

Study on Plasma Treatment of *Acinetobacter baumannii* Biofilm

Qiuchen Cai¹, Cheng Cheng², Jie Shen², Yan Lan², Zhiyuan Yu¹, Xiaoxia Zhou¹, Shuheng Hu^{1*}

¹School of Resources and Environmental Engineering, Hefei University of Technology, Hefei Anhui

²Institute of Plasma Physics, Chinese Academy of Sciences, Hefei Anhui

Email: 764498249@qq.com, *646048406@qq.com

Received: Feb. 5th, 2019; accepted: Feb. 18th, 2019; published: Feb. 25th, 2019

Abstract

The inactivation effect and mechanism of high atmospheric pressure pulsed plasma jet (APPJ) on drug-resistant *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) Biofilm were studied in this paper. It is found that the pulsed plasma has a remarkable ability to inactivate bacteria in biofilm. The CFU counting method of colony forming units showed that almost all the bacteria (99.9%) in the biofilm lost their culturability after 30 minutes of treatment. At the same time, about 80% of the bacteria had lost their metabolism, and some of the bacteria had entered a viable but uncultured state of VBNC. H₂-DCFDA fluorescence staining showed that the concentration of active oxygen-containing group (ROS) in biofilm was increased after plasma treatment. Plasma active species may induce internal stress reaction of bacteria, lead to a large number of intracellular ROS production, and ultimately oxidize the bacterial structure, which may be an important reason for the inactivation of bacteria in biofilm caused by plasma.

Keywords

Atmospheric Pressure Plasma Jet (APPJ), *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) Biofilm, Reactive Oxygen (ROS)

等离子体处理鲍曼不动杆菌生物膜的研究

蔡秋晨¹, 程 诚², 沈 洁², 兰 彦², 俞志远¹, 周小霞¹, 胡淑恒^{1*}

¹合肥工业大学资源与环境工程学院, 安徽 合肥

²中国科学院等离子体物理研究所, 安徽 合肥

Email: 764498249@qq.com, *646048406@qq.com

收稿日期: 2019年2月5日; 录用日期: 2019年2月18日; 发布日期: 2019年2月25日

*通讯作者。

文章引用: 蔡秋晨, 程诚, 沈洁, 兰彦, 俞志远, 周小霞, 胡淑恒. 等离子体处理鲍曼不动杆菌生物膜的研究[J]. 生物医学, 2019, 9(2): 35-42. DOI: 10.12677/hjbm.2019.92006

摘要

研究了高压脉冲等离子体射流(APPJ)对耐药性鲍曼不动杆菌(*A. baumannii*)生物膜的失活效果和机制。研究发现,该脉冲等离子体射流对生物膜中的细菌有明显的灭活作用。菌落形成单位(CFU)计数方法处理显示,30分钟处理后,生物膜中99.9%的细菌失去其可培养发育能力。与此同时,刃天青荧光染色方法显示约80%的细菌失去了新陈代谢能力,部分细菌进入了一种存活但不可培养发育的状态(VBNC),H₂-DCFDA荧光染色方法显示,等离子体处理后生物膜中细菌内的活性含氧基团(ROS)的浓度有所提高。等离子体活性物种可能诱导了细菌内部应激反应的产生,导致胞内ROS的生成,最终氧化破坏细菌结构,这可能是等离子体导致生物膜中细菌失活的重要原因。

关键词

大气压力等离子体射流(APPJ), 鲍曼不动杆菌(*A. baumannii*)生物膜, 活性氧(ROS)

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

鲍曼不动杆菌广泛分布于医院环境,主要引起菌血症、尿路感染、继发性脑膜炎、手术部位感染、医院或呼吸机相关的肺炎等感染,特别是对于重症监护病房的病人来说具有较高的致死率[1]。由于近年来抗生素等药品的广泛应用,使得鲍曼不动杆菌耐药性迅速增强,直至今日鲍曼不动杆菌对几乎所有的抗菌药物产生了耐药性[2][3]。而医院用水量及产生的废水量都很巨大,水环境较为复杂。鲍曼不动杆菌的适应性极强,而医院的这种水环境为细菌的繁殖提供了非常有利的条件。此外,医院排出的废水、废弃物中的鲍曼不动杆菌并未完全灭活,仍具有一定的感染性。

生物膜是由浮游细菌引起,由微生物聚集成多细胞结构中形成的,可以粘附于多种物质的表面。生物膜的形成可以保护细菌较少的受到外界环境变化的影响,可以阻止抗菌药物进入并伤害生物膜深层的细菌,为细菌提供了生理优势和防御条件[4][5]。鲍曼不动杆菌的生物膜结构使它更难以被灭活。

由于细菌生物膜的存在难以灭活,因此用一些新的高效的治疗方法来处理生物膜,其中包括大气压力等离子体射流。等离子体是由电子、离子和中性粒子组成的电离气体,可产生大量的荷电和活性物质[6]。这些等离子体活性物质可引起脂质、蛋白质、DNA等的破坏,导致细胞结构的破坏[7]。

迄今为止,关于等离子体失活鲍曼不动杆菌生物膜及其相关机理的研究很少。本研究中,利用等离子体射流对鲍曼不动杆菌生物膜进行了灭活实验,通过细胞可培养能力、代谢能力、和胞内ROS含量等对等离子体失活效果和对生物膜相关生物学性能进行了评价[8]。

2. 实验材料与方法

2.1. 氦气等离子体射流

大气压等离子体射流的装置示意图如图1所示。石英管的总长度为80 mm,内直径为2 mm,外直径为4 mm。玻璃管的一头为封闭,另一头通入2 mm外径的铜棒,铜棒的总长度为100 mm,铜棒上接高

压脉冲直流电源。电源的电压为 0~30 kV 可调, 频率为 0~2 kHz, 脉宽为 1~5 μs 可调。外围利用聚四氟乙烯作为外壳包裹, 喷口为一个外径 6 mm, 内径 4 mm 的石英玻璃管。

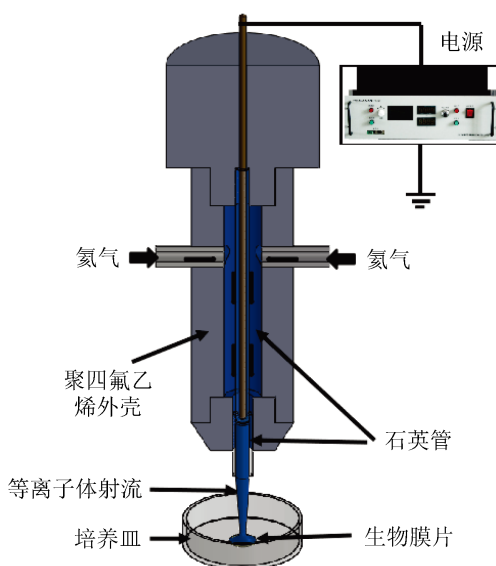


Figure 1. Helium plasma installation
图 1. 氦气等离子体装置图

氦气(99.99%)以 500 L/h 的流量从两个进气口进入放电区。Tektronix MSO 5104 数字示波器配备了高压探头(Tektronix P6015A)和电流探针(Tektronix P6021)用于检测放电时的电压和电流。氦气等离子体射流的发生光谱通过光谱仪(AvaSpec-2048)检测。

2.2. 鲍曼不动杆菌生物膜的制备

实验中所用的鲍曼不动杆菌由安徽医科大学第一附属医院提供。将鲍曼不动杆菌菌株(*A. baumannii*)在 37°C 和 220 转/每分钟搅拌条件下, 在 LB 培养液中培养 24 h。将培养好的菌液通过稀释调配至 1×10^7 细菌/ml。为了制备生物膜, 以 1:100 的比例将细菌悬浮液与 LB 混合, 并将其培养在硼硅酸盐片上, 然后将硼硅酸盐片置于 24 孔板(polystyrene, Costar 3524, Corning, NY, 1 slice/well)中, 然后, 在 37°C 的环境中静置培养 24 h [9]。培养时间结束后, 将硼硅酸盐片取出, 用无菌盐水冲洗生物膜, 以达到去除浮游生物和附着的细菌的目的。最后, 将硼硅酸盐片置于 37°C 的恒温培养箱中, 去除生物膜表面的水分。

2.3. 等离子体处理

将等离子体射流喷嘴固定在生物膜上方 6 mm 处, 此时的等离子体射流可以覆盖整个生物膜。等离子体处理时间分别为 5 min、15 min、30 min。同时将一个没有经过等离子体处理的空白样品作为对照组, 以消除干燥引发的抗菌作用。

2.4. 可培养性

利用平板涂布法培养细菌[10], 然后根据 LB 琼脂平板上生长的 CFU 的计数, 评估了鲍曼不动杆菌生物膜的可培养发育能力。将等离子体处理后的鲍曼不动杆菌生物膜置于 1 ml 去离子水(dH₂O)中。然后将 100 μl 的稀释液滴入 LB 琼脂平板中。将琼脂平板放在 37°C 的恒温培养箱中孵育 24 h。根据计算培养后的菌落数量来判定对鲍曼不动杆菌生物膜的抑菌效果。

2.5. 细胞代谢能力

将处理后的生物膜加入有 800 μl 无菌水的离心管中，离心管在超声波清洗仪中超声 1 分钟，超声强度为 50 kHz。通过超声的方法使细菌从生物膜中分离，在离心管中形成细菌悬浮液。染色时，用 10% 的刃天青染色剂与细菌悬浮液均匀混合，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的避光环境中以每小时 90 转的转速培养 3.5 小时。之后，将刃天青与细菌悬浮液的混合液移至 96 孔酶标板中，每个孔内移入 200 μl 。并且在孔板中加入没有细菌的 dH_2O 作为对样品。

刃天青(7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide)是一种已知的蓝色的非荧光染料。使用刃天青染料染色鲍曼不动杆菌生物膜时，刃天青染液进入生物膜中的活细胞时，因为活细胞还具有代谢能力，刃天青可以与其中的多种还原酶反应，从而被还原成粉色的试卤灵，之后细胞中的还原酶继续将试卤灵还原成白色的二氢试卤灵。而死亡的细菌不再拥有新陈代谢的能力，因此细胞不能产生还原酶与刃天青发生反应，刃天青不再被还原[11]。以此为依据，可以根据刃天青染色细菌后的荧光强度的变化来判断其新陈代谢能力。本文中使用的全自动定量绘图酶标仪(Ex/Em 分别为 560/590 nm)测定染色后的荧光强度值。分析数据得到等离子体处理不同时间后生物膜中的鲍曼不动杆菌代谢能力的变化。

2.6. 胞内活性氧(ROS)

细胞内活性氧的含量使用全自动定量绘图酶标仪来测定。

$\text{H}_2\text{-DCFDA}$ 染料与 dH_2O 的稀释比例为 1:499，稀释混合后的染料与离心管里的细菌悬浮液分别加 100 μl 进入 96 孔酶标板，使之在孔内混合均匀。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的避光环境中静置培养 25 分钟后以同样的波长使用全自动定量绘图酶标仪来测量其数据[12]。

之所以可以用 2,7-二氯二氢荧光素双乙酸探针($\text{H}_2\text{-DCFDA}$)染色来测定鲍曼不动杆菌细胞内活性氧的含量是因为该染色剂进入细胞内后会被细胞酯酶脱乙酰化形成一种非荧光化合物，随后该化合物被细胞内活性氧(ROS)氧化成 2,7, 二氯荧光素(DCF)，所以不同状态下的细胞其荧光强度不同。

2.7. 统计分析

每项实验至少重复三次，一式三份。CFU 计数结果改为 $\log 10\text{-ml}^{-1}$ 。采用 t 检验确定显著性，Ap 值的显著性水平小于 0.05。经过至少 9 次试验，计算得到的平均值和标准差(SD)，误差条表示平均值的标准偏差。

3. 结果与讨论

3.1. 等离子体射流特征

等离子体射流输入电压为 15 kV，频率为 2 kHz，电流峰值约为 1 A，等离子体的平均功率约 3.8 W。利用光谱测量(OES)检测氦气等离子体主要活性物质种类和相对强度[13]。在 200~1050 nm 波长处的观测结果如图 2 所示：主要由 He 发射谱线，OH 谱线(306~310 nm)，以及激发的原子氧(777.2 和 844.6 nm)。活性物质在细胞失活中起着重要的作用。因此，等离子体射流产生的活性氧能有效地破坏微生物结构，达到良好的失活效果。

3.2. 可培养发育能力

鲍曼不动杆菌的可培养发育能力可以根据琼脂平板上形成的细菌菌落单位(CFU)来计算。图 3 表示常压脉冲等离子体处理 0~30 min 后生物膜中具有可培养性的鲍曼不动杆菌菌落单位(CFU/ml)的变化。未经等离子体处理的生物膜，其中的鲍曼不动杆菌数量为 $7.37 \pm 0.143 \log_{10}\text{CFU/ml}$ 。随着处理时间的增长，5

min 后生物膜中的菌种数量为 $5.95 \pm 0.167 \log_{10}\text{CFU/ml}$ 。随后, 当处理时间达到 15 min 时, 生物膜中细菌数量的下降趋势稍有减缓, 这时细菌数量为 $5.16 \pm 0.126 \log_{10}\text{CFU/ml}$ 。等离子体处理时间达到 30 min 后, 细菌数量的变化不再明显, 此时生物膜中的菌种群数为 $3.37 \pm 0.118 \log_{10}\text{CFU/ml}$ 。

Ahmed Chebbi 等人研究表明经等离子体处理后的细胞死亡率达到 70% [14]。在本实验中处理 30 min 后细菌的灭活率可以达到 $(99.94 \pm 0.28)\%$ 。

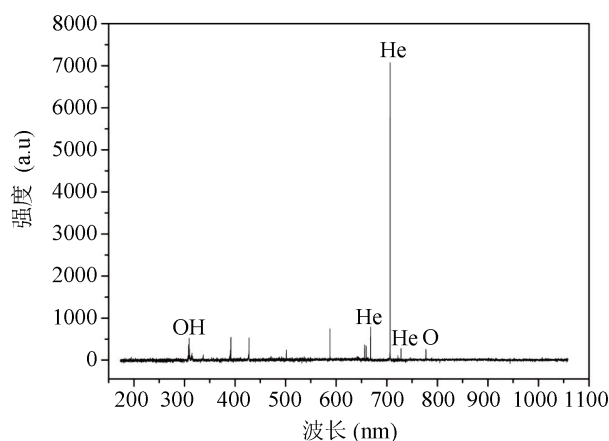


Figure 2. Emission spectra of helium plasma discharge power at 3.8 W

图 2. 氦气等离子体放电功率在 3.8 W 下的发射光谱

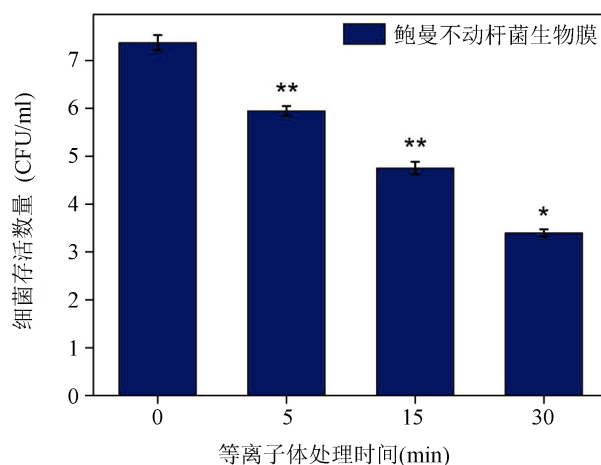


Figure 3. Survival curve of *Acinetobacter baumannii* in biofilm after plasma treatment. *represents an average of nine values \pm sd (standard deviation)

图 3. 等离子体处理后生物膜中鲍曼不动杆菌的存活曲线。*代表 9 个值的平均值 \pm sd (标准差)

3.3. 细胞代谢能力

由全自动定量绘图酶标仪在 Ex/Em 为 560/590 nm 处测得数据, 整理并绘制该柱状图。图 4 表示氦气常压脉冲等离子体处理不同时间后生物膜中具有新陈代谢能力的鲍曼不动杆菌的百分比。未经等离子体处理时 100% 的细菌都具有代谢能力。等离子体处理 5 min 后生物膜中 48.9% 的鲍曼不动杆菌具有新陈代谢能力, 由此得到, 生物膜中超过一半的细菌失去新陈代谢能力。随着等离子体处理时间的再次增长该

百分比的下降趋势减缓。当处理时间达到 30 min 时, 生物膜中仅有 20.3% 的鲍曼不动杆菌具有新陈代谢能力。

由图 3 与图 4 相比可以看出, 等离子体处理 5 分钟后, 细菌就灭活了 99.99%, 但是生物膜中细菌的新陈代谢能力仍有大约 50%。由此判断, 细菌虽然失去了可培养发育能力, 但仍具有代谢能力, 即进入了一种可存活但不可培养状态(VBNC)。VBNC 状态是细菌面对氧化应激, 温度, 湿度等环境因素的改变时使用的一种生存方法[8] [15]。等离子体射流也是一种外部环境威胁, 它能放电产生大量的 ROS 作用并影响到细胞, 对细菌的生存产生了威胁, 因此可能这种外部压力会迫使细菌进入了 VBNC 状态。

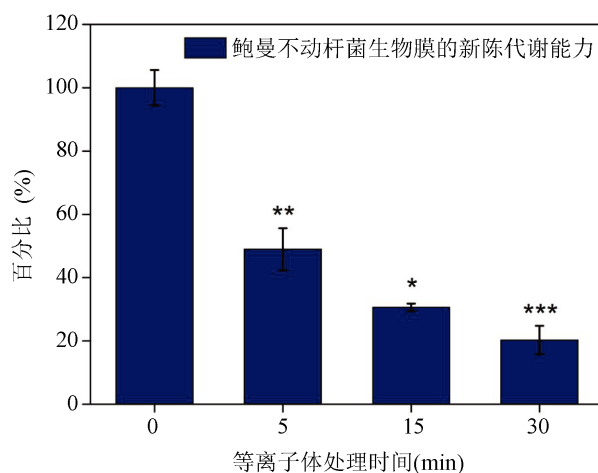


Figure 4. The metabolism of *Acinetobacter baumannii* in plasma treated biofilms was determined by fluorescence intensity (Ex/Em: 560/590 nm). *represents an average of nine values \pm sd (standard deviation)

图 4. 用荧光强度(Ex/Em: 560/590 nm)测定等离子体处理后生物膜中鲍曼不动杆菌的新陈代谢能力。*代表 9 个值的平均值 \pm sd (标准差)

3.4. 胞内活性氧(ROS)

细胞内活性氧的浓度与细菌失活密切相关。图 5, 表示等离子体处理后细胞内活性氧浓度(Ex/Em: 488/525 nm)的变化。

图 5 显示随着等离子体处理时间的增长, 细胞膜的表面荧光强度呈现出先增强后下降的趋势。等离子体放电会产生大量活性氧进入细胞内部, 破坏细胞结构。由于细菌本身对外部环境的刺激具有应激反应, 当等离子体处理生物膜时, 细菌内部产生胞内 ROS 以抵抗外部的压力, 单个细菌内 ROS 浓度会迅速上升。随着等离子体处理时间的增长, 高浓度的活性氧使得细胞被破坏, 因此, 总体的活性氧浓度开始降低。

4. 结论

1) 氦气等离子体处理能有效地灭活生物膜中鲍曼不动杆菌, 是因为它能产生大量的活性物质可以导致细胞壁裂解。这些等离子体活性物质通过氧化细菌组分导致细胞裂解, 在细菌失活过程中起着重要作用。

2) 生物膜中鲍曼不动杆菌的代谢能力与细胞内酶有密切的关系。等离子体产生的活性氧对酶系统的功能有一定的影响。因此, 这就是为什么细菌丧失了可培养能力, 却拥有新陈代谢能力。

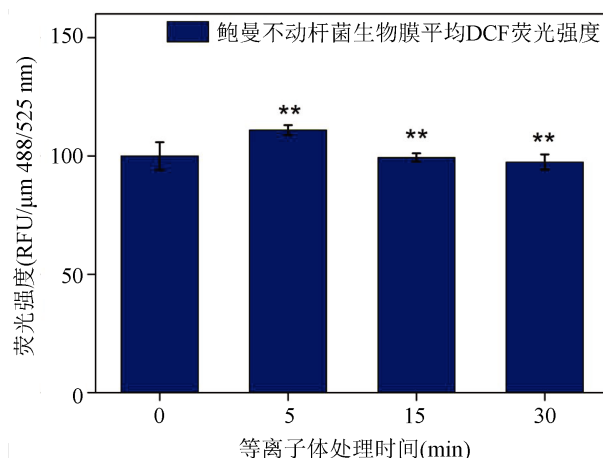


Figure 5. Changes of intracellular reactive oxygen species concentration after plasma treatment. *represents an average of nine values \pm sd (standard deviation)

图 5. 等离子体处理后细胞内活性氧浓度的变化。*代表 9 个值的平均值 \pm sd (标准差)

- 3) 等离子体产生的活性氧能够穿透生物膜，并破坏细菌的膜结构。
- 4) 随着等离子体处理时间的增加，生物膜中的鲍曼不动杆菌不断被破坏。

基金项目

感谢国家自然科学基金资助项目(No. 51541807, No. 5177206);安徽省自然科学基金,1708085MB47, 1708085MA13;合肥工业大学博士科研专项资助项目(No. JZ2016HGBZ0769);合肥工业大学博士专业研究基金 JZ2016HGBZ0768, JZ2017HGBZ0944。

参考文献

- [1] 周海燕, 石月萍, 王国英. 鲍曼不动杆菌 3 年耐药性监测结果分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(20): 2541-2543+2546.
- [2] 张荣芳, 陆建福, 霍剑锋, 冯真真. 解放军 371 中心医院 2016 年度鲍曼不动杆菌临床分布及耐药性分析[J]. 中华灾害救援医学, 2018, 6(10): 585-587.
- [3] 归巧娣, 解娟, 范芸, 宫艳艳. 2014-2016 年 ICU 鲍曼不动杆菌耐药结果分析[J]. 医学动物防制, 2018, 34(12): 1126-1128.
- [4] Bjarnsholt, T. (2013) The Role of Bacterial Biofilms in Chronic Infections. *APMIS*, **136**, 1-51. <https://doi.org/10.1111/apm.12099>
- [5] 谭覃, 徐征, 高尚谦, 祁静文, 孙尚念, 王娇娇, 谷洪涛. 国内外感染伤口细菌生物膜处理方式的研究进展[J]. 医学信息, 2018, 31(22): 43-46.
- [6] 刘玉亭. 大气压射流等离子体活性物种诊断及其对微生物杀伤的研究[C]//中国力学学会等离子体科学技术专业委员会、中国物理学会等离子体物理分会、中国核学会聚变与等离子体物理学会、中国物理学会高能量密度物理专业委员会. 第十八届全国等离子体科学技术会议摘要集. 中国力学学会等离子体科学技术专业委员会、中国物理学会等离子体物理分会、中国核学会聚变与等离子体物理学会、中国物理学会高能量密度物理专业委员会: 中国力学学会, 2017: 1.
- [7] 陈绪松, 李栋, 刘志杰, 刘定新, 陈伟, 郭莉, 孔刚玉. 等离子体射流灭活液体中铜绿假单胞菌的研究[J]. 微生物学通报, 2017, 44(4): 865-871.
- [8] 阮哲, 郭亚俊, 高静, 杨春俊, 兰彦, 沈洁, 许子牧, 程诚, 刘行浩, 张书梅, 杜文辉, 朱剑豪. Control of Multi-drug-Resistant Planktonic *Acinetobacter baumannii*: Biocidal Efficacy Study by Atmospheric-Pressure Air Plasma. *Plasma Science and Technology*, 2018, 20(6): 176-183. <https://doi.org/10.1088/2058-6272/aab302>

- [9] 沈瑾, 段弘扬, 邱侠, 朱亭亭, 班海群, 王佳奇, 孙惠惠, 李新武. 碱性电解水与医用清洗剂去除细菌生物膜的研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(7): 979-982.
- [10] 鲁芸芸, 潘跃龙, 曹骐, 邓先宽, 张劲松. 放射性样品中微生物的检测分析[J]. 科技视界, 2016(12): 15-16.
- [11] 张洪利, 康大力, 莫小路. 刃天青法对溪黄草抗菌活性部位的筛选[J]. 海峡药学, 2013, 25(9): 50-51.
- [12] Xu, Z., Shen, J., Cheng, C., *et al.* (2017) *In Vitro* Antimicrobial Effects and Mechanism of Atmospheric-Pressure He/O₂ Plasma Jet on *Staphylococcus aureus* Biofilm. *Journal of Physics D Applied Physics*, **50**, Article ID: 105201. <https://doi.org/10.1088/1361-6463/aa593f>
- [13] Xiao, D., Cheng, C., Shen, J., *et al.* (2014) Characteristics of Atmospheric-Pressure Non-Thermal N₂ and N₂/O₂ Gas Mixture Plasma Jet. *Journal of Applied Physics*, **115**, Article ID: 033303. <https://doi.org/10.1063/1.4862304>
- [14] Sharkey, M.A., Chebbi, A., McDonnell, K.A., *et al.* (2015) Evaluation of the Sensitivity of Bacterial and Yeast Cells to Cold Atmospheric Plasma Jet Treatments. *Biointerphases*, **10**, Article ID: 029507. <https://doi.org/10.1116/1.4916928>
- [15] 孙宗科. 水中肠道致病菌活的非可培养状态及致病性的研究[D]: [博士学位论文]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2009.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2161-8976, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: hjbm@hanspub.org