

# 不同浓度葡萄糖、氯化钠及氯化铁 对铜绿假单胞菌生物膜形成的影响研究\*

李瑜珍<sup>a</sup>, 郑琳<sup>b</sup>, 张惠媚<sup>a</sup>, 张春雷<sup>a</sup>

(深圳市中医院 a. 检验科; b. 中药制剂研究重点实验室, 广东深圳 518034)

**摘要:**目的 研究不同浓度葡萄糖、氯化钠及氯化铁对铜绿假单胞菌生物膜形成的影响,为铜绿假单胞菌生物膜形成的预防和治疗提供新的思路,及为其体外生物膜模型的构建提供实验优化条件。方法 LB培养基中加入不同浓度葡萄糖、氯化钠、氯化铁,使葡萄糖浓度分别为0, 27.75, 55.51, 83.26和111.01 mmol/L;氯化钠浓度分别为0, 85.56, 171.12, 256.67和342.23 mmol/L;氯化铁浓度分别为0.77, 1.54, 3.09和6.17 mmol/L,与铜绿假单胞菌共培养,以不加葡萄糖、氯化钠及氯化铁为对照组,用结晶紫染色法半定量检测生物膜生成的量。结果 葡萄糖55.51 mmol/L组,氯化钠85.56 mmol/L及171.12 mmol/L组,氯化铁3.09 mmol/L组生物膜生成量与对照组比较,差异有统计学意义( $P=0.020, 0.036, 0.017, 0.041$ )。结论 55.51 mmol/L葡萄糖,85.56 mmol/L及171.12 mmol/L氯化钠,3.09 mmol/L氯化铁会促进铜绿假单胞菌生物膜生成,糖尿病患者感染铜绿假单胞菌应注意控制血糖浓度,铜绿假单胞菌感染的患者不要输注氯化钠溶液,伤口避免用氯化钠溶液清洗,预防生物膜的生成。

**关键词:**葡萄糖;氯化钠;氯化铁;铜绿假单胞菌生物膜

中图分类号:R378.991;R446.5 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2018)04-131-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2018.04.036

## Study on the Effects of Different Concentration Glucose, Sodium Chloride, Ferric Chloride on the Biofilm of *Pseudomonas Aeruginosa*

LI Yu-zhen<sup>a</sup>, ZHENG Lin<sup>b</sup>, ZHANG Hui-mei<sup>a</sup>, ZHANG Chun-lei<sup>a</sup>

(a. Department of Clinical Laboratory; b. Key Laboratory of Traditional

Chinese Medicine Research, Shenzhen TCM Hospital, Guangdong Shenzhen 518034, China)

**Abstract:** Objective To study the effect of different concentrations glucose, sodium chloride, ferric chloride on the biofilm producing capacity of *Pseudomonas aeruginosa*, and provide new strategy for the *P. aeruginosa* biofilm prevention/treatment and optimization of the condition of *P. aeruginosa* biofilm experiment model in vitro. Methods *P. aeruginosa* were co-cultured with glucose at the concentration of 0, 27.75, 55.51, 83.26 and 111.01 mmol/L, with NaCl at the concentration of 0, 85.56, 171.12, 256.67 and 342.23 mmol/L, and with FeCl<sub>3</sub> at the concentration of 0, 0.77, 1.54, 3.09 and 6.17 mmol/L respectively. Compared with the control groups with no glucose, NaCl or FeCl<sub>3</sub>, the biofilm producing capacity of *P. aeruginosa* were tested by semi-quantitative crystal violet method in vitro. Results The groups of 55.51 mmol/L glucose, 85.56 mmol/L, 171.12 mmol/L sodium chloride and 3.09 mmol/L FeCl<sub>3</sub> was respectively compared with the control group the differences were statistically significant ( $P=0.020, 0.036, 0.017, 0.041$ ). Conclusion 55.51 mmol/L glucose, 85.56 mmol/L NaCl, 171.12 mmol/L NaCl, 3.09 mmol/L FeCl<sub>3</sub> treatment could significantly induce the biofilm producing of *P. aeruginosa*. To prevent the *P. aeruginosa* biofilm producing, patient infected with *P. aeruginosa* should control blood glucose and reduce sodium intake.

**Keyword:** glucose; sodium chloride; ferric chloride; *Pseudomonas aeruginosa* biofilm

铜绿假单胞菌是一种常见的条件致病菌,是引起医院感染的主要病原菌,常引起呼吸道、伤口和烧伤患者创面感染<sup>[1]</sup>。其易定植,易产生多重耐药性是临床治疗的难点。细菌感染后,菌体周围环境会影响细菌存在的状态<sup>[2]</sup>,有文献报道,葡萄糖、高渗氯化钠会影响葡萄球菌在人工假体及生物材料上形成生物膜,也有文献报道,铁离子会影响细菌生物膜。为了解这些物质对人体分离的铜绿假单胞菌生物膜的影响,为铜绿假单胞菌生物膜形成的

预防和治疗提供新的思路,同时为其体外生物膜模型的构建提供实验优化条件,本文收集15株铜绿假单胞菌,用结晶紫染色法检测不同浓度的葡萄糖、氯化钠及氯化铁对其生物膜形成的影响。

### 1 材料与方法

1.1 研究对象 15株铜绿假单胞菌分离自我院2017年1~9月住院患者,其中10株分离自痰标本,2株分离自血液,3株分离自伤口分泌物,经结晶紫染色法和银染色法同时检测,确认都具有生物

\* 基金项目:深圳市科技计划项目(JCYJ20150401163247217),广东省医学科学基金项目(A2017402)。

作者简介:李瑜珍(1972—),女,大学本科,学士学位,副主任技师,主要从事临床微生物学研究,E-mail:liyuzhen0803@163.com。

膜形成能力。

1.2 试剂和仪器 LB肉汤培养液由杭州滨和微生物试剂有限公司提供;葡萄糖、氯化钠、氯化铁、95%乙醇等化学试剂由汕头市光华化学厂提供;结晶紫染液由珠海贝索生物技术有限公司提供;恒温振荡器由上海跃进医疗器械有限公司提供。

### 1.3 方法

1.3.1 铜绿假单胞菌生物膜的制备:铜绿假单胞菌培养18~24 h,挑取单个菌落于100 ml LB培养基在恒温振荡器35℃培养过夜;取1 ml培养过夜的菌液于100 ml LB培养液,35℃振荡培养,用分光光度计检测菌液浓度(波长595 nm),待铜绿假单胞菌生长到了对数期,取适量菌液分别加入一定量的葡萄糖、氯化钠及氯化铁,使菌液中葡萄糖浓度分别为0,27.75,55.51,83.26和111.01 mmol/L,氯化钠浓度分别为0,85.56,171.12,256.67和342.23 mmol/L,氯化铁浓度分别为0,0.77,1.54,3.09和6.17 mmol/L。将各个浓度的菌液分别加入96孔细胞培养板中,每孔200  $\mu$ l,每个浓度做3个复孔,以LB液为空白对照,放入35℃恒温培养箱中培养48 h,用移液器小心吸干每孔菌液,PBS缓冲液洗涤3次去除浮游铜绿假单胞菌,生物膜即黏附在微孔中。

1.3.2 铜绿假单胞菌生物膜的检测:生物膜用结晶紫染色,晾干,用无菌纯水漂洗6次直至洗液无色,去除剩余结晶紫,每孔加入50  $\mu$ l 95%(v/v)乙醇溶解生物膜上的染料后,将有色溶液在波长为570 nm处比色,读取吸光度值( $A_{570\text{ nm}}$ )。生物膜形成阳性株筛选标准:菌株吸光度值( $A_{570\text{ nm}}$ )均值与培养液空白吸光度值均值比值 $\geq 2$ ,判定生物膜阳性菌株,比值的高低代表生物膜形成的多少。

1.4 统计学分析 采用SPSS 22.0统计软件对数据进行统计分析,用one way ANOVA单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 不同浓度的葡萄糖对铜绿假单胞菌生物膜形成的影响 见图1。

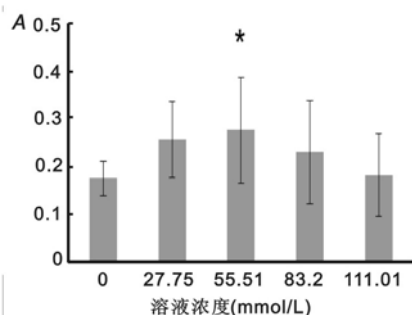


图1 不同浓度葡萄糖对铜绿假单胞菌生物膜的影响

葡萄糖浓度27.75,55.51,86.23和110.01 mmol/L组生物膜生成量与对照组比较, $P$ 值分别为0.091,0.020,0.424和0.999,葡萄糖浓度55.51 mmol/L组与对照组之间差异有统计学意义( $P=0.020$ )。

2.2 不同浓度氯化钠对铜绿假单胞菌生物膜形成的影响 见图2。NaCl浓度85.56,171.12,256.67和342.23 mmol/L组生物膜生成量与对照组比较, $P$ 值分别为0.036,0.017,0.242和0.212,NaCl浓度85.56 mmol/L及171.12 mmol/L组与对照组比较差异有统计学意义( $P=0.036,0.017$ ),而这两组之间比较差异则无统计学意义( $P=0.940$ )。

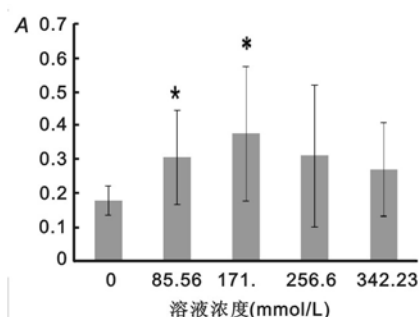


图2 不同浓度氯化钠对铜绿假单胞菌生物膜的影响

2.3 不同浓度氯化铁对铜绿假单胞菌生物膜形成的影响 见图3。

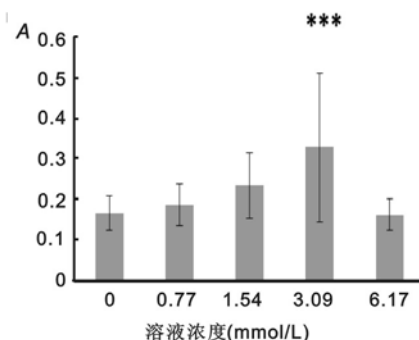


图3 不同浓度铁离子对铜绿假单胞菌生物膜的影响

$\text{FeCl}_3$ 浓度0.77,1.54,3.09和6.17 mmol/L组生物膜生成量与对照组比较 $P=0.924,0.082,0.041,1.000$ , $\text{FeCl}_3$ 浓度3.09 mmol/L组与对照组比较差异有统计学意义( $P=0.041$ )。

3 讨论 细菌生物被膜导致许多临床相关感染,有文献报道细菌生物膜的形成与导管相关性尿路感染有关,由致病细菌形成的细菌生物膜是人工关节感染的重要原因<sup>[3,4]</sup>。美国国立卫生研究院的调查显示,医学上有超过80%以上的细菌性感染与生物膜有关。细菌一旦形成生物膜,则能抵抗成百上千倍正常剂量的抗生素<sup>[5]</sup>,给临床治疗带来极大困难,临床应该关注细菌生物膜形成的条件,预防

生物膜生成。铜绿假单胞菌是医院感染的常见病原菌,常引起难治性感染,临床上许多医学材料、器械的相互感染和某些顽固性感染性疾病的发生与其生物膜的形成有密切的关系<sup>[6]</sup>。本研究结果表明 55.51 mmol/L 的葡萄糖, 85.56 mmol/L 及 171.12 mmol/L 的氯化钠, 3.09 mmol/L 的氯化铁会促进铜绿假单胞菌生物膜生成。正常人血糖浓度空腹为 3.96~6.12 mmol/L,餐后最高也不会超过 11.1 mmol/L,因此,血糖浓度不会影响非糖尿病患者感染的铜绿假单胞菌形成生物膜,只有严重的糖尿病患者血糖水平才有可能达到 55.51 mmol/L,为此糖尿病患者如果感染铜绿假单胞菌,注意控制好血糖,防止其形成生物膜使治疗变得困难。

氯化钠在临床医疗活动中广泛使用,输液、清洗伤口,经常会使用 154 mmol/L 氯化钠,根据本研究结果,这个浓度的氯化钠会促进铜绿假单胞菌生物膜的形成,因此,铜绿假单胞菌感染的患者,应避免输注氯化钠溶液,对铜绿假单胞菌感染的伤口,应尽量避免用氯化钠溶液来冲洗。据文献报道,常规的 154 mmol/L 氯化钠溶液只能从生物膜表面滑过,而无法破坏和清除生物膜,反而促进其生物膜形成不利于治疗。

铁是人体的微量元素,在人体内血清铁的正常参考值男性为 10.6~36.7  $\mu\text{mol/L}$ ,女性为 7.8~32.2  $\mu\text{mol/L}$ ,根据本研究的结果,人体内微量的铁不会影响铜绿假单胞菌形成生物膜。铁主要对外界环境的铜绿假单胞菌生物膜形成造成影响,据报道,铁离子会促进隐形眼镜上铜绿假单胞菌形成生物膜造成眼角膜感染<sup>[7]</sup>。此外,铜绿假单胞菌广泛存在于医院环境,也是使用中医器械主要的携带细菌<sup>[8]</sup>,复用医疗器械中生物膜的存在使得细菌可抵抗清洗与消毒的作用,造成生物材料清洗和消毒的失败,生物膜中的细菌可以从医疗器械表面不断脱落,经血液循环引起急、慢性感染<sup>[9]</sup>。为此不锈钢材质的复用医疗器械要注意做好防锈工作,防止铜绿假单胞菌在其表面形成生物膜导致难以清除造成医院感染。研究这三种物质对铜绿假单胞菌生物膜形成的影响具有重要的临床意义,一方面对已发生的感染可通过控制血糖浓度,减少氯化钠的输入,对铜绿假单胞菌感染的伤口,避免用生理盐水冲洗,不锈钢材质的复用医疗器械要注意做好防锈工作,预防细菌生物膜的形成;另一方面,铜绿假单胞菌的生物膜感染是目前临床研究的热点,为进一步研究其分子机制,经常需要在体外构建其生物膜模型,根据本研究的结果,在体外构建铜绿假单胞菌生物膜模型时,可加入适量的葡萄糖、氯化

钠或氯化铁以促进其生物膜形成,为进一步研究其形成机制提供实验优化条件。

#### 参考文献:

- [1] 王莉,李明,江志红,等. 543株铜绿假单胞菌的临床分布及耐药性[J]. 解放军预防医学杂志, 2017, 35(4): 355-356, 365.  
Wang L, Li M, Jiang ZH, et al. Clinical distribution and drug resistance of 543 strains of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. J Prev Med Chin PLA, 2017, 35(4): 355-356, 365.
- [2] 申友亮,朱同娥,张靖靖,等. 构建膝关节假体感染兔模型:体内环境因素对葡萄球菌生物膜的影响[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(39): 6240-6245.  
Shen YL, Zhu TE, Zhang JJ, et al. Construction of a rabbit model of knee prosthesis infection: environmental factors in vivo affect *Staphylococcus epidermidis* and biofilms[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2015, 19(39): 6240-6245.
- [3] 赵旭,赵璐,严向明,等. 细菌生物膜的形成与导管相关性尿路感染的关系[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(18): 4154-4158.  
Zhao X, Zhao L, Yan XM, et al. Relationship between the formation of bacterial biofilm and catheter associated urinary tract infections[J]. Chin J Nosocomiol, 2017, 27(18): 4154-4158.
- [4] 孙永,周新社. 人工关节假体感染细菌生物膜诊断的研究进展[J]. 安徽医药, 2017, 21(9): 1570-1574.  
Sun Y, Zhou XS. The research progress for diagnosing bacterial biofilm of prosthetic joint infection[J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal, 2017, 21(9): 1570-1574.
- [5] 李瑜珍,曾学辉,李忠新,等. 痰黏液型铜绿假单胞菌的分离及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(5): 1059-1060, 1066.  
Li YZ, Zeng XH, Li ZX, et al. Isolation and resistance analysis of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* from Sputum[J]. Chin J Nosocomiol, 2014, 24(5): 1059-1060, 1066.
- [6] 刘永升,方泓,唐斌擎,等. 铜绿假单胞菌生物膜的研究进展[J]. 北方药学, 2014, 11(4): 67-68.  
Liu YS, Fang H, Tang BQ, et al. Research progress on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm[J]. Journal of North Pharmacy, 2014, 11(4): 67-68.
- [7] 张书楠,王砚颖,廖素华,等. 铁离子对隐形眼镜上铜绿假单胞菌生物膜形成的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(11): 1351-1353, 1356.  
Zhang SN, Wang YY, Liao SH. Effects of iron ions on the biomembrane of *Pseudomonas aeruginosa* on contact lenses[J]. Int J Lab Med, 2013, 34(11): 1351-1353, 1356.
- [8] 殷玉华,刘杨,张秋莹. ICU常用医疗器械工作状态时的病原菌动态监测及院感预防措施[J]. 实用预防医学, 2013, 20(5): 604-606.  
Yin YH, Liu Y, Zhang QY. Dynamic monitoring of pathogenic bacteria in ICU medical devices in working condition and the prevention measures for nosocomial infections[J]. Practical Preventive Medicine, 2013, 20(5): 604-606.
- [9] 张明,宋向阳. 复用医疗器械细菌生物膜清除方法研究进展[J]. 中国消毒学杂志, 2017, 34(6): 567-570.  
Zhang M, Song XY. Research progress in methods for bacterial biofilm clean up on the surface of reusable medical instruments[J]. Chinese Journal of Disinfection, 2017, 34(6): 567-570.

收稿日期:2017-10-22

修回日期:2018-05-29