四川大学学报（医学版）
J Sichuan Univ（Med Sci Edi） 2019，50（3）：339－343

大气压低温等离子体射流对白色念珠菌生物膜的杀灭效果*

蒲启康[1,2]，刘思静[1,2]，黄　欢[1,2]，熊靖飞[1,2]，张　丽[1,2]，方　志[3]，汪　川[1,2△]

1. 四川大学华西公共卫生学院 卫生检验与检疫系（成都 610041）；2. 四川大学华西公共卫生学院 公共卫生与预防医学实验中心（成都 610041）；3. 南京工业大学电气工程与控制科学学院（南京 210009）

【摘要】 目的 评价大气压低温等离子体射流对白色念珠菌生物膜的杀灭效果。**方法** 将对数生长期的白色念珠菌悬液接种于24孔板上，培养白色念珠菌生物膜，通过活菌计数评价生物膜的培养稳定性；将大气压低温等离子体射流作用于白色念珠菌生物膜不同时间后，平板计数法计算残余活菌的量，荧光染色观察死亡真菌的情况，透射显微镜观察真菌形态变化。**结果** 白色念珠菌培养72 h后，可在24孔板上形成典型的、成熟的、稳定的生物膜结构；大气压低温等离子体射流对白色念珠菌生物膜具有较好的杀灭效果，作用20 s可杀灭90%真菌，作用时间超过55 s，则无活菌检出；随着作用时间的增加，荧光素标记的死细胞面积也相应增加；透射显微镜结果显示大气压低温等离子体射流对白色念珠菌的细胞结构具有显著的破坏作用。**结论** 大气压低温等离子体射流可破坏白色念珠菌结构，对白色念珠菌生物膜具有较强的杀灭作用。

【关键词】 大气压低温等离子体　白色念珠菌　生物膜　灭菌

Sterilization Effect of an Atmospheric Low Temperature Plasma Jet on *Candida albicans* Biofilm

PU Qi-kang[1,2], *LIU Si-jing*[1,2], *HUANG Huan*[1,2], *XIONG Jing-fei*[1,2], *ZHNANG Li*[1,2], *FANG Zhi*[3], *WANG Chuan*[1,2△]. 1. *Department of Public Health Laboratory Sciences, West China School of Public Health, Sichuan University*, Chengdu 610041, *China*; 2. *Research Center for Public Health and Preventive Medicine, West China School of Public Health, Sichuan University*, Chengdu 610041, *China*; 3. *College of Electrical Engineering and Control Science, Nanjing Tech University*, Nanjing 210009, *China*

△ Corresponding author, E-mail: wangchuan@scu.edu.cn

【Abstract】 Objective To evaluate the sterilization effect of new designed atmospheric low temperature plasma jet on *Candida albicans* (*C. albicans*) biofilm. **Methods** *C. albicans* was grown into the logarithmic phase, and then was added to polystyrene 24-well microtitre plate. The amount of germs were calculated by viable plate counting to determine the reproducibility of each biofilm well. The germs in biofilm were treated by plasma for different exposure time and then the survived germs were quantified by plate counting, the dead cells were determined by staining the biofilm with propidium iodide (PI), and the ultrastructural changes of the germs in biofilm were observed by transmission electron microscopy (TEM). **Results** When incubated for 72 h, germs tightly polymerized and classical mature biofilm were formed. This atmospheric low temperature plasma jet could inactivate *C. albicans* biofilm within a short exposure time. *C. albicans* were 90% inactivated when treated 20 s and 55 s of plasma treatment reduced bacteria populations to undetectable levels. With the increase of treatment time, enlarged fluorescent positive area appeared, and more bacteria died with the extending of exposure. The TEM scanning results showed that the new plasma jet inactivated *C. albicans* biofilm mainly via disrupting cell envelopes and then leading the release of cellular components, thus resulting in loss of cell viability. **Conclusion** Plasma generated from atmospheric low temperature plasma jet could damage the cell structure of *C. albicans and* efficiently sterilize *C. albicans* biofilm.

【Key words】 Atmospheric low temperature plasma　*Candida albicans*　Biofilm　Sterilization

生物膜是黏附在有生命或无生命体表面的微生物群体，是微生物对于不利环境的一种抵抗机制。相比处于游离态的微生物个体，生物膜对极端环境、消毒剂等的抵抗力更强，是造成慢性感染的重要原因，为临床抗菌治疗、植入物和生物材料的应用带来了极大的挑战[1]。以白色念珠菌（*Canidia albicans*，CA）为代表的念珠菌群是人类最常见的条件致病真菌，是院内感染的主要致病微生物之一[2]。在体内或器械表面，白色念珠菌主要以生物膜的形式存在，使其能有效抵抗机体免疫防御以及抗真菌药物的作用[3]。

等离子体，又称为电浆，被认为是物质的第四态，是原子或分子被电离后产生的离子化气体状物质，可以分为高温等离子体和低温等离子体[4]。大气压等离子体是低温等离子体发生技术的一种，相对于其他等离子体具有可在开放空间中产生、不依赖真空环境、射流温度低、射流活性高、无污染、无残留等优点，因此在生物医学领域具有广阔的应用前景[4]。利用大气压低温等离子体进行微生物灭活是当前的研究热点之一，但目前的研究多集中于细菌领域，对于其他类型的

* 四川省科技厅国际合作项目（No. 2017HH0080）和国家大学生创新训练计划项目资助

△ 通信作者，E-mail：wangchuan@scu.edu.cn

微生物及其特殊存在形式的作用效果研究甚少,因此,本研究以白色念珠菌为真菌代表,评价大气压低温等离子体对其生物膜的杀灭效果,以期为大气压低温等离子体在消毒灭菌领域的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及主要试剂 白色念珠菌标准株(ATCC 10231)购自中国普通微生物菌种保藏管理中心;沙氏琼脂、沙氏培养基购自北京陆桥生物技术有限公司;碘化丙啶(PI)染色试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司。

1.1.2 大气压低温等离子体装置 本研究采用的等离子体发生装置属于微型滑动弧放电(图1),装置高压电源采用0 ~ 30 kV可调的高频谐振高压电源,气泵流速为10 L/min,工作气体为空气,空气通过等离子体发生器产生低温等离子体射流,通过喷嘴进行杀菌,喷嘴内径为0.5 mm。

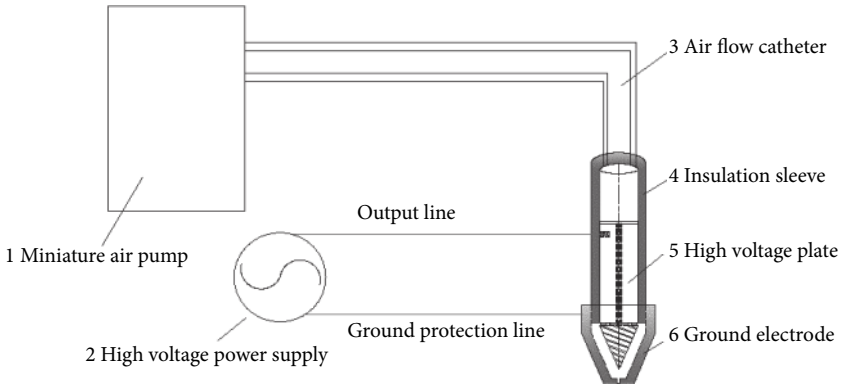


图 1 等离子体装置示意图

Fig 1 Structure of the plasma generator

1.2 方法

1.2.1 白色念珠菌生长曲线的测定 将白色念珠菌新鲜培养物按1:500比例接种于沙氏培养基,于37 ℃、150 r/min培养,沙氏培养基空白调零,每间隔3 h在530 nm的波长下测定吸光度值(A_{530}值),以培养时间为横坐标,A_{530}值为纵坐标绘制生长曲线。

1.2.2 白色念珠菌生物膜的培养及其稳定性测定 取5 mL达到对数生长期的新鲜真菌培养物,3 000×*g*离心5 min,弃上清,用PBS洗涤后以5 mL PBS重悬;取400 μL菌悬液(约6×10^5 CFU/mL)加至24孔板,37 ℃培养24 h、72 h;培养结束后,PBS洗涤3次,自然干燥后于显微镜下观察白色念珠菌生物膜形态。

取定植白色念珠菌生物膜的24孔板,每孔加入400 μL PBS, 20 kHz超声15 min,收集悬液倍比稀释,取适当稀释度涂板活菌计数。4孔为1组,每次设置2组,实验重复3次,共6组。

1.2.3 大气压低温等离子体射流杀灭白色念珠菌生物膜的效果评价 将定植白色念珠菌生物膜的24孔板置于等离子体发生装置喷头下,以作用距离1.2 cm分别作用0 s、5 s、10 s、15 s、20 s、25 s、30 s、35 s、40 s、45 s、50 s、55 s、60 s,处理结束后,每孔加入400 μL PBS, 20 kHz超声15 min,收集悬液倍比稀释,取适当稀释度涂板活菌计数。

1.2.4 大气压低温等离子体射流作用白色念珠菌生物膜后的荧光显微镜观察 将定植白色念珠菌生物膜的24孔板置于等离子体发生装置喷头下,以作用距离1.2 cm分别作用0 s、10 s和40 s,处理结束后,于避光条件下每孔加入200 μL质量浓度为50 μg/mL的PI,室温孵育5 min,孵育结束后PBS洗涤3次,于荧光显微镜下观察。PI是一种核酸荧光染料,不能通过正常完整的细胞膜。当细胞处于坏死或凋亡晚期时,细胞膜被破坏,PI将其染成红色。

1.2.5 大气压低温等离子体射流作用白色念珠菌生物膜后的透射电镜观察 将定植白色念珠菌生物膜的24孔板置于等离子体发生装置喷头下,以作用距离1.2 cm作用0 s和40 s,处理结束后,每孔加入400 μL PBS, 20 kHz超声15 min,收集悬液,3 000×*g*离心3 min,弃上清,加入100 μL体积分数4%多聚甲醛溶液固定,随后漂洗、脱水、包埋和固定,透射电镜下观察白色念珠菌的形态。

1.2.6 统计学方法 所有实验独立重复3次,数据采用$\bar{x} \pm s$表示。对各组数据进行正态分布和方差齐性检

验, 若符合正态分布且方差齐, 多组间的比较采用单因素方差分析, 两两比较采用SNK检验; 不符合正态分布或方差不齐时则采用非参数秩和检验; α= 0.05。

2　结果

2.1　白色念珠菌的生长曲线

如图2所示, 白色念珠菌在培养约15 h后进入对数生长期(A_{530}= 0.5~2.5), 为保证生物膜培养条件的稳定性, 本研究采用A_{530}= 1.0时的白色念珠菌培养物来进行生物膜培养。

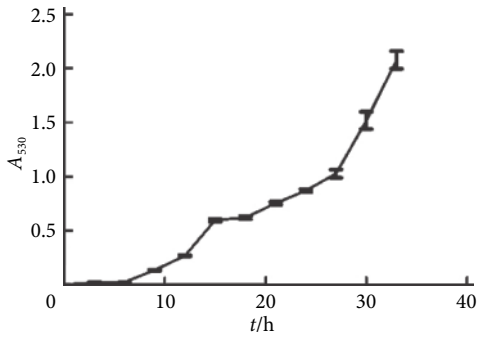


图 2 白色念珠菌生长曲线

Fig 2 Growth curve of *C. albicans*

2.2　白色念珠菌生物膜培养及其稳定性

白色念珠菌生物膜培养不同时间后的形态如图3A、3B所示, 培养24 h后, 白色念珠菌开始黏附聚集, 但镜下形态比较松散, 仍有许多悬浮菌存在; 培养72 h后, 白色念珠菌生物膜结构完全成熟, 在镜下以紧密聚集的形式黏附在24孔板底部, 结果表明以24孔板作为黏附载体、以PBS作为介质培养72 h可获得具备典型生物膜特征的成熟白色念珠菌生物膜。

将6组经72 h培养的白色念珠菌生物膜进行活菌计数, 结果如图3C所示, 每组的活菌计数值均集中在$10^{5.5}$~$10^{6.0}$ CFU, 差异均无统计学意义。

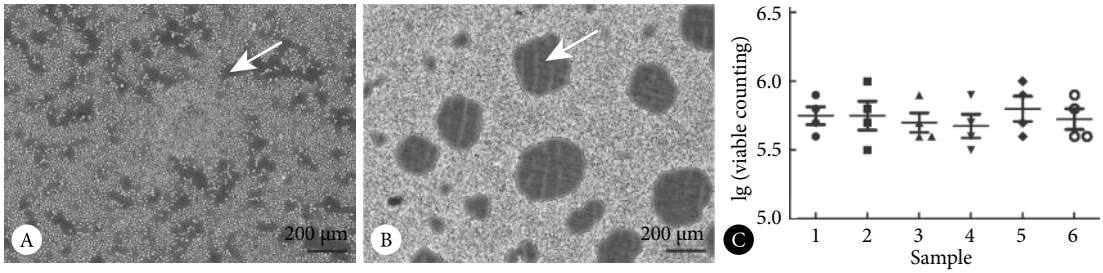


图 3 不同培养时间白色念珠菌生物膜的形态及其稳定性分析。×10

Fig 3 Analysis of formation and reproducibility of *C. albicans* biofilm under different culture time. ×10

Biofilm of *C. albicans* after 24 h (A) and 72 h (B) incubation in PBS solution; C: Viable counting results ($\bar{x} \pm S$) of each parallel well after 72 h biofilm formation; Arrows point to the black hole indicating polystyrene well without biofilm

2.3　大气压低温等离子体射流作用不同时间的杀菌效果

大气压低温等离子体对白色念珠菌生物膜的杀灭效果与作用时间的关系如图4所示, 白色念珠菌的活菌数随着作用时间的延长呈现降低的趋势, 当作用时间≥15 s时, 与作用0 s组活菌数相比, 差异有统计学意义(P< 0.005); 当作用时间达20 s时, 白色念珠菌活菌数由$10^{5.62}$ CFU降至$10^{4.37}$ CFU (P< 0.005), 约90%活菌被杀灭; 作用时间≥55 s后, 活菌数减少至检出限以下。

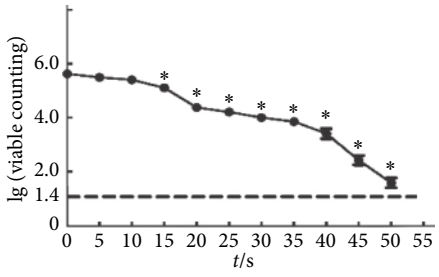


图 4 大气压低温等离子体作用不同时间对生物膜的影响

Fig 4 Viable counting of biofilm after plasma treatment for different exposure time

*P<0.005, vs. 0 s. Dash line: Limit of detection

2.4　大气压低温等离子体射流作用后白色念珠菌生物膜死亡情况

如图5所示, 随着作用时间的增加, 白色念珠菌的着色部分比例增加, 并出现高亮区, 说明该大气压低温等离子体对白色念珠菌的细胞膜具有破坏作用, 随着时间的增加, 对生物膜的破坏程度、面积也相应增加。

2.5　大气压低温等离子体射流作用后白色念珠菌生物膜细菌超微结构的改变

大气压低温等离子体分别作用0 s和40 s时, 透射电镜下的细胞超微结构如图6所示。未处理的白色念珠菌生物膜菌体结构完整, 呈椭圆形, 镜下能观察到电子密度高、结构平滑的细胞壁以及完整的液泡等结构, 细胞内其他部分电子密度均匀; 经大气压低温等离子体处理40 s后, 白色念珠菌生物膜菌体形态发生明

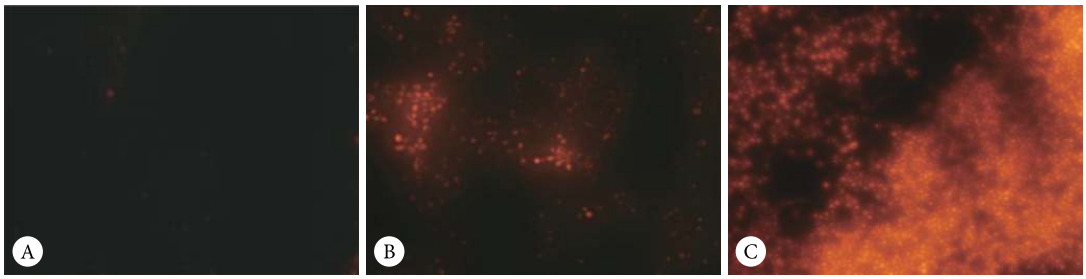


图 5 大气压低温等离子体作用不同时间后白色念珠菌的死亡情况。×20

Fig 5 Fluorescent staining of dead *C. albicans* (red) exposed to plasma for different time. ×20

C. albicans biofilm treated with plasma for 0 s (A), 10 s (B) and 40 s (C)

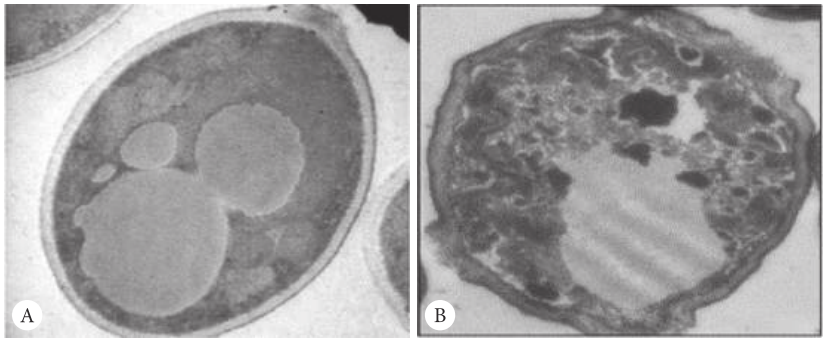


图 6 大气压低温等离子体作用白色念珠菌生物膜后的透射电镜观察。×40 000

Fig 6 TEM images of *C. albicans* biofilm after a plasma exposure. ×40 000

A: Untreated *C. albicans*; B: *C. albicans* treated with plasma for 40 s

显变化,菌体形状不再是规则的椭圆形,细胞壁变得不规则、皱缩、甚至破裂,菌体内部的电子密度分布不均匀,菌体内部结构无法清晰辨明,菌体呈现解体趋势。表明该大气压低温等离子体射流发生装置产生的等离子体对白色念珠菌的结构具有显著的破坏作用。

3 讨论

大气压低温等离子体射流是近年来新兴的研究领域,由于其在大气压下产生、气体温度低、活性高、无污染等特点,适合直接应用于热敏感型基质材料和人体组织,在众多领域尤其是生物医学方面的应用引起了人们广泛的关注[1, 5]。目前,已有大量的文献报道大气压低温等离子体对游离状态的细菌具有较好的杀灭作用[6]。但是,考虑到临床上造成危害的病原微生物如铜绿假单胞菌、白色念珠菌等,很少以游离状态的形式造成感染,而是以生物膜的形式黏附于创口表面、医疗器械表面,造成持续性感染,而且在生物膜中的微生物具有许多与游离状态微生物差异很大的生物学特性,尤其生物膜表现出更强的耐药性[1]。因此本研究以白色念珠菌生物膜为研究对象,评价大气压低温等离子体射流对其的杀灭效果,为大气压低温等离子体在医院消毒灭菌领域的应用提供理论依据。

研究表明白色念珠菌生物膜的形成可以分为早期(0 ~ 11 h)、中期(12 ~ 30 h)和晚期(31 ~ 72 h)3个阶段[7],早期主要表现为真菌的黏附聚集与增殖;中期开始分泌大量的胞外基质包裹微生物;晚期白色念珠菌生物膜基本形成,结构趋于稳定。研究表明,成熟的白色念珠菌生物膜对不利环境的抵抗力最强[3]。因此,本研究选择对数生长期的白色念珠菌接种24孔板,培养72 h,培养出成熟的白色念珠菌生物膜,活菌计数结果表明,该培养方案可以获得较稳定的白色念珠菌生物膜,培养过程中的差异不会影响后续实验的结果判断;白色念珠菌生物膜对大气压低温等离子体的抵抗能力很弱,根据等离子体对白色念珠菌生物膜的杀灭效果与作用时间关系分析,等离子体的作用可大致分为2个阶段,首先,从0 ~ <15 s活菌数呈现缓慢下降的趋势,此时与作用0 s相比,活菌数差异均无统计学意义;其次,当作用时间达到20 s时,杀灭效率约90%,持续作用55 s,生物膜内的菌体被完全杀灭。因此在进一步通过荧光显微镜和透射显微镜观察该大气低温等离子体对白色念珠菌生物膜的破坏情况时,为使结果更具代表性,本研究分别选取了上述两个阶段中期10 s和40 s

作为观测点。荧光染色的结果表明,该大气压低温等离子体对白色念珠菌生物膜的破坏作用随作用时间的延长而增强。透射电镜的观察结果显示,白色念珠菌生物膜经大气压低温等离子体作用后,细胞形态发生异常,细胞壁皱缩,揭示细胞膜通透性及菌体内部渗透压发生改变,这可能与离子体射流的关键活性离子有关。目前,诸多研究表明,等离子体射流中的含氧活性自由基(OH^-自由基、O_3等)和含氮活性自由基(NO、NO_2等)在灭活病菌中起到重要作用[8],OH^-可以破坏细胞膜上的不饱和脂肪酸,使其控制离子和极性物质进出细胞的能力受到损伤;控制各种大分子进出的细胞膜表面蛋白质也易被O或O_2氧化;而且,高浓度的NO会导致细胞衰老和凋亡[8]。但由于等离子体中还富含带电粒子、紫外线、处于激发态或亚稳态的高能粒子,因此该等离子体与白色念珠菌间相互作用的机制仍需进一步探究。

综上所述,大气压低温等离子体对白色念珠菌生物膜具有较强的杀灭效果,为非生命的物体表面生物膜的杀灭提供了一个有效的手段。然而,关于等离子体灭菌技术和相关作用机制,以及等离子体作用后的微生物在分子层面上发生的结构和功能变化的研究尚不明确,仍需要进一步探究。

参　考　文　献

[1] KATHJU S, NISTICO L, TOWER I, *et al*. Bacterial biofilms on implanted suture material are a cause of surgical site infection. Surg Infect (Larchmt), 2014, 15(5): 592–600.

[2] 刘嘉铭, 刘巾男, 魏明天, 等. 白色念珠菌生物膜与耐药抗性的研究进展. 中国病原生物学杂志, 2010, 5(11): 869–871.

[3] PETERS BM, WARD RM, RANE HS, *et al*. Efficacy of ethanol against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* polymicrobial biofilms. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(1): 74–82.

[4] PARK SB, KIM B, BAE H, *et al*. Differential epigenetic effects of atmospheric cold plasma on MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. PLoS One, 2015, 10(6):e0129931[2018-07-10]. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129931.

[5] 熊紫兰, 卢新培, 鲜于斌, 等. 大气压低温等离子体射流及其生物医学应用. 科技导报, 2010, 28(15): 97–105.

[6] ZIUZINA D, PATIL S, CULLEN PJ, *et al*. Atmospheric cold plasma inactivation of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica serovar Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* inoculated on fresh produce. Food Microbiol, 2014, 42(12): 109–116.

[7] RAMAGE G, SAVILLE SP, WICKES BL, *et al*. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(11): 5459–5463.

[8] DAVID BG. The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology. J Appl Phys, 2012, 45(26): 263001[2018-07-10]. http://dx.doi.org/10.1088/0022-3727/45/26/263001.

（2018 – 10 – 02收稿, 2019 – 02 – 01修回）

编辑　余　琳