

【论著】

低温等离子体激活过硫酸盐 灭活红色毛癣菌生物膜

张群霞^{1,2}, 方 草^{1,3}, 杨春俊⁴, 邵长胜^{1,2}, 詹福如^{1,2}, 黄 青^{1,2}

(1 中国科学院合肥物质科学研究院技术生物与农业工程研究所, 安徽合肥 230031;

2 中国科学技术大学; 3 安徽建筑大学; 4 安徽医科大学)

摘要 目的 研究低温等离子体激活过硫酸盐溶液对红色毛癣菌生物膜杀灭效果。**方法** 采用低温大气压等离子体射流装置灭活红色毛癣菌生物膜。**结果** 红色毛癣菌经 96 h 培养形成完整的生物膜。大气压低温等离子体射流处理 5 min, 可完全杀灭红色毛癣菌生物膜。生物膜加水更容易被杀灭, 过硫酸钠溶液可以提高低温等离子体射流杀灭红色毛癣菌生物膜的效果。**结论** 低温等离子体射流可以杀灭红色毛癣菌生物膜, 过硫酸盐可有效提高等离子体灭活红色毛癣菌生物膜的效率。

关键词 低温等离子体; 过硫酸盐; 红色毛癣菌; 生物膜; 杀灭效果

中图分类号: R187.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-7658(2020)01-0001-04

DOI: 10.11726/j.issn.1001-7658.2020.01.001

Low-temperature plasma-activated persulfate inactivates *T. rubrum* biofilm

ZHANG Qun-xia^{1,2}, FANG Cao^{1,3}, YANG Chun-jun⁴, SHAO Chang-sheng^{1,2}, ZHAN Fu-ru^{1,2}, HUANG Qing^{1,2}

(1 Institute of Technical Biology and Agriculture Engineering, Hefei Institutes of Physical Science, Chinese Academy of Sciences, Hefei Anhui 230031; 2 University of Science & Technology of China; 3 Anhui Jianzhu University; 4 Anhui Medical University, China)

Abstract Objective To study the killing effect of low-temperature plasma-activated persulfate solution on *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*) biofilm. **Methods** Low-temperature atmospheric pressure plasma jet (APPJ) device was used to treat the *T. rubrum* biofilm. **Results** *T. rubrum* formed a complete biofilm after 96 h of culture. Low-temperature APPJ was used for 5 min, and *T. rubrum* biofilm could be completely killed. Adding water to the biofilm was benefit for killing effect, and the sodium persulfate solution could promote the effect of low-temperature APPJ to kill *T. rubrum* biofilm. **Conclusion** Low-temperature APPJ can kill *T. rubrum* biofilm, and the sodium persulfate solution can effectively improve the efficiency of plasma inactivation of *T. rubrum* biofilm.

Key words Low-temperature plasma; persulfate; *Trichophyton rubrum*; biofilm; killing effect

生物膜污染已经成为很多领域管道清洁的难题, 特别是在医疗器械管腔和缝隙形成的生物膜是构成医院感染的重要原因。生物膜是被基质包裹的微生物群落, 彼此之间相互粘附, 表面或界面嵌入到胶状基质中, 主要由胞外多糖、少量蛋白质和核酸组成^[1,2]。由于胞外聚合物以及多层结构的保护作用, 使得生物膜内的微生物对外界各种灭菌方式具有一定的抗性, 因此杀灭生物膜形式的微生物非常困

难^[3]。有学者用低温等离子体对念珠菌生物膜的灭活研究取得成功^[4]。还有人证明室温空气等离子体射流对体外的粪肠球菌微生物膜具有很好灭活效果, 以及等离子体放电产生的活性组分能穿透 25.5 μm 厚的生物膜^[5]。本研究采用大气压低温等离子体射流 (APPJ), 以红色毛癣菌生物膜为模型进行了实验室杀灭试验, 观察了大气压等离子体在不同条件下杀灭生物膜的效果, 同时观察了过硫酸钠对低温等离子体杀灭红色毛癣菌生物膜的促进作用。

〔基金项目〕 国家自然科学基金 (11635013, 11775272)

〔作者简介〕 张群霞 (1994 -), 女, 安徽阜阳人, 硕士, 从事等离子体灭菌研究工作。

〔通讯作者〕 黄青, Email: huangq@ipp.ac.cn

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验菌株为红色毛癣菌标准株, 购自中国医学

科学院皮肤病研究所,分离自患者标本。

主要试剂包括葡萄糖、过硫酸钠、无水乙醇、氯化钠;蛋白胨、营养琼脂培养基和 RPMI 1640 培养基等,均为国内市售产品。

试验用仪器和器材:盖玻片、XDS-3KY 型倒置显微镜为国内产品;LIVE/DEAD™ 型荧光显微镜为美国进口;大气压低温等离子体射流装置为自制产品,如图 1 所示。等离子体射流装置为一根长 15 cm 的不锈钢电极放置于石英管中,阳极的上端与 220 V 交流电源连接,峰值电压 9.7 kV、电流 2.8 mA 和频率为 9.6 kHz 左右。等离子体载气为氦气。

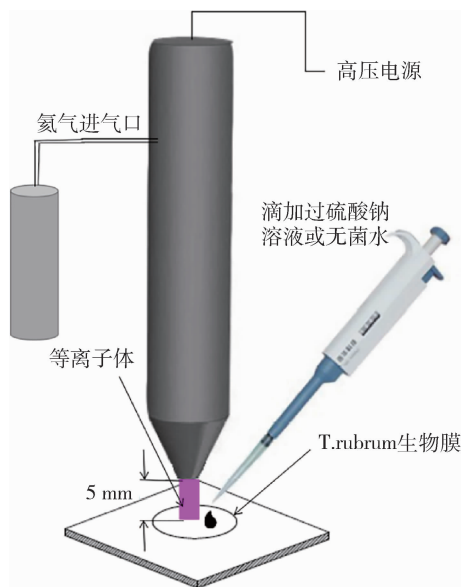


图 1 大气压等离子体射流 (APPJ) 处理 *T. rubrum* 生物膜示意图

1.2 试验方法

1.2.1 红色毛癣菌生物膜模构建 ①菌悬液制备:将红色毛癣菌接种于沙氏葡萄糖琼脂培养基 (SDA),于 28℃ 培养 7 d,即培养出红色毛癣菌孢子。吸取 5 mL 无菌生理盐水覆盖培养物,用接种环将红色毛癣菌刮下,血细胞计数板计数,用 RPMI 1640 培养液配制含菌量为 1×10^6 cfu/mL 菌悬液。②制备生物膜^[6]:将 1 000 μ L 红色毛癣菌孢子悬浮液置于 24 孔板内并覆盖无菌载玻片,放置 37℃ 恒温培养箱中静置孵育 6 h,弃去上清液,再用无菌生理盐水清洗孔板 3 次,以去除未黏附细胞。然后加入 1 000 μ L RPMI 1640 培养基,于 37℃ 培养 24、48、72、96 h 分别取出在倒置显微镜下观察不同时间段生物膜的生长状况,以确定成熟的红色毛癣菌生物膜。

1.2.2 等离子体处理生物膜 ①设定等离子体条件:设定载气气体流量为 1 L/min,首先将载气导入侧边管持续 2 min,以排除管内空气。将生物膜板孔

直接置于载物台上距离射流口 5 mm 位置。②分组:将制得的生物膜分为 5 组,即阴性对照组;在生物膜上加过硫酸钠 300 μ L,不经等离子体处理;生物膜样品直接经等离子体处理;生物膜上加 300 μ L 无菌水经等离子体处理;生物膜上加过硫酸钠 300 μ L 并保持 3~5 min 经等离子体处理。③等离子体处理方法:生物膜上加过硫酸钠生物膜样品的处理时间保持在 3~5 min。进行等离子体放电处理:启动低温等离子体射流处理 5 min。等离子体放电处理后,吸出加入的过硫酸钠溶液/无菌水,所有样品均用无菌生理盐水清洗 3 次,分别进行效果评价。

1.2.3 灭活效果评价方法 ①平板培养法:等离子体放电处理之后,直接将整个盖玻片倒扣在 SDA 平板上于 28℃ 培养 5 d,根据培养长出的平均菌落数评估等离子体对红色毛癣菌生物膜的杀灭率^[7]。②荧光显微镜法:将上述清洗 3 次的生物膜样品加入 200 μ L SYTO 9/PI 染料,以绿色荧光标记活细胞,以红色荧光标记死细胞。在暗室中染色 30 min 后,使用 1 mL 无菌生理盐水再次洗涤所有生物膜样品 3 次,然后用荧光显微镜观察。

2 结果

2.1 红色毛癣菌生物膜生长情况

经倒置显微镜观察,培养 24 h 即出现红色毛癣菌生物膜,随着培养时间延长至 96 h,红色毛癣菌菌株开始大量形成细胞外基质并沿着菌丝形成团块聚集,可见多层膜状结构,最终形成精密的被膜网 (图 2)。结果表明,红色毛癣菌体外生物膜模型构建成功。

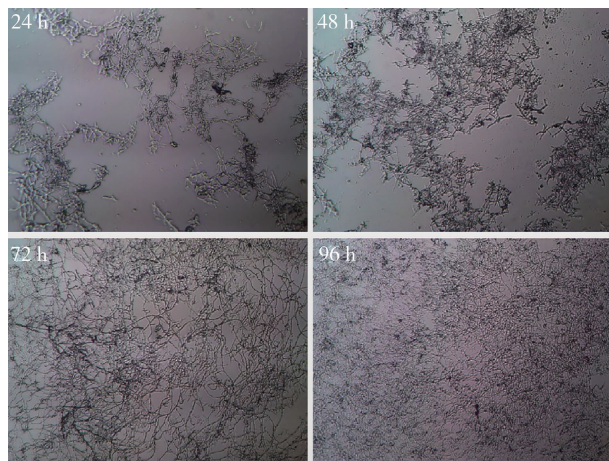


图 2 不同培养时间红色毛癣菌生物膜生长状况 (放大倍数 $\times 250$)

2.2 过硫酸钠对低温等离子体对红色毛癣菌生物膜的灭活效果的影响

2.2.1 SDA 平板培养法检测结果 结果表明,与

未处理的生物膜样品相比,随着低温等离子体射流处理时间的增加,菌落逐渐减小;有过硫酸钠溶液存在时,菌落减少更加明显。结果提示,过硫酸钠对等离子体灭活红色毛癣菌生物膜有促进作用(图 3)。等离子体放电 3 min 灭活效果尚不明显,等离子体放电 5 min,直接处理、间接处理以及加过硫酸钠处理的 3 组的 SDA 平板上均未有菌落长出。结果提示,等离子体放电 5 min 可完全杀灭红色毛癣菌生物膜。

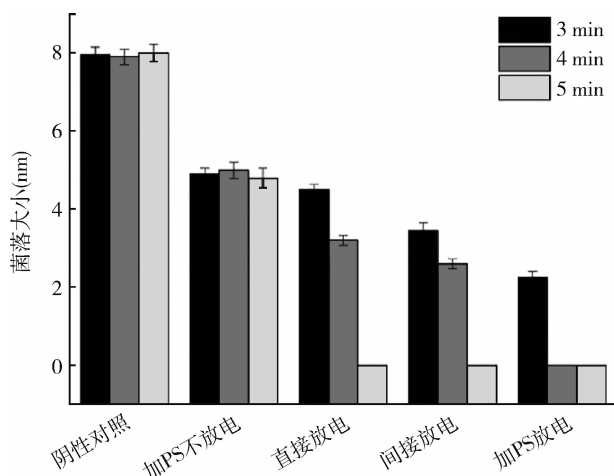


图 3 大气压低温等离子体对各组红色毛癣菌生物膜的灭活效果

2.2.2 荧光显微镜检测结果 红色毛癣菌生物膜经 SYTO 9/PI 染色后,在荧光显微镜下可见其分别被染成绿色(活菌)和红色(死菌),详见图 4。荧光显微镜检测仍然表明,等离子体可杀灭红色毛癣菌生物膜;过硫酸盐可协同大气压低温等离子体有效杀灭红色毛癣菌生物膜,且随着处理程度的增加,杀灭效率进一步增加,其结果与 SDA 平板培养法一致。

3 讨论

等离子体是电离了的气体,可使用多种气源组分产生,这些气源组分包括氩气、氦气、氮气、压缩空气或混合气体等。等离子体包含自由基、激发态分子、带电粒子和紫外光子^[8],能够有效杀灭多种微生物以及生物膜。当电子与其他气体物质处于热力学平衡状态时,等离子体被归类为高温等离子体;当电子与其他气体物质处于非平衡态时,等离子体被归类为低温等离子体。低温等离子体在大气压或低压(真空)条件下获得,它的一个重要特征是能够在接近环境温度(30 ~ 60 °C)下产生大量化学活性物质,如活性氧和活性氮等。诸多研究结果表明低温

等离子体对细菌^[9]、真菌^[10]、生物膜^[11]和病毒^[12]等都有较强的杀灭效果。近年来,低温等离子体在肿瘤治疗^[13]和皮肤病治疗^[14]等方面的潜在临床应用也备受关注。

过硫酸盐是一种强氧化剂,具有 2.01V 的高氧化还原电位,是高级氧化技术降解有机污染物领域的新兴技术^[15]。过硫酸盐可被活化以产生具有更高氧化还原电势($E_0 = 2.6 \sim 3.1V$)的硫酸根自由基($SO_4^{\cdot -}$)^[16],跟常用的有强氧化作用的 $\cdot OH$ 的氧化还原电势($E_0 = 2.8V$)相当;并且, $SO_4^{\cdot -}$ 的寿命要远大于羟基自由基($\cdot OH$), $SO_4^{\cdot -}$ 可表现出更高的选择性和较高的反应活性^[17]。由于这种性质,过硫酸盐协同等离子体已被用来降解有机污染物^[15]和抗生素^[18]。

本研究发现过硫酸钠溶液可促进等离子体杀灭红色毛癣菌生物膜。近年来研究人员对等离子体灭活生物膜进行了广泛的研究。表 1 列出了一些其他组报道的等离子体杀灭生物膜的结果以及本文中我们的相关工作。目前,研究人员对皮肤癣菌生物膜形成以及对其杀灭的研究较少。林浩琪等研究了红色毛癣菌、犬小孢子菌生物膜模型的构建及其对特比萘芬(TERB)药物的敏感性。研究发现,成熟的红色毛癣菌、犬小孢子菌生物膜对 TERB 的敏感性低^[19]。刘雪萍等人初步研究了异黄绵马酸 PB 对红色毛癣菌生物被膜的抑制作用,并探讨其可能的作用机制。研究表明,异黄绵马酸 PB 对红色毛癣菌生物被膜具有较好的抑制作用,其作用机制可能与抑制红色毛癣菌麦角甾醇的生物合成有关^[20]。以上研究都是利用药物来抑制红色毛癣菌生物膜,对其进行杀灭,本文利用低温等离子体射流进行处理,并在等离子体处理过程中加入过硫酸钠溶液,结果显示对红色毛癣菌生物膜有较好的杀灭效果。虽然等离子体产生的所有活性物质都参与了微生物的杀灭过程,但一般认为包括活性氧和活性氮在内的活性化学物质是导致微生物失活的关键因素。就本研究所用的大气压低温等离子体射流而言,其杀灭机制主要是等离子体产生的活性物质,如活性氧 ROS,以及等离子体激活过硫酸盐产生反应活性更强的硫酸根自由基 $SO_4^{\cdot -}$,致使红色毛癣菌生物膜细胞失活。此外,我们在研究中还发现间接处理(即在等离子体处理过程中加无菌水或过硫酸钠溶液)灭活生物膜的效率更高,因为直接处理(不加任何溶液)通常只能杀死表面以及表面以下浅层真菌生物膜细胞,而间接处理可使等离子体产生的活跃化学物质穿透真菌生物膜,使得杀灭效率更高。

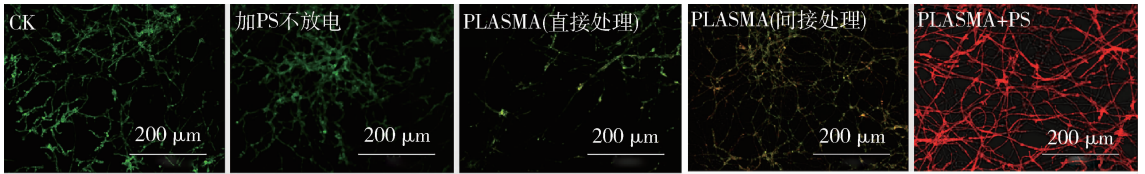


图4 荧光显微镜观察等离子体杀灭红色毛癣菌的效果(放大倍数×200)

表1 等离子体杀灭微生物生物膜的结果

微生物生物膜	气体类型	处理时间 (min)	参考文献
<i>Porphyromonas gin-</i> <i>givalis</i>	He/O ₂ (1%)	5	Xiong Z, <i>et al.</i> 2011
<i>Enterococcus faeca-</i> <i>lis</i>	Air	5	Pei X, <i>et al.</i> 2012
<i>Candida albicans</i>	Air	7	Maisch Ti <i>et al.</i> 2012
<i>Staphylococcus au-</i> <i>reus</i>	Ar	3	Taghizadeh L, <i>et al.</i> 2014
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	Ar	10	Mai-Prochnow A, <i>et al.</i> 2015
<i>T. rubrum</i>	He(不加过硫酸钠)	5	本文
<i>T. rubrum</i>	He(加过硫酸钠)	4	本文

综上所述可以认为,与其他药物抑制红色毛癣菌生物膜的方法相比,等离子体处理相对简单、廉价、有效。本试验在等离子体灭活红色毛癣菌生物膜过程中,在生物膜表面添加无菌水或过硫酸钠溶液,其作用机理与直接等离子体处理生物膜有所不同。研究表明,在等离子体处理过程中加入过硫酸盐溶液,等离子体可以激活过硫酸盐产生反应活性更强的硫酸根自由基 $SO_4^{\cdot -}$, 使得其更有效的杀灭红色毛癣菌生物膜。

参考文献

- [1] William Costerton J, Lewandowski Z, Caldwell DE, *et al.* Microbial biofilms[J]. Annu Rev Microbiol, 1995, 49:711-745.
- [2] Sardi JDCO, Pitangui NDS, Rodríguez-Arellanes G, *et al.* Highlights in pathogenic fungal biofilms[J]. Rev Iberoam Micol, 2014, 31(1):22-29.
- [3] Xiong Z, Du T, Lu X, *et al.* How deep can plasma penetrate into a biofilm? [J]. Applied Physics Letters, 2011, 98(22):221-503.
- [4] Maisch T, Shimizu T, Isbary G, *et al.* Contact-Free Inactivation of *Candida albicans* Biofilms by Cold Atmospheric Air Plasma[J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(12):4242-4247.
- [5] Pei X, Lu X, Liu J, *et al.* Inactivation of a 25.5 μm *Enterococcus faecalis* biofilm by a room-temperature, battery-operated, handheld air plasma jet[J]. J Phys D Appl Phys, 2012, 45:165205.
- [6] Costa-Orlandi CB, Sardi JCO, Santos CT, *et al.* In vitro characterization of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* biofilms [J]. Biofouling, 2014, 30(6):719-727.
- [7] Julia Heinlin TMJL, Thomas Holzmann MSJH, Karrer GMS. Contact-free inactivation of *Trichophyton rubrum* and *Microsporum canis* by cold atmospheric plasma treatment[J]. Future Microbiol, 2013, 8(9):1097-1106.
- [8] Mai-Prochnow A, Clauson M, Hong J, *et al.* Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma [J]. Sci Rep, 2016, 6(1):38610.
- [9] Bai N, Sun P, Zhou H, *et al.* Inactivation of *Staphylococcus aureus* in Water by a Cold, He/O₂ Atmospheric Pressure Plasma Microjet [J]. Plasma Processes and Polymers, 2011, 8:424-431.
- [10] Daeschlein G, Scholz S, Woedtke T, *et al.* In vitro killing of clinical fungal strains by low-temperature atmospheric-pressure plasma jet[J]. IEEE Transact Plasma Sci, 2011, 39(2):815-821.
- [11] Mai-Prochnow A, Bradbury M, Ostrikov K, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* biofilm response and resistance to cold atmospheric pressure plasma is linked to the redox-active molecule phenazine [J]. PLOS ONE, 2015, 10:e0130373.
- [12] Zimmermann JL, Dumler K, Shimizu T, *et al.* Effects of cold atmospheric plasmas on adenoviruses in solution[J]. J Phys D Appl Phys, 2011, 44(50):505201.
- [13] Schlegel J, Köritzer J, Boxhammer V. Plasma in cancer treatment [J]. Clin Plasma Med, 2013, 1(2):2-7.
- [14] Xiong Z, Graves DB. A novel cupping-assisted plasma treatment for skin disinfection[J]. J Phys D Appl Phys, 2017, 50:05LT01.
- [15] Chen J, Feng J, Lu S, *et al.* Non-thermal plasma and Fe²⁺ activated persulfate ignited degradation of aqueous crystal violet: Degradation mechanism and artificial neural network modeling[J]. Sep Puri Technol, 2018, 191:75-85.
- [16] Liang C, Guo Y. Mass transfer and chemical oxidation of naphthalene particles with zerovalent iron activated persulfate [J]. Environ Sci Technol, 2010, 44(21):8203-8208.
- [17] Liang C, Su H. Identification of sulfate and hydroxyl radicals in thermally activated persulfate [J]. Ind Eng Chem Res, 2009, 48(11):5558-5562.
- [18] Fang C, Huang Q. Dielectric barrier discharge plasma activates persulfate to degrade norfloxacin: mechanism and degradation pathways[J]. Plasma Med, 2018, 8(4):321-333.
- [19] 林浩琪, 刘雪萍, 郑银丽, 等. 红色毛癣菌、犬小孢子菌生物被膜模型构建及其对比萘芬敏感性观察[J]. 山东医药, 2018, 58(15):25-28.
- [20] 刘雪萍, 林浩琪, 沈志滨, 等. 异黄绵马酸 PB 对红色毛癣菌生物被膜的抑制作用观察[J]. 山东医药, 2018, 58(40):32-37.