. Figure 2-6 (b) is the assembled system, which is enclosed in an aluminium casing (not shown) to prevent a direct

contact of the ambient air with the discharge zone. We operate the DBD in a diffuse-glow mode (uniform) as opposed to the filamentary mode (non uniform). This diffuse-glow mode of operation is also called the Townsend mode and the discharge is accordingly often referred to as an Atmospheric-Pressure Townsend Discharge (APTD). More details on the APTD can be found in Massines *et al* (2005).

The UV emission that we want to record comes from NO* excited molecules, produced by the APTD in a mixture of N₂ and some oxygen-containing molecule. A parametric study of the influence of the UV intensity on the inactivation rate as a function of the N₂O concentration requires one to keep the discharge in the same operating mode (Townsend mode) throughout the whole range of variation of the N₂O concentration needed to sweep the UV intensity from its maximum value until this intensity becomes negligible. Because of this requirement, it is not suitable to use O₂ as the oxygen-containing gas in the mixture since, above 500 ppm of O₂ added to N₂, the discharge becomes non-uniform (filamentary)⁵ (Miralai *et al* 2000 and Brandenburg *et al* 2005).

The system is initially pumped down (primary-vacuum pump and turbomolecular pump) to 10⁻² mbar before allowing the working gases to flow into it, namely N₂ and N₂O. The pressure is then set, by choking the primary-vacuum pump, at 1000 mbar usually at a 4 slm N₂ flow rate. Before the discharge is started, a 5 to 20 min waiting time is observed to expel any remaining air content and thus tentatively ensure purity and stability of the N₂-N₂O mixture (especially at N₂O concentration as low as a few ppm). After spore exposure, in order to avoid bacterial contamination of the petri dish from the ambient atmosphere, the vacuum pump is halted and the gas mixture allowed to flow freely until the system pressure slightly exceeds atmospheric pressure before opening the DBD vessel.

⁵ The discharge is in the Townsend mode provided there are enough N₂(A) (metastable) molecules to help breakdown occurring at the beginning of each period. At high concentrations of O₂, the O₂ molecules quench the N₂(A) state more efficiently than N₂O molecules do.

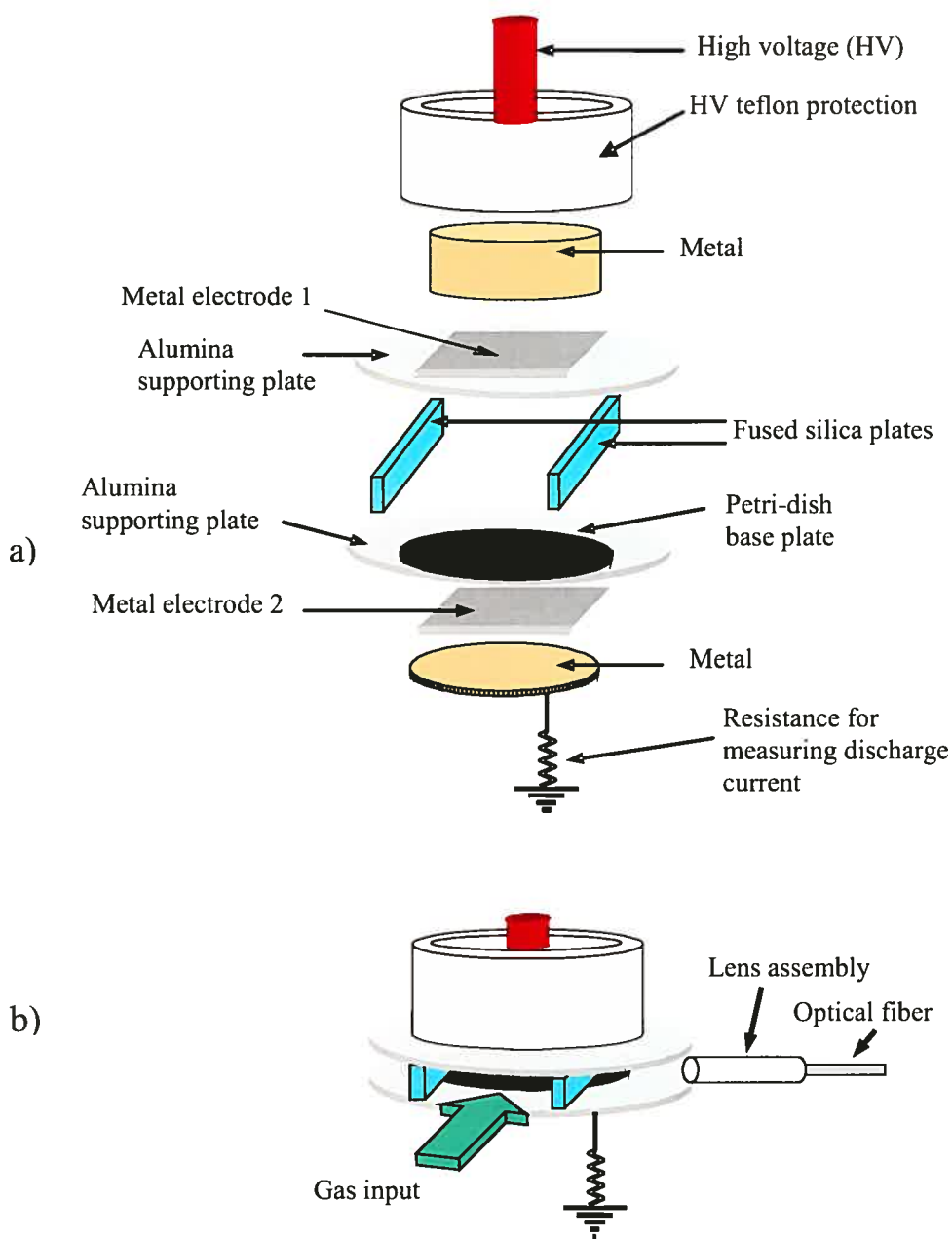


Figure 2-6. (a) Exploded view of the dielectric barrier discharge (DBD) used. Dimensions of the metal square electrodes 1 and 2 are 32 mm by 32 mm; (b) assembled DBD system (without its aluminium enclosure) showing the gas entering the discharge area (and exiting in the same way on the other side); the discharge emitted light is focused by a lens assembly on an optical fiber leading to the spectrophotometer.

Optical emission spectroscopy measurements were made with a 27 cm focal length monochromator equipped with a 1200 grooves/mm grating and a CCD camera for signal detection. Emitted light from the APTD was focused by a lens assembly onto an optical fiber leading to the monochromator. We mainly studied the spectral domain comprised between 200 and 320 nm (NO_γ system) and that extending from 320 up to 420 nm (N_2 molecular second positive system).

The polystyrene Petri dishes utilized for the biological tests had their side-wall cut out, leaving out a flat, circular plate over which spore deposition is made ($\approx 1 \text{ cm}^2$ circular spot). Fused silica plates are used to provide two side-walls that hold the two square electrodes, thereby defining the discharge area (see Figure 2-6 (a)). Note that the Petri plate extends outside the active part of the DBD, as illustrated Figure 2-7 drawn approximately to scale.

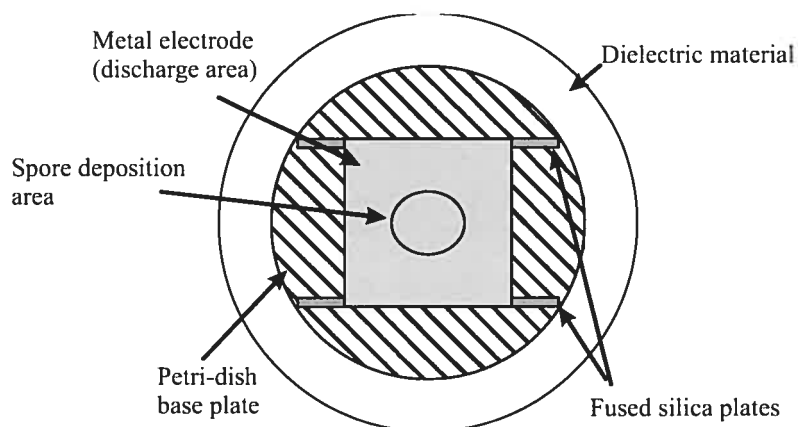


Figure 2-7 Detailed view, completing Figure 2-6 (a), that shows the location of the Petri plate with respect to the DBD metal electrodes that define the discharge area: part of the Petri plate lies outside it.

2.3.2.2 Setting of operating conditions for maximum UV intensity

As already shown in Figure 2-1 (b), the UV emission from an N_2 - N_2O mixture subjected to an APTD comes from the NO_γ system, the NO_β band then being absent in contrast to the case of the reduced-pressure flowing afterglow from an N_2 - O_2 (microwave) discharge (Figure 2-3) (see appendix A for explanations). The maximum of UV intensity in our APTD is achieved by monitoring the UV intensity with the spectrophotometer while tuning the N_2O mass flow meter.

Figure 2-8 shows, as functions of the ppm concentration of the oxygen-containing molecule (O_2 at reduced pressure and N_2O at atmospheric pressure) added to N_2 , the emission intensity from the NO_β band in the case of reduced-pressure operation and that from the NO_γ band at atmospheric pressure: the higher the pressure, the narrower the peak for maximum UV intensity. In addition, the range of the percentage of added N_2O molecules for which the UV emission intensity is significant is extremely narrow (a precision 0-1 sccm flow meter had to be used to determine it) and at very low ppm values, possibly close to gas contamination (provided it is not too high!). Actually, finding the appropriate gas conditions to achieve a significant UV intensity level at atmospheric pressure is not straightforward and can easily escape the attention of the experimentalist, while it is not as critical in the reduced-pressure case (Figure 2-8).

Figure 2-8 also shows that when increasing N_2 pressure, the percentage of oxidant for maximum UV emission intensity shifts towards lower oxidant concentration values. Actually, the partial pressure of the oxygen-containing molecule yielding the maximum intensity of UV radiation does not depend much on the total gas pressure (Figure 2-9), even though two different oxidants are used, namely O_2 and N_2O . As a matter of fact, Brandenburg *et al* (2005) report that the O_2 partial pressure (60 ppm, i.e. 0.045 torr) yielding the maximum intensity of NO_γ emission in an APTD is close to the N_2O partial pressure found here (40 ppm, i.e. 0.03 torr).

Therefore, in the process of searching for the maximum of UV intensity for other N_2 -oxygen-containing mixtures at atmospheric pressure, the value in Figure 2-9 of the N_2O partial pressure can be taken as an approximate starting concentration value for any given oxidant and, then, with the help of a UV detector, this concentration can be fine tuned for maximum UV intensity.

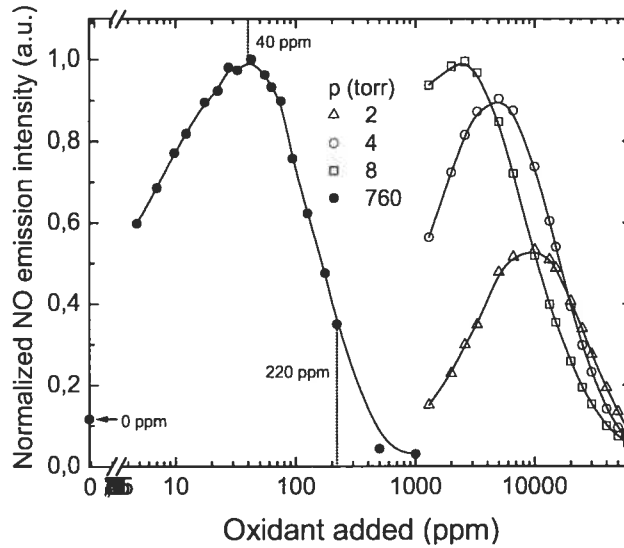


Figure 2-8. Recorded emission intensity integrated over the 200-285 nm range of the NO_γ system at atmospheric pressure and that of a representative line (303.9 nm) of the NO_β system in the case of reduced-pressure operation, as functions of the percentage of the oxygen-containing molecule (N_2O at atmospheric pressure and O_2 at reduced pressure) added to N_2 . At atmospheric pressure, the maximum of UV intensity, normalized to unity, is attained around 40 ppm of N_2O in N_2 , the carrier gas; at 220 ppm, the UV intensity is 0.35 of its peak value; at 0% N_2O , the spectrum recorded is that of the NO_γ system and the corresponding UV intensity is 0.12 of the 40 ppm peak value, due to discharge gas contamination (see Figure 2-10 (a) and also Figure 2-1 (a)).

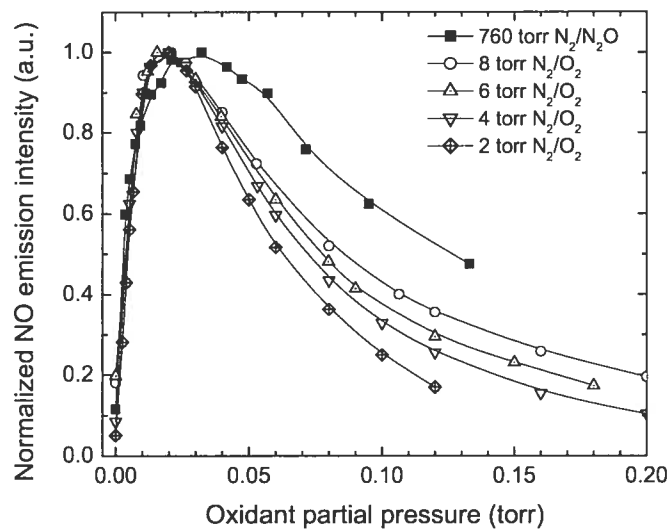


Figure 2-9. Emission intensity of the NO excited molecule as a function of the partial pressure of the oxygen-containing molecule (O_2 at reduced pressure and N_2O at atmospheric pressure) in the mixture. The partial pressure of the oxygen-containing molecule yielding the maximum intensity of UV radiation does not depend significantly on the actual total gas pressure.

Figure 2-10 shows the APTD emission spectra recorded at 0, 40, 220 and 1000 ppm of the N_2O concentration added to N_2 . At (and above) 1000 ppm, there is no UV emission in the range 200-290 nm, as is the case in a dry-air cold discharge.

Recall that it is commonly agreed that the most efficient UV photons for spore lethality are in the 200-280 nm range (Tyrrell 1978, Nicholson *et al* 2000). Using a deuterium lamp and appropriate high-pass and neutral filters (to maintain the same UV flux), we found the inactivation rate of *B. subtilis* spores to decrease dramatically above 280 nm.

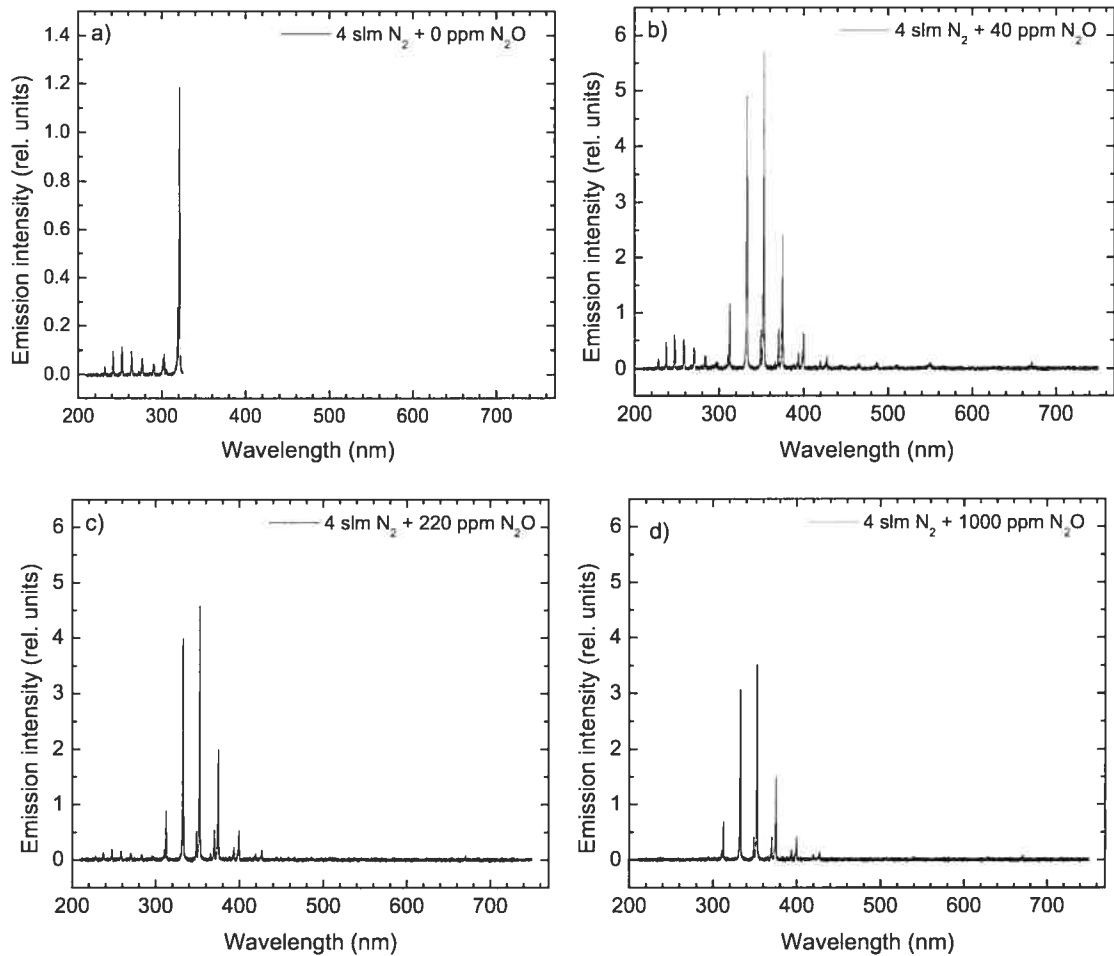


Figure 2-10. APTD emission spectra recorded at four different N_2O concentration values: 0, 40, 220 and 1000 ppm. The 40 ppm N_2O concentration yields the maximum intensity from the NO_γ system (200-285 nm) while the intensity at 220 ppm is 0.35 of the peak value. The 0 ppm spectrum was not recorded above 325 nm. At 1000 ppm and above, there is no UV emission in the range 200-290 nm.

2.3.2.3 Survival curves

Figure 2-11 shows the survival curves obtained at 4 different values of the N_2O concentration, each data point resulting from 3 independent experiments. Three of these curves are clearly bi-phasic with D_1 inactivation times shorter than D_2 , as is the case at reduced pressure (Figure 2-5). Comparing Figure 2-11 with Figure 2-8, we observe that the D_1 time is the shortest when the UV intensity is maximum, as is the case also in the N_2-O_2 mixture at reduced pressure (section 2.3.1.2).

Looking at the survival curves in greater detail and as a function of an increasing N_2O concentration, two cases should be considered which are as follow:

- (i) the presence of UV radiation: to 0 ppm of N_2O ($I_{UV} = 0.12$) corresponds the longest D_1 time (2.5 min); at 40 ppm of N_2O ($I_{UV} = 1$), the D_1 time is the shortest (0.4 min), as already mentioned, while at 220 ppm ($I_{UV} = 0.35$), it is between the previous two D_1 values;
- (ii) the absence of UV radiation: at 1000 ppm of N_2O , the D_1 time (2 min) is nonetheless shorter than at 0 ppm where $I_{UV} = 0.12$.

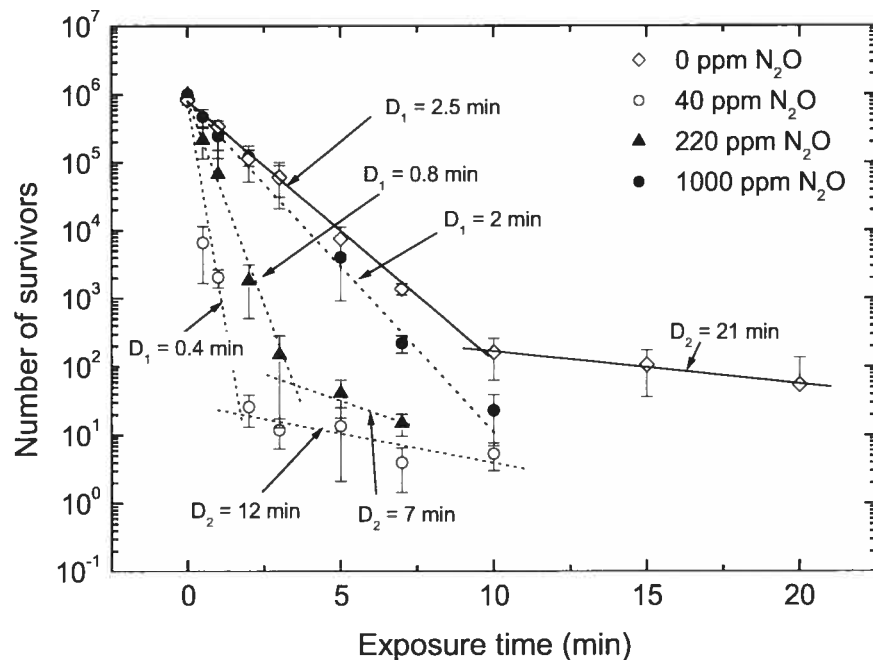


Figure 2-11. Survival curves obtained with *B. subtilis* in direct contact with the DBD at atmospheric pressure (APTD mode) at different percentages of N_2O added to N_2 in an N_2-N_2O mixture.

Concerning the first case, the higher the UV intensity, the shorter the D_1 time (see Table 2-1). The second case demonstrates that a substantial inactivation rate can be obtained even in the absence of UV radiation, which we believe to be due to chemically reactive species such as O and O₃. The inactivation mechanisms involved in this second case cannot be erosion of the spores since their protecting coats is barely damaged as can be seen when comparing Figure 2-12 (a) with (d).⁶ We actually believe that the diffusion of chemically active oxygen species deeply inside the spore, followed by oxidation reactions, can damage the cytoplasmic membrane, metabolic proteins and the genetic material (DNA) and, therefore, inactivate the micro-organism.

To support our statement that, in the first case, the inactivation is dominated by UV irradiation, we need to show that the inactivation rate is proportional to the UV intensity: clearly, if the UV flux is low, it will take more time to reach the lethal dose⁷ of a given number of spores and, conversely, if the UV flux is high, it will take less time. In other words, the product of the UV flux times time needs to be constant (Appendix B), this product being, by definition, a fluence. When considering D_1 as the time duration, the fluence is then equal to the lethal dose for a decade of spores. Table 2-1 shows that it is approximately the case when the UV intensity from the discharge is significant. Therefore, the fact that the inactivation rate is proportional to the UV intensity is a clear indication that the UV irradiation dominates the inactivation process whenever the UV intensity is high enough.

⁶ As we have shown in a previous article (Crevier *et al* 2002), the eroded portion of the spore in Figure 2-12 (b), (c) and (d) concerns only the outer part of the spore protecting coats and, therefore, cannot be held responsible for the spore inactivation.

⁷ A certain minimum number (statistically speaking) of lethal lesions to the genetic material must occur for a spore to be inactivated, which implies a large number of photons hitting the spore.

Table 2-1. D_1 values and UV intensities taken from Figure 2-11 and Figure 2-8, respectively, showing that the product $D_1 \times I_{UV}$ (lethal dose for one decade) is approximately constant when there is UV radiation.

N_2O (ppm)	0	40	220	1000
D_1 (min)	2.5	0.4	0.8	2
I_{UV} (rel. u.)	0.12	1	0.35	0
$D_1 \times I_{UV}$	0.3	0.4	0.3	-

In summary:

- (i) when the UV intensity is high enough (at 0, 40 and 220 ppm of N_2O), the inactivation process is dominated by the action of UV photons whereas, in the absence of UV radiation (1000 ppm), it can only be controlled by the action of the reactive species;
- (ii) even in the case where the inactivation process is dominated by UV radiation, the oxygenated species are, to some extent, acting on the spore surface through erosion. In fact, erosion seems to be slightly more important when UV radiation is significant (Figure 2-12(b) and (c)) than when there is no UV radiation (Figure 2-12(d)), which can be interpreted as a synergistical etching action involving UV photons and oxygenated species, as is observed in UV-assisted polymer etching in the presence of reactive radicals.

Similar observations and conclusions were arrived at in the case of the reduced-pressure flowing afterglow of an N_2 - O_2 microwave discharge (Philip *et al* 2002).

2.3.3 Low external damage to spores

Figure 2-12 shows SEM micrographs of *B. subtilis* spores, unexposed (Figure 2-12(a)) and exposed to the APTD during 10 min with 40, 220 and 1000 ppm of N_2O molecules in the mixture (Figure 2-12(b), (c) and (d), respectively). At 40 ppm of N_2O , according to Figure 2-11, less than 10 spores are still living. We see that the dimensions of the exposed spores have been slightly reduced by erosion, but their structure and external appearance are the same as initially. The micrographs presented in the articles reviewed in section 2.2, in many cases, show exposed spores that have been heavily damaged, more specifically (in the order of the papers reviewed) : reduced to microscopic debris, ruptured with their cellular contents released on the substrate surface, disrupted, with their surface

folded and mottled, punctured, suffering from lysis, breached. The fact that, in our case, the exposed spores are comparatively much less damaged is indicative, in our opinion, of a milder treatment method (implying less damage to the devices to be sterilized). The low degree of erosion observed is in accordance with the use of an APTD, which yields an homogeneous plasma resulting in a low local density of energy, whereas a filamentary discharge, because it induces a localized high energy dissipation and ion bombardment, is expected to cause heavy damage to exposed spores and medical devices to be sterilized.

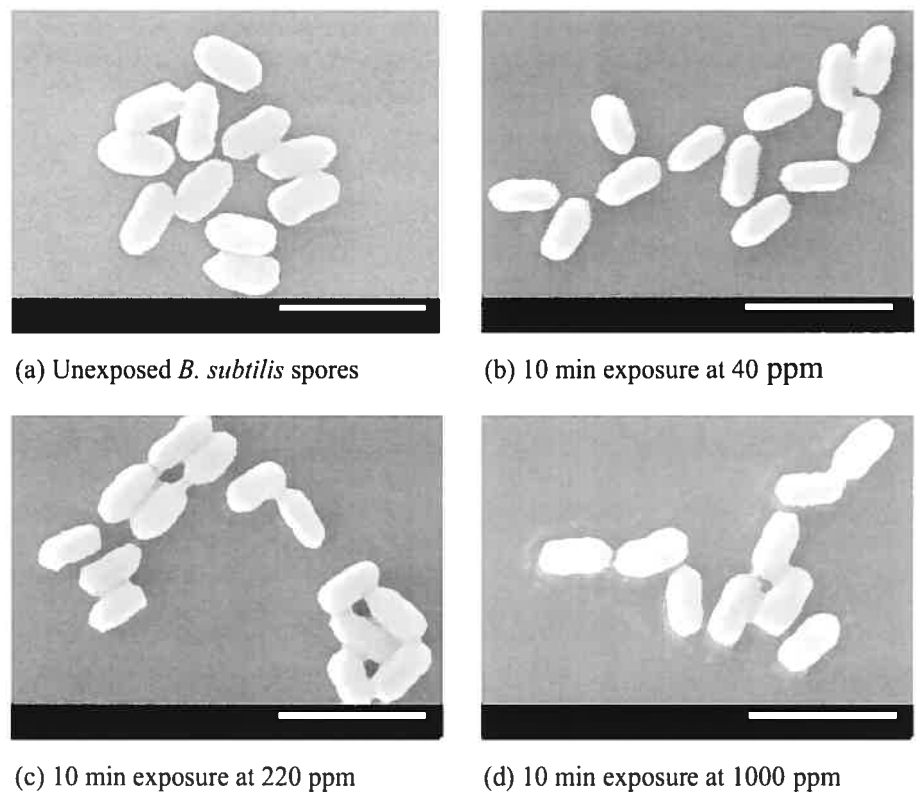


Figure 2-12 SEMmicrographs of *B. subtilis* spores : (a) untreated spores for reference; (b), (c) and (d) spores subjected directly to an APTD operated in an N_2 - N_2O mixture with 40, 220 and 1000 ppm, respectively, of N_2O molecules added to N_2 .

2.4 Conclusion

We have demonstrated that it is possible to find operating conditions such that spore inactivation with an atmospheric-pressure discharge can be mainly due to UV radiation. In the present investigated case of an N_2 - N_2O mixture, these conditions were found to be restricted to a small range of the oxidant concentration. We have also shown that spore inactivation can be obtained in the absence of UV radiation due to the action of chemically reactive species such as oxygen atoms. In this last case, two processes can then be brought forward: spore erosion due to a surface action of radicals and internal oxidative irreversible damage to proteins, cytoplasmic membrane and genetic material, subsequent to the diffusion of the radicals deeply inside the spores. The limited damage to the spore coats by erosion cannot be called upon to account for the observed inactivation.

Our review of the literature has shown that most people claimed that there is no UV inactivation at atmospheric pressure, advocating that the chemically reactive species are entirely responsible for the observed inactivation. We have brought concrete and experimental facts that prove that spore inactivation, depending on operating conditions, can be achieved either under dominant UV radiation or, on the contrary, under the sole action of the reactive species, thereby resolving the controversy on that matter.

Acknowledgments

This work was financed by the Fonds de Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT) of the Gouvernement du Québec, by the Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie (CRSNG) of Canada, by the Service des Relations Internationales de l'Université Paul Sabatier and the Direction des Relations Internationales de l'Université de Montréal, and by Air Liquide (Centre de recherche Claude-Delorme, France). The authors are indebted to Dr. D. Kéroack and J. Pollak for comments and critical reading of the manuscript.

Appendix A. UV emission from excited NO molecules generated in low-temperature discharges achieved in a mixture of N₂ with an oxygen-containing molecule: at atmospheric pressure, only the NO_γ band is emitted in contrast to the reduced-pressure case where both NO_β and NO_γ bands are observed

The NO_β and NO_γ emission bands are both due to an electronic transition from an excited state of the NO molecule, namely the NO(B) and NO(A) states respectively, to the ground state, designated as NO(X). This ground state level is perfectly stable, i.e. it does not further deexcite through dissociation as it is the case, for example, with excimers. Nonetheless, the NO molecule can interact with other species in the mixture.

The predominance of the NO_γ band emission over that of the NO_β band at atmospheric pressure can be readily explained by considering the excitation and deexcitation channels of these two systems, and comparing, for each system, their radiative and collisional deexcitation frequencies ν (these are numbered according to their rate equation number):

Excitation:



where M is some third body.

Deexcitation:



Radiative deexcitation pathways (A.4) and (A.5) are in competition with their corresponding collisional deexcitation channels (A.6) and (A.7). We look into this in details below.

We know that in a cold discharge at atmospheric pressure only the NO_γ band is observed. Although this could be due in part to the excitation channel, it is most probably related to the efficient collisional quenching (A.7) of the $\text{NO}(\text{B})$ state. Indeed, the (radiative) deexcitation frequency ν_5 is of the order of $3 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ while the reaction rate k_7 is $6 \cdot 10^{-13} \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, yielding an equivalent (collisional) deexcitation frequency ν_7 at atmospheric pressure in N_2 of $14 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$: the collisional deexcitation frequency of the $\text{NO}(\text{B})$ state is approximately 50 times higher than its radiative deexcitation, hence the NO_β band should not be observed. In contrast, when looking at the $\text{NO}(\text{A})$ state under the same conditions, we get $\nu_4 = 5 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$ and $k_6 = 2 \cdot 10^{-13} \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, i.e. at atmospheric pressure in N_2 , an equivalent deexcitation frequency $\nu_6 \approx 4,5 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$: the collisional and radiative deexcitations of the $\text{NO}(\text{A})$ level are equally probable, hence the possibility of recording the NO_γ system.

Appendix B. Spore inactivation under the sole action of UV irradiation: applicability of the lethal UV dose and fluence concept in such a case

Referring to the lethal UV dose requires that a certain minimum number (statistically speaking) of lethal lesions must occur for the spore to be definitively inactivated; clearly, if the UV flux is low, it will take more time to reach such a dose and, conversely, if the UV flux is high, it will take less time. The lethal dose can be expressed as the product of the UV flux times time, which is, by definition, a fluence. To make use of this property when describing the inactivation of one decade of spores, we need to consider the D_1 values (the time required to inactivate one decade of spores) and the corresponding UV intensities, I_{UV} . The concept of lethal UV dose is perfectly verified if the product D_1 times I_{UV} is constant or, expressed differently, if D_1^{-1} varies linearly with I_{UV} . This is illustrated in Figure 2-13 where 10^6 *B. subtilis* spores were subjected exclusively to UV irradiation by using a Hg lamp (254 nm) under ambient conditions. The lamp full output intensity was reduced at calibrated intensity levels by using optical attenuators (neutral filters).

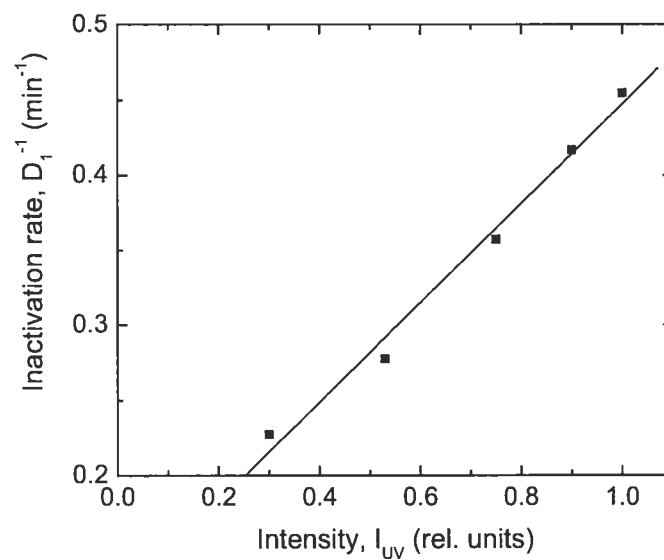


Figure 2-13. Measured inactivation rate, D_1^{-1} , of 10^6 *B. subtilis* spores as a function of the (relative) UV intensity, I_{UV} , of a Hg lamp (254 nm). The lamp full UV output power is reduced at calibrated intensity levels by using optical attenuators (neutral filters). The inactivation rate is observed to vary linearly with the UV intensity, as should be expected when only UV photons are participating in the inactivation process.

References

- Akitsu T, Ohkawa H, Tsuji M, Kimura H and Kogoma, M 2005** Plasma sterilization using glow discharge at atmospheric pressure *Surface & Coatings Technology* **193** 29-34.
- Bankupalli S, Dhali S and Madigan M 2005** Ambient Plasma in Decontamination of Microorganisms *Proc. International Symposium on Plasma Chemistry* (Toronto).
- Becker K, Koutsospyros A, Yin, S M, Christodoulatos C, Abramzon N, Joaquin J C and Brelles-Marino G 2005** Environmental and biological applications of microplasmas *Plasma Physics and Controlled Fusion* **47** B513-B523.
- Birmingham J G 2004** Mechanisms of bacterial spore deactivation using ambient pressure nonthermal discharges *IEEE Transactions on Plasma Science* **32** 1526-1531.
- Birmingham J G and Hammerstrom D J 2000** Bacterial decontamination using ambient pressure nonthermal discharges *IEEE Transactions on Plasma Science* **28** 51-55.
- Brandenburg R, Maiorov V A, Golubovskii Yu B, Wagner H-E, Behnke J, Behnke J F 2005** Diffuse barrier discharges in nitrogen with small admixtures of oxygen: discharge mechanism and transition to the filamentary regime *J. Phys. D: Appl. Phys.* **38** 2187-2197.
- Choi J H, Han I, Baik H K, Lee M H, Han D-W, Park J-C, Lee I-S, Song K M and Lim Y S 2006** Analysis of sterilization effect by pulsed dielectric barrier discharge *Journal of Electrostatics* **64** 17-22.
- Crevier MC, Moisan M, Yahia L'H, Saoudi B 2002** Cold plasma effects on spores and polymers *Proc. Proc. of the International symposium on advanced materials for biomedical applications (SAMBA)* (Montréal, Québec)
- Deng X T, Shi J J, Shama G and Kong M G 2005** Effects of microbial loading and sporulation temperature on atmospheric plasma inactivation of *Bacillus subtilis* spores *Applied Physics Letters* **87** 153901.
- Efremov N M, Adamiak B Y, Blochin V I, Dadashev S J, Dmitriev K I, Gryaznova O P and Jusbashev V F 2000** Action of a self-sustained glow discharge in atmospheric pressure air on biological objects *IEEE Transactions on Plasma Science* **28** 238-241.
- Heise M, Neff W, Franken O, Muranyi P and Wunderlich J 2004** Sterilization of polymer foils with dielectric barrier discharges at atmospheric pressure *Plasmas and Polymers* **9** 23-33.

- Herrmann H W, Henins I, Park J and Selwyn G S 1999** Decontamination of chemical and biological warfare, (CBW) agents using an atmospheric pressure plasma jet (APPJ) *Physics of Plasmas* **6** 2284-2289.
- Kunhardt E E and Becker K 1999** *US Patents* 5872426, 2000 *US Patents* 6005349, 2000a *US Patents* 6147452, 2005 *US Patents* 6879103.
- Kuzmichev A I, Soloshenko I A, Tsiolko V V, Kryzhanovsky V I, Bazhenov V Y, Mikhno I L and Khomich V A 2000** Features of sterilization by different types of atmospheric pressure discharges *Proc. Int. Symp. on High Pressure, Low Temperature Plasma Chemistry HAKONE VII* (Germany, Greifswald)
- Laroussi M 2002** Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: Review, analysis, and prospects *IEEE Transactions on Plasma Science* **30** 1409-1415.
- Laroussi M 2005** Low temperature plasma-based sterilization: Overview and state-of-the-art *Plasma Processes and Polymers* **2** 391-400.
- Laroussi M and Leipold F 2004** Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure *International Journal of Mass Spectrometry* **233** 81-86.
- Laroussi M, Mendis D A and Rosenberg M 2003** Plasma interaction with microbes *New Journal of Physics* **5** 41.1-41.10.
- Lee K-Y, Joo Park B, Hee Lee D, Lee I-S, Hyun O S, Chung K-H and Park J-C 2005** Sterilization of *Escherichia coli* and MRSA using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure *Surface and Coatings Technology* **193** 35-38.
- Massines F, Gherardi N, Naudé N, Ségur P 2005** Glow and Townsend dielectric barrier discharge in various atmospheres *Plasma Phys. Control. Fusion* **47** B577-B588.
- Miralai S F, Monette E, Bartnikas R, Czeremuszkina G, Latrèche M, Wertheimer M R 2000** Electrical and optical diagnostics of dielectric barrier discharges (DBD) in He and N₂ *Proc 7th International Symposium on High Pressure Low Temperature Plasma Chemistry (Hakone VII)* (Greifswald, Germany) 83-87
- Moisan M, Moreau S, Tabrizian M, Pelletier J, Barbeau J, Yahia L'H 1999** Système et procédé de stérilisation par plasma gazeux à basse température, PCT WO 00/72889 (12/07/2000), European Patent EP 1 181 062 (2004) applied for in France, Belgium, Spain, Switzerland, Italy, Germany, US patent 6,707,254 (2004).

Moisan M, Barbeau J, Moreau S, Pelletier J, Tabrizian M and Yahia L'H 2001 Low-temperature sterilization using gas plasmas : a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms *International Journal of Pharmaceutics* **226** 1-21.

Moisan M, Philip N, Saoudi B 2002 Système et procédé de haute performance pour la stérilisation par plasma gazeux à basse température. PCT WO2004/011039 A2 (07/24/2003).

Moisan M, Saoudi B, Crevier M C, Philip N, Fafard E, Barbeau J and Pelletier J 2003 Recent development in the application of microwave discharges to the sterilization of medical devices *Proc. 5th International workshop on microwave discharges* (Zinnowitz (Greifswald, Germany)).

Montie T C, Kelly-Wintenber K and Roth J R 2000 An overview of research using the one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP) for sterilization of surfaces and materials *IEEE Transactions on Plasma Science* **28** 41-50.

Nicholson W L, Munakata N, Horneck G, Melosh H J and Setlow P 2000 Resistance of Bacillus endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64** 548-572.

Park B J, Lee D H, Park J C, Lee I S, Lee K Y, Hyun S O, Chun M S and Chung K H 2003 Sterilization using a microwave-induced argon plasma system at atmospheric pressure *Physics of Plasmas* **10** 4539-4544.

Philip N, Saoudi B, Crevier M C, Moisan M, Barbeau J, Pelletier J 2002 The respective roles of UV photons and oxygen atoms in plasma sterilization at reduced gas pressure: the case of N₂-O₂ mixtures *IEEE Transaction on Plasma Science* **30** 1429-1436.

Pointu A M, Ricard A, Dodet N, Odic E, Larbre J and Ganciu M 2005 Production of active species in N₂-O₂ flowing post-discharges at atmospheric pressure for sterilization *Journal of Physics D-Applied Physics* **38** 1905-1909.

Rahul R, Stan O, Rahman A, Littlefield E, Hoshimiya K, Yalin A P, Sharma A, Pruden A, Moore C A, Yu Z and Collins G J 2005 Optical and RF electrical characteristics of atmospheric pressure open-air hollow slot microplasmas and application to bacterial inactivation *Journal of Physics D-Applied Physics* **38** 1750-1759.

Ricard A, Moisan M and Moreau S 2001 Détermination de la concentration d'oxygène atomique par titrage avec NO dans une post-décharge en flux, émanant de plasmas de Ar-O₂ et N₂-O₂, utilisée pour la stérilisation *J. Phys. D : Appl. Phys.* **34** 1203-1212.

Sharma A, Pruden A, Yu Z Q and Collins G J 2005 Bacterial inactivation in open air by the afterglow plume emitted from a grounded hollow slot electrode *Environmental Science & Technology* **39** 339-344.

Trompeter F J, Neff, W J, Franken O, Heise, M, Neiger M, Liu S H, Pietsch G J and Saveljew A B 2002 Reduction of *Bacillus Subtilis* and *Aspergillus Niger* spores using nonthermal atmospheric gas discharges *IEEE Transactions on Plasma Science* **30** 1416-1423.

Tyrrell R M 1978 Solar dosimetry with repair deficient bacterial spores: action spectra, photoproduct measurements and a comparison with other biological systems, *Photochem. Photobiol.* **27** 571-579.

Conclusion

Au cours de cette étude, nous avons pu montrer qu'il est possible d'inactiver efficacement une importante charge bactérienne principalement par l'action des photons UV émis par une DBD à la PA. L'obtention d'un tel mécanisme d'action, qui repose de façon prédominante sur les UV, nécessite de se placer dans des conditions opératoires finement ajustées, caractérisées par une pression partielle d'oxydant bien précise (de l'ordre du pourcent). De plus, nous avons montré que les dommages infligés aux spores par ce contact direct avec le plasma sont relativement faibles, notamment en comparaison des données comparables de la littérature. Cependant, nombre d'aspects de cette étude restent encore obscurs et nécessitent un examen approfondi. À cet effet, il importerait de procéder à une caractérisation plus poussée de la décharge, en mesurant par exemple (et au minimum) les densités des espèces les plus réactives chimiquement (O, O₃, NO etc.). D'autre part, il serait peut-être pertinent de se pencher sur le possible rôle des espèces chargées dans cette configuration et leur contribution aussi bien à l'érosion qu'à l'inactivation; il faut souligner qu'à l'exception de quelques publications récentes qui attribuent un rôle privilégié aux ions⁸, ceux-ci sont pratiquement ignorés au profit des espèces chimiquement réactives.

Aussi, si ce système ainsi conçu possède des caractéristiques intéressantes, il présente néanmoins des limitations quant aux perspectives de sa mise en œuvre pratique. Pour qu'une installation soit réellement viable, il conviendrait de réduire de façon très importante le temps de stérilisation qui, dans le cas présent, se compare à celui obtenu à pression réduite. L'autre obstacle quant à une adaptation concrète provient du faible volume utile de cette décharge (environ 10 000 fois plus faible que celui de la post-décharge) et qui demeure un inconvénient de taille pour la stérilisation à grande échelle de dispositifs médicaux.

⁸ **Fridman G**, Brooks A D, Balasubramanian M, Fridman A, Gutsol A, Vasilets V N, Ayan A, Friedman G **2007** Comparaison of Direct and Indirect Effects of Non-Thermal Atmospheric-Pressure Plasma on Bacteria Plasma Process. Polym. 4 370-375.

Chapitre 3

Caractérisation de la post-décharge d'un plasma de N₂-O₂ à basse pression : ajustement des conditions opératoires afin d'obtenir une lointaine post-décharge et corrélation des variations des densités des atomes N et O avec l'intensité d'émission de la bande NO_β

(Article publié dans : J. Phys. D : Appl. Phys. 40 1694 (2007).)

Mise en contexte

Dans le chapitre précédent, nous avons rendu compte des résultats d'inactivation de spores *B. subtilis* obtenus avec une décharge à barrière diélectrique, entretenue dans un mélange N₂-N₂O, à la pression atmosphérique. Nous avons montré que si un tel système présentait des avantages certains, il n'en demeurerait pas moins qu'il comporte aussi plusieurs limitations qui empêchent une réelle perspective de mise en œuvre. À cet effet, la petitesse extrême du volume utile de traitement, alliée aux modestes performances de stérilisation, nous ont amenés à faire le choix de nous atteler plutôt à compléter l'optimisation de notre système de stérilisation fonctionnant à basse pression. En effet, plusieurs aspects restaient et restent encore à améliorer avant de disposer de systèmes de haute performance pouvant fonctionner en milieu hospitalier, par exemple : i) réduire au minimum les dommages infligés aux matériaux à base de polymères, ii) accélérer de façon notable l'inactivation de micro-organismes, iii) réaliser une extension d'échelle amenant nos stérilisateur, prototypes de laboratoire, à une capacité de traitement avoisinant les 200 L (capacité standard utilisée en milieu hospitalier).

L'importance qu'il y a à maîtriser le phénomène d'érosion provient de ce que nous avons constaté qu'avec notre système (post-décharge de N₂-O₂, à pression réduite), les dommages infligés aux polymères les plus sensibles peuvent être importants si ces polymères sont disposés en contact direct avec le faisceau de post-décharge : celui-ci résultant de l'entrée dans l'enceinte de stérilisation des effluents provenant de la source de

plasma. Dans cette zone cylindrique (sur un diamètre de 5 cm autour de l'axe, et sur 30 cm en longueur) qui forme le faisceau, les échantillons de type polymère subissent une érosion et un échauffement significatifs plus importants que partout ailleurs dans l'enceinte (un Petri peut même fondre au niveau de ses bords!) Pour mieux contrôler ce phénomène, nous avons cherché à en comprendre l'origine et à identifier les espèces impliquées (à priori, radicaux, ions, métastables) dans ce processus. L'intégrité des DM traités peut alors être mieux respectée en réduisant au minimum, dans l'enceinte de stérilisation, la concentration des espèces responsables de cette érosion. Expérimentalement, nous allons suivre, en fonction de conditions opératoires contrôlées, l'évolution de l'intensité d'émission des bandes du 1^{er} négatif (tête de bande de N_2^+ (391.4 nm) et celles du 1^{er} positif de N_2^0 (dans la gamme 560-600 nm du visible). L'efficacité de cette procédure de réduction des espèces dommageables (c'est-à-dire respectivement ions, métastables) dans l'enceinte de post-décharge sera évaluée par microscopie électronique à balayage sur des microbilles de polystyrène.

En ce qui à trait au volet "accroissement de l'efficacité de stérilisation", cela revient, dans notre cas, à augmenter de façon importante l'intensité d'émission UV, émise par les molécules NO excitées, en particulier NO(B). Dans ce cadre, nous avons réalisé antérieurement une étude approfondie des conditions opératoires (débit, pression, %O₂, puissance) contrôlant cette émission, et précisé la contribution de chacun de ces paramètres à la maximisation de l'émission UV dans l'enceinte. Cependant, malgré l'optimisation de tous ces paramètres, nous ne pouvions guère aller au-delà d'un certain seuil d'intensité. Rappelons que le but recherché est celui de multiplier par 2 (au moins!) cette intensité UV. Aussi, il nous fallait aborder le problème autrement, puisque dans l'étape précédente, nous avons pu agir essentiellement sur la réaction de formation de NO(B) ($N + O + M \rightarrow NO(B) + M$) en optimisant la fréquence de collision correspondante en jouant sur les conditions opératoires. Ainsi, dans le travail qui suit et pour ce volet, nous chercherons principalement à : i) déterminer, avec plus de précision, l'influence du %O₂ sur le taux de formation de NO(B); ii) comprendre les mécanismes de perte des particules N et O tout au long de leur

⁹ Les variations des densités de population des différents niveaux ro-vibrationnels peuvent être utilisées pour évaluer la contribution, faible ou importante, de certains métastables de N_2 (i.e., $N_2(A)$ et $N_2(a')$) au peuplement de ces niveaux (voir annexe de l'article).

trajet en direction de l'enceinte. Pour ce faire, nous aurons recours à la mesure des densités de N et O tant au niveau de la décharge (par actinométrie), de la post-décharge proche (titrage par NO) que dans la chambre de stérilisation elle-même (densité de N dans la post-décharge lointaine par mesure de la densité relative de N ($I_{N_2(580\text{ nm})}$)). Ainsi faisant, nous pourrons suivre les variations de ces deux densités à partir du lieu de leur production jusqu'à leur utilisation dans la formation de NO(B).

Characterization of the flowing afterglows of an N₂-O₂ reduced-pressure discharge: setting the operating conditions to achieve a dominant late-afterglow and correlating the NO_β UV intensity variation with the N and O atom densities.

M K Boudam

Groupe de Physique des plasmas, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal H3C 3J7, Québec

B Saoudi

Groupe de Physique des plasmas, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal H3C 3J7, Québec

M Moisan

Groupe de Physique des plasmas, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal H3C 3J7, Québec

A Ricard

Centre de Physique Atomique de Toulouse (CPAT), 118, route de Narbonne, Université Paul Sabatier, 31062-Toulouse, France

Abstract

The flowing afterglow of an $\text{N}_2\text{-O}_2$ discharge in the 0.6–10 torr range is examined in the perspective of achieving sterilization of medical devices (MDs) under conditions ensuring maximum UV intensity with minimum damage to polymer-based MDs. The early afterglow is shown to be responsible for creating strong erosion damage, requiring that the sterilizer be operated in a dominant late-afterglow mode. These two types of afterglow are characterized by optical emission spectroscopy: the early afterglow is distinguished by an intense emission from the $\text{N}_2^+ 1^{\text{st}}$ negative system (band head at 391.4 nm) while the late afterglow yields an overpopulation of the $v' = 11$ ro-vibrational level of the $\text{N}_2(\text{B})$ state, indicating a reduced contribution from the early afterglow N_2 metastable species. We have studied the influence of operating conditions (pressure, O_2 content in the $\text{N}_2\text{-O}_2$ mixture, distance of the discharge from the entrance to the afterglow (sterilizer) chamber) in order to achieve a dominant late afterglow that also ensures maximum and almost uniform UV intensity in the sterilization chamber. As far as operating conditions are concerned, moving the plasma source sufficiently far from the chamber entrance is shown to be a practical means for significantly reducing the density of the characteristic species of the early afterglow.

Using the NO titration method, we obtain the (absolute) densities of N and O atoms in the afterglow at the NO injection inlet, a few cm before the chamber entrance: the N atom density goes through a maximum at approximately 0.3–0.5% O_2 and then decreases, while the O atom density increases regularly with the O_2 percentage. The spatial variation of the N atom (relative) density in the chamber is obtained by recording the emission intensity from the 1^{st} positive system at 580 nm: in the 2 to 5 torr range, this density is quite uniform everywhere in the chamber. The (relative) densities of N and O atoms in the discharge are determined by using the actinometry method: the density of N atoms decreases from its maximum value at 0% O_2 as the percentage of O_2 is increased while the density of O atoms increases, almost linearly, as a function of the percentage of O_2 , as in the afterglow. The intensity variation of the NO_β UV emission as a function of the percentage of O_2 is characterized by a maximum around 0.6% O_2 (2 torr) followed by an approximately exponential decay. We observe that, in the 0–1% O_2 range, the UV emission is limited by the availability of O atoms. Beyond this point, decrease of the UV intensity follows the

decrease of the N atom density, while on the average, the O atom density keeps on increasing with O₂%. Erosion of polymer microspheres is found to be strongest at the chamber axis when no O₂ is present, implying a dominant early afterglow. Adding even only 1% O₂ causes a strong quenching of the N₂ metastable species, leading to a dominant late afterglow and therefore considerably reducing the etching rate at the axis. In contrast, at 5 cm from the axis under the same operating conditions, a dominant late afterglow prevails; in the absence of oxygen, erosion is negligible, but it increases regularly as O₂ is introduced, following approximately the increase of the O atom density.

3.1 Introduction

The possibility of utilizing gas discharges, either at reduced pressures (0.1–10 torr) or at atmospheric pressure, to sterilize medical devices (MDs) against microorganisms, and eventually prion proteins, has led over the last decade to a growing interest for this sterilization technique (Kelly-Wintenberg *et al* 1998, Herrmann *et al* 1999, Moreau *et al* 2000, Lerouge *et al* 2000, Moisan *et al* 2001, Laroussi 2002, Trompeter *et al* 2002, Moisan *et al* 2003, Heise *et al* 2004, Becker *et al* 2005, Deng *et al* 2005, Laroussi 2005). In particular, by using the discharge flowing-afterglow from different gas mixtures at reduced pressure, complete inactivation of 10⁶ bacterial spores has been achieved at low gas temperature, with treatment times of less than an hour. The flowing afterglow of N₂-O₂ mixtures is a good example of such an attractive afterglow since it is an efficient source of both N and O atoms (chemically reactive species), and of ultraviolet (UV) radiation emitted by NO excited molecules (NO_β system (200–380 nm)) resulting from N and O collisions in the afterglow chamber (Moreau *et al* 2000, Moisan *et al* 2002, Villegier *et al* 2003, 2005). When the concentration of O₂ in the N₂-O₂ mixture is tuned such that the UV intensity is maximum, the UV photons dominate the inactivation process of the reference bacterial spores (Moisan *et al* 1999, Philip *et al* 2002, Boudam *et al* 2006). However, in the opposite case where UV emission is barely detectable, the specific role of O atoms in the effective inactivation of microorganisms is not yet really understood, although it is clear that O atoms, besides contributing to the generation of UV photons through the formation of excited NO molecules, are etching the micro-organisms. As a matter of fact, inactivation under very little or no UV radiation is achieved before erosion can reach the vital parts of the spore (Crevier *et al* 2002), raising the possibility of O atoms diffusing deeply inside the

spores and inducing lethal lesions through oxidation of their sensitive components (DNA, cytoplasmic membrane...) (Saoudi *et al* 2005, Kim and Kim 2006). Furthermore and more recently, the N atoms provided by the afterglow of N₂-O₂ discharges have been alleged to have some inactivation efficiency inasmuch as the micro-organism substrate holder has reached a certain minimum temperature due to surface recombination of these atoms (Villegier *et al* 2005). The above considerations show the importance of determining the density variation of N and O atoms in the afterglow as functions of the percentage of O₂ in the N₂-O₂ mixture; such data, once correlated with the spore survival curves obtained at different O₂%, should lead to more insight into the respective role of oxygen atoms and UV photons in the inactivation process of microorganisms by a plasma.

The aim of the present study is to obtain a flowing afterglow that is efficient in terms of microorganism inactivation and creates as less damage as possible to sensitive materials (e.g. polymers) to be sterilized while it also provides a uniform distribution of the active species within the entire sterilization chamber. In some of our previous works, we had observed a significant erosion of the reference spores and of a variety of polymers (Crevier *et al* 2002) in the afterglow chamber when the samples were located at or in the vicinity of the discharge tube axis ($z \approx 0$ in Figure 3-1 (a)). In contrast, at a few cm away from the axis, erosion was barely observable. The strong on-axis erosion is, as we will show, due to the action of the metastable state molecules that characterize, together with nitrogen molecular ions (N₂⁺ and N₄⁺ ions, see Gherman *et al* 2004), the so-called early afterglow.¹⁰ As is well known, the flowing afterglow of an N₂ discharge is composed of an early and a late afterglow. The early afterglow is designated as such because it is observed immediately past the discharge region; it is followed, further away from the discharge, by the late afterglow, comprising only neutral particles with barely no metastable state species. The acceptance of our sterilization process requires finding operating conditions (gas pressure, flow rate and added O₂ percentage to N₂, distance of the plasma source to the chamber entrance) that reduce, if not eliminate, the contribution from the early afterglow.

¹⁰ In absence of surface biasing, the (thermal) energy of ions is too low to sputter materials although other mechanisms of ion energy transfer (e.g. recombination with electrons) to surfaces are possible. The damaging role of the metastable N₂(A) and N₂(a') states appears more probable since they can de-excite collisionally on surfaces by yielding 6 and 8 eV respectively. In contrast, vibrationally excited N molecules in the electronic ground state simply bounce off from surfaces without losing energy (Guerra and Loureiro 1997).

To achieve these various tasks, we are going to use intensively optical emission spectroscopy. To characterize the early afterglow, we will first monitor the intense emission from the 1st negative system, namely the $N_2^+(B)$ to $N_2^+(X)$ transition (most intense band head at 391.4 nm; see appendix C for the main collisional reactions leading to the $N_2^+(B)$ ion excited state). We will also record the emission intensity of the transition from the $N_2(B)$ state to the $N_2(A)$ state, which is known as the 1st positive system; in the early afterglow, the kinetic route to the $N_2(B)$ state involves the $N_2(A)$ metastable state while in the late afterglow the $N_2(B)$ state essentially comes out from the interaction of $N(^4S) + N(^4S)$ ground-state nitrogen atoms, which then yields a significant overpopulation of the $N_2(B, v'=11)$ level. As a result, once the operating conditions have been defined and set such that, at the chamber entrance, there is no emission from the first negative system and that the $N_2(B, v'=11)$ level is overpopulated, we should be dealing, throughout the chamber, with a dominant late afterglow as required for optimum sterilization conditions. Operating under these conditions, we go on with determining, first through titration with added NO, the (absolute) value of the N and O atom densities immediately before the chamber entrance. Then, to obtain the spatial variation within the chamber of the N atom (relative) density, we use a complementary method, proposed by Bockel *et al* (1995) and based on monitoring the emission intensity from the $N_2(B, v'=11)$ to $N_2(A, v''=7)$ transition (at 580 nm). To gain insight into the loss and creation mechanisms of N and O atoms in the afterglow, we probe their densities in the discharge from which they originate, using the actinometry method. Finally, we examine the variation of the UV intensity from the NO_β system with respect to the variations of the N and O densities as functions of the O_2 percentage.

3.2 Experimental arrangement

The experimental set-up is shown in Figure 3-1(a). The discharge is sustained in a fused silica tube of 6 mm inner diameter (i.d.) and 8 mm outer diameter (o.d.) by means of a 2450 MHz electromagnetic surface wave launched with a surfatron (Moisan and Zakrzewski 1991). Close to the afterglow chamber, the 6 mm i.d. discharge tube widens, over approximately 2 cm, into a tube of 26/30 mm i.d./o.d. and of approximately 12 cm length, which ends through a vacuum O-ring on a circular hole made in the afterglow chamber wall (Figure 3-1(b)). The distance between the surfatron launching gap and the beginning of the widening of the tube, designated x_1 , can be varied while the distance x_0 from the beginning

of the widening of the tube and the chamber inner wall is fixed; the axial and transverse positions within the chamber are denoted by x and z , respectively. High purity N_2 is used alone or with admixture of O_2 as discharge gases. The flow rate of N_2 , $Q(N_2)$, is set at 2 standard liter/min (slm) and a percentage y of O_2 is added to N_2 , where $y(\%) = \{Q(O_2)/Q(N_2)\} \times 100$, using a precision flowmeter; the operating pressure in the afterglow chamber can be varied from 0.6 to 10 torr by means of a throttle valve. The microwave power to the wave launcher is set at 100 W. The main frame of the parallelepipedic 50 L afterglow chamber (internal dimensions: 28 cm \times 30 cm \times 60 cm) is made from aluminium with a fused silica window extending along it to allow for spectroscopic observations (Figure 3-1(a)).

The discharge and afterglow light emissions between 300–400 nm and 560–600 nm are collected with a collimator (3 mm diameter, 5 cm length) and sent, to be analysed, through an optical fibre to a spectrophotometer, as indicated in Figure 3-1(a); spectral resolution is 0.1 nm. The light emission from the discharge, essentially for comparison purposes with the afterglow, is recorded at 1 cm from the launching gap. The contribution of the early afterglow with respect to the late afterglow is achieved by: 1) monitoring the emission intensity of the 391.4 nm band-head of the 1st negative system at $x = 1.5$ cm, except otherwise mentioned; 2) recording the emission intensity of the $N_2(B, v'=11)$ to $N_2(A, v''=7)$ transition (580 nm) in the afterglow chamber at various x and z positions for different x_1 values. Both series of measurements were obtained by varying the following parameters: surfatron distance $x_1 = 3, 6$ and 10 cm, pressure from 0.6 to 10 torr, percentage y of O_2 between 0 and 10%

The N and O atoms densities are determined, in the afterglow chamber, by the NO titration technique (greater detail in Ricard *et al* 2001) and, in the plasma, by actinometry (Henriques *et al* 2005). Titration with NO requires the presence, in the late afterglow, of a calibrated NO flow (due to its toxicity, NO is strongly diluted in argon: Ar-1.5%NO). To ensure a good mixing of the NO gas with the incoming flowing-afterglow, NO is introduced in the 26 mm diameter tube, at 6 cm before the chamber at $x_0/2$ (see Figure 3-1(a)), and not in the chamber itself.

The chemiluminescence reactions related to the NO titration method (see below) are clearly observed in the late afterglow only at pressures between 1 and 5 torr. At higher gas pressure, e.g. at 6 torr, turbulences appear and the titration method is then inaccurate to

determine the N atom density (required to further determine the O atom density). Note that the total gas pressure in the reactor chamber increases, with respect to the value initially set with the N_2 - O_2 gas flow alone, as Ar-NO is injected.¹¹

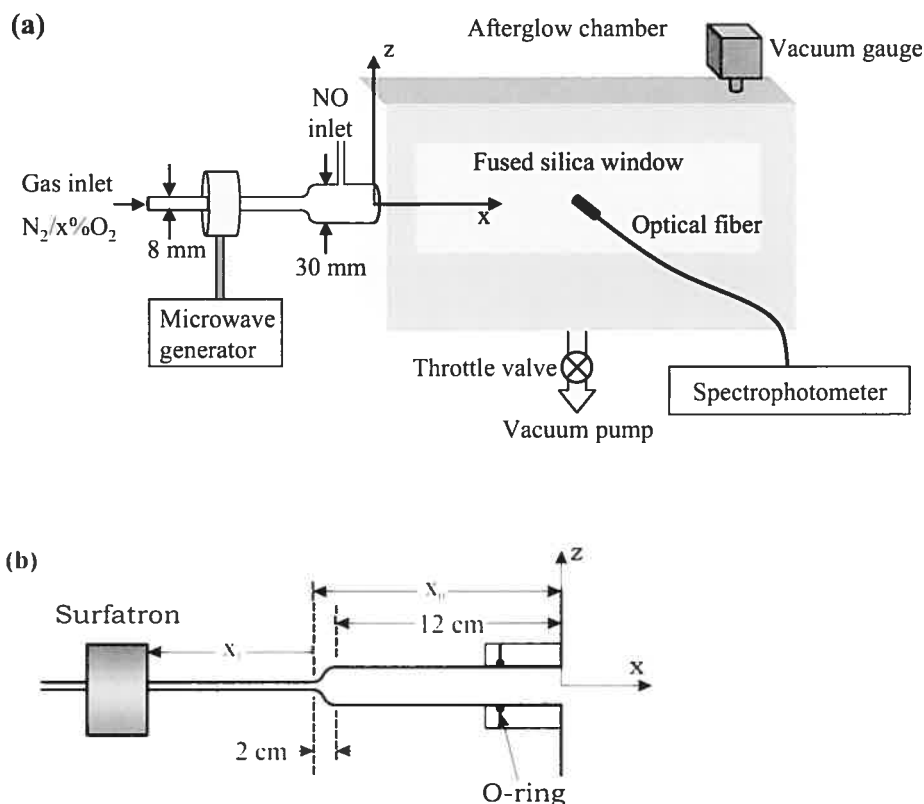


Figure 3-1. (a) Schematic representation of the basic flowing-afterglow system as used for plasma sterilization purposes. It is comprised of the microwave-sustained plasma source, operated at 2450 MHz, and of a 50 L afterglow chamber (sterilizer). The discharge tube of 6/8 mm i.d./o.d. connects to a larger 26/30 mm i.d./o.d. tube. The NO titration gas is introduced perpendicularly to the main gas flow into the larger diameter tube. (b) Configuration and dimensions of the tube linking the discharge region to the afterglow chamber where x_0 is fixed and x_1 varied between 3 and 10 cm (the NO injection inlet is not shown).

In the coming sections that deal with the results, we first briefly compare the characteristics of the early afterglow with those of the discharge and then with those of the

¹¹ The addition of NO (diluted in argon) to the N_2 - O_2 gas mixture in the course of the titration process (at pressures of 2 torr or less) raises by approximately 20% the maximum intensity of the NO_β system, but the percentage of O_2 in the mixture that yields the maximum of UV intensity remains the same.

late afterglow (section 3.3). In section 3.4, operating under late afterglow conditions, we determine the (relative) density of N atoms as a function of position within the chamber. Following this, we measure the (absolute) densities of N and O atoms by NO titration at the titration inlet position. In section 3.5, we probe through the actinometry technique the (relative) densities of N and O atoms in the discharge. Finally, in section 3.6 we examine the damage caused to polymer microspheres subjected to the afterglow.

3.3 Description and characterization of the early and late afterglows

3.3.1 Identification and characterization of the early afterglow with respect to the discharge

A strong intensity of the $N_2^+(B)$ state band head (391.4 nm) relatively to that of the $N_2(C)$ emission (394.3 nm)¹² is a signature of an early afterglow with respect to the discharge itself (Sadeghi *et al* 2001, Sa *et al* 2004, Levaton *et al* 2005). The $N_2(C)$ state is indeed more populated in the discharge, due to its excitation by electron collisions, whereas the electrons in the early afterglow, although possibly reaching density values as high as $3 \times 10^9 \text{ cm}^{-3}$ (Gherman *et al* 2004), are not energetic enough for that purpose; the $N_2(C)$ state in the early afterglow is, in fact, produced through a less efficient mechanism, the pooling reaction of $N_2(A)$ metastable molecules (see equation (C.4) in the appendix C). This study is carried out at 0.6 and 2 torr, at different percentages of added O_2 to N_2 and for a surfatron position $x_1 = 3 \text{ cm}$.

3.3.1.1 Low gas pressure case (0.6 torr).

At 0.6 torr and for a flow rate of 2 slm, the early afterglow seems to be dominant at the entrance of the chamber.¹³ Its emission spectra for an N_2 -0.2% O_2 mixture, recorded at the discharge-tube axis ($z = 0$ position) and at a distance $x = 1.5 \text{ cm}$ from the entrance of the afterglow chamber, are shown for the 300–400 nm part of the spectrum in Figure 3-2(a) and

¹² Although the intensity of the 315.93 nm line is much higher than that of the 394.3 nm line, it becomes buried under the NO_p system emission when adding O_2 and increasing gas pressure.

¹³ No distinction is made experimentally in what follows between the early afterglow and the pink afterglow, the latter being slightly delayed in time with respect to the former (Levaton *et al* (2005)). The term early afterglow therefore designates both these afterglows.

for the 560–600 nm range in Figure 3-2(b). In the violet part of the spectrum, one can identify the $N_2^+ 1^{st}$ negative system (strong intensity of its main band head at 391.4 nm), the $N_2 2^{nd}$ positive system with its various band head emissions at 315.93, 337.13, 380.49, 394.3, 399.84 nm, and the NO_β system having band head emissions at 304.3 (shown in Figure 3-4(a)), 320.69 and 358.35 nm; as for the red part of the spectrum, only the $N_2 1^{st}$ positive system emission is observed (Figure 3-2(b)). Figure 3-3(a) and Figure 3-3(b) show the same two spectral regions, but in the discharge itself.

Comparing Figure 3-2(a) and Figure 3-3(a), we observe a stronger intensity of the $N_2^+(B)$ state band head (391.4 nm) in the early afterglow with respect to the discharge plasma while, in contrast, the $N_2(C)$ emission (394.3 nm) is slightly stronger in the discharge. This leads us to introduce the intensity ratio $r = I(N_2^+, 391.4) / I(N_2, 394.3)$ to put into relief the main features of the early afterglow compared to those of the discharge. Under the present operating conditions, r is found to be 1.3 in the discharge while it is equal to 13 at the chamber entrance ($x = 1.5$ cm), indicating that the $N_2^+(B)$ state in the early afterglow is strongly populated relatively to the $N_2(C)$ state through heavy-particle collisions, and not by electrons. Such collisional processes (see appendix C, part I) are characteristic of the early afterglow, since electrons then have not enough energy to participate in such excitation processes. The value of r reduces as the percentage of added O_2 is increased in the N_2 - O_2 mixture, as shown in table 1. This decrease could be mainly the result of the quenching by O_2 of the $N_2(a')$ metastable-state molecules (Kossyi *et al* 1992, reaction (115)) that are required to generate the $N_2^+(B)$ state (see equation (C.2) in the appendix C).

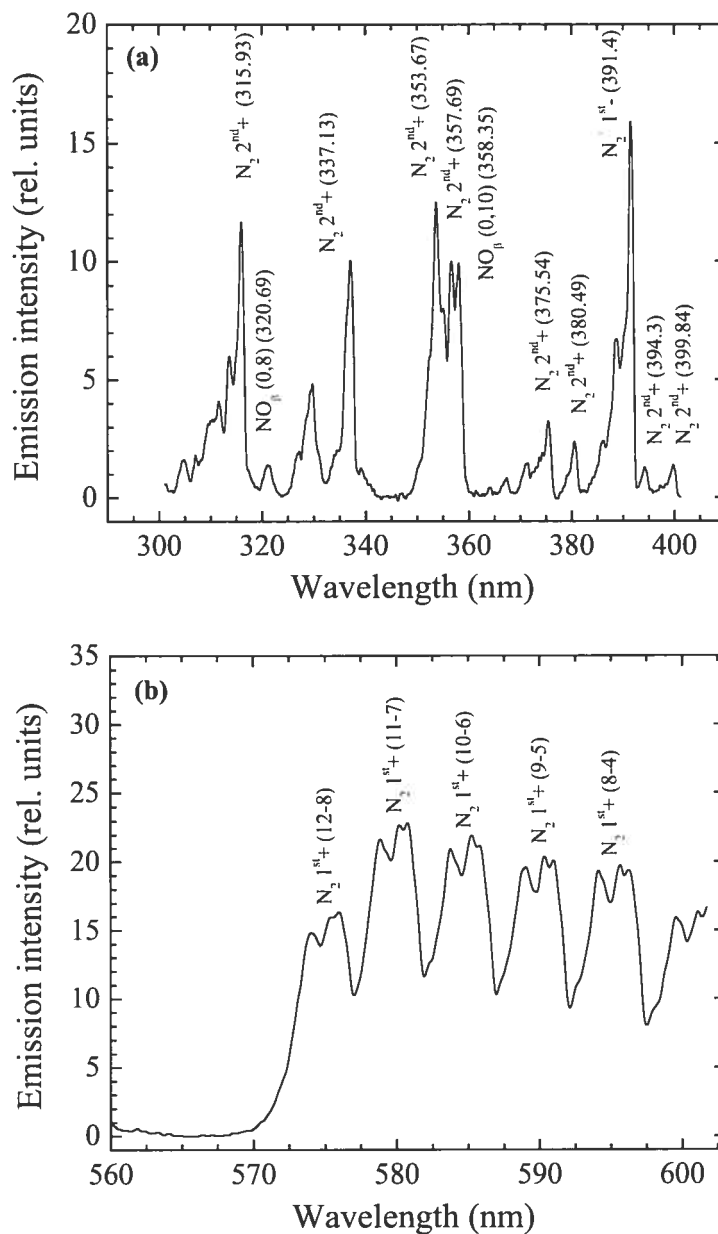


Figure 3-2. Observed emission spectra in the N_2 -0.2% O_2 early afterglow at 0.6 torr, 2 slm N_2 and 100 W: a) 300–400 nm spectral range with identification of the characteristic band head of the N_2^+ 1^{st} negative system (391.4 nm), of the band heads of the N_2 2^{nd} positive system and of some of the NO_β system; b) 550–600 nm spectral range: the N_2 1^{st} positive-system band heads are identified by their upper and lower-level vibrational quantum numbers, v' and v'' . The spectral resolution is 0.2 nm and the collimator aims at the chamber at $x = 1.5$ cm from its entrance plane and at $z = 0$, the plasma source axis.

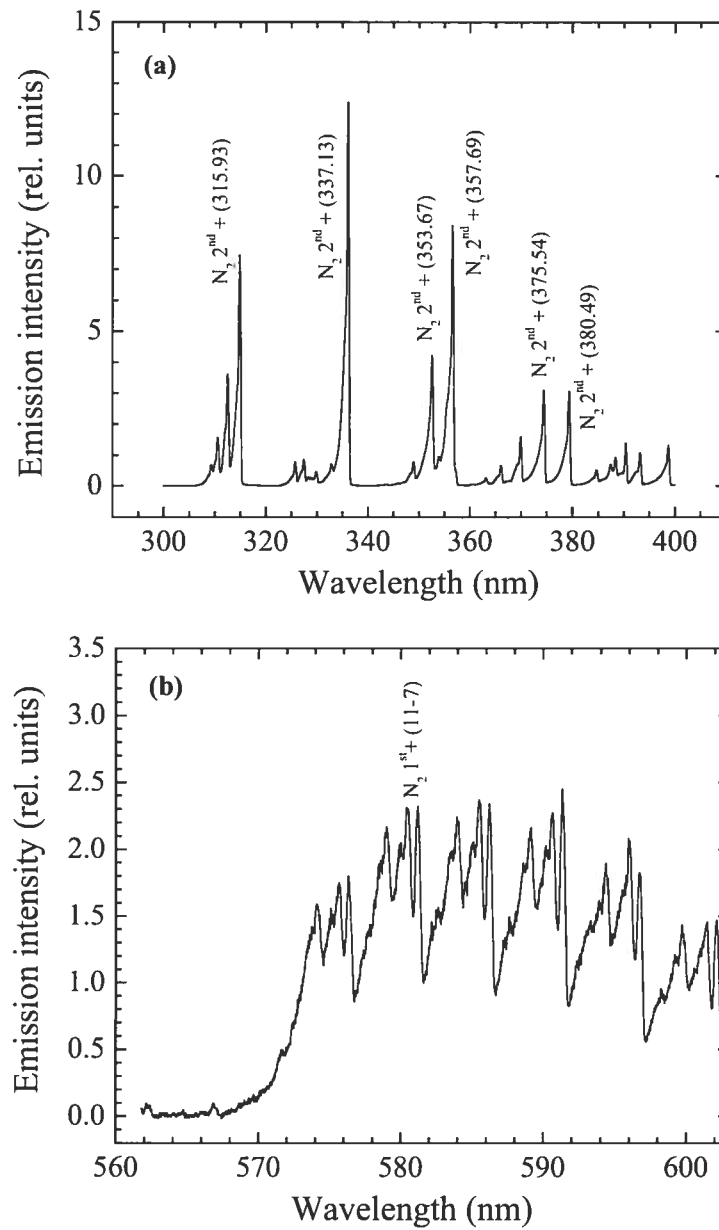


Figure 3-3. Observed emission spectra from the N_2 -0.2% O_2 discharge itself at 2 cm from the launching gap, for the same two spectral domains ((a) and (b)) and otherwise under the same operating conditions as in Figure 3-2.

Table 3-1. Emission intensity ratio r of the N_2^+ 391.4 nm band head to that of the N_2 2nd positive system at 394.3 nm as a function of the percentage y of O_2 added to 2 slm N_2 and at 100 W, as measured in the discharge tube (DT) at 1 cm from the surfatron launching gap and in the early afterglow (EA) at $x = 1.5$ cm and $z = 0$ in the chamber.

y (%)	0.6 torr		2 torr	
	$I(N_2^+)/I(N_2)$		$I(N_2^+)/I(N_2)$	
	DT	EA	DT	EA
0	1.3	12.5	1.5	6.3
0.2	1.3	12.9	1.5	6.6
0.5		8		3
1		3		

3.3.1.2 Higher gas pressure case (2 torr).

The emission spectra of the afterglow taken at $z = 0$, the plasma source axis, and at $x = 1.5$ cm from the reactor entrance, at 2 torr, are shown in Figure 3-4(a) and (b), for the same spectral ranges as in Figure 3-2(a) and (b) (at 0.6 torr). The intensity ratio r at 2 torr equals 6.3 in the afterglow (Table 3-1) while it is 1.5 in the discharge itself (spectra not shown). Compared to the case of 0.6 torr, this clearly shows that increasing the pressure reduces the extent of the early afterglow region, as confirmed experimentally by the shrinking (both radially and axially) of the early afterglow beam. For O_2 percentages higher than 0.2, the r value decreases abruptly, for the same reason as with 0.6 torr (Table 3-1). Increasing the pressure not only leads to a decrease of the population of the $N_2^+(B)$ state but also to that of all N_2 excited states, including $N_2(C)$, as a result of metastable quenching, while there is a strong increase of the NO_β system emission (compare Figure 3-2 and Figure 3-4). In contrast, the intensity of the $N_2(B, v'=11)$ to $N_2(A, v''=7)$ transition increases with pressure relatively to the neighbouring transitions (Figure 3-4(b)), denoting an overpopulation of the $N_2(B, v'=11)$ upper level, which is indicative of a larger contribution from the late afterglow (see further). In summary, increasing the N_2 gas pressure and/or the O_2 percentage in the mixture reduces the contribution from the early afterglow and increases that of the late afterglow.

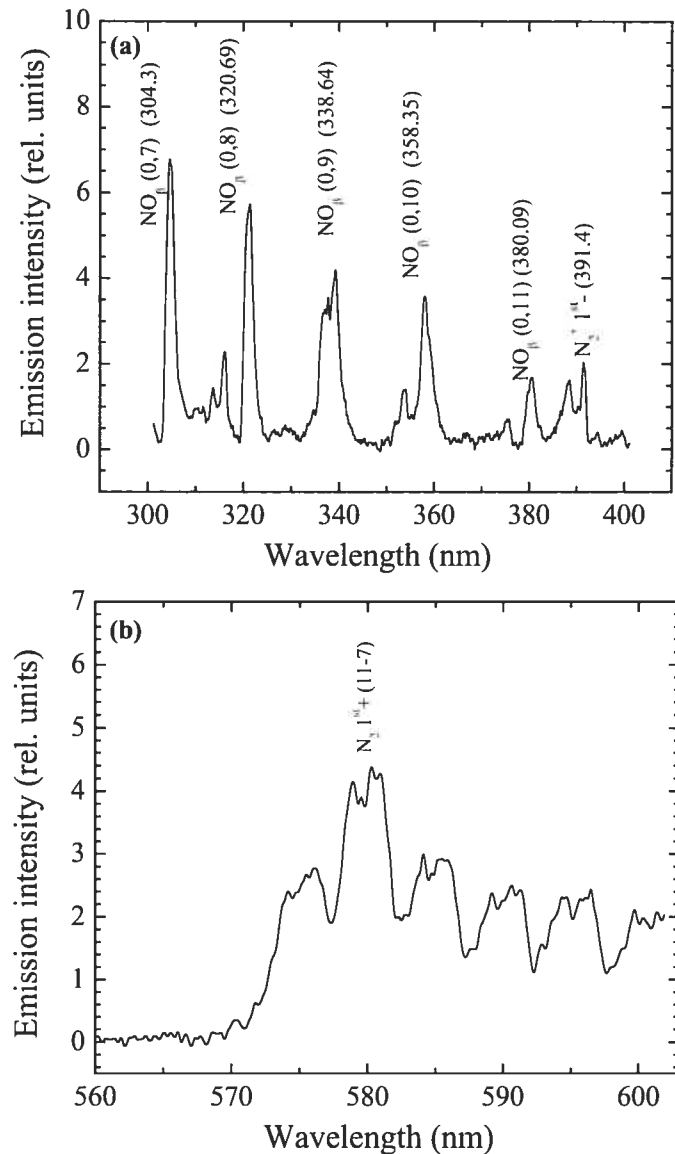


Figure 3-4. Emission spectra in the N_2 -0.2% O_2 early afterglow at 2 torr: a) 300–400 nm spectral range; b) 550–600 nm spectral range. The collimator aims at the chamber at $x = 1.5$ cm from its entrance plane and at $z = 0$, the plasma source axis. The relative units appearing in Figure 3-2(a), Figure 3-3(a) and Figure 3-4(a) are the same, and thus can be compared, and similarly as concerns Figure 3-2(b), Figure 3-3(b) and Figure 3-4(b).

3.3.2 Contribution of the early afterglow in a late afterglow environment

Before examining in detail the characteristics of both afterglows, we comment their visible aspects. Consider a constant flow rate of 2 slm of the carrier gas (N_2), with no added O_2 . When working at a pressure of 0.6 torr, the afterglow, which starts at the end of the discharge region, appears in the chamber as an orange-yellow cylindrically-shaped beam, approximately 3 cm in diameter, that ends at 30 cm away from the chamber entrance. When

the gas pressure reaches 2 torr, the afterglow beam in the chamber is in the form of a glowing beam that reduces to approximately 1 cm in diameter and 15 cm in length; above 3 torr, no such beam is observed. Similar observations have been obtained with the N₂-O₂ mixture for percentages of added O₂ not exceeding 0.5%. The presence of an afterglow beam indicates a significant contribution from the N₂⁺(B) early afterglow while the absence of such a beam does not imply that the contribution from the early afterglow in terms of metastable species is negligible, hence the method that we now present to evaluate such a contribution.

3.3.2.1 Abacus representation of the N₂(B, v') state densities as a means of determining the relative contribution of the early and late afterglows.

This method allows to somehow quantify on a 0 to 1 scale the relative contribution of the early afterglow with respect to the late afterglow (also called Lewis-Rayleigh afterglow). It is based on the plot of the population distribution of the vibrational states of the B level of the N₂ 1st positive system (B³Π_g - A³Σ_u⁺), present in both types of afterglow. When the observed populations of these states, identified by the vibrational quantum number v' (v' = 7 to 12), tend to accumulate at v'=11, it is indicative of a late afterglow (see equation (C.7) in the appendix C and Bockel *et al* 1995); in contrast, in a pure early afterglow, the population of these vibrational levels tends to decrease as v' increases (Boltzmann-like distribution).

To take advantage of this fact, following Bockel *et al* (1995), we introduce, for a given vibrational state v', its (normalized) density distribution $R_{B,v'}$:

$$R_{B,v'} = [N_2(B, v')] / \sum_{v'=7-12} [N_2(B, v')]. \quad (3.1)$$

$R_{B,v'}$ is determined by recording the emission intensity of the corresponding vibrational transitions v' to v'', which is assumed to be proportional to $[N_2(B, v')]$, the upper level density in the present case. Then, to quantify the relative contribution of the early and late afterglows when both are involved, we assume $R_{B,v'}$ to result from a linear combination of the density distribution of these two types of afterglow:

$$R_{B,v'} = ar_{B,v'}(\text{late}) + br_{B,v'}(\text{early}) \quad (3.2)$$

where the $r_{B,v'}(\text{late})$ and the $r_{B,v'}(\text{early})$ (normalized) density distributions are obtained experimentally in the case of a pure late afterglow ($a = 1$ and $b = 0$) and of a pure early afterglow ($a = 0$ and $b = 1$) respectively. Varying the coefficients a ($b = 1 - a$) enables one to obtain the abacus plotted in Figure 3-5 as a function of v' . This abacus is used to characterize the relative importance of the two types of afterglow for given operating conditions. Figure 3-5 has been obtained for a pressure of 4.5 torr (6.6 hPa), which is not too far from our experimental conditions (0.6–5 torr).

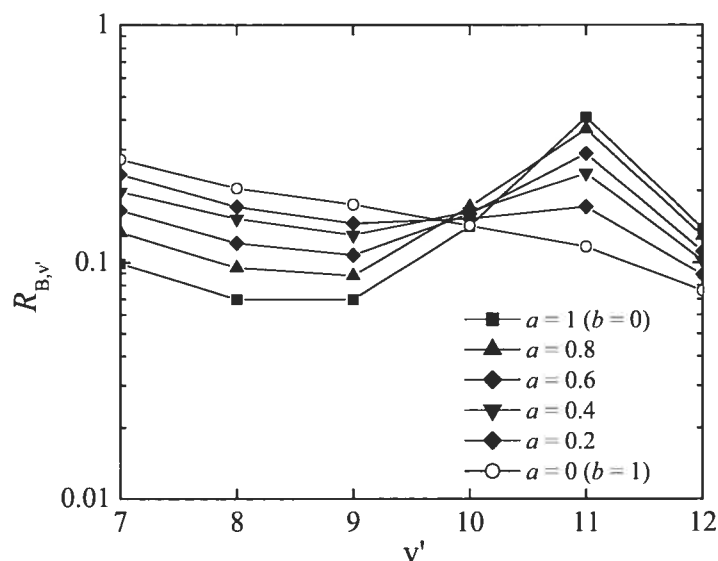


Figure 3-5. Plot of $R_{B,v'}$, the normalized density distribution of the v' vibrational level, as a function of v' , for the $N_2(B^3\Pi_g)$ electronic state, the upper level of the N_2 1st positive system (from Bockel *et al* 1995). This abacus is obtained by combining linearly the experimental density distribution from a pure early-afterglow ($a = 0$) and that from a pure late-afterglow ($a = 1$), using expression (3.2).

As an example of the use of the abacus in Figure 3-5, the spectrum in Figure 3-2(b) yields $a = 0$, implying a dominant early-afterglow. Varying the percentage of O_2 from 0 to 1% in the N_2 - O_2 mixture at 0.6 torr (not shown) does not affect the vibrational distribution, yielding the same result for a . In contrast, Figure 3-4(b) shows an enhancement of the N_2 1st positive system band-head intensity at $v' = 11-7$ (≈ 580 nm): the parameter a is actually

found to be approximately 0.2, indicating a weak contribution of the late afterglow, at 2 torr than at 0.6 torr ($a = 0$). The abacus method and Figure 3-5 will be used further in this article.

3.3.2.2 Operating parameters affecting the characteristic species of the early afterglow.

In section 3.3.1, we have seen that the presence of the early afterglow in the chamber was reduced when increasing pressure (0.6 to 2 torr range tested) and by increasing the O₂ content (0 to 1% range tested). This study needs to be completed: i) the best operating conditions of the sterilizer imposes the pressure to be higher, in the 2 to 10 torr range; ii) increasing the percentage of O₂ admixed to N₂ is efficient in reducing the contribution from the early afterglow, but inactivation of microorganisms in our system requires the O₂ content to be adjusted to provide maximum UV intensity, restricting it to the 0–1% range; iii) the increase of the distance between the surfatron launching gap and the chamber entrance can reduce the contribution from the early afterglow (N₂⁺ (and N₄⁺) ions and N₂ metastable states) in the chamber, since the travelling time of the short-lived species of the early afterglow is augmented, eventually preventing them from reaching the chamber entrance.

Influence of the gas pressure

Figure 3-6(a) is a recording of the intensity variation of the 391.4 nm band head in the 30 mm tube at $x_0/2$ (NO injection inlet position as shown in Figure 3-1(b)) with a surfatron position $x_1 = 3$ cm and for three different pressures. The 391.4 nm emission had to be recorded at $x_0/2$, upstream of the chamber, since this emission is too weak when the pressure in the chamber is increased above 5 torr. We observe that there is no significant decrease of the N₂⁺ ion contribution when pressure is raised from 2 to 5 torr while, at 10 torr, the band-head intensity has dropped by a factor of 2.

Figure 3-6(b) plots the emission intensity from the 1st positive system (N₂(B) to N₂(A) transition) in the 560–600 nm range at the same observation position as in Figure 3-6(a). It shows only a slight increase, at 10 torr, of the population density of the $v' = 11$ upper level relatively to the other vibrational levels displayed. This means that, even at 10 torr, there still remains a significant contribution to the N₂(B) state from the metastable species of the early afterglow. It follows from Figure 3-6(a) and Figure 3-6(b) that increasing the gas pressure from 5 to 10 torr is not an efficient solution for strongly reducing

the density of both the molecular ions and the N_2 metastable molecules. Furthermore, as far as sterilization is concerned, operating at 10 rather than 5 torr leads to a strong transverse inhomogeneity of the active species (UV photons in particular), which is detrimental to the process.

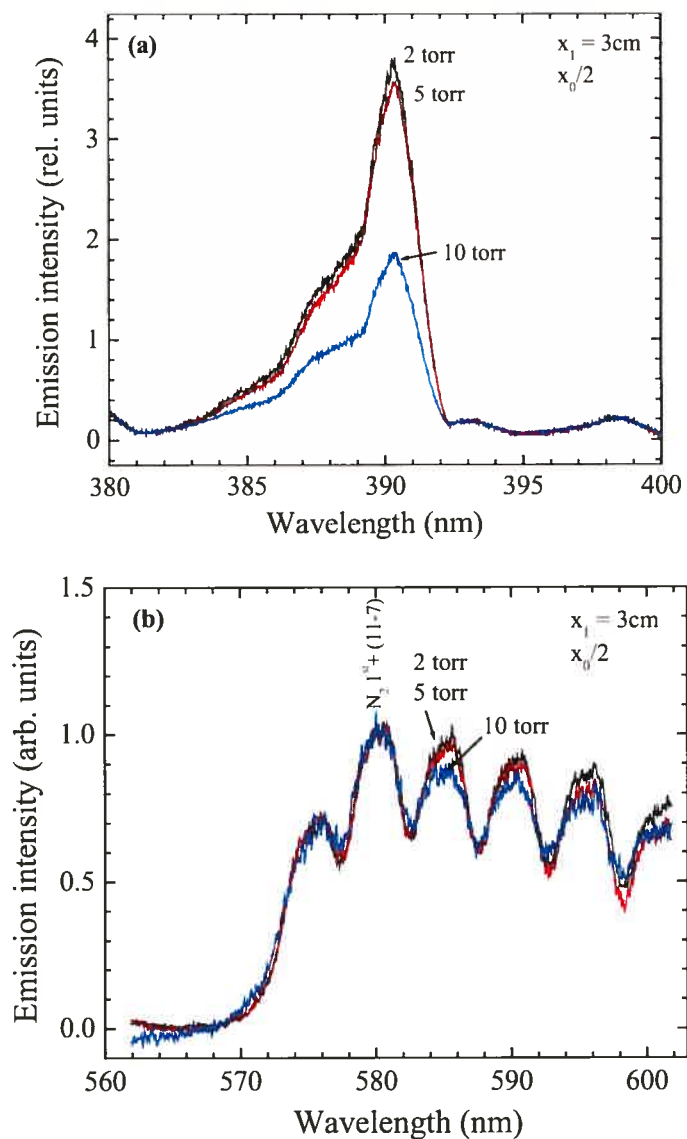


Figure 3-6. (a) Intensity variation of the 391.4 nm band head recorded in the 30 mm tube at $x_0/2$ (NO injection inlet) for a surfatron position $x_1 = 3$ cm, N_2 gas without added O_2 . Other conditions as in Figure 3-2; (b) Emission intensity, at the same observation position as in Figure (a), from the 1st positive system ($N_2(B)$ to $N_2(A)$ electronic transition) in the 560–600 nm range showing the evolution of a few ro-vibrational transitions at three different pressures. The spectra are normalized at the $v' = 11$, $v'' = 7$ transition. The parameter a in the abacus is 0 for 2 and 5 torr, 0.1 for 10 torr.

Influence of the percentage of added O₂

The addition of O₂, as already shown in Table 3-1 (section 3.3.1), can also reduce the contribution of the early afterglow species. Figure 3-7(a) is a recording of the emission intensity of the first negative system at the 391.4 nm band head in the chamber at the tube axis ($z = 0$) and at axial position $x = 1.5$ cm, at 2 torr with $x_1 = 3$ cm, under different percentages of added O₂ (see Figure 3-1(b) for the coordinate system). We observe that for a percentage of added O₂ as low as 0.2%, the band head intensity decreases by a factor of 6 (Capitelli *et al* 2000). At 1% of O₂, which corresponds approximately at that pressure to the maximum NO _{β} UV intensity, the peak intensity of the band head is almost zero, implying that, practically speaking, there are no ions left from the early afterglow at this position. The density of the N₂ metastable species in the early afterglow is also significantly reduced when adding as little as 0.2% of O₂ to N₂, as can be seen in Figure 3-7(b). This figure also shows that the $v' = 11$ level becomes at 1% largely overpopulated compared to the other vibrational levels.

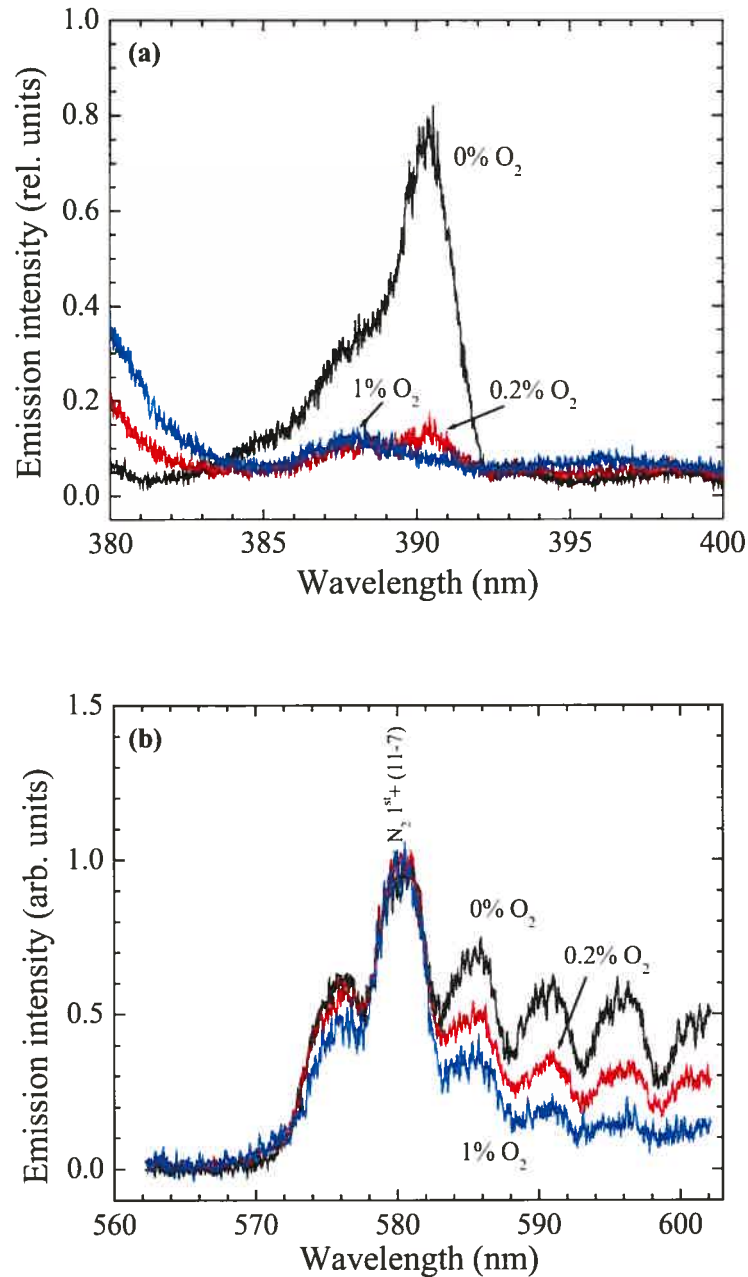


Figure 3-7. (a) Emission intensity of the first negative system at the 391.4 nm band head in the chamber at the tube axis ($z = 0$) and at axial position $x = 1.5$ cm, at 2 torr with $x_1 = 3$ cm, under different percentages of added O₂; (b) emission intensity from the 1st positive system (N₂(B) to N₂(A) transition) under different percentages of added O₂, other conditions as in Figure 3-7(a). The abacus in Figure 3-5 approximately yields $a = 0.2$ at 0% O₂, 0.6 at 0.2% O₂ and reaches almost 1 at 1% O₂, indicating in this last case a really dominant late afterglow.

Influence of the surfatron position

Figure 3-8 shows the transverse variation, with respect to the discharge tube axis ($z = 0$), of the emission intensity of the main band head (391.4 nm) of the 1st negative system at a fixed axial position $x = 1.5$ cm in the chamber, at 2 torr and with no added O_2 , at three different positions x_1 of the surfatron. The emission intensity is maximum close to the tube axis ($z = 0$) and decreases rapidly as the collimator is moved away from the axis in the transverse direction. The waist of the $x_1=3$ cm curve is representative of the afterglow beam width, indicating that the early afterglow exists only in a limited region (± 2 cm) of the chamber located around the tube axis. Comparing the maximum intensity of each recording, we find that it decreases by a factor of 7 from $x_1 = 3$ cm to $x_1 = 6$ cm and by a factor of 30 from $x_1 = 3$ cm to $x_1 = 10$ cm.

Figure 3-9 shows the intensity variation of the 391.4 nm band head, this time in the 30 mm tube at mid-position ($x_0/2$: NO injection inlet) at $x_1 = 3$ and 10 cm. We observe that the contribution of the N_2^+ ions to the early afterglow, even at this upstream position closer to the plasma source, is negligible for $x_1 = 10$ cm. Moving the plasma source away from the afterglow chamber is definitely an efficient way of eliminating the early afterglow.

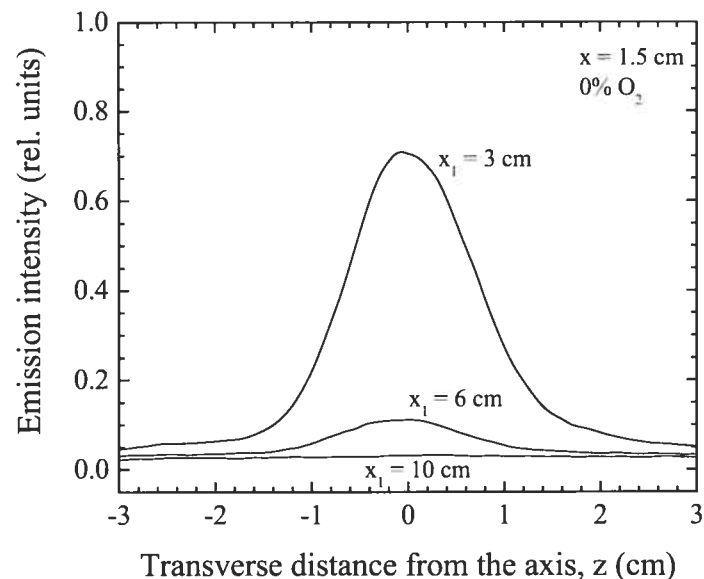


Figure 3-8. Transverse variation, with respect to the discharge tube axis ($z = 0$), of the emission intensity of the main band head (391.4 nm) of the 1st negative system at a fixed axial position $x = 1.5$ cm in the chamber, at 2 torr and with no added O_2 , for three different positions x_1 of the surfatron.

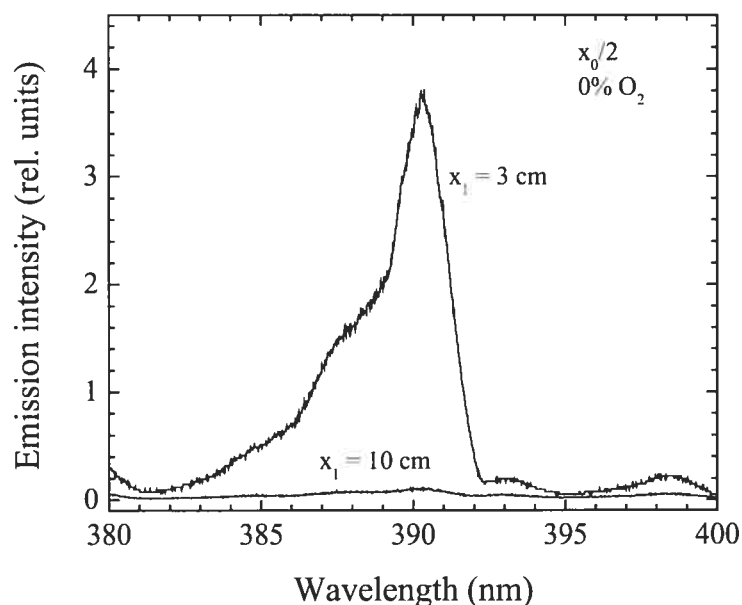


Figure 3-9. Emission intensity variation of the 391.4 nm band head of the 1st negative system in the 30 mm o.d. tube at mid-position ($x_0/2$: NO injection inlet), at 2 torr and with no added O_2 , for surfatron positions x_1 of 3 cm and 10 cm.

Figure 3-10 (a) and (b) show the emission intensity from the 1st positive system ($N_2(B)$ to $N_2(A)$ transition) in the 560–600 nm range at the tube axis ($z = 0$) and for a fixed axial position $x = 1.5$ cm in the chamber, at 2 torr and with no added O_2 , for surfatron positions $x_1 = 3$ cm and 10 cm. The intensity from the various ro-vibrational levels decreases by at least a factor of 6 from $x_1 = 3$ cm to $x_1 = 10$ cm, as shown in Figure 3-10(a). To monitor the changes in the density distribution of the various ro-vibrational levels, the two spectra are normalized with respect to the $v', v'' = 11-7$ transition, as shown in Figure 3-10(b). We observe that for $x_1 = 10$ cm, the $v' = 11$ level is much more populated than the other levels recorded, in comparison with the $x_1 = 3$ cm case. Such a relative overpopulation of the $v' = 11$ level clearly indicates an enhancement of the late afterglow contribution. It also means that the density of the $N_2(A)$ metastable state contributing to the population of the $N_2(B)$ state through reactions (C.5) and (C.8) has decreased in an important way whereas reaction (C.7) is enhanced.

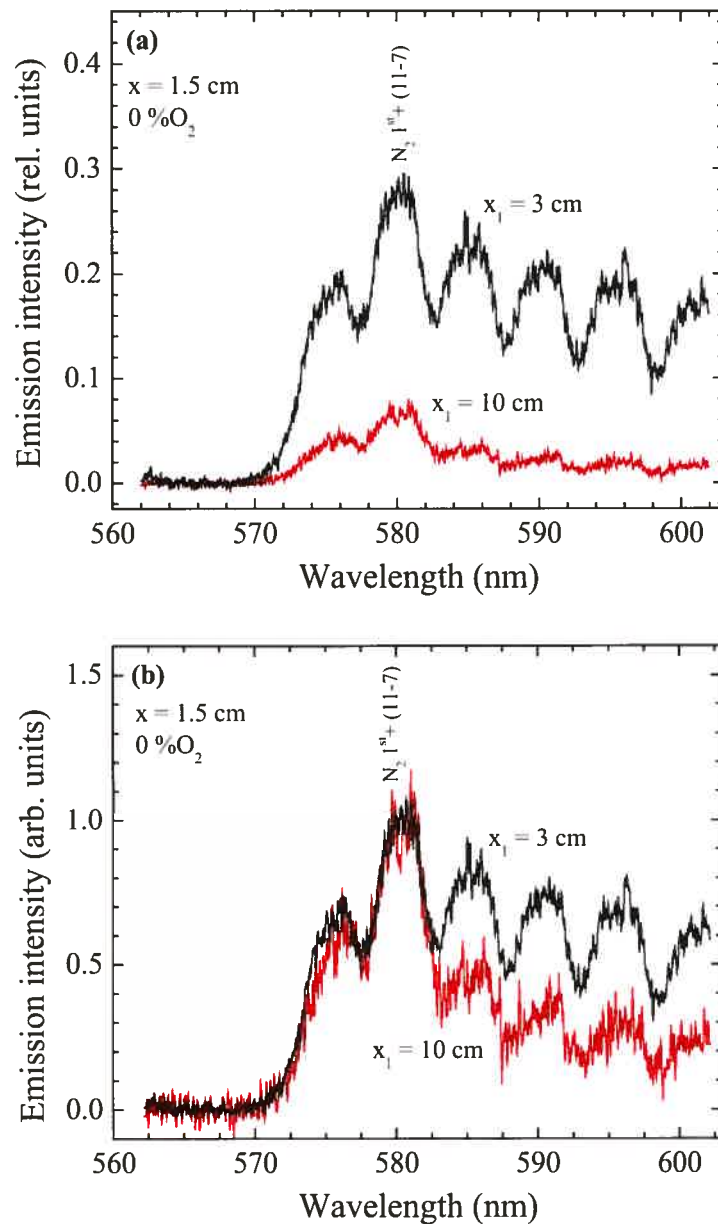


Figure 3-10. (a) Emission intensity from the 1st positive system ($N_2(B)$ to $N_2(A)$) transition) in the 560–600 nm range in the chamber at the axis ($z = 0$) and for a fixed axial position $x = 1.5$ cm, at 2 torr and with no added O_2 , with surfatron positions $x_1 = 3$ cm and 10 cm; (b) The two spectra in Figure 3-10(a) have been normalized at the intensity of the $v' = 11$, $v'' = 7$ transition at $x_1 = 3$ cm for an easier comparison. The parameter a is approximately 0.2 at $x_1 = 3$ cm while it is 0.6 at $x_1 = 10$ cm.

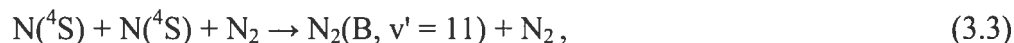
In summary, moving the surfatron away from the chamber entrance reduces the contribution from both the ions and the metastable species of the early afterglow, but it is actually more effective in reducing the presence of ions. On the other hand, increasing the percentage of added O_2 seems to be more efficient in reducing the contribution from the metastable species, as a result of O_2 quenching. Increasing the gas pressure is of no real practical interest since it only slightly reduces the early afterglow contribution; furthermore, raising the pressure above 5 torr leads to a less uniform distribution of the active species in the sterilization chamber, which should be avoided. When considering operating conditions for sterilization purposes, the percentage of added O_2 is not a free parameter as it needs to be set for maximum UV intensity; nonetheless, this percentage of added O_2 being close to 1%, it reduces significantly the early afterglow contribution. Finally, increasing the distance of the discharge from the chamber appears to be the adequate parameter for further reducing the contribution from the early afterglow, bringing it at the level required for damage control.

3.4 Density of N and O atoms

In the first coming section, we determine the spatial variation in the afterglow chamber of the N atom (relative) density, using a method, proposed by Bockel *et al* (1995), to be described below. Then, in the second section, using a titration technique based on NO addition to the afterglow, we obtain the N and O atom (absolute) densities at the NO injection plane. Bockel's method, which yields local values of the N atom (relative) density, is straightforward and easy to use provided the emission intensity measurements are carried out in a late afterglow. In contrast, the titration technique is not that simple to utilize as we will see and gives the density value at a fixed location. This is because it relies critically on an adequate mixing of the externally introduced NO_{ext} with the afterglow, which makes it necessary to introduce the NO gas, upstream of the chamber, in a confined region of the afterglow such that all N atoms react with the added NO gas. Finally, in the third section we compare the results obtained from both methods.

3.4.1 Concentration of N atoms in a late afterglow environment (Bockel's method)

Since the (almost) unique kinetic route to the $N_2(B)$ state in a pure late afterglow (see appendix C part II for detail) is:



the N atom density, $[N]$, can thus be obtained by recording the band head intensity at 580 nm of the 1st positive system, $I(N_2)$, since the population balance of the $N_2(B)$ state under steady-state conditions leads to:

$$I(N_2) = C_1 d A(N_2) [N]^2 [M] k_1 / (\nu_1 + k_2 [M]), \quad (3.4)$$

where C_1 , a coefficient related to the spectral response of both the light collecting system and spectrophotometer, depends on the energy of the photons, d is the thickness of the radiative medium that can be assumed to be optically thin for the various components of the molecular system; $A(N_2)$ is the spontaneous radiative frequency (transition probability) for the band head; $[M]$ stands for the concentration of N_2 or O_2 molecules, k_1 is the rate coefficient for reaction (3.3), ν_1 is the global (through all possible channels) radiative loss frequency of the $N_2(B)$ state and k_2 is the quenching rate coefficient of the $N_2(B)$ radiative states by M (Ricard *et al* 2001). The k_2 values can be found in Gordiets and Ricard (1993). As a result, the N atom density can be expressed as depending only on $I(N_2)$ as:

$$[N]^2 = k I(N_2) \quad (3.5)$$

where $k = (\nu_1 + k_2[M]) / C_1 d A k_1 [M]$. In the case where all the parameters making up k are not known, the relative value of the concentration $[N]$ stemming from equation (3.4) can be turned into an absolute density value by calibration with results from NO titration (Mérel *et al* 1998). Relation (3.5) can be used only in a dominant late afterglow ($a \geq 0.5$) since we are assuming that the $N_2(B)$ state is populated exclusively by N + N atoms recombination

(relation (3.3)) and not through excited N_2 molecules (equations (C.5) and (C.6) of the appendix C) as is the case in the early afterglow.

Figure 3-11(a), (b) and (c) show the N atom (relative) density as a function of the percentage of added O_2 at different axial (x) and transverse (z) positions, for pressures of 2, 5 and 10 torr, respectively. A marked maximum of N atom density appears for O_2 percentages in the 0.05 to 0.15 range followed by its rapid decrease as the O_2 content is increased. Spatial uniformity at 2 and 5 torr appears fairly good for both axial and transverse variations. In contrast, at 10 torr the density of N off-axis ($z = 10$ cm) differs significantly from its value at the axis ($z = 0$), which can be attributed to a reduced diffusion velocity of N atoms in the transverse direction due to a higher collision rate as pressure is increased. For both the 2 and 5 torr cases, the value of $[N]$ slightly increases along the axis.

The N atom values obtained at $x = 1.5$ cm must be considered with caution since the contribution from the early afterglow at this position is not negligible (for O_2 percentages $< 1\%$ O_2) while the assumptions of the method requires a dominant late afterglow. However, since the dispersion of the values of the N atom density recorded at different positions throughout the chamber is small, this suggests that the density values deduced for $x = 1.5$ cm by Bockel's method are realistic.

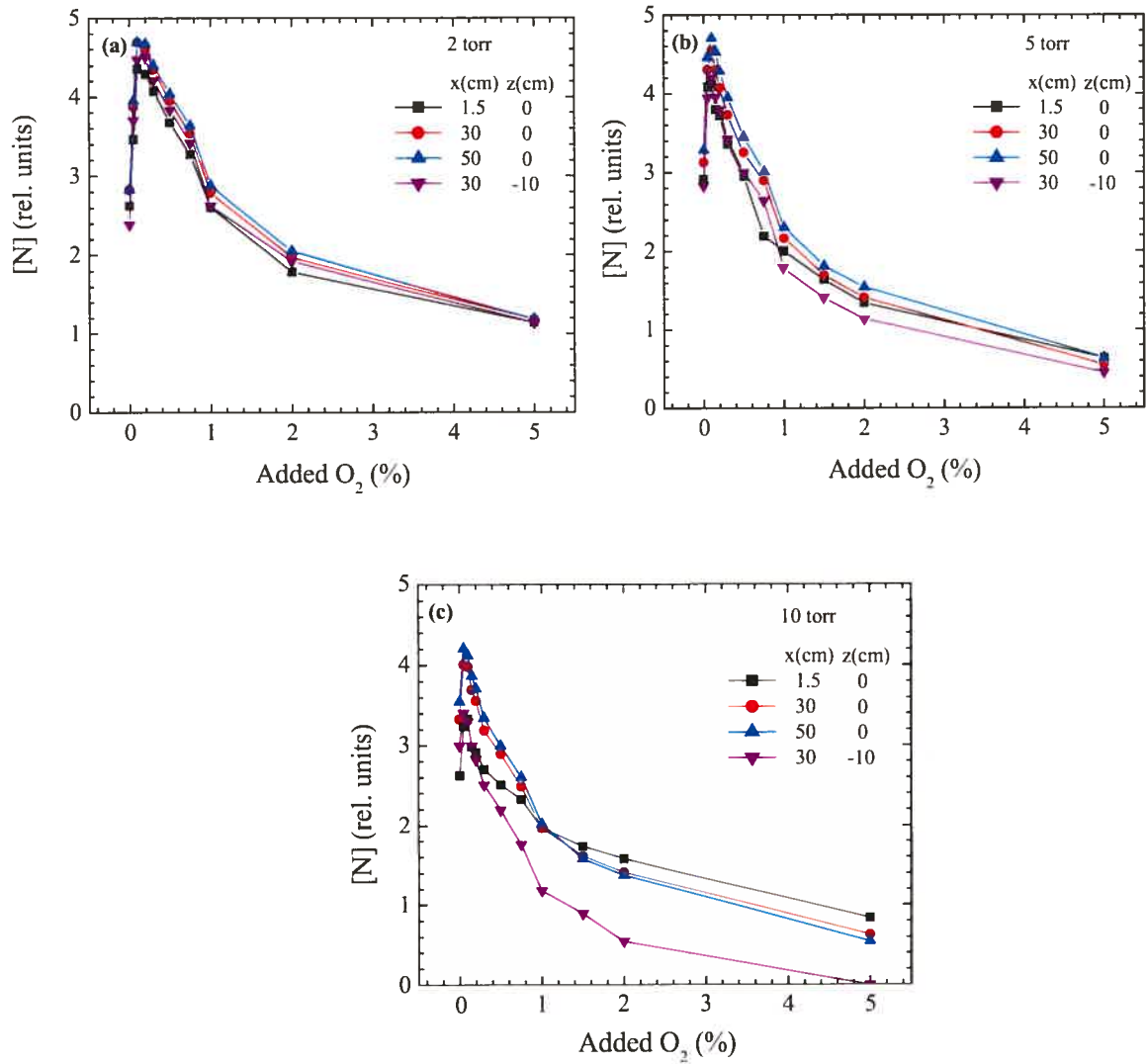


Figure 3-11. Relative density of N atoms (obtained through $I(N_2)$) as a function of added O_2 percentage for $x_1 = 10$ cm, as recorded at different axial and transverse positions for different pressures: (a) 2, (b) 5 and (c) 10 torr. Recall that the 50 L chamber length is 60 cm and its height 28 cm.

A similar interpretation can be considered for the case where the position x_1 of the surfatron is decreased from 10 to 3 cm, thereby increasing the early afterglow contribution (section 3.3.2.2). Nonetheless, the density values obtained at $x = 50$ cm are quite the same as shown in Figure 3-12. Noting that the density values obtained at 1% O_2 are the same and that these correspond for both $x_1 = 3$ and 10 cm to a dominant late afterglow is indicative of very small losses of N atoms when increasing the distance between the plasma source and the chamber.

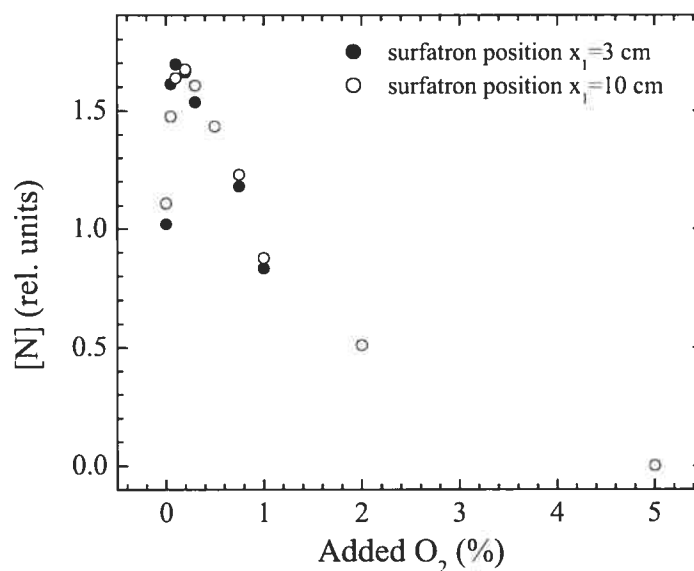


Figure 3-12. Relative density of N atoms (obtained through $I(N_2)$) at a fixed position ($x = 50$ cm, $z = 0$) as a function of the percentage of added O_2 , at a pressure of 2 torr, for two different positions x_1 of the surfatron.

Remark

i) Relation (3.5) should be considered as an approximation allowing to determine the relative contribution of the two types of afterglow. A more complete description can be found in Levaton *et al* (2005), where, for instance, the contribution of $N + N$ reactions to the population of the N_2 ($B^3\Pi_g$) state (reaction (3.3)), not taken into account by Bockel in the early afterglow, is shown to be non negligible. The approach of Levaton *et al* (2005) is, however, more complicated to utilize since it requires to estimate the N_2 (X, A) vibrational temperatures while the model of Bockel *et al* is satisfactory when one aims, as we do, at following qualitatively the evolution from a dominant early afterglow to a dominant late afterglow.

ii) Relation (3.5) can be formally extended to the case of a late afterglow comprising a slight contribution from the early afterglow by introducing the weighting parameter a' , to be determined according to Levaton *et al* (2005). It amounts to rewriting (3.5) as:

$$[N]^2 = ka'I(N_2). \quad (3.6)$$

3.4.2 Determination of the density (absolute value) of N and O atoms in the afterglow through NO titration

In the previous section (3.4.1), we have determined the spatial distribution of the N atom relative density. The titration method offers the possibility of obtaining the absolute value of this density, in practice at a given and fixed position. Furthermore, titration can also probe the absolute value of the O atom density. For comparison purposes, the titration measurements are also achieved under dominant late afterglow conditions, as done in section 3.3.2.2. In the following, we recall the main expressions and steps involved in using the titration method (Ricard *et al* 2001).

3.4.2.1 Relation yielding the N atom density in an N₂ afterglow.

We start by considering the case where no O₂ is added to N₂. The N atoms of the afterglow react with the externally supplied NO, noted NO_{ext}, to yield O atoms according to the following efficient (fast) reaction:

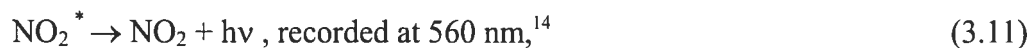


Then, the created O atoms and the N atoms can interact in the afterglow in the presence of a third body M (N₂ or O₂) to yield excited NO(B) molecules, which in turn emit UV photons in the NO_β system (part of this emission spectrum, shown in Figure 3-4(a), is in the 300–400 nm domain) following the reactions:



where NO(B) is the upper level and NO(X) (the electronic ground state of the NO molecule), the lower level of the transition yielding the NO_β system. Reaction (3.8) can go on providing NO_β emission as long as $Q(\text{NO}_{\text{ext}}) < Q(\text{N})$, where $Q(\text{NO}_{\text{ext}})$ is the flow rate of NO_{ext}, and $Q(\text{N})$ that of N atoms. Indeed, when $Q(\text{NO}_{\text{ext}}) \geq Q(\text{N})$, all the N atoms react with NO_{ext}: one can then say that all the N atoms have been "transformed" into O atoms (reaction

(3.7)). As a result, there are no more N atoms available for reaction (3.8) to occur, the NO_β system emission therefore extinguishes, and instead the following reactions take place:



where NO_2^* and NO_2 designates an excited state of NO_2 and its ground state, respectively. Therefore, for flow rates of NO_{ext} slightly larger than that of N, one observes the (green) emission from NO_2^* .

Let us designate $[\text{N}]_0$ as the N atom density when no O_2 is admixed. According to the above, the value of $[\text{N}]_0$ is simply obtained by determining the exact flow rate of NO_{ext} leading to the extinction of the NO_β emission (the whole afterglow chamber actually becomes dark), before the green emission appears, namely when :

$$Q(\text{NO}_{\text{ext}}) = Q(\text{N}). \quad (3.12)$$

Since:

$$[\text{N}]/[\text{N}_2] \equiv Q(\text{N})/Q(\text{N}_2), \quad (3.13)$$

thus, in the case where no O_2 is added (hence the zero subscript to Q), $[\text{N}]_0$ is given by:

$$[\text{N}]_0 = \{Q_0(\text{NO}_{\text{ext}})/Q(\text{N}_2)\} [\text{N}_2]. \quad (3.14)$$

When O_2 is added to N_2 in the discharge ($\text{N}_2\text{-O}_2$ mixtures), the procedure just described applies for the determination of the density of the N atoms in the afterglow:

$$[\text{N}] = \{Q(\text{NO}_{\text{ext}})/Q(\text{N}_2)\} [\text{N}_2], \quad (3.15)$$

¹⁴ Unresolved ro-vibrational spectrum or "continuum": Pearse and Gaydon 1963.

where $[N]$ varies as a function of the $O_2\%$ since $Q(NO_{ext})$ depends on it.

3.4.2.2 Relation yielding the O atom density in an N_2 - O_2 mixture.

To determine the concentration of O atoms in the N_2 - O_2 afterglow, we need to plot the NO_2^* ro-vibrational intensity (at 560 nm) as a function of NO_{ext} . Indeed, the O atom density can be deduced from the following relation (see Ricard et al 2001, for a demonstration):

$$[O] = [N]_0 r_i / r_1, \quad (3.16)$$

The value of r_1 is obtained from the plot of the NO_2^* ro-vibrational intensity (at 560 nm) as a function of $Q_0(NO_{ext})$ in the case of an N_2 discharge without O_2 while the value of r_i is given by the same plot for a given percentage of added O_2 . This can be best seen from Figure 3-13. As for the influence of the argon atoms in which the NO_{ext} is diluted, it cancels out when expressing the r_i/r_1 ratio.

The NO_2^* emission intensity being observed at $x = 50$ cm, $z = 0$, it yields the value of $[O]$ at that position. For practical reasons, determination of the extinction of the NO_β system emission is also achieved at this position. Nonetheless, the value of $[N]$ is actually that in the 30 mm tube at the injection inlet position: the procedure used to detect the NO_β extinction is right since extinction occurs simultaneously within the whole chamber.

The density of O atoms stemming directly from the titration method is, in fact, higher than the value of $[O]$ existing before introducing NO_{ext} since all the N atoms are transformed, through the titration reaction (3.7), into O atoms; therefore, one needs to subtract from the O atom density obtained through titration the value of $[N]$ to get the actual value of $[O]$ in the chamber, i.e. without NO being present.

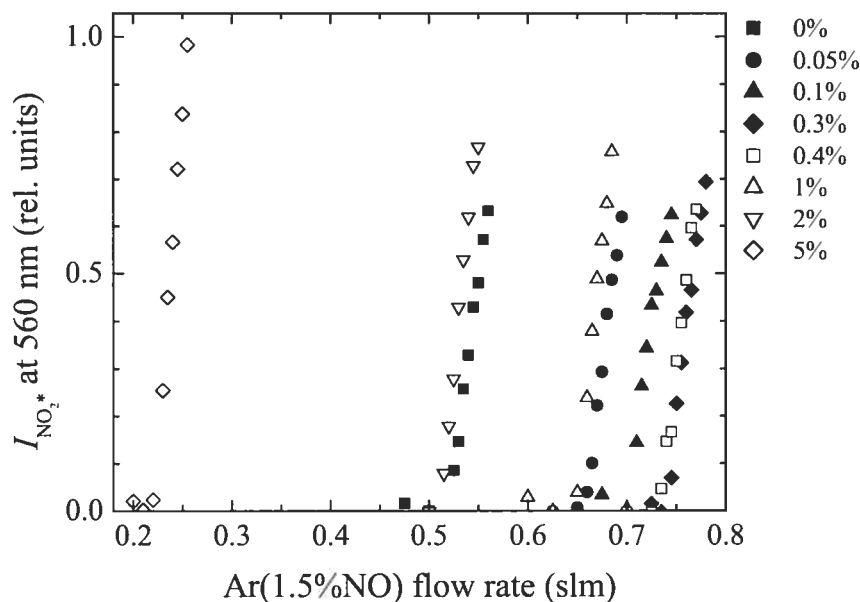


Figure 3-13. NO_2^* emission intensity recorded at 560 nm ($x = 50$ cm, $z = 0$) as a function of the $\text{Ar-1.5\%NO}_{\text{ext}}$ flow rate, at different percentages of O_2 admixed to N_2 with $Q(\text{N}_2) = 2$ slm. Pressure is 2 torr (prior to introducing NO_{ext}). A straight line can be fitted to the data points corresponding to any given percentage of added O_2 ; the slope obtained when no O_2 is added yields the value of r_1 while the set of points for a given percentage of O_2 provides the value of r_1 . Each set of data points was recorded three times and their slope values averaged.

3.4.2.3 Measured values of N and O atom densities as functions of $\text{O}_2\%$.

Figure 3-14 shows the values of N and O atom densities obtained as functions of the admixed O_2 percentage at 2 torr, for two surfatron positions x_1 , namely 3 and 10 cm. For both positions, the density of N atoms shows a maximum at low O_2 percentages in the mixture, and it decreases gradually as the $\text{O}_2\%$ is increased past this maximum. As for the density of O atoms, a faint minimum of density possibly appears for the $x_1 = 10$ cm case. Within experimental errors, there are no real differences between both sets of values recorded at the two surfatron positions. This is, to some extent, unexpected since at $x_1 = 3$ cm, the contribution from the early afterglow molecular ions at the injection inlet position is more important than at $x_1 = 10$ cm (Figure 3-9). We further note that the dissociation degree of N_2 is relatively high, being approximately one percent (N_2 density at 2 torr, 300 K, is $6.4 \times 10^{16} \text{ cm}^{-3}$).

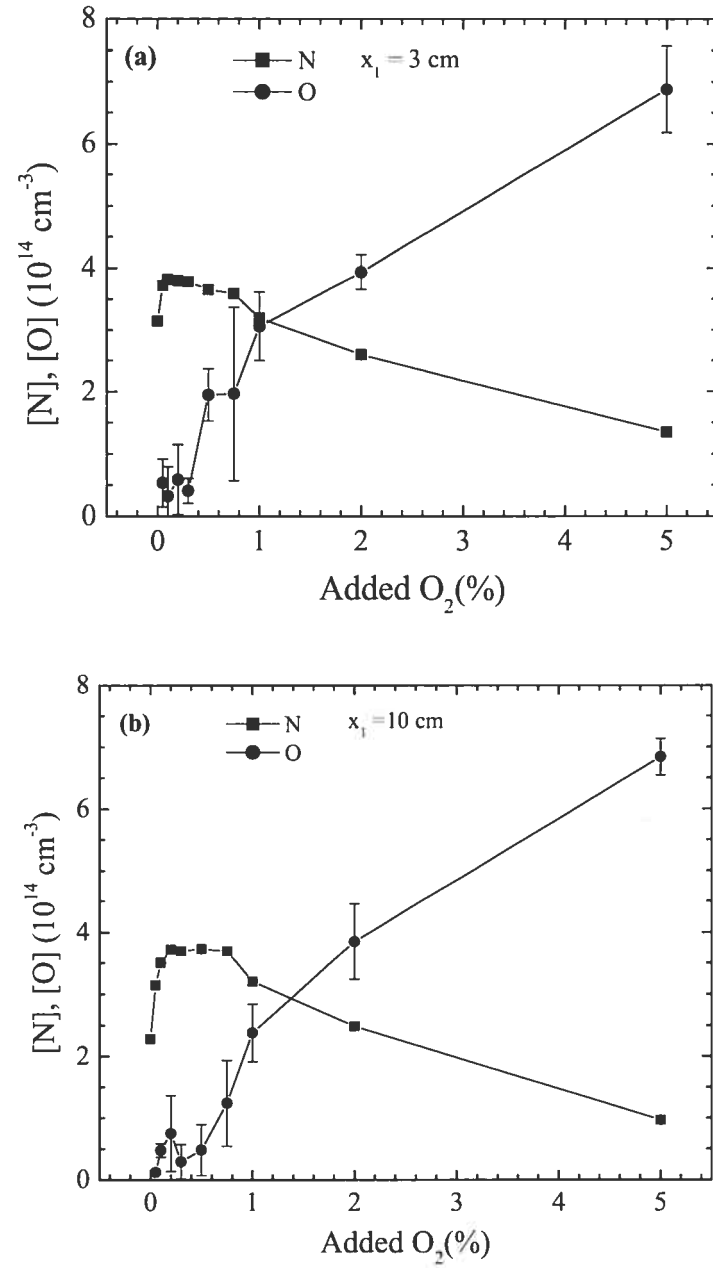


Figure 3-14. Measured N and O atom densities obtained from the titration method as functions of the percentage of added O_2 at 2 torr for surfatron positions x_1 : (a) 3 cm and (b) 10 cm.

3.4.2.4 Limitations of the titration method.

In the case of the N₂-O₂ mixture, titration of N atoms with NO_{ext} is no longer possible (the extinction point in terms of Q(NO_{ext}) cannot be determined) when the added O₂ exceeds approximately 10% since then all N atoms have been used up before reaching the injection inlet position, through the following reactions (see Pintassilgo *et al* 2005 for the kinetic reaction rates):



which occurs in the discharge since, to be efficient, it requires the gas temperature to be high, and:



which occurs very efficiently both in the discharge and in the flowing afterglow. In an analogous way to (3.10), reaction (3.17) can actually lead to:



yielding the characteristic green emission from NO₂* without NO_{ext} being introduced.

3.4.3 Correlation between UV emission intensity and N and O atom densities in the chamber

Figure 3-15(a) compares the density values of the N and O atoms obtained from the titration method (Figure 3-14) with the UV emission intensity from the NO_β system as functions of the percentage of added O₂. The ascending part of the UV emission curve is limited by the availability of the O atom density up to approximately 0.5% O₂ (slightly beyond the UV maximum intensity). Actually, the maximum of UV intensity occurs at a percentage of added O₂ corresponding closely to the end of the plateau of the N atom density. Beyond this point, the decrease of the UV intensity follows the decrease of the N atom density, while on the average, the O atom density keeps on increasing with O₂%.

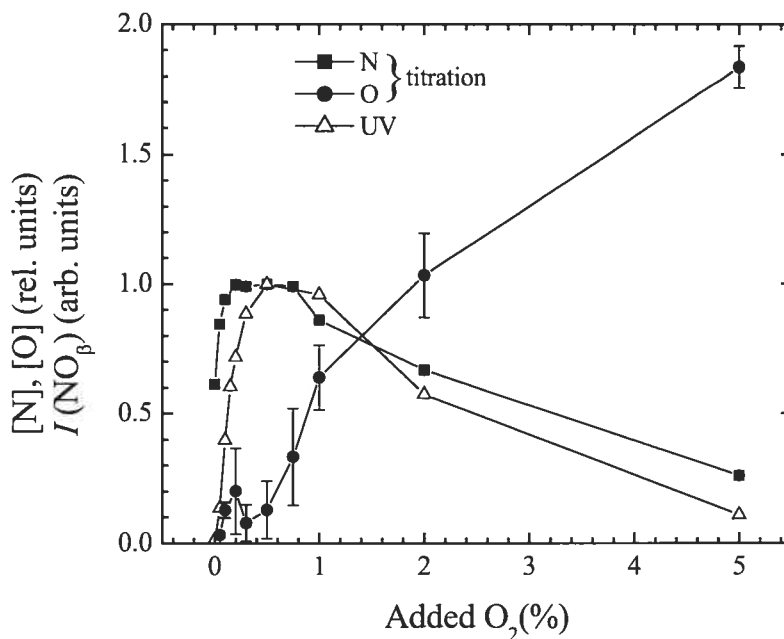


Figure 3-15. Density of N and O atoms obtained from the titration method (Figure 3-14) compared with the UV emission intensity from the NO_β system (UV intensity normalized at the maximum of N atom density) as functions of the percentage of added O_2 , recorded at $x = 50$ cm, $z = 0$. Operating conditions: surfatron position $x_1 = 10$ cm, pressure at 2 torr and N_2 flow rate at 2 slm.

Figure 3-16(a) compares the evolution of the N atom density obtained from titration (curve 1), at the NO injection inlet, with that inferred from the $I(\text{N}_2)$ emission intensity (curve 2), recorded at $x = 50$ cm, $z = 0$, as a function of the added $\text{O}_2\%$. Recall that the titration method yields the total amount of N atoms available at the entrance of the chamber, i.e. before any of the N atoms participate in the formation of $\text{NO}(\text{B})$ molecules. In contrast, the $I(\text{N}_2)$ emission provides the amount of "free" N atoms in the chamber. To estimate roughly the density of the N atoms used up, we subtract curve 2 from curve 1 in Figure 3-16(a), yielding curve 3 in Figure 3-16(b). This curve is then compared with the measured NO_β -UV intensity (curve 4) assumed proportional to the amount of N atoms involved in forming $\text{NO}(\text{B})$ molecules. We observe that, in the 0 to 0.5% O_2 range, curves 3 and 4 show a similar increasing trend suggesting that reaction (3.8) dominates (formation of $\text{NO}(\text{B})$ molecules); beyond 1% O_2 , the N atoms are used up in other reactions, most probably (18) and wall recombination.

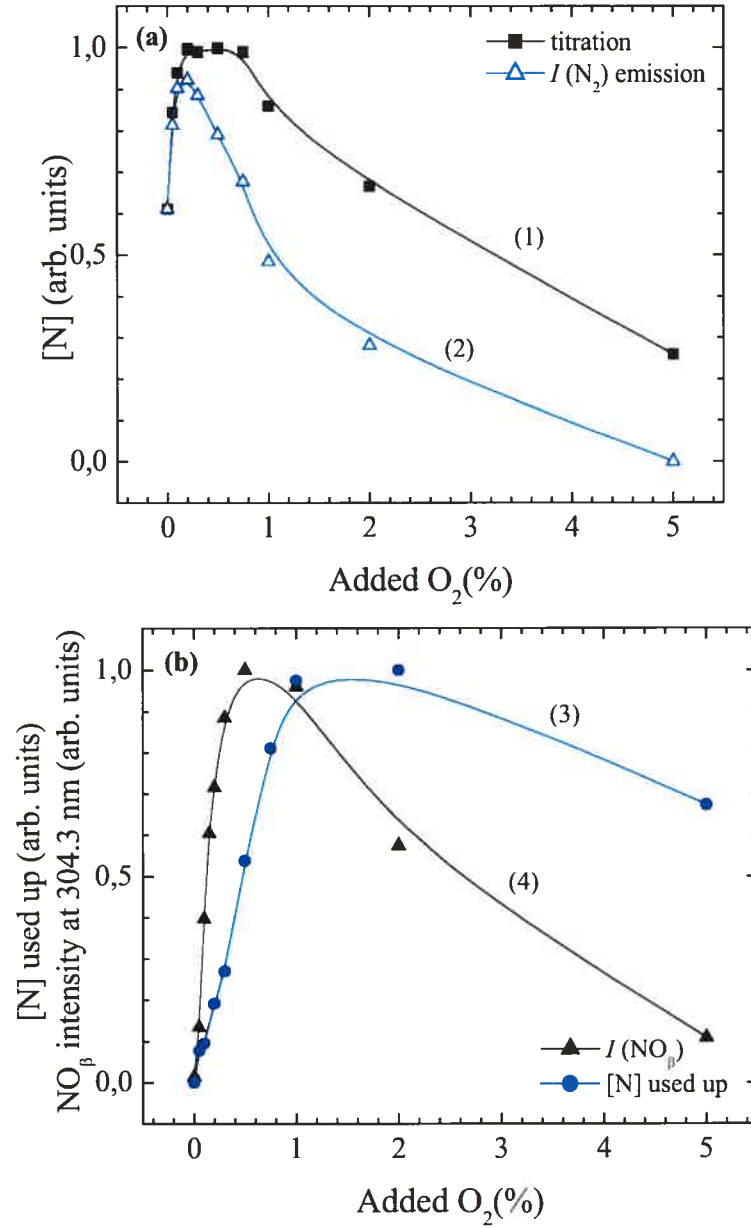


Figure 3-16. (a) Variation, as a function of O₂%, of the N atom density obtained from titration, at $x_0/2$, with that inferred from the $I(N_2)$ emission intensity (both sets of values normalized at 0% O₂); (b) variation, as a function of O₂%, of the N atoms used up compared with the amount of N atoms assumed to be involved in the formation of the NO(B) molecules. Both curves are normalized arbitrarily to unity at their maximum value. Operating conditions as in Figure 3-15.

Having determined the N and O atom densities in the afterglow, we would like to probe these same atoms in the discharge from which they originate to gain insight into their loss and creation mechanisms as they move from the discharge into the afterglow of the chamber. To achieve this, we turn to the actinometry technique, aiming essentially at getting the main trends in the variation of N and O atom densities as functions of the percentage of O₂ in the discharge.

3.5 Determination of the density (relative value) of N and O atoms in the discharge through actinometry

We use the actinometry method to obtain the (relative) densities of N and O atoms in the discharge, these atoms resulting from the dissociation of N₂ and O₂ molecules through electron collisions (see Nahorny *et al* 1995 in the case of a N₂-O₂ DC afterglow). These spectroscopic measurements are carried out at 1 cm from the launching gap (Figure 3-1(b)). A further aim in using actinometry is to determine the evolution of the N and O atom densities beyond 10% O₂ where the titration method seems to fail (section 3.4.2.4).

3.5.1 Summary of actinometry requirements and presentation of the measurement results

Applying the actinometry method to the determination of the density of N and O atoms in an N₂-O₂ discharge requires recording the intensity I of adequate N and O emission spectral lines with reference to the intensity of a so-called actinometer, Ar in the present case, introduced in the mixture at the few percent level (see Dreyfus *et al* 1985, Henriques *et al* 2005 and references therein, St-Onge and Moisan 1994). The (relative) densities of the N and O atoms are then deduced respectively from the following relations:

$$I_N/I_{Ar} = k_N/k_{Ar} [N]/[Ar]; \quad I_O/I_{Ar} = k_O/k_{Ar} [O]/[Ar], \quad (3.19)$$

where k_N , k_O and k_{Ar} are the excitation rates ensured by electron impact on the N, O, and Ar atoms to bring them to an upper energy level from which they must decay mainly radiatively with intensities I_N , I_O and I_{Ar} respectively. From (3.19), we see that the actinometry method is best applied to yield $[N]$ and $[O]$ when the k_N/k_{Ar} and k_O/k_{Ar} ratios

keep constant when the operating conditions, essentially here the percentage of O₂ in the mixture, are varied. As a rule, this implies choosing radiative states with excitation cross-sections that have similar shape and energy threshold to account for the case where the electron energy distribution function would change with operating conditions.

In the present case, we had to use the ArI 811.5 nm line as the actinometer signal instead of the commonly used ArI 750.4 nm line because the latter is overlapped by the N₂ first positive system emission. Actually, choosing the 811.5 nm line creates specific problems since its upper level is not excited by electron collisions on the argon-atom ground level but on its Ar ³P₂ metastable state (Boffard *et al* 1999), implying at least a different excitation energy threshold. Therefore, since the N and O atom upper levels considered are created by collisions on their ground level, hence at a higher electron-energy threshold than for the 811.5 nm line, changes in the electron energy distribution function could affect the validity of the results obtained. Nonetheless, experimentally, the evolution of the O and N atom densities provided by actinometry is similar to that obtained by titration in the afterglow, giving us confidence in using the 811.5 nm line as the actinometer. A further support to the use of the 811.5 nm line instead of the 750.4 nm line is that the 811.5 nm line has been utilized by many authors to obtain N and/or O atom densities in either pure N₂ or O₂ discharges or in mixtures of these molecules. In N₂-O₂ mixtures, it has been employed, for example, by Gordiets *et al* (1995) and Henriques *et al* (2005) in the few torr range. It was used in pure O₂ discharges by Bluem *et al* (1995) and in pure N₂ discharges by Levaton *et al* (2006). Finally, as far as possible radiative cascade contributions to the 2p₉ level (upper level of the ArI 811.5 nm line) are concerned, the exhaustive study of Boffard *et al* 1999 shows that this contribution accounts for less than 10% of the total excitation cross-section of that level, meaning that the population of this level is mainly controlled by electron collisions as required by the assumptions of the actinometry method.

The OI 844.6 nm line, which is excited by electron impact on the O atom ground state, was used to probe the O atom density (Dreyfus *et al* 1985, Selwyn 1986) while for the N atom density we turned to the NI 821.6 nm line (Henriques *et al* 2005, Levaton *et al* 2006), whose upper level is also excited by electron impact on the atom ground state (Czerwiec *et al* 2005). Finally, for all the lines chosen here, quenching of the upper level of the transition by collision appears negligible, these levels all deexciting radiatively as

required by the actinometry method (ArI 811.5 nm line: Levaton *et al* 2006; OI 844.6 nm line: Gordiets *et al* 1995; NI 821.6 nm line: Czerwiec *et al* 2005).

In the present work (microwave-sustained N₂-O₂ plasma at 100 W and 2 torr with a flow rate of 2 slm), 0.1 slm of Ar (5%) was introduced in the mixture to monitor the emission intensity of the ArI 811.5 nm line.

The variation of the $I_{\text{N}}/I_{\text{Ar}}$ and $I_{\text{O}}/I_{\text{Ar}}$ line intensity ratios in the discharge tube, interpreted as the variation of the relative value of the N and O atom densities respectively, as functions of the percentage of added O₂, is plotted in Figure 3-17: we observe a relatively fast decrease of the concentration of N atoms and a linear increase of that of O atoms. Our results for the density of O atoms are in agreement with TALIF experiments carried out in N₂-O₂ DC positive columns that show that the O atom density increases up to 20% O₂ (this density saturates between 20 and 90% O₂ and finally decreases above 90% O₂) (Gordiets *et al* 1996).

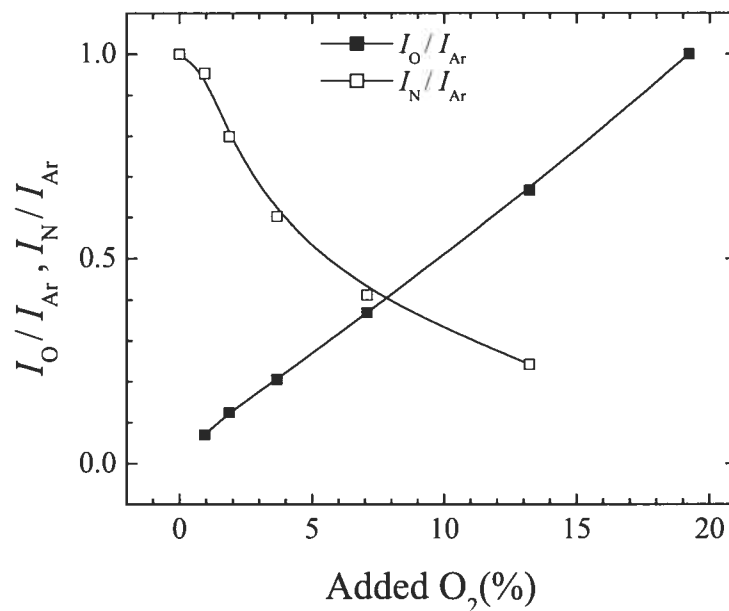
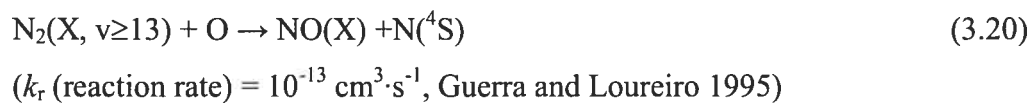


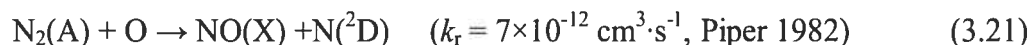
Figure 3-17. Variation of the $I_{\text{N}}/I_{\text{Ar}}$ and $I_{\text{O}}/I_{\text{Ar}}$ ratios in the discharge as functions of the added O₂ percentage. Operating conditions: 2 slm of N₂, 0.1 slm of argon and a variable percentage of added O₂; pressure in the chamber is 2 torr before the addition of O₂.

3.5.2 Comparison of the N and O atom densities obtained in the discharge (actinometry) and in the afterglow (titration)

Figure 3-18 compares the values of the N and O atom (absolute) densities in the afterglow as given by NO titration (section 3.4.2.3) with the corresponding (relative) densities in the discharge as inferred from actinometry. Normalization of the N atom densities at unity is effected at zero percent O₂ while the O atom densities are normalized at the lowest O₂% value for which there are data points from both methods. Figure 3-18(a) suggests that [N] increases in the afterglow as O₂ is added initially (< 0.3% O₂) as a result of highly vibrationally excited N₂(X) molecules reacting with O atoms according to the following reaction:



or through interaction of N₂(A) metastable molecules with O atoms as:



The density of nitrogen atoms in the afterglow presents a maximum around 0.3% O₂ (observed not only with titration but also with $I(\text{N}_2)$ emission: Figure 3-11), whereas its value in the plasma decreases (exponentially) from the start, most probably due to reactions (3.18) and (3.17). In contrast, the density of oxygen atoms in the discharge and in the afterglow increases with O₂% almost linearly. The fact that the density of O atoms measured with titration does not increase beyond 5% O₂ at the same rate as in the discharge could be due to some O atoms being used up or to a partial failure of the titration method (section 3.4.2.4).

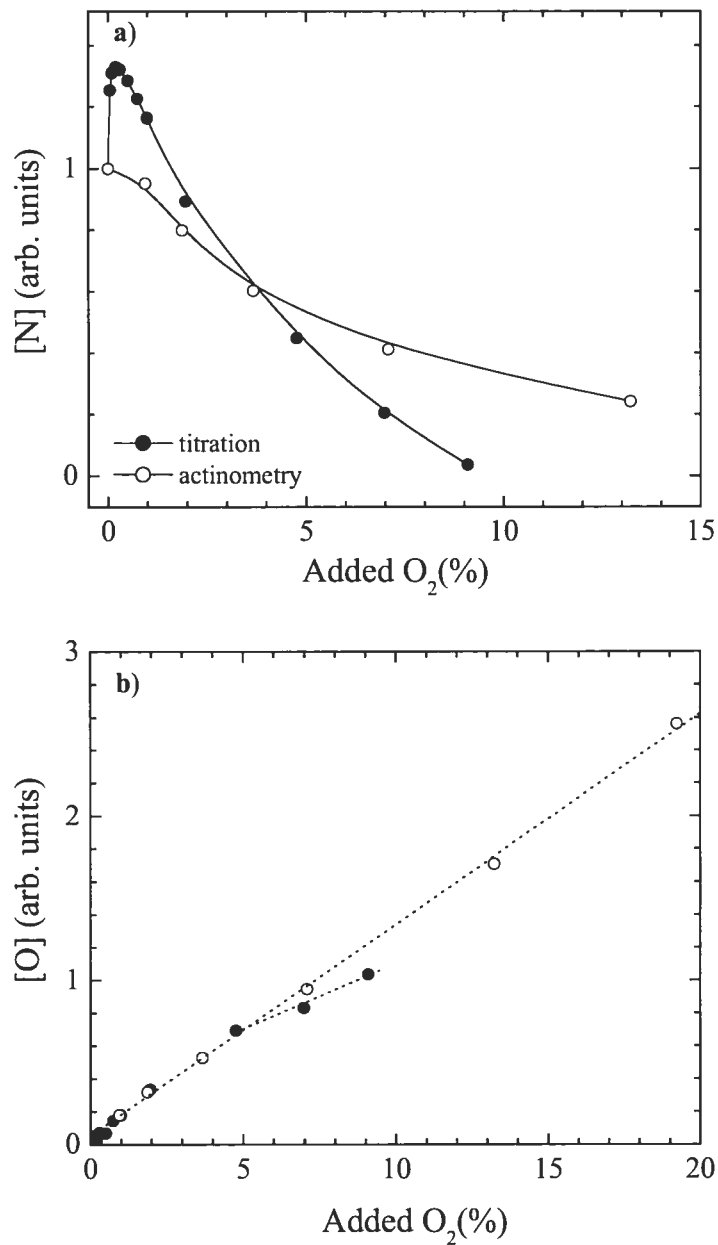


Figure 3-18. Variation of the (a) N atom density and (b) O atom density as functions of O_2 % obtained by actinometry in the plasma and by NO titration in the afterglow. The normalization of the N atom densities is effected at zero percent O_2 while the O atom densities from actinometry are calibrated with those of titration, taking the actinometry value at 0.05 % O_2 (the lowest O_2 % value for which there are data points from both methods) to be equal to that obtained by titration. Plasma conditions as in Figure 3-17.

3.6 Damage to polymers exposed to an N₂-O₂ afterglow

We have previously reported on the erosion of spores and flat pieces of polymers subjected to an N₂-O₂ afterglow (Crevier *et al* 2002). To gain more insight into this matter, we turn to microspheres of polystyrene of approximately the same size (with little dispersion) as our reference spores but, in contrast to spores, their composition is uniform throughout, therefore facilitating the interpretation of the observed erosion as a function of time. Having at this point a better knowledge of the properties of the early and late afterglows, we are going to subject these microspheres to conditions where either the early afterglow is dominant or the late afterglow prevails. This study simulates the eventual damage experienced by polymer-based medical devices subjected to an afterglow for sterilization purposes.

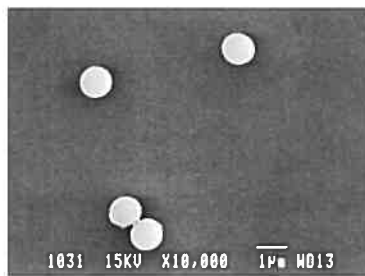
3.6.1 Erosion on and off axis

Figure 3-19 shows a set of scanning electron microscope (SEM) micrographs of the microspheres located at the discharge axis ($x = 1.5$ cm, $z = 0$) and below it ($x = 1.5$ cm, $z = 5$ cm) after being exposed for 2 hours to an N₂-O₂ afterglow for surfatron positions $x_1 = 3$ and 10 cm (see Figure 3-1(b) for coordinates). The percentage of admixed O₂ was set at 1% to correspond to maximum UV intensity at this pressure and gas flow (2 torr, 2 slm of N₂). We see that for $x_1 = 3$ cm the microspheres placed at the axis are disrupted while relatively only weakly eroded off axis. In contrast, at $x_1 = 10$ cm, the microspheres located at the axis have retained their initial shapes although they are heavily eroded as compared to the spheres located off axis for the same x_1 position. The higher damage observed at $x_1 = 3$ cm is related to a larger contribution to the afterglows from the early afterglow than at $x_1 = 10$ cm (see Figure 3-9 and Figure 3-10), most probably due to the action of metastable state species.

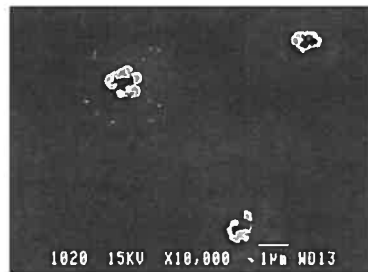
Table 3-2 presents a quantitative evaluation of the microsphere observed erosion. It indicates that to avoid damage to the devices to be sterilized, these should not be located at the axis unless the surfatron position x_1 is large.

Table 3-2. Polystyrene microsphere diameter after exposure to the afterglow under conditions of Figure 3-19 (statistics on 15 to 20 microspheres).

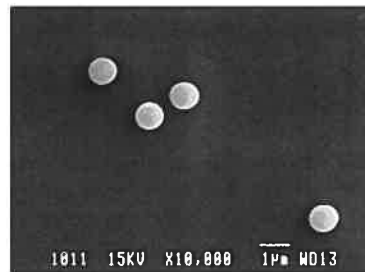
Unexposed (control)		$1.05 \mu\text{m} \pm 0.01 \mu\text{m}$
$x_1 = 3 \text{ cm}$	$z = 0 \text{ cm}$	Disrupted
$x_1 = 3 \text{ cm}$	$z = 5 \text{ cm}$	$0.93 \mu\text{m} \pm 0.01 \mu\text{m}$
$x_1 = 10 \text{ cm}$	$z = 0 \text{ cm}$	$0.84 \mu\text{m} \pm 0.02 \mu\text{m}$
$x_1 = 10 \text{ cm}$	$z = 5 \text{ cm}$	$0.95 \mu\text{m} \pm 0.01 \mu\text{m}$



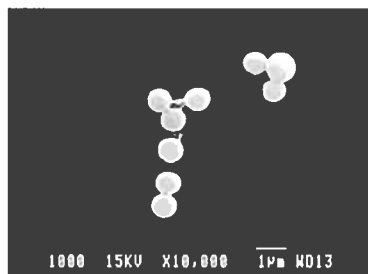
Control (unexposed)



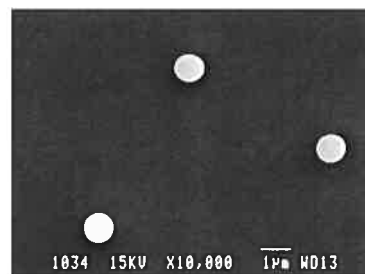
$x_1 = 3 \text{ cm} / z = 0 \text{ cm}$



$x_1 = 3 \text{ cm} / z = 5 \text{ cm}$



$x_1 = 10 \text{ cm} / z = 0 \text{ cm}$



$x_1 = 10 \text{ cm} / z = 5 \text{ cm}$

Figure 3-19. Scanning electron microscope (SEM) micrographs of microspheres, deposited on glass plates, located at the discharge axis ($x = 1.5 \text{ cm}$, $z = 0$) and below it ($x = 1.5 \text{ cm}$, $z = 5 \text{ cm}$) subjected for 2 hours to an $\text{N}_2\text{-O}_2$ afterglow with surfatron positions $x_1 = 3$ and 10 cm (see Figure 3-1(b) for coordinates). Gas pressure is 2 torr with an N_2 gas flow of 2 slm and 1% of added O_2 for maximum UV intensity at this pressure and gas flow.

3.6.2 Erosion as a function of O₂%

Figure 3-20 shows the evolution of the microsphere erosion as a function of the O₂ percentage in N₂-O₂, at the axis and at $z = 5$ cm below the axis. For microspheres located at the axis, the erosion at 0% O₂ is the strongest whereas adding only 1% of O₂ reduces considerably the erosion process. Beyond 1%, erosion increases slightly as the O₂ content is increased in the mixture; beyond 3% O₂, erosion cannot be determined as the microspheres are disrupted. In contrast, for microspheres exposed off axis, there is almost no erosion at 0% O₂ while it increases regularly with increasing O₂%.

The strong on-axis erosion observed at 0% O₂ is attributed, in accordance with the results of the previous sections, to the action of both the N₂ metastable molecules and N₂⁺ ions while the addition of only 1% O₂ quenches efficiently these metastable molecules, leading to a much lower erosion of the microspheres. As far as erosion of the microspheres far from the axis is concerned, the erosion rate is correlated with the increase of the density of O atoms in the afterglow as the O₂ percentage is increased. The fact that the microspheres are disrupted beyond 3% O₂ implies that the metastable species play a non-negligible role in the erosion process in contrast to what happens off-axis where the O atoms dominate the erosion mechanism.

In conclusion, damage to the microspheres is high when they are subjected to a dominant early afterglow (0% O₂), which is essentially localized as a beam coaxial to the axis (see Figure 3-8 for the beam waist). Damage is also important, even off axis, when the O₂ content is high. Setting operating conditions for maximum UV intensity ($\leq 1\%$ O₂) is not only useful to obtain the shortest sterilization time, but it also ensures low erosion of the medical devices (MDs). Our method is, in terms of damage, mild as compared to plasma techniques based on the action of radicals.

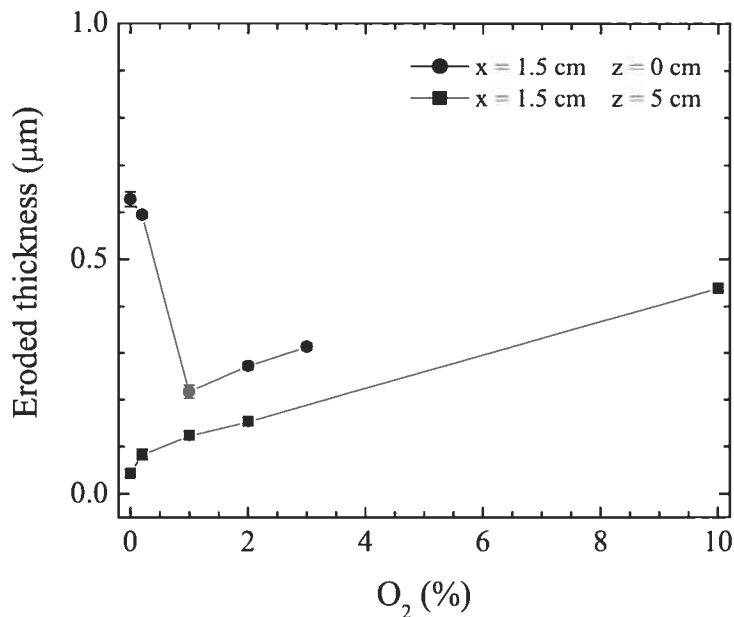


Figure 3-20. Eroded thickness of polystyrene microspheres as a function of the percentage of O₂ added to N₂, at two different spatial positions ($x = 1.5$ cm, $z = 0$ and $x = 1.5$ cm, $z = -5$ cm). Surfatron position $x_1 = 10$ cm, exposure time is 2 hours at 2 torr, other conditions as in Figure 3-19.

3.7 Summary and conclusion

We have examined the flowing afterglows of an N₂-O₂ discharge in the 0.6–10 torr range in the perspective of achieving the sterilization of medical devices (MDs) under conditions providing maximum UV intensity with minimum damage to polymer-based MDs. The lead followed was to reduce as much as possible the relative contribution of the early afterglow with respect to that of the late afterglow in the sterilization chamber. As a matter of fact, from the beginning, we believed that the early afterglow was responsible for causing heavy damage while not being efficient in generating UV emission. To characterize these two flowing afterglows, we have extensively used optical emission spectroscopy as a diagnostic means. The results obtained can be gathered around the four following main topics: 1) main characteristics, essentially, of the early afterglow; 2) variation of the N and O atom densities as functions of the percentage of O₂ added to N₂ and position; 3) correlation of the N and O atom densities with the variation of the UV intensity of the NO_β system; 4) erosion of polystyrene microspheres under either dominant early afterglow or dominant late afterglow conditions.

The early afterglow was demonstrated to be characterized by the presence of nitrogen molecular ions and metastable state molecules. Our aim was to reduce these populations as much as possible in the sterilization chamber. To achieve this, we have shown that one could use two practical and complementary criteria: the emission intensity of the first negative system of N_2 , indicative of the presence of molecular ions, needs to be extremely low if not absent, and there should be an overpopulation of the $v' = 11 N_2(B)$ ro-vibrational level, attesting the reduction of the N_2 metastable state molecules. As we have shown, this can be carried out by increasing the N_2 pressure, the O_2 percentage in the mixture and moving off the discharge (surfatron plasma) from the afterglow chamber. Moving away the surfatron, i.e. allowing more time for ion recombination and increasing the number of collisional events of metastable species with the background gas, appears to be the best practical solution in the present case since increasing too much the gas pressure leads to nonuniformity of the active species in the sterilization chamber while the percentage of admixed O_2 needs to be tuned for maximum intensity UV radiation to ensure the fastest inactivation rate of microorganisms.

The NO titration method yields the absolute values of N and O atoms in the afterglow at the NO injection inlet, a few cm before the chamber entrance: the N atom density goes through a maximum at approximately 0.3–0.5% O_2 and then decreases, while the O atom density increases regularly with the O_2 percentage. The spatial variation of the N atom (relative) density in the chamber is obtained by recording the emission intensity from the 1st positive system band head at 580 nm: in the 2 to 5 torr range, this density is uniform everywhere in the chamber (of importance for the sterilization process). The relative value of N and O atoms in the discharge was determined by using the actinometry method: the N atom density decreases from its maximum value at 0% O_2 as the percentage of O_2 is increased while the density of O atoms increases, almost linearly, as a function of the percentage of O_2 , as in the afterglow.

The UV intensity curve is characterized by a maximum around 0.6% O_2 (2 torr) followed by an approximately exponential decay. We observe that, in the 0–1% O_2 range, the UV emission is limited by the availability of the O atom density. Beyond this point, the decrease of the UV intensity follows the decrease of the N atom density, while on the average, the O atom density keeps on increasing with $O_2\%$.

Erosion of polymer microspheres is found to be strongest at the chamber axis when no O_2 is present, which implies, in the pressure range considered, a dominant early afterglow. Adding even only 1% O_2 causes a strong quenching of the N_2 metastable species, leading to a dominant late afterglow and, therefore, considerably reducing the etching rate at the axis. In contrast, at 5 cm from the axis, under the same operating conditions, a dominant late afterglow prevails; in the absence of oxygen, erosion is negligible, but it increases regularly as O_2 is introduced, following approximately the O atom density increase.

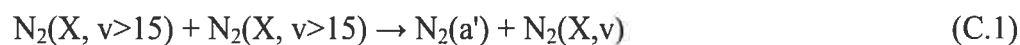
Acknowledgments

This work was financed by the Fonds Québécois de Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT) of the Gouvernement du Québec, by the Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie (CRSNG) of Canada, by the Service des Relations Internationales de l'Université Paul Sabatier and the Direction des Relations Internationales de l'Université de Montréal, and by Air Liquide (Centre de recherche Claude-Delorme). The authors are indebted to Dr. D. Kéroack, Dr. K. Makasheva and J. Pollak for comments.

Appendix C. N₂ species specific to the early afterglow and to the late afterglow

I. Kinetic pathway leading to the N₂⁺(B) and N₂(C) states, characteristic of an early (pink) afterglow

The most probable pathway leading to the creation of the N₂⁺(B) ionic state in the early afterglow can be broken down into the following sequence of 3 reactions (Levaton *et al* 2002):

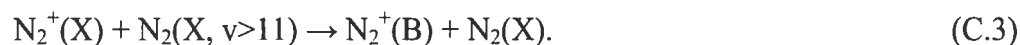


where N₂(X) is the electronic ground state of the nitrogen molecule and v is its vibrational quantum number; N₂(a') is a metastable state of the nitrogen molecule. Then:

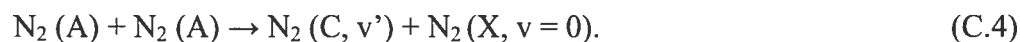


which is called a chemi-ionization process (Sheverev *et al* 2002).

Finally:



As for the N₂(C) state, it results from the pooling reactions of the N₂(A) metastable-state molecules (Levaton *et al.* 2002):



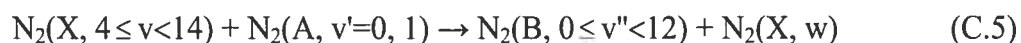
The spontaneous emission from the N₂⁺(B) state to the N₂⁺(X) electronic ground state gives rise to the N₂ Ist negative system (²Σ_u⁺, v' → ²Σ_g⁺, v + hv (300–590 nm)) having its most intense band head at 391.4 nm (v'=0, v''=0 transition). The spontaneous emission

from the $N_2(C)$ state to the $N_2(B)$ state accounts for the so-called N_2 2nd positive system ($C^3\Pi_u, v' - B^3\Pi_g, v'' + h\nu$ (260–550 nm)).

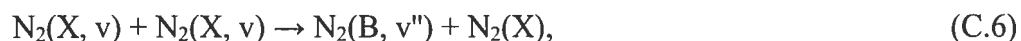
II. Kinetic reactions leading to the $N_2(B)$ state in the early afterglow and in the late afterglow

The $N_2(B)$ state is present in both the early and late afterglows, but the way that it is generated is not the same in these two afterglows.

In the early afterglow, the main kinetic route to the $N_2(B)$ state is either (Bockel *et al* 1995):



where w is any vibrational quantum number, or:



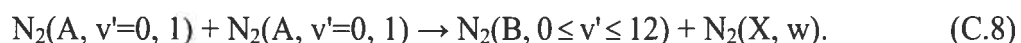
where v' can be as high as 17, 18 (note that levels with $v' > 13$ are autodissociative, i.e. they do not radiate).

In contrast, in the late afterglow, the unique kinetic route to the $N_2(B)$ state is:



where $N(^4S)$ is the nitrogen-atom ground state. The $N(^4S) + N(^4S)$ recombination follows the weakly attractive $N_2(^5\Sigma^+_g)$ potential curve which crosses the $N_2(B)$ curve at $v'' = 11$, giving rise to an overpopulation of the sole $v'=11$ level of the $N_2(B)$ state, which therefore appears characteristic of this type of afterglow, as can be seen in figure 3.

According to Levaton *et al* (2005), the three-body reaction (C.7) also contributes (to some extent) to the early afterglow as well as the following interaction:



The spontaneous emission from the $N_2(B)$ state to the $N_2(A)$ state generates the N_2 I^{st} positive system ($B^3\Pi_g, v' - A^3\Sigma_u^+, v'' + h\nu$ (470–2530 nm)).

In summary, the $N_2^+(B)$, $N_2^+(X)$ and $N_2(C)$ states, which are (together with N_2 metastable state molecules) characteristic species of the early afterglow, are generated through the interaction of metastable molecules, namely $N_2(a')$ and $N_2(A)$. As for the $N_2(B)$ state when present in the early afterglow, it is also, but partially, populated through the participation of $N_2(A)$ metastable molecules. In contrast, the N_2 species present in the late afterglow are created without any significant contribution of metastable N_2 states (Gordiets *et al* 1998): the practical absence of metastable species can be considered as a distinctive feature of the late afterglow with respect to the early afterglow.

References

- Becker** K, Koutsospyros A, Yin S M, Christodoulatos C, Abramzon N, Joaquin J C and Brelles-Marino, G **2005** Environmental and biological applications of microplasmas *Plasma Phys. Control. Fusion* **47** B513-B523.
- Bluem** E, Bechu S, Boisselapporte C, Leprince P and Marec J **1995** Spatial investigation of a large-diameter microwave plasma *Journal of Physics D: Appl. Phys.* **28** 1529-1533.
- Bockel** S, Diamy A M and Ricard A **1995** Optical Diagnostics of Active Species in N₂ Microwave Flowing Postdischarges *Surf. Coat. Technol.* **74-5** 474-478.
- Boffard** J B, Piech G A, Gehrke M F, Lagus M E, Anderson L W and Lin C C **1996** Electron impact excitation out of the metastable levels of argon into the 3p⁵4p J=3 level *Journal of Physics B-Atomic Molecular and Optical Physics* **29** L795-L800.
- Boffard** J B, Piech G A, Gehrke M F, Anderson L W and Lin C C **1999** Measurement of electron-impact excitation cross sections out of metastable levels of argon and comparison with ground-state excitation *Physical Review A* **59** 2749-2763.
- Boudam** M K, Moisan M, Saoudi B, Popovici C, Gherardi N and Massines F **2006** Bacterial spore inactivation by atmospheric pressure plasmas in the presence or absence of UV photons as obtained with the same gas mixture *J. Phys. D: Appl. Phys.* **39** 3494-3507.
- Capitelli** M, Ferreira C M, Gordiets B F and Osipov A I **2000** *Plasma kinetics in atmospheric gases* (Springer) chap. 13.
- Chilton** J E, Boffard J B, Schappe R S and Lin C C **1998** Measurement of electron-impact excitation into the 3p⁵4p levels of argon using Fourier-transform spectroscopy *Physical Review A* **57** 267-277.
- Crevier** M C, Moisan M, Yahia L and Saoudi B **2002** Cold plasma effects on spores and polymers. *Proc. of the International symposium on advanced materials for biomedical applications (SAMBA)* (Montréal, Québec) 365-374.
- Czerwiec** T, Greer F and Graves D B **2005** Nitrogen dissociation in a low pressure cylindrical ICP discharge studied by actinometry and mass spectrometry *Journal of Physics D: Appl. Phys.* **38** 4278-4289.

- Deng X T, Shi J J, Shama G and Kong M G 2005** Effects of microbial loading and sporulation temperature on atmospheric plasma inactivation of *Bacillus subtilis* spores *Appl. Phys. Lett.* **87** 153901.
- Dreyfus R W, Jasinski J M, Walkup R E and Selwyn G S 1985** Optical Diagnostics of Low-Pressure Plasmas *Pure and Applied Chemistry* **57** 1265-1276.
- Gherman T, Eslami E, Romanini D, Kassi S, Vial J C and Sadeghi N 2004** High sensitivity broad-band mode-locked cavity-enhanced absorption spectroscopy: measurement of $\text{Ar}^*(^3\text{P}_2)$ atom and N_2^+ ion densities *J. Phys. D: Appl. Phys.* **37** 2408-2415.
- Gordiets B and Ricard A 1993** Production of N, O and NO in $\text{N}_2\text{-O}_2$ flowing discharges *Plasma Sources Sci. Technol.* **2** 158-163.
- Gordiets B F, Ferreira C M, Guerra V L, Loureiro J M A H, Nahorny J, Pagnon D, Touzeau M and Vialle M 1995** Kinetic-Model of a Low-Pressure $\text{N}_2\text{-O}_2$ Flowing Glow-Discharge *Ieee Transactions on Plasma Science* **23** 750-768.
- Gordiets B, Ferreira C M, Nahorny J, Pagnon D, Touzeau M and Vialle M 1996** Surface kinetics on N and O atoms in $\text{N}_2\text{-O}_2$ discharges *J. Phys. D: Appl. Phys.* **29** 1021-1031.
- Gordiets B, Ferreira C M, Pinheiro M J and Ricard A 1998** Self-consistent kinetic model of low-pressure $\text{N}_2\text{-H}_2$ flowing discharges: I. Volume processes *Plasma Sources Sci. Technol.* **7** 363-378.
- Guerra V and Loureiro J 1995** Nonequilibrium Coupled Kinetics in Stationary $\text{N}_2\text{-O}_2$ Discharges *J. Phys. D: Appl. Phys.* **28** 1903-1918.
- Guerra V and Loureiro J 1997** Electron and heavy particle kinetics in a low-pressure nitrogen glow discharge *Plasma Sources Sci. Technol.* **6** 361-372.
- Heise M, Neff W, Franken O, Muranyi P and Wunderlich J 2004** Sterilization of polymer foils with dielectric barrier discharges at atmospheric pressure *Plasmas Polym.* **9** 23-33.
- Henriques J, Villeger S, Levaton J, Nagai J, Santana S, Amorim J and Ricard A 2005** Densities of N- and O atoms in $\text{N}_2\text{-O}_2$ flowing glow discharges by actinometry *Surf. Coat. Technol.* **200** 814-817.
- Herrmann H W, Henins I, Park J and Selwyn G S 1999** Decontamination of chemical and biological warfare, (CBW) agents using an atmospheric pressure plasma jet (APPJ) *Phys. Plasmas* **6** 2284-2289.

- Kelly-Wintenberg K**, Montie T C, Brickman C, Roth J R, Carr A K, Sorge K, Wadsworth L C and Tsai P P Y **1998** Room temperature sterilization of surfaces and fabrics with a One Atmosphere Uniform Glow Discharge Plasma *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **20** 69-74.
- Kim S M** and Kim J I **2006** Decomposition of biological macromolecules by plasma generated with helium and oxygen *J. Microbiol.* **44** 466-471.
- Kossyi A**, Kostinsky A Yu, Matveyev A A and Silakov V P **1992** Kinetic scheme of the non-equilibrium discharge in nitrogen-oxygen mixtures *Plasma Sources Sci. Technol.* **1** 207-220.
- Laroussi M** **2002** Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: Review, analysis, and prospects *IEEE Trans. Plasma Sci.* **30** 1409-1415.
- Laroussi M** **2005** Low temperature plasma-based sterilization: Overview and state-of-the-art *Plasma Process. Polym.* **2** 391-400.
- Lerouge S**, Wertheimer M R, Marchand R, Tabrizian M and Yahia L **2000** Effect of gas composition on spore mortality and etching during low-pressure plasma sterilization *J. Biomed. Mater. Res.* **51** 128-135.
- Levaton J**, Amorim J, Souza A R, Franco D and Ricard A **2002** Kinetics of atoms, metastable, radiative and ionic species in the nitrogen pink afterglow *J. Phys. D: Appl. Phys.* **35** 689-699.
- Levaton J**, Amorim J and Franco D **2005** Experimental and calculated $N(^4S)$ temporal density profile in the N_2 flowing post-discharge *J. Phys. D: Appl. Phys.* **38** 2204-2210.
- Levaton J**, Ricard A, Henriques J, Silva H R T and Amorim J **2006** Measurements of $N(^4S)$ absolute density in a 2.45 GHz surface wave discharge by optical emission spectroscopy *J. Phys. D: Appl. Phys.* **39** 3285-3293.
- Mérel P**, Tabbal M, Chaker M, Moisan M and Ricard A **1998** Influence of the field frequency on the nitrogen atom yield in the remote plasma of an N_2 high frequency discharge *Plasma Sources Sci. Technol.* **7** 550-556.
- Moisan M** and Zakrzewski Z **1991** Plasma Sources Based on the Propagation of Electromagnetic Surface-Waves *J. Phys. D: Appl. Phys.* **24** 1025-1048.
- Moisan M**, Moreau S, Tabrizian M, Pelletier J, Barbeau J, Yahia L'H **1999** Système et procédé de stérilisation par plasma gazeux à basse température, PCT WO 00/72889 (12/07/2000), European Patent EP 1 181 062 (2004) applied for in France, Belgium, Spain, Switzerland, Italy, Germany, US patent 6,707,254 (2004).

- Moisan M, Barbeau J, Moreau S, Pelletier J, Tabrizian M and Yahia L 2001** Low-temperature sterilization using gas plasmas : a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms *International Journal of Pharmaceutics* **226** 1-21.
- Moisan M, Barbeau J, Crevier M C, Pelletier J, Philip N and Saoudi B 2002** Plasma sterilization: methods and mechanisms *Pure Appl. Chem.* **74** 349-358.
- Moisan M, Saoudi B, Crevier M C, Philip N, Fafard E, Barbeau J and Pelletier J 2003** Recent development in the application of microwave discharges to the sterilization of medical devices *Proc. 5th International workshop on microwave discharges* (Zinnowitz (Greifswald, Germany)).
- Moreau S, Moisan M, Tabrizian M, Barbeau J, Pelletier J, Ricard A and Yahia L'H 2000** Using the flowing afterglow of a plasma to inactivate *Bacillus subtilis* spores: Influence of the operating conditions *J. Appl. Phys.* **88** 1166-1174.
- Nahorny J, Ferreira C M, Gordiets B, Pagnon D, Touzeau M and Vialle M 1995** Experimental and theoretical investigation of a N₂-O₂ DC Flowing glow discharge *J. Phys. D: Appl. Phys.* **28** 738-742.
- Pearse R W B and Gaydon A G 1963** The identification of molecular spectra 3rd edition (ed Chapman & Hall, London).
- Philip N, Saoudi B, Crevier M C, Moisan M, Barbeau J and Pelletier J 2002** The respective roles of UV photons and oxygen atoms in plasma sterilization at reduced gas pressure: the case of N₂-O₂ mixtures *IEEE Trans. Plasma Sci.* **30** 1429-1436.
- Piech G A, Boffard J B, Gehrke M F, Anderson L W and Lin C C 1998** Measurement of cross sections for electron excitation out of the metastable levels of argon *Physical Review Letters* **81** 309-312.
- Pintassilgo C D, Loureiro J and Guerra V 2005** Modelling of a N₂-O₂ flowing afterglow for plasma sterilization *J. Phys. D: Appl. Phys.* **38** 417-430.
- Piper L G 1982** The Excitation of O(¹S) in the reaction between N₂(A ³Σ_u⁺) and O(³P) *J. Chem. Phys.* **77** 2373-2377.
- Ricard A, Moisan M and Moreau S 2001** Détermination de la concentration d'oxygène atomique par titrage avec NO dans une post-décharge en flux, émanant de plasmas de Ar-O₂ et N₂-O₂, utilisée pour la stérilisation *J. Phys. D : Appl. Phys.* **34** 1203-1212.
- Ricard A, Jaoul C, Gaboriau F, Gherardi N and Villegier S 2004** Production of N, H, O, and C atoms in flowing microwave discharges *Surf. Coat. Technol.* **188-89** 287-293.

- Sa P A, Guerra V, Loureiro J and Sadeghi N **2004** Self-consistent kinetic model of the short-lived afterglow in flowing nitrogen *J. Phys. D: Appl. Phys.* **37** 221-231.
- Sadeghi N, Foissac C and Supiot P **2001** Kinetics of $N_2(A^3\Sigma_u^+)$ molecules and ionization mechanisms in the afterglow of a flowing N_2 microwave discharge *J. Phys. D: Appl. Phys.* **34** 1779-1788.
- Saoudi B, Moisan M, Popovici C **2005** Role of O atoms in plasma sterilization at reduced pressures: recent results and new hypotheses *Proc. 3rd Intl. Symp. on Advanced Biomaterials/Biomechanics (ISAB, Montréal)* p 163.
- Selwyn G S **1986** Spatially Resolved Detection of O-Atoms in Etching Plasmas by 2-Photon Laser-Induced Fluorescence *Journal of Applied Physics* **60** 2771-2774.
- Sheverev V A, Stepaniuk V P and Lister G G **2002** Chemi-ionization in neon plasma *J. Appl. Phys.* **92** 3454-3457.
- St-Onge L and Moisan M **1994** Hydrogen atom yield in RF and microwave hydrogen discharges *Plasma Chem. Plasma Process.* **14** 87-116.
- Tabbal M, Kazopoulo M, Christidis T and Isber S **2001** Enhancement of the molecular nitrogen dissociation levels by argon dilution in surface-wave-sustained plasmas *Applied Physics Letters* **78** 2131-2133.
- Trompeter F J, Neff W J, Franken O, Heise M, Neiger M, Liu S H, Pietsch G J and Saveljew A B **2002** Reduction of *Bacillus Subtilis* and *Aspergillus Niger* spores using nonthermal atmospheric gas discharges *IEEE Trans. Plasma Sci.* **30** 1416-1423.
- Villeger S, Cousty S, Ricard A and Sixou M **2003** Sterilization of E-coli bacterium in a flowing N_2 - O_2 post-discharge reactor *J. Phys. D: Appl. Phys.* **36** L60-L62.

Conclusion

L'analyse par spectroscopie optique des caractéristiques de la post-décharge de N₂-O₂, corrélée avec les données d'érosion obtenues par microscopie électronique (MEB), nous a permis de montrer que: i) l'érosion est maximale lorsque la densité des particules métastables est maximum, en particulier sur et autour du faisceau de post-décharge de N₂ seul; ii) la destruction de ces espèces métastables s'obtient en ayant à ajouter qu'un faible %O₂ (1% environ), et/ou en éloignant, d'au moins 20 cm, la source de plasma de l'entrée de l'enceinte; ces deux paramètres permettent d'agir très fortement sur l'érosion et l'échauffement des polymères. Ayant ainsi identifié l'origine du processus d'érosion, il est possible de le contrôler et de le rendre quasiment négligeable. Par ailleurs, il se trouve que ces deux paramètres (distance source/enceinte et %O₂) permettent d'agir sur la nature de la post-décharge dans l'enceinte : en effet, dans les conditions précisées ci-dessus, on obtient une lointaine post-décharge, condition nécessaire à une production appropriée de NO(B).

En procédant à l'analyse comparative des résultats de mesure des densités de N et O tant au niveau de la décharge (par actinométrie), de la post-décharge proche (titrage) et dans la chambre de stérilisation elle-même (par la mesure de I_{N₂(580nm)}), et connaissant les différentes réactions impliquant les espèces présentes (N, O, N₂, O₂), nous avons pu aboutir aux conclusions importantes suivantes:

i) qu'un certain nombre de réactions "indésirables", ayant lieu ou se déroulant depuis la zone de la décharge et tout le long du tube à décharge, consomment N et O et diminuent en conséquence les densités correspondantes dans le réacteur, réduisant ainsi le taux de formation de NO(B) qui se réalise essentiellement dans le réacteur de stérilisation par la relation (N + O + M → NO(B) + M);

ii) pour O₂ ≤ 0.5%, l'intensité UV provenant de NO(B) est limitée par la densité de O ; au-delà de 0.5%O₂, c'est la densité de N qui devient le facteur limitant de la formation de NO(B).

Chapitre 4

Étude de l'influence de la température sur la cinétique d'inactivation de spores traitées par plasma

4.1 Introduction

Si les dispositifs médicaux (DM) de nature métallique ou céramique peuvent supporter des températures élevées comme celles de l'autoclave (chaleur humide) ou du four Poupinel (chaleur sèche), il n'en va pas de même pour les matériaux à base de polymères qui se dégradent facilement dans ces conditions. Aussi, dans le cas de la stérilisation des matériaux thermosensibles, il est nécessaire de ne pas dépasser une température de traitement d'environ 60 °C si l'on veut préserver leur intégrité structurale et fonctionnelle. Cependant, à défaut de stériliser par le seul effet thermique, comme c'est le cas de la chaleur sèche et de la chaleur humide, la majeure partie des autres méthodes de stérilisation fait quand même appel à une élévation limitée de température du DM afin de susciter un effet synergique avec l'agent principal d'inactivation, spécifique de chacune des méthodes en question. Cet effet synergique, inducteur d'une accélération notable de l'inactivation, est mis en oeuvre dans la plupart des cas, et est très généralement obtenu dans la frange supérieure de la gamme des températures généralement explorées (-15 à 70 °C). Ainsi, les propriétés stérilisantes de l'oxyde d'éthylène (Oxborrow 1983), du peroxyde d'hydrogène (Jonas 1989), de l'ozone (Craik 2002), des irradiations UV (Kim 2001) et γ (Kim 2001) sont toutes améliorées lorsque ces différents agents agissent en présence d'une température de l'objet à stériliser relativement élevée. En ce qui concerne le plasma froid comme agent stérilisant, les travaux, très peu nombreux, publiés sur la question rapportent une nette amélioration des propriétés d'inactivation en présence d'une assistance thermique concomitante (Hury 1998, Villeger 2005).

Ayant pris connaissance de l'importance de la température sur les cinétiques d'inactivation de différentes méthodes conventionnelles de stérilisation, il nous a paru pertinent d'étudier l'effet de l'apport de chaleur sur la cinétique d'inactivation de spores bactériennes *B. atrophaeus*, traitées dans une post-décharge de N₂-O₂ où les ions n'interviennent pas ; seuls les UV et les espèces neutres de type radicalaire comme O

peuvent donc jouer un rôle dans l'inactivation. Cependant, en plus de l'effet germicide de ces espèces neutres, l'adsorption des espèces chimiques et les réactions chimiques exothermiques qui ont lieu à la surface de n'importe quel objet peuvent conduire à son échauffement, localement ou sur la totalité de l'objet selon le degré de conduction thermique de ce matériau. Pour un objet donné, cette élévation de température dépend des conditions plasma utilisées (densité de puissance, nature du gaz, etc.)¹⁵ et croît en général avec le temps d'exposition; c'est donc un processus peu contrôlable de l'extérieur. Aussi, une étude contrôlée de l'influence de la chaleur sur la cinétique d'inactivation par plasma impose de pouvoir maintenir constante la température d'un objet lors de son traitement par plasma.

Ce chapitre comprend trois parties : (i) revue concise de la littérature scientifique traitant de l'impact de la température sur l'inactivation de micro-organismes traités aussi bien dans un plasma que par des lampes UV germicides ; ii) présentation détaillée de nos résultats expérimentaux qui comprennent le cas de traitements par "température seule", puis avec plasma à différentes températures, en l'occurrence, 12, 28, 52 et 68 °C ; iii) interprétation et discussion des résultats obtenus, avec modélisation, fondée sur le concept de fluence et prenant en compte le paramètre température, du cas où l'intensité UV est optimale.

4.2 Revue bibliographique : effet de la température sur l'inactivation de micro-organismes traités par plasma et par lampe UV

Dans cette section, nous allons rapporter, de manière concise, quelques unes des principales études publiées sur les effets combinés "température / plasma" et "température / lampe UV".

¹⁵ Pour un diélectrique, par exemple un polymère, traité dans la post-décharge de N₂-O₂, on enregistre une faible élévation de température (moins de 10 °C, excepté sur l'axe) durant les 40 min d'exposition ; pour un métal, en revanche, dans les mêmes temps la température peut atteindre 80 °C; le processus d'échauffement par recombinaison dépend, entre autres, des caractéristiques de la surface, de la nature et de la densité de la particule incidente ainsi que de la température du gaz.

4.2.1 Effet de la température sur l'efficacité de l'inactivation par plasma

Hury *et al* (1998) ont rapporté des résultats expérimentaux d'inactivation de spores *B. atrophaeus* soumises directement à une décharge de CO₂ basse pression (1 mtorr) à trois températures différentes (-15, 15, 60 °C). Les courbes de survie obtenues sont bi-phasiques et présentent une cinétique d'inactivation variant de façon complexe avec la température. En effet, la meilleure inactivation (10⁶ spores en 30 min) est obtenue pour 60 °C et la plus faible à 15 °C (10³ spores en 30 min). Ces auteurs n'évoquent ni l'existence d'une synergie possible entre les espèces actives du plasma et la température, ni ne proposent une explication du phénomène observé.

Moreau *et al* (2000), en vue d'inactiver 10⁶ spores *B. atrophaeus*, ont utilisé la post-décharge d'un plasma micro-ondes d'oxygène à basse pression (20 mtorr) à deux températures différentes (15 et 50 °C) du porte-échantillon. Ils obtiennent des courbes de survie bi-phasiques et la meilleure inactivation à 50 °C. Afin d'expliquer ce résultat, ils affirment que l'inactivation des spores est due à leur gravure, et que la température permet d'augmenter l'efficacité de ce processus.

Trompeter *et al* (2002) ont réalisé l'expérience suivante, mettant en évidence un effet thermique sur l'efficacité germicide d'une décharge à barrière diélectrique (DBD) à la pression atmosphérique (PA) : dans un premier temps, partant d'une faible température, ils soumettent les spores à des doses croissantes d'espèces actives (profil 1, Figure 4-1); lors de ce traitement, les électrodes de la DBD subissent un échauffement progressif; dans un second temps, et partant alors d'une température des électrodes plus élevée, ils diminuent progressivement la dose d'espèces actives que reçoivent les spores¹⁶ (profil 2, Figure 4-1), la température des électrodes continuant à augmenter. On observe avec eux que la mortalité des spores est plus importante, à dose équivalente, lorsque la température des électrodes est plus élevée. Ils évoquent l'existence d'un effet de synergie mais ne proposent aucune explication.

¹⁶ Celles-ci ont été déposées sur un film d'emballage qui repose sur l'une des deux électrodes de la DBD.

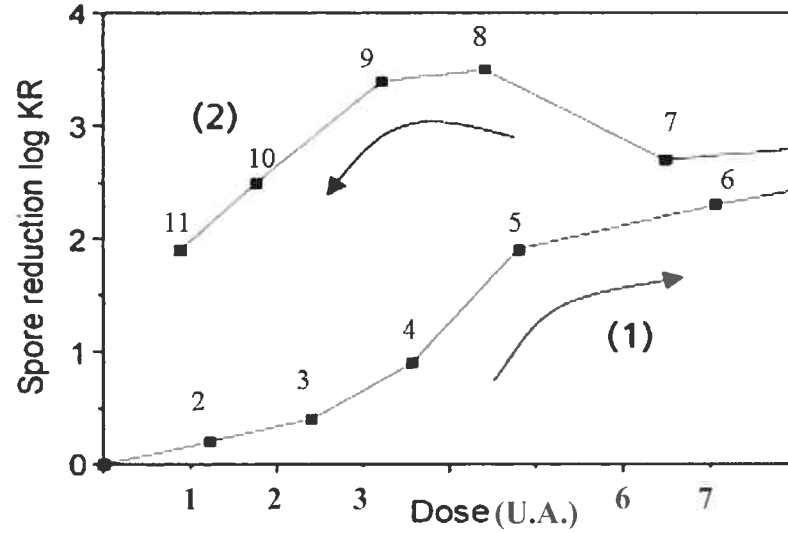


Figure 4-1 Profils d'inactivation obtenus selon que : (1) la dose est augmentée en commençant alors que les électrodes sont à la température ambiante, leur température s'accroissant progressivement avec le temps ; (2) la dose est diminuée en partant d'une température déjà élevée et continuant à croître (Figure 4-2) (figure adaptée de Trompeter *et al* (2002)).

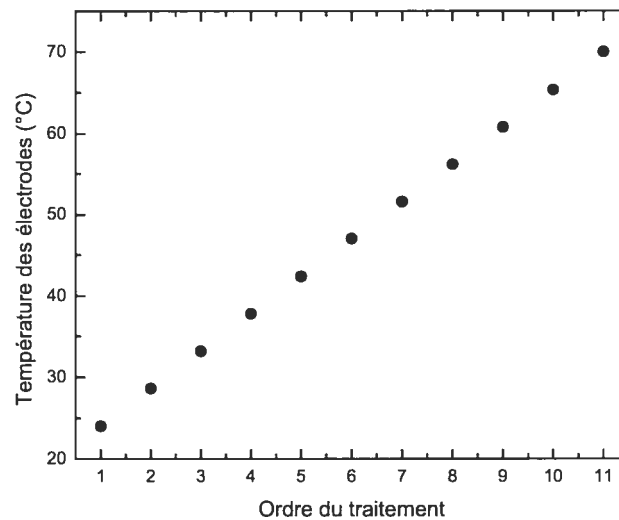


Figure 4-2. Évolution estimée de la température des électrodes de la DBD de Trompeter *et al* (2002) en fonction de l'ordre des traitements tel que présenté à la Figure 4-1, en supposant une progression constante de la température d'un traitement à l'autre.

Villeger *et al* (2005) ont traité 10^{12} bactéries végétatives *E. coli* à l'aide d'une post-décharge d'un plasma micro-ondes N_2 -5% O_2 , à basse pression (5 torr), à quatre températures différentes (sans chauffage externe, puis 60, 80 et 120 °C). Ils obtiennent des courbes de survie bi-phasiques dont la cinétique d'inactivation augmente avec l'élévation de la température. Ils rapportent une inactivation de 12 log de bactéries en 5 min à 120 °C, alors que la température seule en inactive 6 log en 30 min ; le traitement sans chauffage en inactive 2 log en 5 min. Ils attribuent l'efficacité accrue de leur inactivation plasma / température à un effet de synergie entre les espèces actives de la post-décharge et la température. Cependant, le mécanisme d'inactivation par ces espèces n'est pas explicité.

Cvelbar *et al* (2006) ont réalisé une série d'expériences dans lesquelles ils exposent 10^6 spores *B. subtilis* en contact direct avec une décharge radio-fréquences (RF) d'oxygène à basse pression (0.3 torr). Pour étudier l'effet de la température sur la cinétique d'inactivation, ils utilisent deux types de supports (aluminium et verre) immergés dans la décharge, et dont ils suivent les variations de température en fonction du temps d'exposition. En mode continu, ils observent une inactivation complète en 40 secondes (support aluminium) et 100 secondes (support verre), tandis qu'en mode pulsé la stérilité est obtenue en 60 secondes avec le support aluminium et n'est toujours pas atteinte après 300 secondes avec le support en verre. Ils attribuent la plus grande efficacité du traitement en mode continu à une contribution due à un échauffement thermique important du support en aluminium (passage de 300 à 550 K en 40 s) et à un moindre échauffement du support en verre (allant de 300 à 370 K). Ils affirment que le mécanisme d'inactivation est le résultat de la combinaison d'un effet thermique (échauffement du substrat dû à la recombinaison de O atomique en surface) et de la gravure (radicaux oxygénés). Notons que les auteurs cités décrivent un effet synergique faisant intervenir la température et les atomes d'oxygène alors que Villeger *et al* (2004) évoquent un effet de synergie de la température avec les atomes N de la post-décharge.

En somme, l'ensemble des travaux rapportés dans notre brève revue fait mention d'effets synergiques entre la température et spécifiquement des espèces chimiquement réactives issues du plasma. Rappelons que le plasma de post-décharge (chapitres antérieurs) comprend, comme espèces actives, outre les radicaux, des photons UV et que nous avons cherché à optimiser l'effet des UV qui, dans notre cas, constituent l'espèce active

dominante. Par conséquent, il est important pour compléter cette étude bibliographique de nous pencher sur les travaux traitant de l'effet synergique, s'il existe, entre les UV et la température. Pour cela, nous allons passer en revue quelques travaux importants portant sur les effets combinés de la température avec les UV émis par des lampes germicides.

4.2.2 Effet de la température sur l'efficacité de l'inactivation par lampe UV

Tyrrell (1976) a effectué les deux séries d'expériences suivantes : i) il a étudié l'effet d'une exposition en fonction du temps à la température de 52 °C de bactéries végétatives *E. Coli* prétraitées par UV de différentes longueurs d'onde (254, 334, 365 et 405 nm) et à différentes doses. Hormis le cas de 254 nm, les trois autres longueurs d'onde ont donné lieu à une élimination (réduction) progressive (avec la dose) de l'épaulement (phase de latence) présent dans le cas du traitement à la chaleur seule, et à une augmentation de la vitesse d'inactivation. De plus, la comparaison des effets synergiques en fonction de la longueur d'onde indique que 334 nm est la longueur d'onde la plus sensibilisante (à l'effet subséquent de la chaleur) ; ii) il a étudié l'effet d'un pré-traitement à la chaleur sur une inactivation subséquente aux UV. Pour cela, les souches bactériennes végétatives ont été exposées durant 15 min à 52 °C, puis soumises aux radiations UV de 254 et 365 nm à température ambiante. Ce chauffage relativement doux (52 °C) de 15 min réduit très fortement la phase de latence à 365 nm et occasionne une relative augmentation de la cinétique d'inactivation. A contrario, à 254 nm, il n'y a pratiquement pas d'effet notable. Il conclut alors que les longueurs d'onde de 334, 365 et 405 nm montrent une forte synergie avec des températures peu élevées, tandis qu'à 254 nm, l'interaction synergique observée est mineure (cet effet, pour des longueurs d'ondes comprises entre 218 et 295 nm, avait déjà été rapporté par Hollaender 1943). Afin d'expliquer ce phénomène, Tyrrell avance qu'un traitement doux par la chaleur pourrait accélérer les processus de dégradation (non spécifiés) en des sites de brins d'ADN et interférer avec les systèmes de réparation.

Severin *et al* (1983) soumettent différents micro-organismes (*E. Coli* et *Candida parapsilosis*, des bactéries végétatives, et le virus F2) à l'action d'une lampe basse pression au mercure (254 nm) à trois températures différentes (5, 20, 35 °C). Ils confirment le fait qu'à 254 nm, la cinétique d'inactivation est quasiment indépendante de la température pour la plage allant de 5 à 35 °C et pour les 3 différents micro-organismes testés.

Takeuchi *et al* (1996) soumettent des cellules (végétatives) de concombre à l'effet d'une lampe UV moyenne pression dont le spectre d'émission est compris entre 280 et 360 nm. Ils mesurent le nombre de lésions à l'ADN (dimères et photo-produits) créées par l'exposition à la lampe UV, en fonction de la température entre 0 et 35 °C. Ils observent que le nombre de lésions à l'ADN augmente avec la température mais ne donnent aucune explication à ce phénomène.

Kim *et al* (2006) ont examiné l'influence de la combinaison "UV / température" sur l'inactivation de cellules végétatives fongiques *S. cerevisiae* dans les conditions suivantes : i) traitement par photons UV seuls (254 nm à une puissance de 1.5 Wm^{-2}); ii) traitement thermique seul (57.5 °C); iii) action simultanée des UV et de la température. Il ressort clairement des résultats obtenus que la vitesse d'inactivation dans le cas (iii) est plus importante que celle où l'on additionne les effets séparés de chacun des deux agents (UV seuls et température seule), ce qui montre l'existence d'une synergie. Pour mieux comprendre l'interaction entre UV et température, ils ont étudié les variations d'inactivation pour trois valeurs de la fluence UV (0.033, 0.25 et 1.5 Wm^{-2}) à différentes températures. On observe que pour une intensité UV donnée, la synergie passe par un maximum pointu en fonction de la température. Si bien qu'en dehors d'une plage de température très restreinte (largeur à mi-hauteur de 10 °C), l'effet synergique peut être nul. Ceci pourrait expliquer les observations de Tyrrell (1976) et de Severin *et al* (1983) concernant l'absence ou une très faible interaction entre les UV émis à 254 nm et la température. En conclusion, Kim *et al* (2006) supposent, à la suite de plusieurs chercheurs, que la synergie UV/température est la transformation de sous-lésions (lésions non encore létales) induites par un des agents en lésions létales par l'intervention de l'autre agent d'inactivation. On peut penser que certaines sous-lésions, disons créées par les UV, deviennent létales par l'action de la chaleur, ou inversement.

Il ressort de ce qui précède que les processus d'inactivation par irradiation UV (ce qui peut être le cas du plasma, lorsque les UV sont dominants) et par chaleur sèche ont pour cible privilégiée l'ADN. De plus, les publications identifient deux facteurs de résistance communs à ces deux types de traitement, à savoir : i) le rôle important dévolu aux protéines SASP, et ii) le rôle de la réparation de l'ADN lors de la germination. La fragilisation amorcée et entretenue par la température pourrait intervenir : i) en rendant plus dommageable, durant le traitement, le travail des UV qui bombardent alors des sites thermo-

sensibilisés et donc plus fragiles ; ii) en fragilisant en particulier le système de réparation qui ne peut plus être aussi efficace lors de la germination du fait d'un certain nombre de lésions aux protéines de ce système de réparation.

4.3 Dispositif expérimental et protocole

Le dispositif utilisé dans notre étude comprend quatre éléments : i) la chambre de stérilisation ; ii) la source de plasma ; iii) le système de pompage et d'évacuation du gaz ; iv) le système de contrôle de la température du porte-substrat.

4.3.1 Source de plasma

La Figure 4-3 présente le montage expérimental permettant de créer et d'entretenir la décharge utilisée lors de nos expériences. Il se compose d'un générateur micro-ondes Sairem (GLP 06 KED/RI1354) de fréquence 915 MHz, qui peut délivrer une puissance de l'ordre de 600 W ; d'un circulateur (intégré au générateur) dont le rôle est de rediriger la puissance éventuellement réfléchiée par la source de plasma vers une charge adaptée plutôt que vers le générateur ; d'une ligne bidirectionnelle associée à un bolomètre permettant de mesurer les puissances incidente et réfléchiée ; d'un diviseur de puissance 3 dB répartissant la puissance incidente en deux parts égales ; et finalement d'un applicateur de champ (surfatron) qui permet de créer et d'entretenir une décharge en lançant une onde électromagnétique qui se couple aux électrons du plasma sous forme d'une onde de surface (O.S.) se propageant à l'interface plasma – diélectrique (tube à décharge) (Moisan et Zarkrewski 1991).

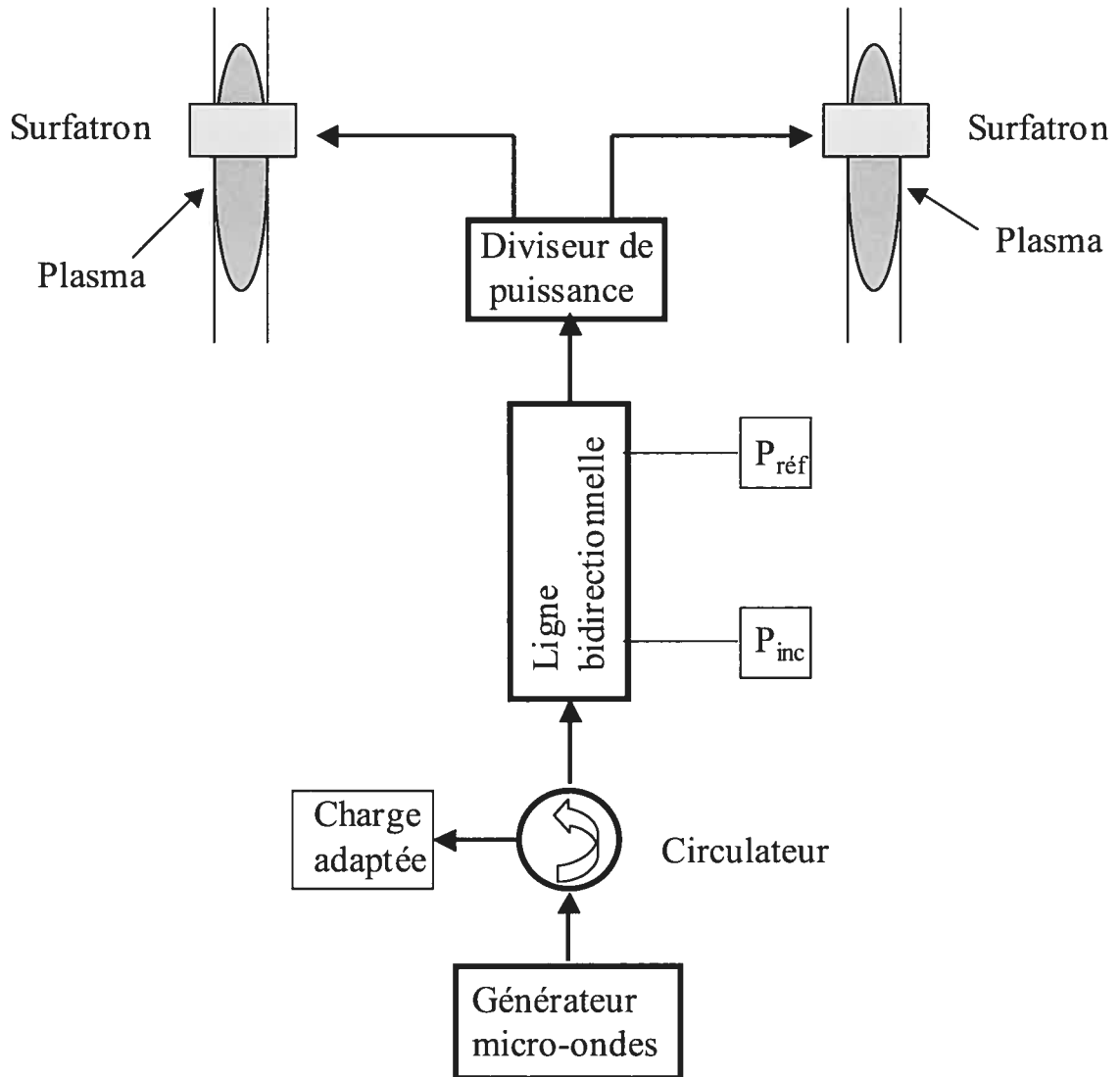


Figure 4-3. Composantes de la source de plasma utilisées lors de nos expériences. Celle-ci est constituée d'un générateur micro-ondes ; d'un circulateur couplé à une charge adaptée ; d'une ligne bidirectionnelle permettant la mesure des puissances incidente et réfléchie; d'un système séparant la puissance micro-ondes en deux parts égales (diviseur 3 dB) et, de deux surfatrons permettant le lancement d'ondes de surface le long des tubes à décharge situés de part et d'autre de l'enceinte de stérilisation (Figure 4-4).

4.3.2 Chambre de stérilisation

La chambre de stérilisation utilisée dans notre étude est présentée à la Figure 4-4. Elle est en aluminium et est de forme parallélépipédique. Les dimensions internes de la chambre (61 cm x 26 cm x 30 cm) lui confèrent un volume d'environ 50 litres. Elle comprend, de plus, deux sources de plasma (Figure 4-3), créées dans des tubes de 26 mm de diamètre interne (d.i.) et 30 mm de diamètre externe (d.e.), disposées axialement et symétriquement de part et d'autre de l'enceinte.

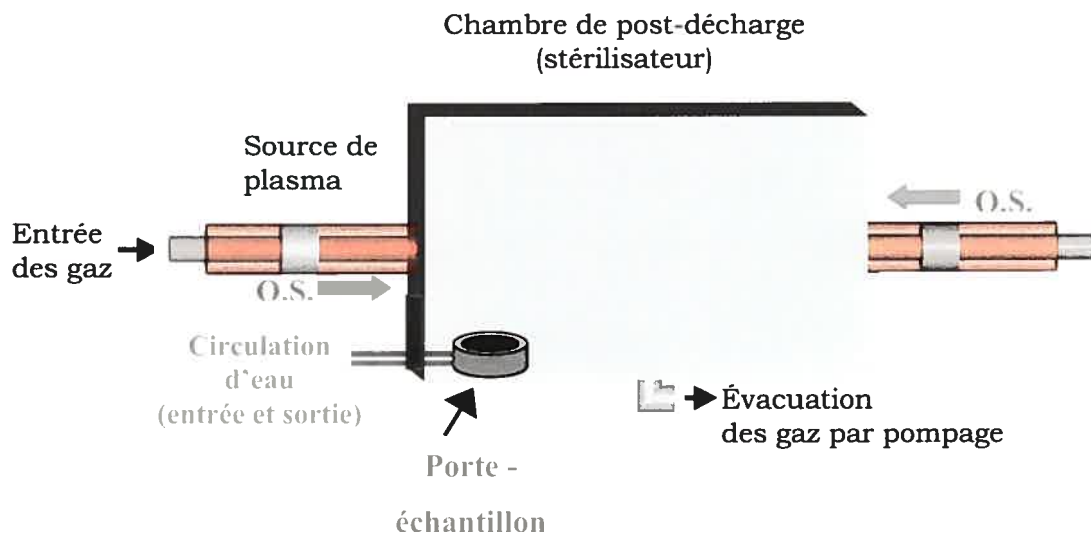


Figure 4-4. Vue latérale de la chambre de stérilisation. Volume de 50 L (dimensions internes 61 x 26 x 30 cm³); tubes à décharge 26 d.i. 30 d.e. ; fréquence d'excitation 915 MHz.

4.3.3 Système de pompage

Le système d'évacuation des gaz est constitué d'une pompe sèche (Alcatel ACP28), caractérisée par une vitesse de pompage maximale de 470 L/min. Elle permet d'atteindre un vide initial (avant introduction du gaz de la décharge) de 50 mtorr en quelques minutes, et de maintenir ensuite une pression de 4-5 torr pour un débit de travail de 2 L/min. La valeur de la pression dans la chambre de stérilisation est mesurée à l'aide d'une jauge capacitive couvrant l'intervalle de pressions allant de 10 mtorr à 10 torr.

4.3.4 Contrôle de la température des échantillons

Le système de contrôle de la température des échantillons est constitué d'un porte-échantillon (PE) métallique (cuivre) dont la température est maintenue à une valeur de consigne grâce à une circulation d'eau couplée à un échangeur thermique (Neslab). Cependant, un tel montage peut poser des problèmes d'homogénéisation de la température du dépôt de spores : en effet, le transfert de chaleur doit d'abord s'effectuer de l'échangeur thermique au métal du PE, puis du PE à la boîte de Petri (Petri) et, finalement, du Petri aux spores ; ces dernières ne sont d'ailleurs pas forcément toutes en contact avec le Petri. Afin de vérifier la valeur de la température du Petri, nous avons utilisé un thermocouple, et mesuré la température du fond du Petri, en fonction du temps, pour chaque température imposée par l'échangeur thermique. La Figure 4-5 présente l'évolution, en fonction du temps, de la température du Petri pour deux valeurs de température de l'échangeur (10 et 80 °C). Nous observons que la température du Petri atteint sa valeur d'équilibre (valeur asymptotique) en environ 5 min. Dans notre protocole (c.f. 4.3.5.2), nous laissons la température du Petri se stabiliser pendant 15 min avant de le soumettre à l'action du plasma.

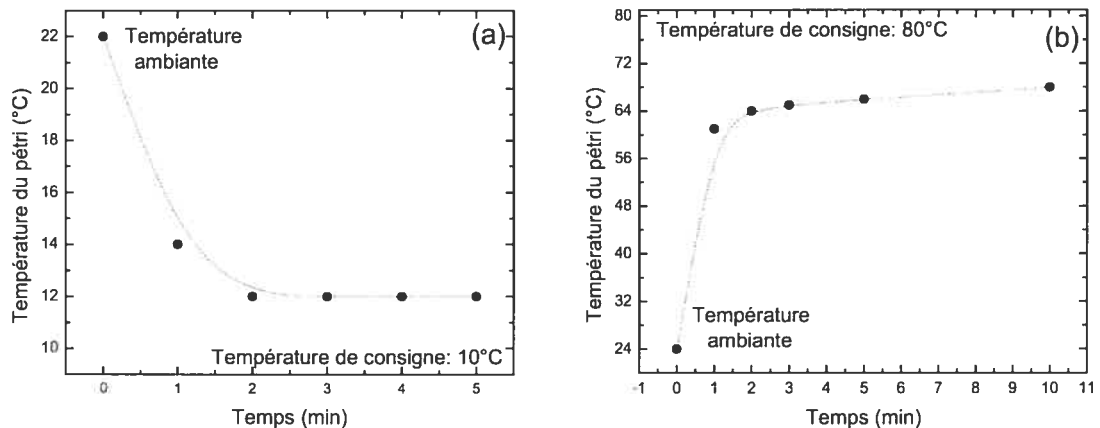


Figure 4-5. Évolution à partir de la température ambiante de la température du Petri en fonction du temps, à deux valeurs de la température de consigne de la console de chauffage : a) 10 °C ; b) 80 °C.

À titre de comparaison, la Figure 4-6 présente l'écart existant entre la température du Petri versus celle de l'échangeur, pour une plage de variation allant de 2 à 80 °C. Ainsi, même si le Petri n'est pas exactement à la température de consigne, la température à laquelle il est porté varie de façon proportionnelle à celle-ci.

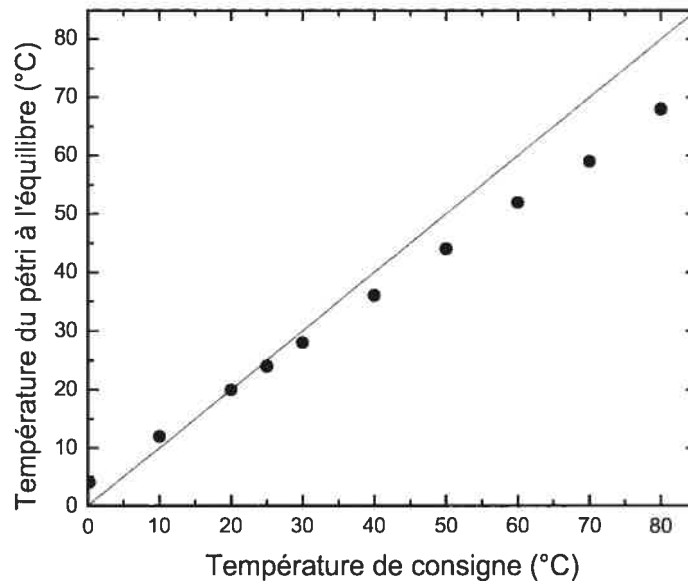


Figure 4-6 Évolution de l'écart entre la température de consigne variant de 2 à 80°C, et celle mesurée du Petri.

4.3.5 Le protocole de stérilisation

Le protocole de stérilisation comprend trois phases : i) préparation des échantillons ; ii) exposition au plasma ; iii) récupération des échantillons et dénombrement des spores survivantes. Dans ce qui suit, nous développerons ces différentes étapes.

4.3.5.1 Préparation des échantillons

Préparation de la suspension-mère

On cultive des spores d'une souche *B. atrophaeus* ATCC®9372 dans 5 ml de Bouillon de Soja TSB (Trypticase Soy Broth). Puis, on dispose une partie de la préparation dans un milieu de sporulation que l'on laisse incubé pendant 10 jours à 37 °C. Les spores sont finalement récoltées, lavées puis la suspension bactérienne ainsi obtenue conservée à 4 °C à l'abri de la lumière.

Évaluation de la concentration des spores viables

Afin d'évaluer la concentration de spores viables dans la solution-mère, on prépare des dilutions sérielles 1/10 de la suspension dans de l'eau ultra-pure. Puis, des échantillons, en duplicata, de 50 µl et 100 µl sont étalés sur de la gélose de soja TSA (Trypticase Soy Agar) et un décompte de colonies (une colonie correspond en principe à une spore vivante) est effectué après une incubation de 24 h à 37 °C.

Dépôt des spores sur Petri

On procède à la dilution de la solution-mère afin d'obtenir une concentration de spores viables égale à 5×10^7 /ml. Puis, on dépose un volume de 200 µl de cette suspension (contenant 10^7 spores) dans un Petri stérile. Le dépôt est mis à sécher à la température ambiante et entreposé à l'abri de la lumière.

4.3.5.2 Exposition au plasma

Le porte-échantillon est d'abord amené à la température désirée grâce à l'échangeur thermique¹⁷. Puis, après avoir déposé le Petri contenant les spores sur le PE, le pompage est lancé et la pression abaissée jusqu'à environ 50 mtorr. Après 10 min de pompage, on injecte l'azote dans chacun des tubes (1 Litre standard par minute (Lsm) par tube), on fixe le débit de O₂ afin d'obtenir le pourcentage souhaité dans le mélange N₂-O₂, et la vitesse de pompage est réglée afin d'obtenir une pression de 5 torr dans l'enceinte de stérilisation. Finalement, après 5 min (au total 15 min de chauffage du Petri), on fixe la puissance du générateur à 500 W (250 W par tube) et on allume le plasma, dans chaque tube, à l'aide d'une bobine Tesla.

À la fin du temps d'exposition choisi, on coupe la puissance micro-ondes, on arrête la circulation des gaz et on revient progressivement à la pression atmosphérique en ouvrant une vanne disposée sur le côté de l'enceinte. Lorsque la pression dans l'enceinte a atteint la pression atmosphérique, on ouvre la chambre de stérilisation, on recouvre le Petri avec son couvercle d'origine, puis on l'entrepose à l'abri de la lumière jusqu'à la récupération.

¹⁷ La température du pétri est obtenue de la température de consigne de l'échangeur telle que corrigée en tenant compte de la courbe de calibration (Figure 4-16).

4.3.5.3 Évaluation du nombre de spores survivantes

Récupération

On ajoute 5 ml de Tween salin 0.5% (dont 0.85% NaCl) à chaque Petri puis, à l'aide d'un écouvillon stérile, on frotte la zone où se trouve le dépôt de spores. La suspension obtenue (ainsi que la tête de l'écouvillon) est versée dans un tube puis agitée par vortex afin de l'homogénéiser. À partir de cette suspension et suivant le nombre de survivants attendus, on applique une des deux méthodes de comptage suivantes :

Étalement sur milieu solide

Divers volumes (50, 100 ou 200 μ l) et dilutions (de 10^0 à 10^{-4}) de la suspension sont étalés dans des boîtes de gélose TSA, chaque étalement étant effectué en triplicata, puis incubées pendant 24 heures à 37 °C. Après quoi, on dénombre le nombre de colonies formées. Cette méthode est utilisée lorsque le nombre de spores survivantes attendu dépasse 100.

Filtration sur membrane

Sous une hotte laminaire et à l'aide d'une unité de filtration comprenant une membrane de nitrocellulose de 0.22 μ m stérile, on filtre, sous vide, le volume complet (5 ml) de la suspension de récupération. La membrane utilisée est par la suite déposée sur une gélose TSA, laissée à incuber pendant 24 heures, puis le nombre de colonies formées est compté. Cette méthode permet d'estimer avec une très bonne précision de faibles nombres de spores survivantes.

Obtention d'une courbe de survie

Chaque point d'une courbe de survie est la moyenne du nombre de survivants enregistré sur 3 Petri traités indépendamment, mais pour des conditions expérimentales identiques. La barre verticale autour du point représente l'écart à la moyenne.

4.4 Résultats expérimentaux

Dans ce qui suit, nous allons exposer successivement les résultats obtenus lors du traitement combiné plasma/température : i) spores soumises aux conditions optimales d'émission UV avec température fixée à 12, 25, 52 et 68 °C; ii) spores soumises aux mêmes conditions expérimentales, avec cette fois un filtre passe-haut (avec $\lambda > 115$ nm) ne laissant passer, normalement, que les UV et non les espèces gazeuses (radicalaires) ; iii) spores soumises à deux autres conditions plasma (avec 1 et 10%O₂) où l'intensité UV a diminué d'un facteur donné. Enfin, nous introduirons les bases du modèle utilisé pour rendre compte des résultats obtenus, puis comparerons les données expérimentales avec la théorie.

4.4.1 Effet de la température sur la cinétique d'inactivation dans des conditions d'émission UV optimales.

4.4.1.1 Effet thermique seul sur la survie des spores dans une plage de températures allant de 12 à 68 °C

Avant toute étude de l'effet de la température en combinaison avec le traitement plasma, il importe de vérifier l'influence du chauffage seul sur la mortalité des spores. Nous avons effectué une telle étude avec 10⁷ spores de *B. atrophaeus* pour 3 températures différentes (12, 52 et 68 °C), à une pression de 5 torr du mélange N₂-0,3%O₂, plasma non allumé. La Figure 4-7 montre que les spores ne sont aucunement affectées par ce traitement, ce qui est conforme aux indications de la littérature scientifique affirmant que les spores résistent à des températures pouvant dépasser les 100 °C (Block 2002).

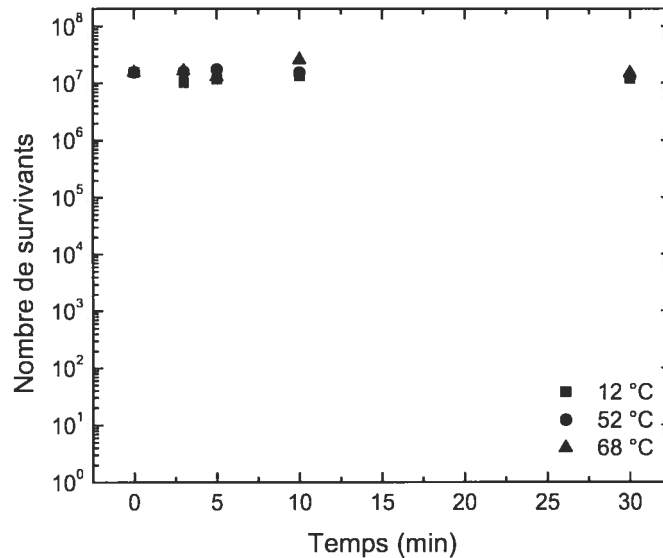


Figure 4-7 Évolution du nombre de spores survivantes en fonction du temps après traitement par chauffage seul à 12 °C, 52 °C et 68 °C dans un flux de 1 Lsm (par tube) de N₂-0,3%O₂ à 5 torr.

Nous allons maintenant étudier l'effet du chauffage sur la cinétique d'inactivation de spores soumises à la post-décharge dans des conditions d'émission UV optimales.

4.4.1.2 Traitement plasma/température dans des conditions optimales d'émission UV

Synergie plasma/température dans le cas de traitements simultanés

La Figure 4-8 présente les résultats de l'inactivation de 10⁷ spores bactériennes dans une post-décharge de N₂-O₂ dans les conditions d'émission UV maximale (0,3%O₂) et pour les températures de 12, 28, 52, et 68 °C. Il faut noter que le Petri est exposé directement aux effluents de la post-décharge, l'interposition de filtres passe-haut entre le flux gazeux et le Petri n'étant présentée que plus loin, section 4.4.1.4. On observe que chaque courbe de survie obtenue présente deux phases, quelle que soit la température. De plus, la pente de la première phase de chaque courbe devient de plus en plus raide (D_1 diminue) à mesure que la température augmente¹⁸ (voir aussi Figure 4-9). Cela montre l'existence d'une synergie entre les espèces actives issues du plasma et la température à laquelle est élevé le Petri (et

¹⁸ Du fait de notre incapacité à contrôler l'empilement des spores dans les dépôts, nous n'avons pas considéré les variations affectant la deuxième phase.

donc les spores). Cela est confirmé aussi par une diminution significative du nombre de survivants après 30 min de traitement lorsque la température passe de 4 à 68 °C, comme le décrit la Figure 4-10 ; ainsi l'efficacité accrue obtenue en première phase du fait de l'effet thermique se retrouve aussi en seconde phase des courbes.

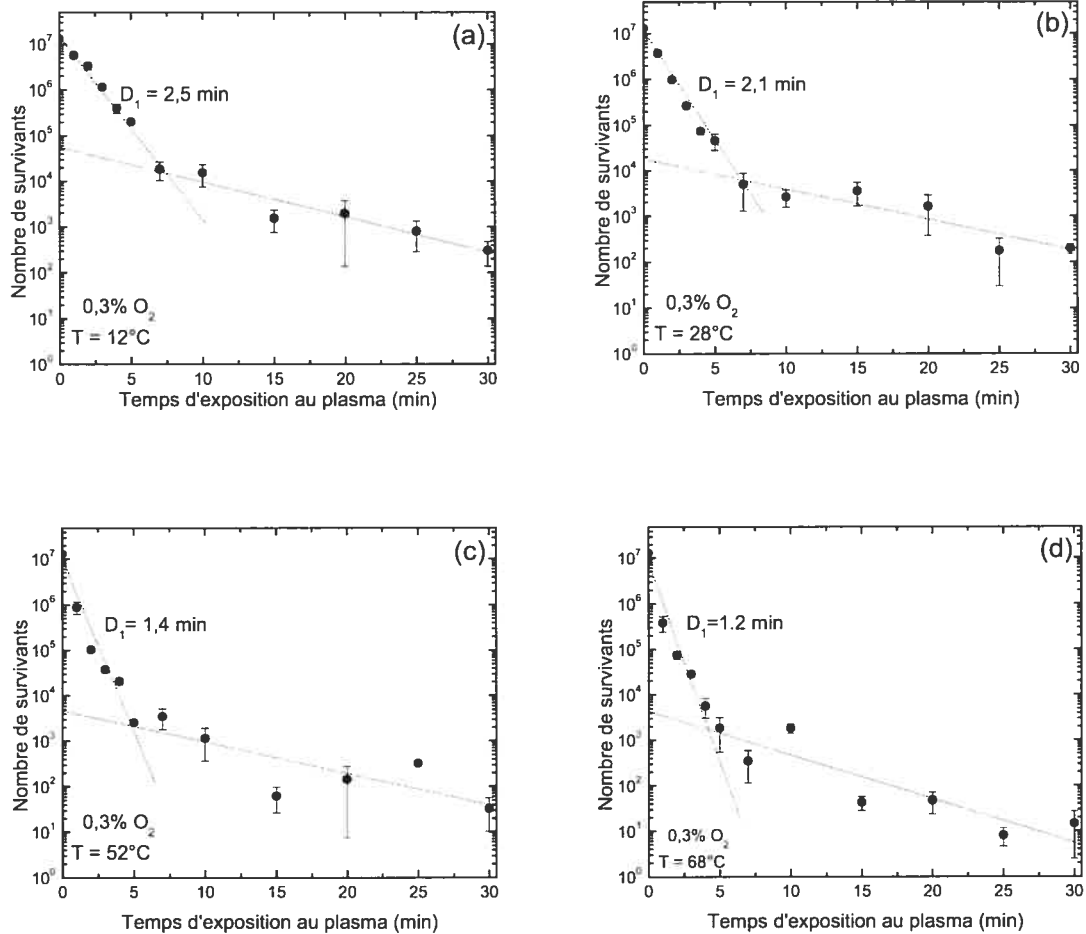


Figure 4-8. Courbes de survie de spores *B. atrophaeus* obtenues pour des températures de 12, 28, 52, et 68 °C. Conditions plasma : 1L standard de N_2 / min (par tube à décharge), $0,3\% \text{ O}_2$, 5 torr, 250 W par tube (915 MHz).

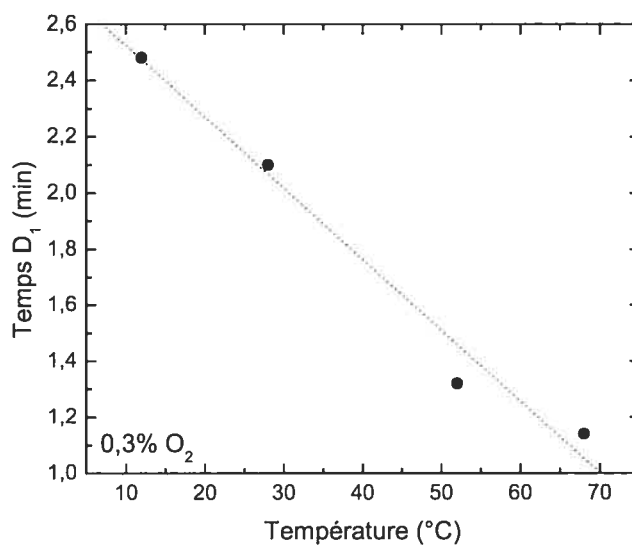


Figure 4-9 Évolution du temps D₁ en fonction de la température du Petri obtenue dans des conditions d'émission UV optimales (0,3%O₂).

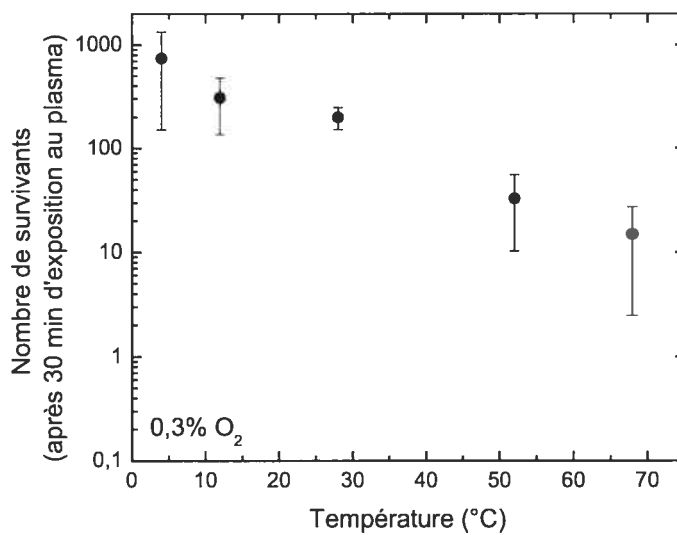


Figure 4-10 Évolution du nombre de spores survivants après 30 min de traitement (10^7 spores au départ) en fonction de la température du Petri dans des conditions d'émission UV optimales (0,3%O₂). On passe, en moyenne, de 800 spores à 10 °C à 20 spores à 68 °C.

Conditions d'existence d'un effet synergique

Nous avons observé ci-dessus un effet de synergie entre l'action de la température et l'exposition au plasma lorsque les deux types de traitement (plasma + chauffage) sont simultanés. Cependant, on pourrait se demander si cet effet de synergie se conserve lorsque le traitement plasma précède le chauffage du Petri ou, au contraire, lorsque le chauffage du Petri précède le traitement plasma, ce qui est rapporté pour des bactéries à l'état végétatif (Tyrrell 1976). La Figure 4-11 présente les résultats obtenus pour les différents traitements suivants : i) chauffage à 52 °C pendant un temps compris entre 16 et 25 min, suivi d'un traitement plasma pendant 1, 2, etc., 10 min. Le traitement plasma est réalisé 3 heures après le conditionnement thermique pour bien séparer les effets des deux agents (chauffage et plasma). De plus, nous avons choisi d'opérer à 12 °C pour le traitement plasma dans le but de mieux discriminer les deux effets ; ii) traitement par plasma (après conditionnement thermique à 12 °C) durant 1, 2, etc., 10 min, puis, en l'absence de plasma, chauffage à 52 °C durant 16, 17, etc., 25 min. De la même manière, le chauffage est réalisé 3 heures après le traitement plasma pour bien séparer ces deux effets ; iii) pour fins de comparaison, nous avons aussi réalisé un traitement combiné plasma/chauffage à 12 et 52 °C.

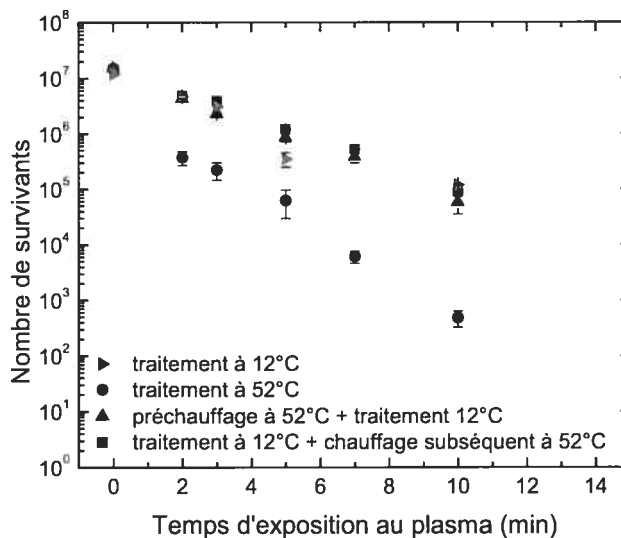


Figure 4-11. Évolution du nombre de survivants en fonction du temps de traitement pour 4 protocoles différents : i) traitement par plasma à 52 °C ii) traitement par plasma à 12 °C, iii) préchauffage à 52 °C puis traitement par plasma à 12 °C, iv) traitement par plasma à 12 °C puis chauffage subséquent à 52 °C. Le cas échéant dans des conditions d'émission UV optimales (0,3%O₂).

On observe d'après la Figure 4-11 que les traitements séparés (chauffage seul puis plasma ou plasma seul puis chauffage) ne donnent lieu à aucun changement significatif par rapport au cas du traitement par plasma sans apport thermique au PE (en fait à 12 °C dans le cas présent¹⁹). De plus, la synergie plasma/température est manifeste puisque l'on observe un gain d'inactivation de 2 log, après seulement 10 min d'exposition au plasma, quand on passe de 12 à 52°C.

De manière concise, on peut écrire : $T(52) + UV(12) = UV(12) + T(52) = UV(12) < UV(52)$.

En conclusion, on enregistre un effet de synergie sur l'inactivation de spores *uniquement* lorsque le traitement par plasma et le chauffage sont réalisés *simultanément*.

4.4.1.3 Inactivation plasma/température dans des conditions optimales d'émission UV en présence du filtre CaF₂

Sachant que dans la post-décharge, on retrouve des photons UV mais aussi des espèces réactives telles que les atomes d'oxygène, on peut se demander avec laquelle de ces deux espèces actives la synergie avec la température est la plus importante. Ainsi, pour séparer les effets synergiques dus aux photons UV de ceux dus aux espèces réactives, nous avons eu recours à un filtre passe-haut de fluorure de calcium (CaF₂) afin de ne laisser passer que les photons (notamment les UV en ce qui nous concerne, de longueur d'onde supérieure à 120 nm) mais pas le flux gazeux. En effet, si le filtre optique est déposé de façon adéquate sur le Petri, il y empêche la pénétration des espèces gazeuses chimiquement réactives (notamment l'oxygène atomique, O) du plasma.

La Figure 4-12 présente les résultats d'inactivation de spores soumises au plasma à différentes températures (12, 28, 52, 68 °C), avec le filtre CaF₂ en place sur chaque Petri exposé. Précisons que nous ne nous intéressons ici qu'à la première phase de la courbe de survie.

Les regressions linéaires effectuées sur les données de la Figure 4-12 montrent que le temps D₁ diminue à mesure que la température augmente, comme dans le cas sans filtre. Le temps D₁ est plus élevé dans le cas de l'inactivation sans filtre du fait du plus faible flux de photons atteignant les spores. En effet, on estime que l'utilisation du filtre CaF₂ a comme

¹⁹ Le traitement plasma de référence à 23 °C (température ambiante) aurait été plus approprié.

conséquence une diminution du flux de photons atteignant les spores de 50%. Cette diminution peut s'expliquer par l'atténuation obtenue du filtre lui-même (10%) mais surtout par l'impossibilité pour les espèces émettrices de photons UV de se rendre jusqu'au dépôt de spores.

Ces résultats montrent qu'il y a une certaine synergie (à préciser dans la section suivante) entre les seuls photons issus du plasma, puisque les espèces radicalaires ne peuvent jouer aucun rôle dans le cas présent, et la température du Petri.

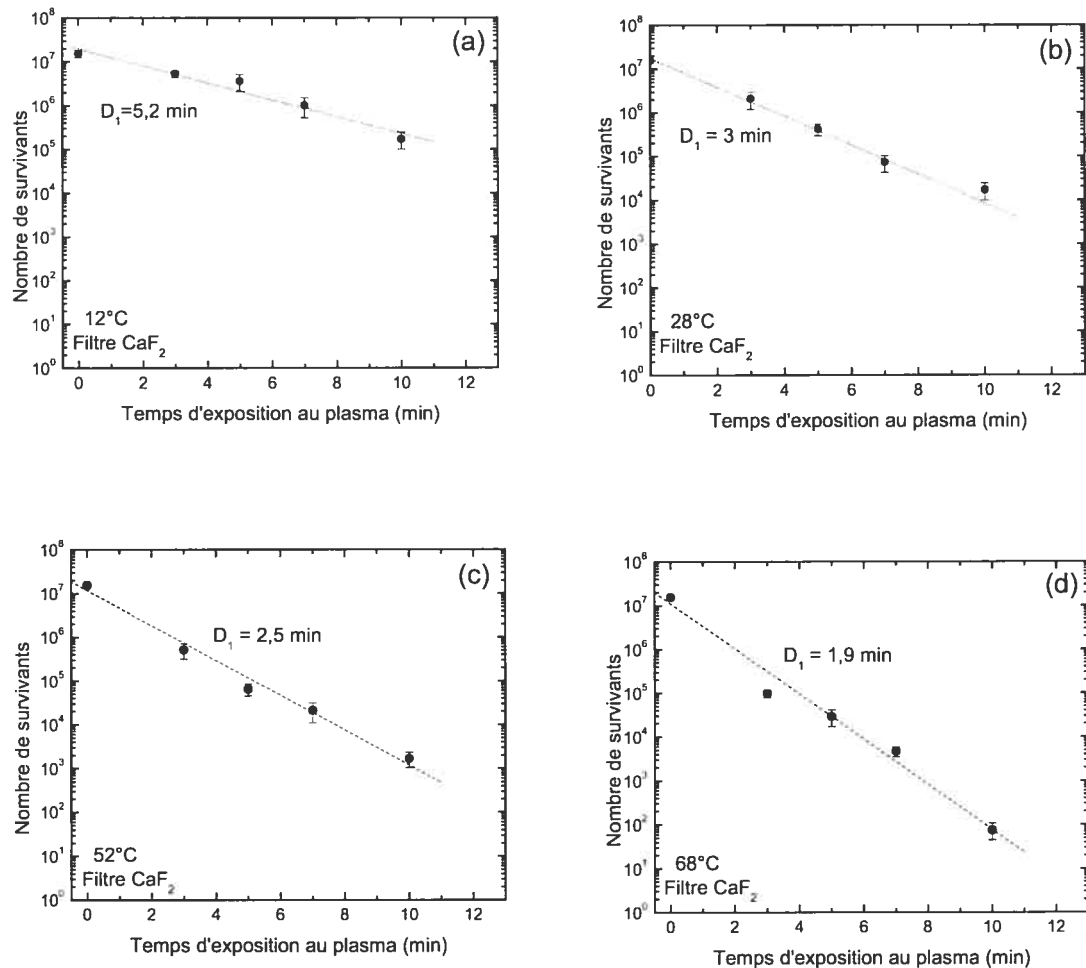


Figure 4-12. Courbes de survie de spores *B. atrophaeus* obtenues pour des températures du Petri de 12, 28, 52 et 68 °C. Conditions plasma : 1L N₂ (par tube à décharge), 0,3%O₂, avec filtre CaF₂, 5 torr, 250 W par tube (915MHz).

4.4.1.4 Inactivation avec et sans filtre, et synergie UV/température

Pour mieux cerner la contribution de chacune des espèces actives du plasma (UV et radicaux) à la synergie avec la température, il est intéressant de comparer les courbes d'inactivation obtenues avec et sans filtre CaF_2 . La Figure 4-13 montre une telle comparaison pour deux températures (12 et 52 °C) où l'on a considéré, conformément à ce qui vient d'être mentionné (c.f. 4.4.1.3), que le filtre CaF_2 atténuait l'intensité UV d'un facteur 2 relativement au cas sans filtre : on a donc multiplié par un facteur 2 les temps d'exposition (sans filtre) des Petri afin de conserver la fluence en présence du filtre. Le résultat obtenu est que les premières phases des courbes de survie, pour les conditions plasma et température données, se superposent quasiment. Cela va dans le sens de notre hypothèse de travail que, dans des conditions opératoires telles que l'émission UV est optimale ($0,3\% \text{O}_2$), ce sont les UV qui contrôlent totalement l'inactivation des spores et qui sont responsables de l'effet synergique observé.

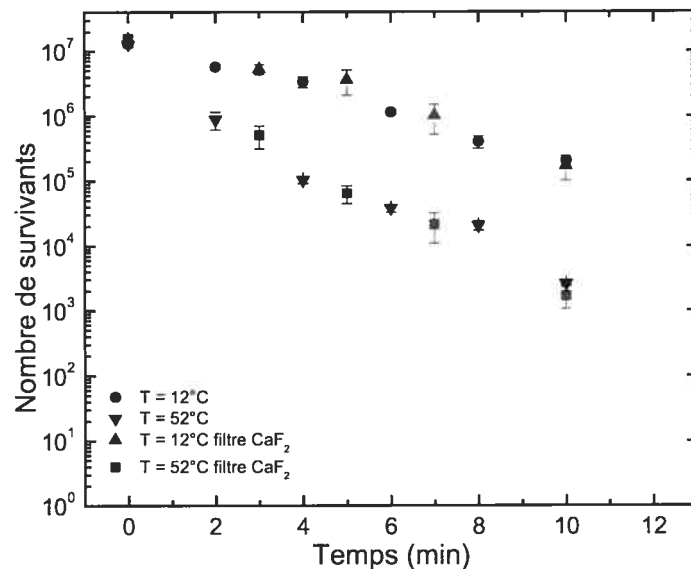


Figure 4-13. Comparaison des courbes de survie obtenues à deux températures (12 et 52 °C) avec et sans filtre CaF_2 , dans des conditions d'émission UV optimales ($0,3\% \text{O}_2$). La comparaison a été effectuée en supposant que le filtre CaF_2 atténue le flux de photons d'un facteur 2 : les temps d'exposition sans filtre sont alors multipliés par 2.

4.4.2 Traitement plasma/température hors conditions UV optimale, soit 1% et 10%O₂

Avant de présenter les résultats d'inactivation de spores pour les deux nouveaux pourcentages d'O₂ choisis, rappelons comment l'intensité d'émission UV varie en fonction du pourcentage d'oxygène (Figure 4-14). Elle présente un maximum d'intensité UV aux alentours de 0,3%O₂ et décroît exponentiellement à partir de cette valeur. Ainsi 1% de O₂ correspond à 50% de l'intensité maximale, et 10%O₂ correspond à 1% de l'intensité maximale. Dans le même temps, il faut noter que la densité d'oxygène atomique en post-décharge augmente (cf. chapitre 3), ce qui laisse supposer que la contribution à la synergie des espèces chimiquement réactives pourrait être plus importante pour ces deux %O₂, du moins à 10%.

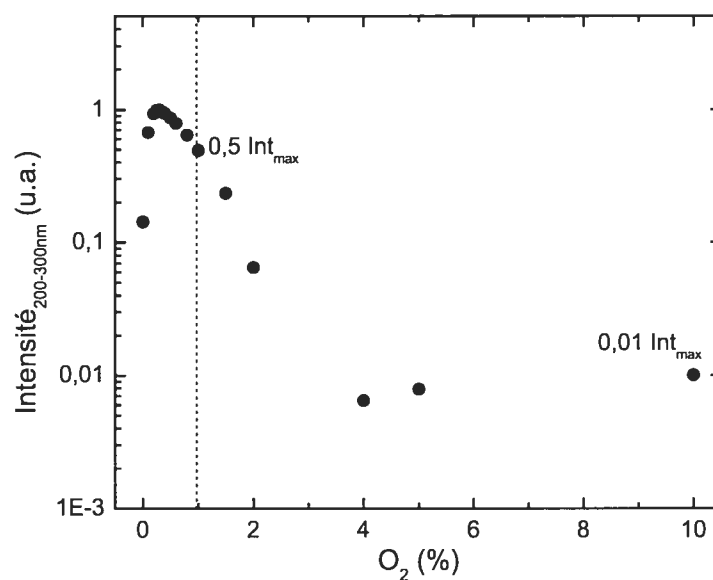


Figure 4-14. Évolution de l'émission UV entre 200 et 300 nm, en fonction du pourcentage de O₂ dans le mélange N₂ - %O₂.

4.4.2.1 Traitement plasma/température dans une post-décharge $N_2-1\%O_2$

La Figure 4-15 présente les résultats d'inactivation à $1\%O_2$ dans les mêmes conditions d'exposition qu'en Figure 4-8. Comme à $0,3\%O_2$ (conditions pour un maximum d'émission UV), le temps D_1 de chaque première phase diminue avec l'augmentation de température, mais les temps D_1 obtenus à 1% sont beaucoup plus grands.

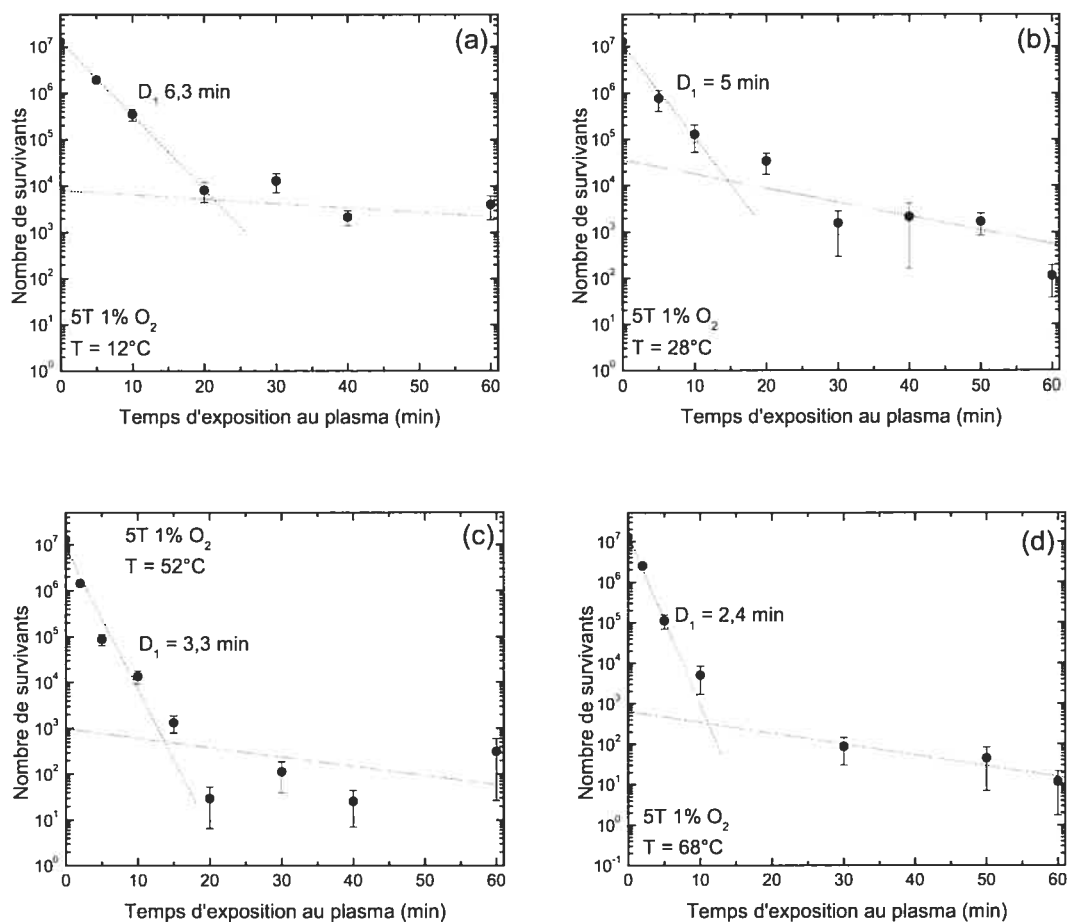


Figure 4-15 Courbes de survie de spores *B. atrophaeus* obtenues pour des températures de 12, 28, 52 et $68^\circ C$. Conditions plasma : 1L N_2 (par tube à décharge), $1\%O_2$, 5 torr, 250 W par tube (915 MHz).

4.4.2.2 Traitement plasma/température dans une post-décharge $N_2-10\%O_2$

La Figure 4-16 présente les résultats d'inactivation à $10\%O_2$ dans les mêmes conditions d'exposition qu'en Figure 4-8. On remarque que les temps D_1 , du moins ceux correspondant à 12 et $28^\circ C$, sont déjà beaucoup plus grands (facteur 2) qu'à $1\%O_2$ en raison du plus faible flux d'UV (Figure 4-14). Néanmoins, ce temps D_1 décroît de façon très appréciable (facteurs 1,9 et 2,5) lorsque la température grimpe à 52, puis à $68^\circ C$.

Comparées aux Figure 4-16 (a) et (b), les Figure 4-16 (c) et (d) présentent des évolutions d'inactivation plus complexes : nous pouvons en effet calculer deux temps décimaux D_1 et D_1' pour chacune de ces courbes de survie, selon que l'on considère 2 log d'inactivation (nombre final de survivants : 10^5) ou 4 log (nombre final de survivants : 10^3). Dans ce qui suit (section 4.4.3.2), nous considérons les pentes obtenues après 4 log d'inactivation.

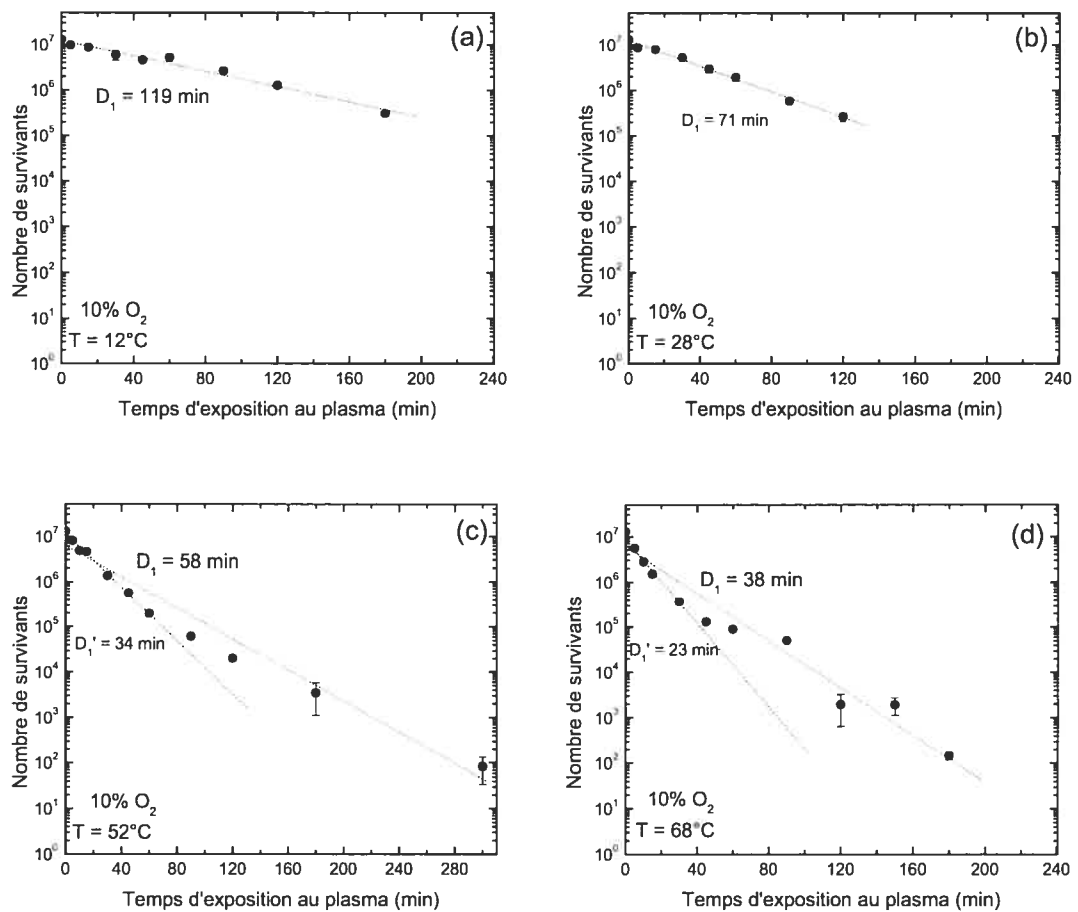


Figure 4-16. Courbes de survie de spores *B. atrophaeus* obtenues pour des températures de 12, 28, 52 et 68 °C. Conditions plasma : 1L N_2 (par tube à décharge), 10% O_2 , 5 torr, 250 W par tube (915 MHz).

En conclusion, il s'avère que même pour un flux d'UV fortement (1% O_2) ou très fortement (10% O_2) réduit, on observe toujours un effet synergique entre les espèces actives du plasma et la température à laquelle est porté le Petri.

4.4.2.3 Synergie UV/température à 0,3% et 10%O₂ : comparaison

Il serait souhaitable, d'une façon en quelque sorte complémentaire à ce que nous avons fait (4.4.1.4), d'évaluer les contributions respectives des UV et des espèces chimiquement réactives à l'effet synergique observé. En effet, on pourrait supposer qu'à 10% O₂, la densité des espèces réactives est plus importantes qu'à 0,3%O₂ (c.f. Figure 3-14) et pourrait donc jouer un rôle accru dans l'inactivation. Pour y parvenir, nous allons poser l'hypothèse que la différence d'inactivation, pour une température donnée, enregistrée entre les post-décharges à 0,3 et à 10%O₂, est seulement due à une différence de fluence entre ces deux cas considérés. La superposition de la courbe expérimentale à 0,3%O₂ sur celle à 10%O₂ à 28 °C conduit à multiplier les temps d'inactivation à 0,3%O₂ par un facteur 38, ce qui indique une intensité UV 38 fois plus faible²⁰ à 10%O₂ qu'à 0,3% (conservation de la fluence). La Figure 4-17 compare les résultats des autres courbes obtenues à 10%O₂ avec normalisation par le même facteur 38 à celle observée à 0,3%O₂, pour trois températures. On constate que la superposition est très bonne pour les cas à 12 et 52 °C, et tout aussi bonne, entre 0 et 90 min à T = 68 °C. Pour ce dernier cas, on enregistre, cependant, un écart notable entre les deux courbes d'inactivation, à partir de 100 min, comme le montre clairement la Figure 4-17(d). Cette bonne concordance entre l'évolution des premières phases obtenues à 0,3 et à 10%O₂, quelle que soit la température (hormis le cas à 68 °C, à partir de 100 min), indique que les espèces actives du plasma qui agissent à 10%O₂ sont aussi celles qui agissent à 0,3%O₂. Rappelons qu'à 0,3%O₂, en comparant les courbes de survie obtenues avec et sans filtre (section 4.4.1.4), nous avons pu conclure que les photons UV constituent l'espèce issue de la post-décharge contrôlant l'inactivation et agissant en synergie avec le chauffage. Nous constatons qu'il en est de même à 10%. Par ailleurs, et ainsi que nous l'avons souligné lors de la comparaison/superposition des courbes à ces 2 pourcentages de O₂, il existe un léger écart entre les courbes d'inactivation obtenues à 0,3 et 10%O₂ pour T = 68 °C et des temps d'exposition supérieurs à 90 min (Figure 4-17 (d)). Cet écart pourrait être dû à une contribution supplémentaire, alors non négligeable, d'un effet

²⁰ L'intensité UV à 10%O₂ telle que mesurée par un photomultiplicateur est 100 fois plus faible que celle obtenue à 0,3% (voir Figure 4-14). Le rapport d'intensité UV obtenu par la superposition des deux courbes 0,3 et 10%O₂ à 28 °C, qui est de 38 seulement, indiquerait que notre méthode de mesure de la contribution des UV est insuffisamment précise.

synergique entre les espèces chimiquement réactives et cette température relativement élevée.

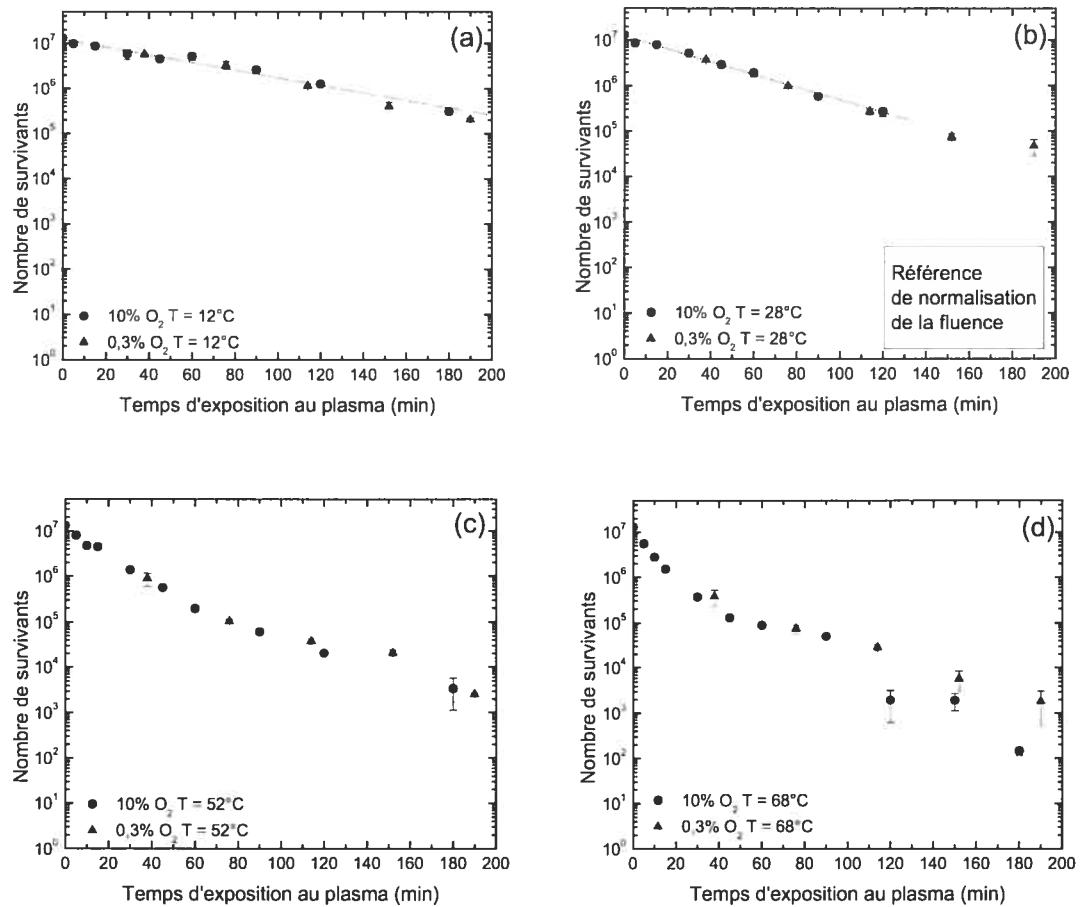


Figure 4-17. Comparaison des courbes de survie (première phase) obtenues à 4 températures (12, 28, 52 et 68 °C) pour 0,3% de O_2 et 10% de O_2 . La comparaison a été effectuée en supposant que le passage de 0,3% à 10% O_2 a comme conséquence une diminution du flux de photons d'un facteur 38, facteur obtenu en superposant la première pente de la courbe de survie à 0,3% O_2 à celle à 10% et 28 °C (conservation de la fluence). Ce même facteur multiplicatif est appliqué aux courbes de survie (a), (c) et (d).

4.4.2.4 Érosion des spores traitées par plasma à différentes températures

Jusqu'ici, nous nous sommes intéressés à l'inactivation (courbes de survie) de spores dans différentes conditions plasma, et suivant différentes températures du Petri. Il nous semble pertinent d'examiner l'effet de ces divers traitements sur la forme et la taille des spores, ceci étant susceptible de nous donner des indications sur les processus physico-

chimiques en jeu. La Figure 4-18 montre des micrographies, obtenues par MEB, de spores traitées durant 30 min dans une post-décharge de N_2-O_2 , à 10% O_2 et pour les températures de 28, 45 et 68 °C (rappelons que la concentration d'oxygène atomique est plus élevée à 10% O_2 qu'à 1% O_2 et 0,3% O_2 , chapitre 3). Précisons que les Petri sont disposés à au moins 10 cm du jet de post-décharge²¹, donc loin des espèces dommageables telles que métastables ou ions. Les spores ne semblent pas affectées dans leur forme et aspect extérieurs, et sont quasiment identiques à celles non traitées. Ces données expérimentales suggèrent que les espèces chimiquement réactives ont un effet minime dans l'inactivation des spores par plasma, dans nos conditions d'utilisation.

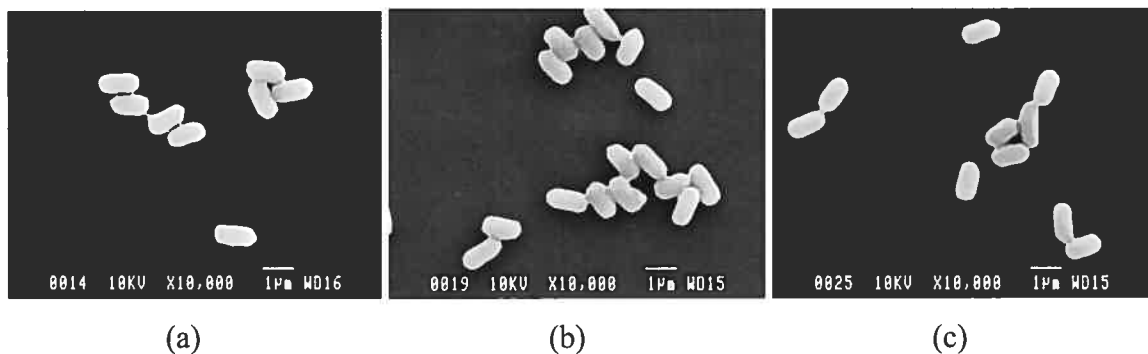


Figure 4-18. Micrographies de MEB de spores traitées pendant 30 min à 10% O_2 , à 3 températures du Petri : (a) 28 °C (b) 45 °C, (c) 68 °C.

Conclusion partielle : identification des espèces réactives

Il ressort de nos résultats expérimentaux qu'il existe une synergie significative plasma/température lors de l'inactivation de spores *B. atrophaeus* ; cette synergie augmente de façon monotone avec la température (12 à 68 °C). Par ailleurs, nous avons montré que ce sont les photons UV du plasma, quel que soit le pourcentage d'oxygène, qui agissent en synergie avec l'apport thermique au Petri. Les photons UV contrôlent totalement le processus d'inactivation des spores, sauf pour de forts pourcentages de O_2 et une température élevée : il est alors possible que les espèces chimiquement réactives agissent en synergie avec la température, cette synergie ne se manifestant que pour des temps d'exposition très longs (> 90 min).

²¹ Celui-ci (voir chapitre 3) est responsable de l'érosion de microsphères de polystyrène, observée en post-décharge N_2-O_2 à différents % O_2

4.4.3 Vitesse d'inactivation des spores et énergie d'activation par apport thermique : hypothèse explicative de l'action de la température

Nous avons vu qu'il existe un effet synergique significatif entre le plasma et la température du Petri (12 à 68 °C) contenant les spores. Les données publiées sur l'inactivation de micro-organismes par lampe UV (voir section 4.2.2) suggèrent au moins trois différentes interprétations de ce phénomène de synergie. Une première hypothèse considère que l'effet thermique pourrait agir sur l'efficacité des différents mécanismes de réparation de la spore (qui entrent en jeu en période de germination de celle-ci) pour l'augmenter ou la réduire ; cet effet dépend du type de bactérie (le mécanisme de réparation des spores étant bien plus efficace que celui des bactéries végétatives) (Block 2002). Une deuxième hypothèse prétend que la synergie UV/température est le résultat d'interactions entre des sous-lésions (lésions non encore létales) induites par chacun des agents (température et UV) donnant lieu, grâce à leur combinaison, à des dommages létaux additionnels effectifs. La troisième hypothèse considère que la température augmente l'efficacité des réactions photochimiques conduisant à la formation de photoproduits qui sont autant de lésions à l'ADN. En particulier, ces réactions de niveau moléculaire mettraient en jeu des états triplets (dans l'exemple qui va suivre) dont la formation est elle-même influencée par la température (Augentsine *et al* 1961).

Dans ce qui suit, nous allons considérer la troisième hypothèse qui semble la plus plausible dans nos conditions opératoires. Pour effectuer le calcul de l'énergie d'activation des réactions impliquées dans l'inactivation des spores, nous allons nous appuyer sur la théorie d'Arrhenius. L'énergie d'activation ainsi obtenue doit être considérée comme une estimation, une valeur moyenne, de l'énergie d'activation de l'ensemble des réactions impliquées dans le processus de formation de lésions.

4.4.3.1 Processus photochimiques entrant dans la formation de photoproduits

L'hypothèse d'inactivation retenue implique que les photons UV ont pour cible principale l'ADN. Ceux-ci, dans la gamme des longueurs d'onde $190 \text{ nm} < \lambda < 320 \text{ nm}$, comme vu au Chapitre 1, occasionnent différents types de lésions à l'ADN, dont on peut citer : i) cassures (franches) de liaisons au niveau d'un brin ou des deux brins, ii) formation de photoproduits (section 1.4.2). Nous n'allons considérer que ce dernier cas.

Lorsqu'un photon est absorbé par une molécule de l'ADN, un électron de l'état fondamental est excité vers un niveau supérieur. Cet électron peut : i) se désexciter radiativement vers le niveau fondamental (généralement par fluorescence) dans le cas où le niveau excité possède la même multiplicité que celle du fondamental (état singulet dans l'exemple de la Figure 4-19) ; ii) réagir avec une molécule voisine et créer un photoproduit ; iii) subir une transition vers un état électronique de spin total S différent. Cet état, de multiplicité différente de celle du fondamental, ne pouvant se désexciter radiativement vers celui-ci (règle de non intercombinaison), a une durée de vie beaucoup plus importante (pouvant aller jusqu'à quelques secondes) que celle du niveau singulet²² et est donc plus susceptible de réagir avec une molécule voisine et finalement créer un photoproduit.

Ainsi, d'après cette hypothèse, les variations de la cinétique d'inactivation en fonction de la température reflèteraient principalement celles des réactions des états triplets (dans notre exemple), l'élévation de température ayant pour conséquence d'accroître la formation de photoproduits. Nous allons vérifier, en nous appuyant sur les données de la Figure 4-8, que la cinétique d'inactivation en fonction de T obéit à l'équation d'Arrhenius.

²² L'état singulet excité, dans l'exemple de la Figure 4-19, est dit transitoire en ce qu'il a une durée de vie très courte (quelques ns) parcequ'il peut se désexciter radiativement vers l'état fondamental (également singulet). Dans le cas d'un état triplet (multiplicité $2S+1$ où $S = 1$), deux électrons restent non appariés (paramagnétique), d'où la réactivité chimique plus grande de cet état (Cantor *et al* 1980).

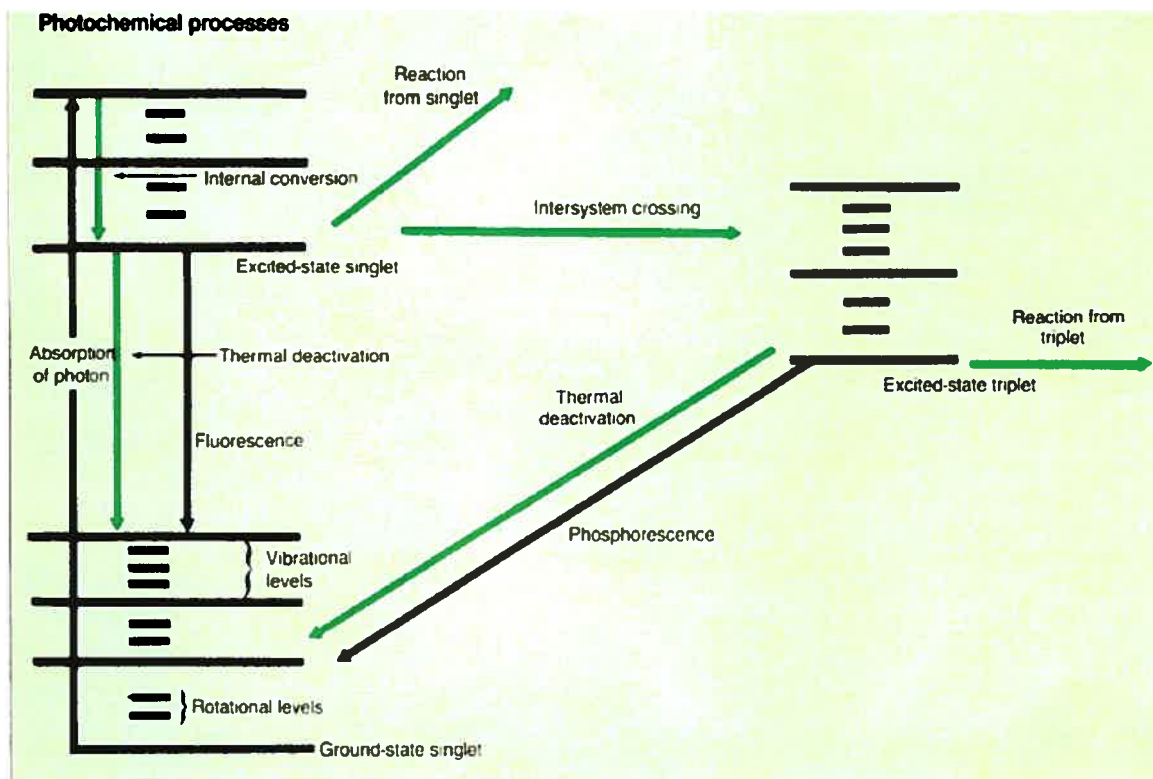


Figure 4-19. Schéma simplifié des transitions en énergie et des processus photochimiques pouvant avoir lieu lors de l'absorption d'un photon par une molécule (cas d'un état fondamental de multiplicité singulet ($S = 0$) l'autre état étant alors un triplet ($S = 1$)) (Larson et Berenbaum 1988).

4.4.3.2 Modèle d'Arrhenius et calcul de l'énergie d'activation

Pour calculer l'énergie d'activation dont nous venons de parler, nous allons nous appuyer sur un modèle très simplifié de cinétique chimique de réaction entre deux molécules A et B, en insistant sur la notion d'énergie (ou barrière) d'activation. Lorsque deux espèces A et B réagissent chimiquement pour former un produit AB, selon la réaction (4.1) :



la vitesse de réaction est donnée par (Atkins 1998):

$$k_{AB} = \alpha_{AB}(T) n_A n_B \quad (4.2)$$

où n_A , n_B sont les concentrations des réactifs A et B, $\alpha_{AB}(T)$ étant le coefficient de réaction qui dépend de la température et qui varie selon l'expression dite d'Arrhenius :

$$\alpha_{AB}(T) = A(T) \exp(-E_a/RT) \quad (4.3)$$

où $A(T)$, le terme pré-exponentiel, dépend faiblement de la température²³, E_a , est l'énergie d'activation de la réaction, R , est la constante molaire des gaz qui vaut $8.314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$, T , la température en kelvin.

Ainsi, la relation (4.2) peut être écrite sous une forme classique dite équation d'Arrhenius :

$$\ln \alpha_{AB} = \ln A - (E_a/R) \times (1/T). \quad (4.4)$$

Dans notre cas, en portant la variation du logarithme de la vitesse d'inactivation $\frac{1}{D_1}$ de la première phase obtenue à différentes températures, en fonction de $1/T$ (T en kelvin), nous obtenons une dépendance linéaire de la pente $\frac{1}{D_1}$ en $1/T$. La Figure 4-20 présente les diagrammes obtenus pour 0,3%, 1% et 10%O₂ ; nous y avons inclus le cas de 0,3%O₂ avec filtre CaF₂ pour évaluer la contribution à l'énergie d'activation des seuls photons UV. Les différentes Figure 4-20 (a), (b), (c) et (d) vérifient bien la loi d'Arrhenius : le logarithme de $\frac{1}{D_1}$ est linéaire en $1/T$, avec quasi une même pente donnée par $\tau = -E_a/R$.

Notre calcul de la valeur de E_a (tirée de $\tau = -E_a/R$) donne une énergie d'activation moyenne égale à 13 kJ/mol (Tableau 4-1). Cette valeur de E_a est relativement faible en comparaison de celles généralement publiées dans la littérature. En effet, à titre d'exemples, l'énergie d'activation de la réaction $\text{N}_2 + \text{O} \rightarrow \text{NO} + \text{N}$ (phase gazeuse, voir Chapitre 3) est de 315 kJ/mol ; celle de la formation de l'acide chlorhydrique ($\text{H}_2 + \text{Cl} \rightarrow \text{HCl} + \text{H}$) est de 23 kJ/mol.

²³ Si l'on considère la réaction chimique comme une collision entre deux particules A et B, animées respectivement des vitesses \mathbf{v}_A et \mathbf{v}_B , le terme $A(T)$ serait en gros le produit de la section efficace de collision σ_{AB} et de la norme de leur vitesse relative $|\mathbf{v}_A - \mathbf{v}_B|$ (Moisan et Pelletier 2006).

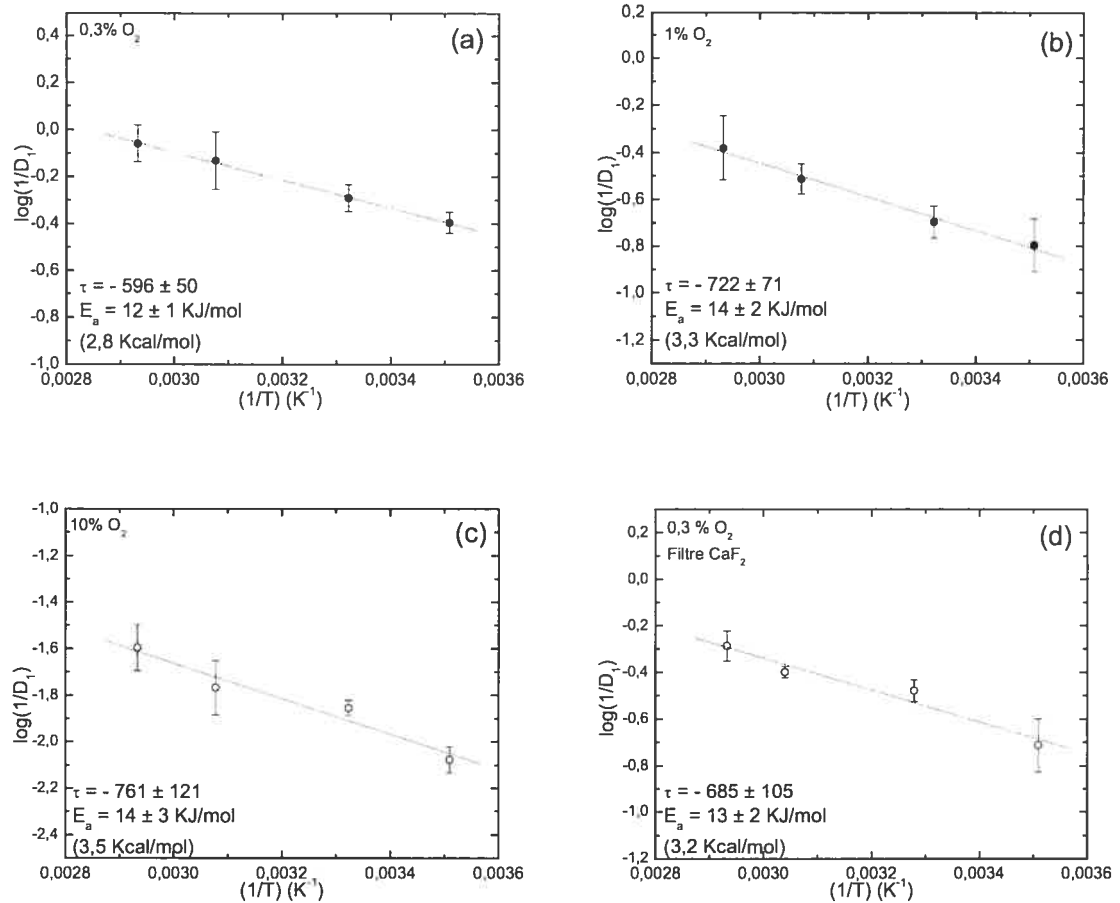


Figure 4-20. Diagramme d'Arrhenius des variations du logarithme de la vitesse (fréquence) d'inactivation de 10^7 spores (première phase) dans une post-décharge de N_2-O_2 pour 0,3% O_2 , 1% O_2 , 10% O_2 , et 0.3% O_2 avec filtre CaF_2 : le $\log(1/D_1)$ (où D_1 est le temps nécessaire pour inactiver 1 log de spores) est linéaire en $1/T$, avec une pente donnée par $\tau = -E_a/R$.

% O_2	0.3% sans filtre	0.3% avec filtre	1% sans filtre	10% sans filtre
E_a	12 ± 1 kJ	13 ± 2 kJ	14 ± 2 kJ	14 ± 3 kJ

Tableau 4-1: valeurs de E_a déterminées pour 4 différentes conditions d'exposition. Noter la relative constance de la valeur de E_a .

Le fait qu'en présence du filtre CaF_2 , c'est-à-dire des seuls photons UV, E_a a approximativement la même valeur que la valeur sans filtre indique que les UV sont l'agent principal d'inactivation. D'autre part, la relative constance de E_a en fonction des différentes conditions plasma (0,3%, 1% et 10% O_2) montre que les réactions favorisant ou conduisant à

l'inactivation sont, dans le cas présent du moins, indépendantes de l'intensité du flux d'UV émis dans la chambre de post-décharge (Tableau 4-1).

4.5 Prise en compte de l'effet thermique sur la cinétique d'inactivation par plasma

Nous cherchons ici à rendre compte, par le biais d'un modèle simple, de l'évolution des courbes de survie de spores traitées par plasma, en présence d'un effet (contrôlé) de température. Pour cela, dans un premier temps, nous allons ignorer l'effet de température sur le cas "standard" (température ambiante), l'inactivation étant supposée due à la seule action des photons UV²⁴.

4.5.1 Modélisation de la cinétique d'inactivation par photons UV seuls

Nous allons modéliser la courbe de la Figure 4-8 (b) qui comporte deux phases (sans atteindre la stérilité): une phase dite rapide (passage de 10^7 à 10^3 spores survivantes) et une seconde phase lente (10^3 à 10^1 spores survivants).

En général, les courbes d'inactivation ne présentant qu'une seule phase sont modélisées à l'aide d'une fonction du premier ordre quant au nombre des spores (Chick 1908) :

$$\mathcal{N} = \mathcal{N}_0 \times 10^{-\alpha_1 I t} \quad (4.5)$$

où α_1 est un facteur traduisant la sensibilité des spores aux UV (à déterminer ultérieurement à partir des résultats expérimentaux), I l'intensité du flux de photons UV et t le temps de traitement.

Lorsqu'une deuxième phase apparaît, il est possible de la modéliser par l'ajout d'un second terme (Cerf 1977) à l'équation (4.5) :

$$\mathcal{N}_0 = \mathcal{N}_{0-1} \times 10^{-\alpha_1 I t} + \mathcal{N}_{0-2} \times 10^{-\alpha_2 I t} . \quad (4.6)$$

²⁴ Nous considérerons que la température de 28°C constitue une référence par rapport à laquelle l'effet de synergie dû à la température pourrait cependant être positif (accélération de la réaction) ou négatif (ralentissement de la réaction) selon les cas.

où \mathcal{N}_{0-1} est le nombre de spores isolées et \mathcal{N}_{0-2} le nombre de spores empilées, au temps $t = 0$ (voir plus loin Figure 4-22). Dans ces conditions, \mathcal{N}_0 , le nombre total de micro-organismes au temps $t = 0$, est donné par :

$$\mathcal{N}_0 = \mathcal{N}_{0-1} + \mathcal{N}_{0-2}. \quad (4.7)$$

Le premier terme de droite de l'équation 4.6 décrit l'inactivation des spores isolées tandis que le second décrit celle des spores plus résistante au traitement (dans notre cas, cette résistance est probablement due à l'effet d'ombrage, conséquence de l'empilement de spores que l'on peut observer sur la Figure 4-21).

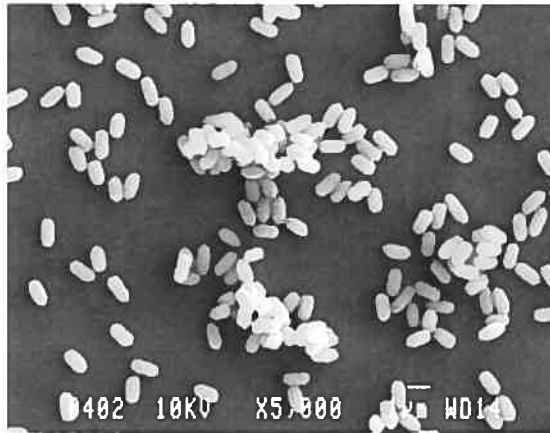


Figure 4-21. Micrographie d'un dépôt de spores non traitées présentant des empilements de celles-ci.

À partir des points expérimentaux de la Figure 4-8 (b) (28 °C), et en posant qu'à l'émission UV optimale I est égale à 1, nous obtenons par lissage les différents termes de l'équation 4.6 :

$$\mathcal{N} = 1,3 \times 10^7 \times 10^{-0,52t} + 8000 \times 10^{-0,053t}. \quad (4.8)$$

Le nombre de 8000 spores renvoie à \mathcal{N}_{0-2} , obtenu par extrapolation du segment de droite de la seconde phase au temps $t = 0$ (voir Figure 4-22) et constitue une estimation du nombre de spores empilées dans nos dépôts. Ces spores empilées, dissimulées à l'action directe des

UV, sont plus résistantes à l'action du procédé plasma. La Figure 4-22 montre le lissage, par la relation (4.8), des points expérimentaux obtenus à 28 °C et 0,3%O₂.

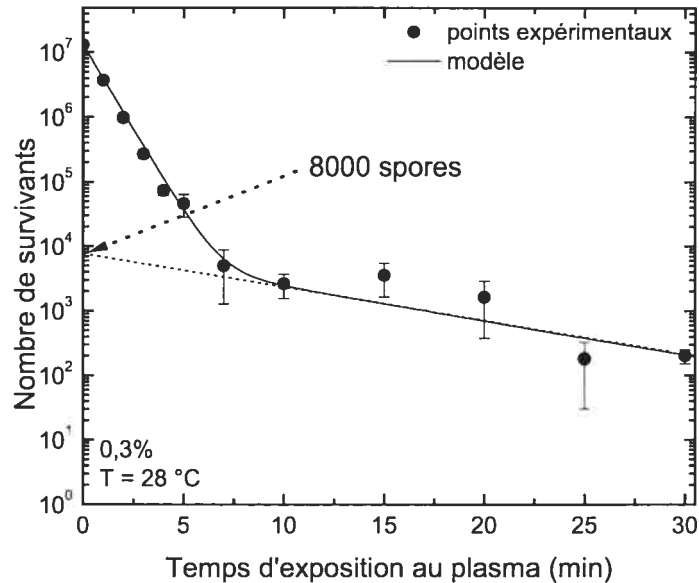


Figure 4-22. Lissage à l'aide de la relation 4.8 des points expérimentaux correspondant aux conditions expérimentales : 0,3%O₂, 28 °C. À comparer avec la Figure 4-8 où les courbes présentées résultent de régressions linéaires et non du modèle comme dans le cas présent.

4.5.2 Prise en compte de l'effet de la température

Dans ce qui suit, nous cherchons maintenant à prendre en compte l'effet thermique, agissant en synergie avec les UV émis par le plasma, en nous inspirant du modèle élaboré par Li *et al* (2001) pour rendre compte de l'inactivation par ozone de cellules *C. parvum*, dans des conditions thermiques contrôlées.

Nous avons vu précédemment que le coefficient de réaction α dépendait de T suivant la loi d'Arrhenius (équation 4.4) :

$$\alpha(T) = A(T) \exp(-E_a/RT). \quad (4.4)$$

Soit α_{T_1} , le coefficient de réaction à la température T_1 (K) et α_{T_2} , le coefficient de réaction à la température T_2 (K), nous pouvons écrire, pour de faibles domaines de température (le terme $A(T)$ étant supposé alors constant) :

$$\frac{\alpha_{T_1}}{\alpha_{T_2}} = \exp\left(-\frac{E_a}{R}\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)\right). \quad (4.9)$$

Afin de simplifier cette équation, il est possible d'introduire le terme θ donné par :

$$\theta = \exp\left(\frac{E_a}{RT_1T_2}\right), \quad (4.10)$$

T_1 et T_2 étant les températures (K) minimale et maximale de notre étude, c'est-à-dire, respectivement 285 K (12 °C) et 341 K (68 °C).

Ainsi, la contribution de la température au coefficient de réaction pourra être écrit, relativement au cas standard, comme :

$$\alpha_T = \alpha_{28} \times \theta^{(T-28)}, \quad (4.11)$$

où cette fois T peut être exprimé en °C.

4.5.3 Modélisation des effets combinés des UV et du chauffage

Finalement, en supposant que l'effet de la température est identique dans les deux phases de la courbe de survie, l'équation 4.8 peut, selon 4.11, être transformée en :

$$\mathcal{N} = 1,3 \times 10^7 \times 10^{-0,52t \theta^{(T-28)}} + 8000 \times 10^{-0,053t \theta^{(T-28)}} \quad (4.12)$$

Afin d'estimer le terme θ , nous nous sommes servis de la moyenne des valeurs de E_A obtenues pour les différentes conditions expérimentales, c'est-à-dire $E_a=13$ kJ.mol⁻¹ (Tableau 4-1); dans ce cas, nous obtenons $\theta \approx 1,017$ et l'équation 4.12 devient alors :

$$\mathcal{N} = 1,3 \times 10^7 \times 10^{-0,52t 1,017^{(T-28)}} + 8000 \times 10^{-0,053t 1,017^{(T-28)}}. \quad (4.13)$$

La Figure 4-23 compare les courbes calculées à l'aide de l'équation 4.13 et les points expérimentaux obtenus pour les températures de 12, 28, 52 et 68 °C, et pour une émission UV optimale. On observe que ce modèle, assez simple dans sa formulation mathématique, rend bien compte des données expérimentales, et plus particulièrement de la synergie UV/effet thermique.

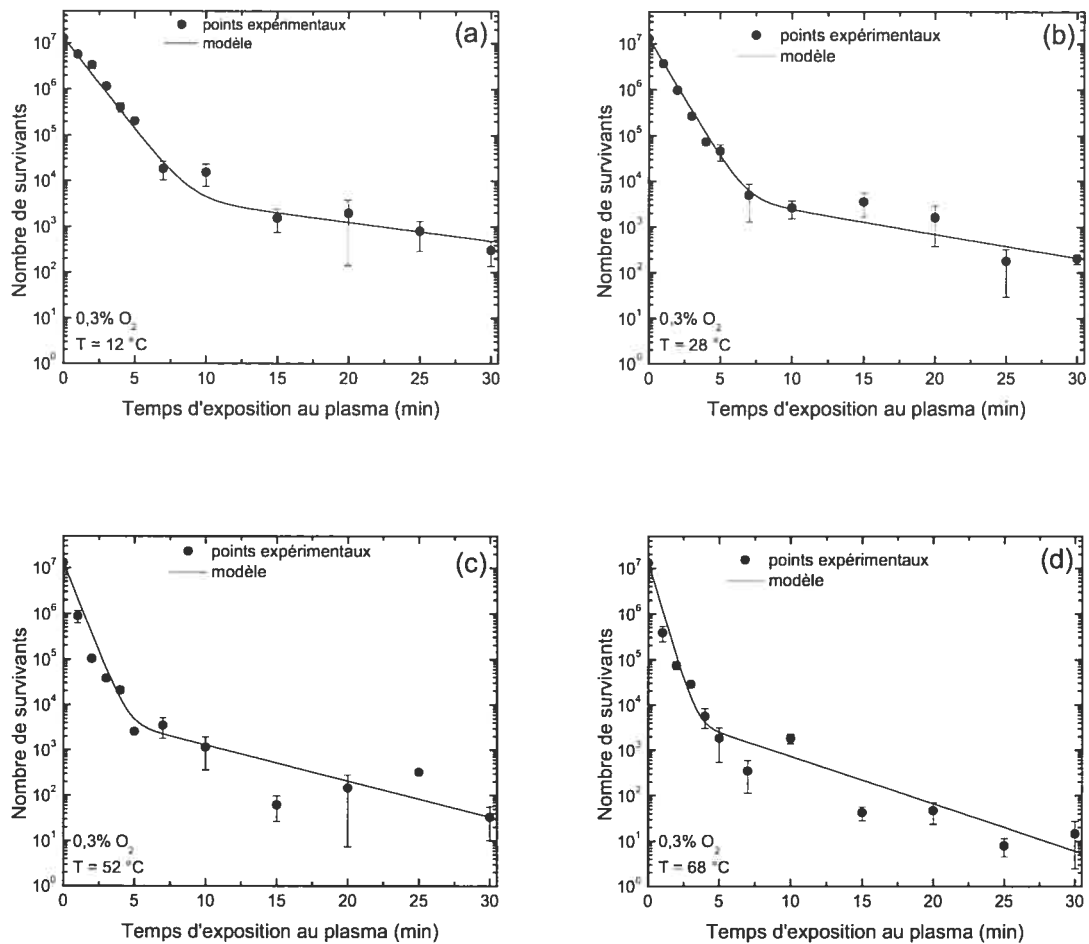


Figure 4-23. Comparaison des courbes calculées à l'aide de l'équation 4.13 avec les points expérimentaux tels qu'obtenues pour des températures de 12, 28, 52 et 68 °C, et pour une émission UV optimale (0,3% O_2).

Une conséquence intéressante de cette modélisation est la possibilité de prédire, avec assez d'exactitude, le nombre de spores survivantes au bout d'un temps donné de traitement plasma/température. À titre d'exemple, la Figure 4-24 illustre un tel accord expérience/théorie quant au nombre de spores survivantes après 30 min d'exposition, pour 5 températures fixes du porte-échantillon.

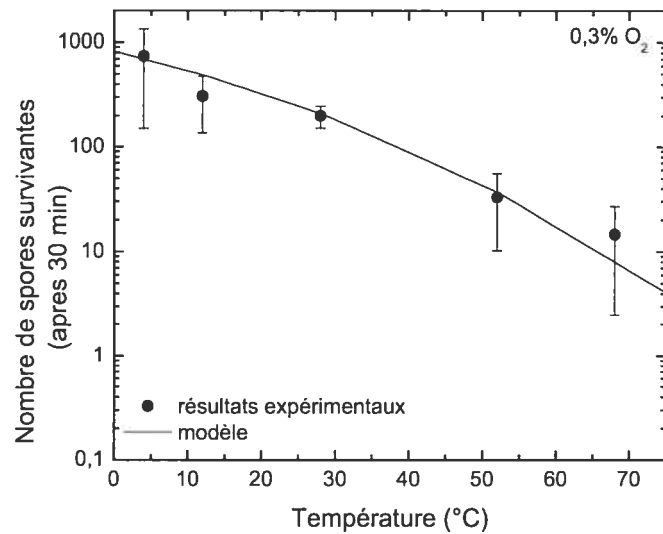


Figure 4-24. Comparaison du nombre de spores survivantes après 30 min de traitement, calculé à l'aide de la relation 4.13 avec les valeurs expérimentales obtenues pour les températures de 12, 28, 52 et 68 °C, et pour une émission UV optimale (0,3%O₂).

4.6 Conclusion

Nous avons montré qu'il est possible d'accroître la vitesse d'inactivation de spores bactériennes dans une post-décharge de N₂-O₂ en augmentant la température du support (Petri) sur lequel sont déposées ces spores. Cet effet, de type synergique, dépend notablement de la température du porte échantillon et n'apparaît que si les deux agents physico-chimiques (UV et température) sont présents simultanément. Il est, de plus, indépendant de l'intensité du flux de photons UV. En utilisant un filtre CaF₂, nous avons montré que le seul agent responsable de cet effet (en ce qui concerne le plasma) est le photon UV. Finalement, nous avons vu qu'il est possible de modéliser l'action de la température agissant en synergie avec le plasma, en ajoutant un facteur de correction à la cinétique d'inactivation UV-induite, qui tient compte de l'effet thermique. Ce modèle prédit bien que l'effet thermique agit de façon monotone aussi bien en première qu'en seconde phase des courbes de survie.

Références

- Atkins P 1998** Elements de chimie physique (2^{ième} édition) *DeBoeck Université, Bruxelles*.
- Augentsine L G, Ghiron C A, Grist K L, Mason R 1961** The inactivation of trypsin by Ultraviolet light, II. The involvement of Intramolecular Hydrogen Bond Disruption *Biochemistry* **47** 1733-1741.
- Block S. S. 2002** Disinfection, sterilization and preservation (5^{ième} édition), *Lea & Febiger, Philadelphia*.
- Cantor C R, Schimmel R P 1980** Biophysical chemistry. Part III, the behaviour of biological macromolecules *Greeman and Co., New York*.
- Cerf O 1977** Tailing of survival curves of bacterial spores *J. Appl. Bacteriol.* **42** 1-9.
- Chick H 1908** An investigation of the laws of disinfection *Journal of Hygiene* **8** 92-158.
- Craik S A, Smith D W, Belosevic M, Chandrakhanth M 2002** Use of *Bacillus subtilis* spores as model micro-organism for ozonation of *Cryptosporidium parvum* in drinking water treatment *J. Environ. Eng. Sci.* **1** 173-186.
- Cvelbar U, Vujosevik D, Vratnica Z, Mozetic M 2006** The influence of substrate material on bacteria sterilization in an oxygene plasma glow discharge *J. Phys. D: Appl. Phys.* **39** 3487-3493.
- Hollahender A 1943** Effect of long ultraviolet and short visible radiation (3500 to 4900Å) on escherichia coli *J. Bacteriol.* **46** 531-541.
- Hury S, Vidal D R, Desor F, Pelletier J, Lagarde T 1998** A parametric study of the destruction efficiency of *Bacillus* spores in low pressure oxygen-based plasmas *Letters in Applied Microbiology* **26** 417-421.
- Jonas S K, Riley P A, Willson R L 1989** Hydrogen peroxide cytotoxicity. Low-temperature enhancement by ascorbate or reduced lipoate *Biochem J.* **264** 651-655.
- Kim J K, Petin V G, Zhurakovskaya G P 2001** Exposure as a determinant of the synergistic interaction of heat combined with ionizing or UltraViolet radiation in cell killing *J. Radiat. Res.* **42** 361-369.
- Kim J K, Komarova L N, Zhurakovskaya G P, Petin V G 2006** The fluence rate determines the synergistic interaction of UV radiation and heat for mitotic recombination and cell inactivation in yeasts *Photochem. Photobiol.* **82** 1053-1057.

- Larson R A, Berenbaum M R 1988** Solar ultraviolet radiation affects the toxicity of natural and man-made chemicals *Enviro. Sci. Technol.* **22** 354-360.
- Moisan M, Pelletier J 2006** Physique des plasmas collisionnels : application aux décharges haute fréquence *Les Ulis, France : EDP Sciences.*
- Moisan M, Zarkrewski Z 1991** Plasma sources based on the propagation of electromagnetic surface waves *J. Phys. D: Appl. Phys.* **24** 1025-1048.
- Moreau S, Moisan M, Tabrizian M, Barbeau J, Pelletier J, Ricard A, Yahia I'H 2000** Using the flowing afterglow of a plasma to inactivate *Bacillus subtilis* spores: Influence of the operating conditions *J. Appl. Phys* **88** 1166-1174.
- Oxborrow G S, Placencia A M, Danielson J W 1983** Effects of Temperature and Relative Humidity on Biological Indicators Used for Ethylene Oxide Sterilization *Appl. Environ. Microb.* **45** 1983.
- Li H, Gyürek L L, Flinch G R, Smith D W, Belosevic M 2001** Effect of temperature on ozone inactivation of *Cryptosporidium parvum* in oxydant demand-free phosphate buffer *J. environ. Engin.* **127** 456-467.
- Severin B F, Suldan M T, Engelbrecht R S 1983** Effet of temperature on Ultraviolet Light Disinfection *Environ. Sci. Technol.* **17** 721-730.
- Takeuchi Y, Murakami M, Nakajima N, Kondo N, Nikaido O 1996** Induction and Repair of Damage to DNA in Cucumber Cotyledons Irradiated with UV-B *Plant cell physiol.* **37** 181-187.
- Trompeter F J, Neff, W J, Franken O, Heise, M, Neiger M, Liu S H, Pietsch G J, Saveljew A B 2002** Reduction of Bacillus Subtilis and Aspergillus Niger spores using nonthermal atmospheric gas discharges *IEEE Transactions on Plasma Science* **30** 1416-1423.
- Tyrell R M 1976** Synergistic lethal action of ultraviolet violet radiations and mild heat in Escherichia coli *Photochem. Photobiol.* **24** 345-351.
- Villeger S 2004** Optimisation d'une post-décharge de N₂-O₂ en vue d'une application à un procédé de stérilisation *Thèse de doctorat Université Toulouse III – Paul Sabatier (France).*
- Villeger S, Sarrette J P, Ricard A 2005** Synergy Between N and O Atom Action and Substrate Surface Temperature in a Sterilization Process Using a Flowing N₂-O₂ Microwave Post-Discharge *Plasma Process. Polym.* **2** 709-714.

Conclusion générale

Cette étude, qui s'inscrit dans le cadre général de la stérilisation d'objets médicaux, a porté sur l'inactivation de micro-organismes par plasma gazeux, aussi bien à la pression atmosphérique qu'à pression réduite. À la PA, nous nous sommes attachés à montrer la possibilité d'inactiver des spores bactériennes principalement par le moyen des UV, en faisant appel à une décharge de type barrière diélectrique alimentée avec le mélange N_2-N_2O ; il faut rappeler que l'hypothèse d'une inactivation fondée sur les UV était très peu admise, sinon rejetée, par la majeure partie des chercheurs du domaine. Pour ce qui relève de la pression réduite, nous nous sommes concentrés sur trois volets bien distincts : i) caractérisation de la post-décharge de N_2-O_2 en vue de réduire les dommages aux matériaux qui peuvent leur être causés par des espèces oxydantes ou fortement énergiques, ii) compréhension des mécanismes qui président à la formation (ou empêchent celle-ci) de la molécule NO dans l'état NO(B) (à partir duquel elle émet toute la bande NO_β), permettant ainsi de maximiser l'émission UV dans toute l'enceinte de post-décharge; iii) mise en évidence d'un phénomène de synergie plasma/température qui, à l'instar de la plupart des techniques de stérilisation conventionnelles, permet d'accélérer de façon substantielle l'inactivation induite par plasma gazeux.

À la pression atmosphérique, nous avons étudié l'inactivation de spores bactériennes dans une décharge DBD dans des conditions où l'intensité UV émise par l'état NO(A) (bande NO_γ) dans cette décharge est fixée à une valeur relative connue, déterminée par la concentration de l'oxydant N_2O dans le mélange N_2-N_2O . Nous avons pu montrer que, lorsque les conditions expérimentales sont bien choisies et optimisées, les photons UV émis dans cette décharge peuvent être l'espèce active dominant le processus d'inactivation. Par ailleurs, nous avons remarqué que, dans ce cas où précisément les UV prédominent, les temps caractéristiques d'inactivation obtenus à la PA se comparent assez bien à ceux déterminés en post-décharge à pression réduite. Enfin, quelques aspects méritent d'être examinés de façon plus approfondie afin d'étayer plus solidement cette hypothèse d'une inactivation induite par les seuls photons UV. On retiendra à cet effet la nécessité de mesurer, par le moyen de la fluorescence induite par laser par exemple, la densité des espèces telles que O et O_3 , particulièrement lorsque l'intensité UV est maximum ; cela

permettrait d'écarter définitivement la possibilité que ces espèces puissent jouer un rôle significatif dans l'inactivation, précisément dans ces conditions.

À pression réduite, comme mentionné ci-dessus, nous nous sommes penchés d'abord sur la caractérisation de la post-décharge de N_2-O_2 , en faisant appel : i) à la technique de spectroscopie d'émission pour déterminer les conditions d'obtention d'une post-décharge lointaine; ii) au titrage par NO pour la mesure des densités des espèces importantes que sont N et O dans l'enceinte de stérilisation; iii) à l'actinométrie pour les mêmes espèces mais dans la décharge elle-même.

L'analyse par spectroscopie optique des caractéristiques de la post-décharge de N_2-O_2 , corrélée avec les données d'érosion obtenues par microscopie électronique, a permis de montrer que l'érosion est maximale lorsque la densité des particules métastables (p.ex. $N_2(A)$) est maximum, en particulier autour de l'axe de la source de plasma dans l'enceinte de post-décharge pour N_2 seul. La destruction des espèces métastables est obtenue, par exemple, par l'ajout d'un faible % O_2 : ces conditions répondent non seulement à l'obtention d'une intensité UV maximale (efficacité optimale du dispositif de stérilisation), mais à celle d'une post-décharge lointaine, exempte de tout champ électrique et de particules trop fortement énergiques (source d'érosion). En ajustant ainsi le pourcentage de O_2 , les dommages aux matériaux sont quasiment négligeables, ils ne deviennent en réalité importants que pour des % O_2 dépassant les 5%. Avec les deux techniques de mesure de densités d'espèces en post-décharge et en décharge (appuyées par la méthode de Bockel), nous avons pu suivre les variations des densités de N et O à partir du lieu de leur production jusqu'à leur utilisation dans la formation de NO(B), et identifier les mécanismes de création et de perte de ces deux espèces atomiques. En comparant les données obtenues avec ces différentes techniques, nous avons pu montrer que la formation de NO(B) se réalise essentiellement dans le réacteur de stérilisation; que le taux de formation de NO est contrôlé par la densité de O lorsque $O_2 \leq 0.5\%$, et par la densité de N au-delà de cette concentration de O_2 .

Inspirés par certains travaux de la littérature, nous avons recherché l'existence d'une synergie plasma/chauffage qui permettrait d'améliorer les performances d'inactivation obtenues en post-décharge de N_2-O_2 . Sur la base d'une série d'expériences, nous avons montré qu'il est en effet possible d'augmenter de façon significative la vitesse d'inactivation de spores bactériennes dans une post-décharge de N_2-O_2 , en élevant la température du

support (Petri) sur lequel sont déposées ces spores. Ce phénomène de synergie apparaît lorsque les deux processus physico-chimiques (plasma et chaleur) agissent simultanément. Enfin, si l'exploitation d'un apport thermique peut être envisagée avec intérêt, notamment dans l'inactivation de prions ou de biofilms, il reste néanmoins à résoudre un certain nombre de problèmes liés à sa mise en œuvre de façon efficace et qui évite de porter atteinte à l'intégrité des matériaux thermosensibles.

Annexe

Article 1

Boudam M K, M Moisan, B Saoudi, C Popovici, N Gherardi, F Massine *Bacterial spore inactivation by atmospheric-pressure plasmas in the presence or absence of UV photons as obtained with the same gas mixture.* J. Phys. D: Appl. Phys. 39 (2006) 3494–3507.

Ma contribution à cet article se situe au niveau de la prise des mesures expérimentales et de la mise en forme des résultats expérimentaux ainsi que de leur analyse.

Article 2

Boudam M K, B saoudi, M Moisan, A Ricard *Characterization of the flowing afterglows of an N₂-O₂ reduced pressure discharge: setting the operating conditions to achieve a dominant late-afterglow and correlating the NO β UV intensity variation with the N and O atom densities.* J. Phys. D: Appl. Phys. 40 (2007) 1694-1711.

Tout comme pour l'article 1, ma contribution se situe au niveau de la mise au point des diagnostics du plasma, de la prise des mesures, de la mise en forme des résultats expérimentaux ainsi que de leur analyse.

