

强酸性电解质水对饥饿态粪肠球菌生物膜的杀灭作用研究

赵春苗^{1,2}, 程小刚², 余擎²

作者单位:¹宝鸡市口腔医院牙体牙髓病科, 陕西 宝鸡 721006;

²空军军医大学口腔医学院牙体牙髓病科, 陕西 西安 710032

通信作者: 余擎, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 研究方向为根管感染控制和牙髓组织再生, E-mail: yuqing@fmmu.edu.cn

基金项目: 2018年度宝鸡市卫生健康委员会计划立项课题(2018-49)

摘要: **目的** 观察强酸性电解质水(SAEW)对饥饿态粪肠球菌生物膜的杀菌作用。**方法** 将 1.5×10^9 CFU/mL的粪肠球菌4℃低温离心、PBS溶液溶解, 饥饿诱导形成饥饿态粪肠球菌生物膜, 用SAEW、5.25%次氯酸钠(阳性对照)和0.9%氯化钠溶液(NS, 阴性对照)分别处理1、5、10 min后, 分别用活菌计数法和扫描电子显微镜(SEM)两种方法观察SAEW对饥饿态粪肠球菌生物膜的杀灭作用。**结果** 活菌计数法显示SAEW对饥饿态粪肠球菌生物膜中的细菌表现出了有效的杀灭作用, 且处理10 min时的细菌存活率(5.31 ± 0.74)%与5.25%次氯酸钠的(4.06 ± 1.44)%差异无统计学意义($P > 0.05$), 即杀菌作用接近。SEM观察结果显示, 随着NS处理时间的延长细菌细胞皱缩失水现象加重; SAEW和5.25%次氯酸钠处理后不仅有严重的皱缩失水现象, 还出现了细菌细胞的溶解和破坏、细胞膜表面有穿孔和碎片样改变, 而且随着处理时间的延长细菌细胞的破坏更加严重。**结论** SAEW对饥饿态粪肠球菌生物膜具有有效的杀灭作用。

关键词: 粪肠球菌; 生物膜; 饥饿; 次氯酸; 电解; 根管冲洗剂; 强酸性电解质水; 杀菌作用

Investigation of the killing effect of strong acid electrolytic water on biofilm of enterococcus faecalis in starvation phase

ZHAO Chunmiao^{1,2}, CHENG Xiaogang², YU Qing²

Author Affiliations: ¹Department of Operative Dentistry and Endodontics, Stomatology Hospital of Baoji, Baoji, Shaanxi 721006, China; ²School of Stomatology of Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China

Abstract: Objective To evaluate the bactericidal effect of strong acid electrolytic water (SAEW) on biofilm of enterococcus faecalis in starvation phase. **Methods** Enterococcus faecalis dilution (1.5×10^9 CFU/mL) was centrifuged at 4℃ and dissolved in PBS solution. Enterococcus faecalis in starvation phase were incubated to develop bacterial biofilms. Then the biofilms were individually treated with SAEW, sodium hypochlorite (NaClO), and normal saline for 1, 5, and 10 min, respectively. Colony formation units (CFUs) counts and scanning electron microscopy (SEM) were used to investigate the bactericidal efficiency of SAEW on starved enterococcus faecalis biofilm. **Results** SAEW showed an effective killing effect on starved enterococcus faecalis biofilm. There was no significant difference in bacterial survival rate between SAEW (5.31 ± 0.74)% and 5.25% NaClO (4.06 ± 1.44)% at 10 min ($P > 0.05$). That is, the killing effect is close. The results of SEM observation showed that the shrinkage and water loss of bacterial cells increased with the prolongation of NS treatment time. After treatment with SAEW and 5.25% NaClO, there was not only serious shrinkage and water loss, but also dissolution and destruction of bacterial cells, perforation and fragment changes on the surface of cell membrane, and the destruction of bacterial cells became more serious with the prolongation of treatment time. **Conclusion** SAEW has effective bactericidal efficiency to starved enterococcus faecalis biofilm.

Key words: Enterococcus faecalis; Biofilm; Starvation; Hypochlorous acid; Electrolysis; Root canal irrigants; Strong acid electrolytic water; Bactericidal efficiency

根管治疗术存在一定的失败率, 这些病例的失败主要是由于根管内的细菌没有被完全清除^[1]。经过根管治疗的患牙根管系统的内的营养物质大量减少, 也就是说经过治疗的根管为细菌提供的是一个营养缺乏的环境^[2], 这时候细菌通过自身的适应性机

制以饥饿的状态来适应新的环境^[3]。Stuart CH等^[4-6]对根管治疗后发生再感染的病例进行细菌培养发现, 约24%~77%的根管中有粪肠球菌(enterococcus faecalis), 它还可以长期饥饿生存并形成生物膜。

现有的应用最多的根管冲洗剂是不同浓度的

次氯酸钠(NaClO)。Liu H等^[7]的研究发现次氯酸钠对饥饿态的粪肠球菌生物膜有杀菌作用,所以本实验选用次氯酸钠作为阳性对照。PH值约为2.3~2.7的强酸性电解质水(strong acid electrolytic water, SAEW)^[8-9],由于它的安全性和抗菌效果较好,从二十几年前便被尝试用作根管冲洗剂^[10]。Cheng X等^[11]的实验结果表明SAEW能杀灭粪肠球菌,但SAEW能否杀灭饥饿态粪肠球菌生物膜还需要研究。本实验于2019年3—5月通过微生物学实验观察SAEW对饥饿态粪肠球菌生物膜的杀菌作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 粪肠球菌冻干株 ATCC 29212(空军军医大学口腔医学院牙体实验室);脑心浸液培养基(BHI;Difco, MI, 美国);SAEW用专用的电解质水生成装置-电解质水生成仪(Alfa Light; Amano Co., 日本)电解1 g/L的氯化钠溶液阳极获得;5.25%次氯酸钠溶液(空军军医大学口腔医学院);Biofuge Stratos 型台式冷冻离心机(Kendro, USA);24孔板(NUNCLON; Nunc, Roskilde, Denmark);干燥机(ES-2030, Hitachi, 日本);离子溅镀系统(Lon Sputter E-1045, Hitachi, 日本);扫描电子显微镜(SEM, S-4800, Hitachi, 日本)。

1.2 粪肠球菌饥饿状态诱导及饥饿态粪肠球菌生物膜的形成 参考Heim等^[12]的方法,将粪肠球菌(ATCC 29212)冻干菌株复苏后培养4 h,获得对数生长期的粪肠球菌菌液,细菌密度约为 1.5×10^9 CFU/mL。在4℃条件下,低温离心机以4 000 r/min的转速离心15 min获取粪肠球菌沉淀,把沉淀溶于磷酸缓冲盐溶液(PBS)溶液中,再低温离心并溶于PBS中,重复两次后溶于PBS溶液中,调节细菌密度为 10^9 CFU/mL。调节好密度的细菌悬液置于37℃恒温箱中在厌氧避光的条件下培养48 h,获得饥饿态粪肠球菌。

将 11×11 mm²盖玻片(已高温高压灭菌器灭菌)置于24孔板中。滴1 mL饥饿态粪肠球菌菌液。37℃厌氧静止培养24 h后饥饿态粪肠球菌生物膜形成。

1.3 不同冲洗剂对饥饿态粪肠球菌生物膜的杀菌作用观察 将饥饿态粪肠球菌生物膜分成9组,每组20个样本,分别用5.25%次氯酸钠、SAEW以及0.9%氯化钠溶液(NS)处理1、5和10 min。处理后用PH=7的PBS缓冲液轻柔地洗去残留的处理液。每组中的10个样本用震荡的方法得到处理后的样本,将菌液涂布于BHI平板,37℃厌氧培养24 h后,用活菌计数法得到被处理后细菌存活率。

每组中另10个样本在4℃条件下用2.5%戊二醛隔夜固定。固定后用50%、70%、80%和90%的乙

腈进行梯度脱水,每个浓度脱水20 min;接着100%的乙腈脱水2次,每次20 min。然后用干燥机二氧化碳临界点干燥,干燥后用离子溅镀系统喷金,喷金以后SEM观察^[13]。

1.4 统计学方法 采用SPSS 13.0软件(SPSS Inc., Chicago, 美国)对不同冲洗剂处理后细菌存活率 $\bar{x} \pm s$ 进行方差分析。同一组别不同时间点比较以及同一时间点三组比较,用方差分析中的SNK-*q*检验进行两两比较,检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 不同冲洗剂处理后活菌计数结果 如表1所示,同一冲洗液1、5、10 min不同时间组之间进行组内比较发现SAEW和5.25%次氯酸钠各时间组之间差异有统计学意义($P < 0.05$),也就是说SAEW和5.25%次氯酸钠对饥饿态粪肠球菌有杀灭作用,且处理1 min时的效果最弱,处理5 min时杀菌效果增强,处理10 min时的杀菌效果最强。同一时间不同冲洗液组间比较发现,SAEW和5.25%次氯酸钠都有一定的杀菌作用,且杀灭效果都比NS组强($P < 0.05$),同时5.25%次氯酸钠处理1 min和5 min时对饥饿态粪肠球菌的杀灭作用比SAEW的作用强($P < 0.05$);但是处理10 min组时两组的杀灭作用接近($P > 0.05$)。说明SAEW对饥饿态粪肠球菌生物膜有有效的杀灭作用,且处理10 min的杀菌效果接近5.25%次氯酸钠处理10 min的杀菌效果。

表1 不同冲洗液处理后的细菌存活率/(%, $\bar{x} \pm s$)

冲洗液数	样本	处理1 min	处理5 min	处理10 min
SAEW	10	32.37±1.49	20.09±2.19 ^a	5.31±0.74 ^{ab}
5.25%次氯酸钠	10	22.98±4.68 ^c	10.42±2.14 ^{ac}	4.06±1.44 ^{ab}
0.9%氯化钠溶液	10	95.34±1.30 ^{cd}	94.52±0.90 ^{cd}	93.64±2.26 ^{cd}
<i>F</i> 值		1 804.368	6 240.413	10 246.774
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:a、b分别示与同一冲洗液处理1 min、5 min比较, $P < 0.05$;c、d分别示与同一时间点强酸性电解质水(SAEW)、5.25%次氯酸钠处理组比较, $P < 0.05$

2.2 SEM观察的结果 SEM观察结果显示(图1, 2),饥饿态的粪肠球菌生物膜由皱缩失水的细菌细胞形成,细菌细胞表面凹凸不平、均一性较差。随着NS处理时间的延长细菌细胞皱缩失水现象加重;SAEW和5.25%次氯酸钠处理后不仅有严重的皱缩失水现象,还出现了细菌细胞的溶解和破坏、细胞膜表面有穿孔和碎片样改变,而且随着处理时间的延长细菌细胞的破坏更加严重。这提示SAEW和5.25%次氯酸钠可能具备对饥饿态的粪肠球菌生物膜相似的杀灭机制。

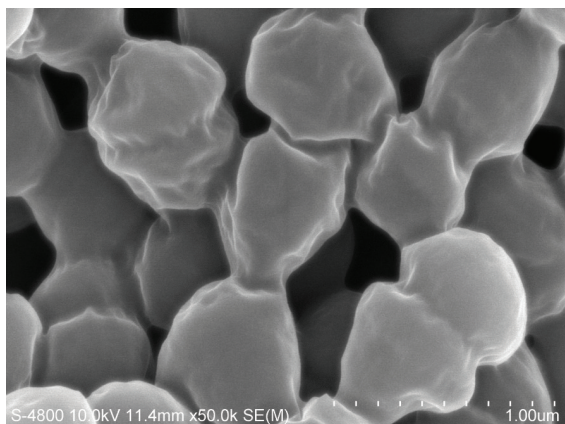


图1 未处理的饥饿态粪肠球菌生物膜扫描电子显微镜图片
(×50 000)

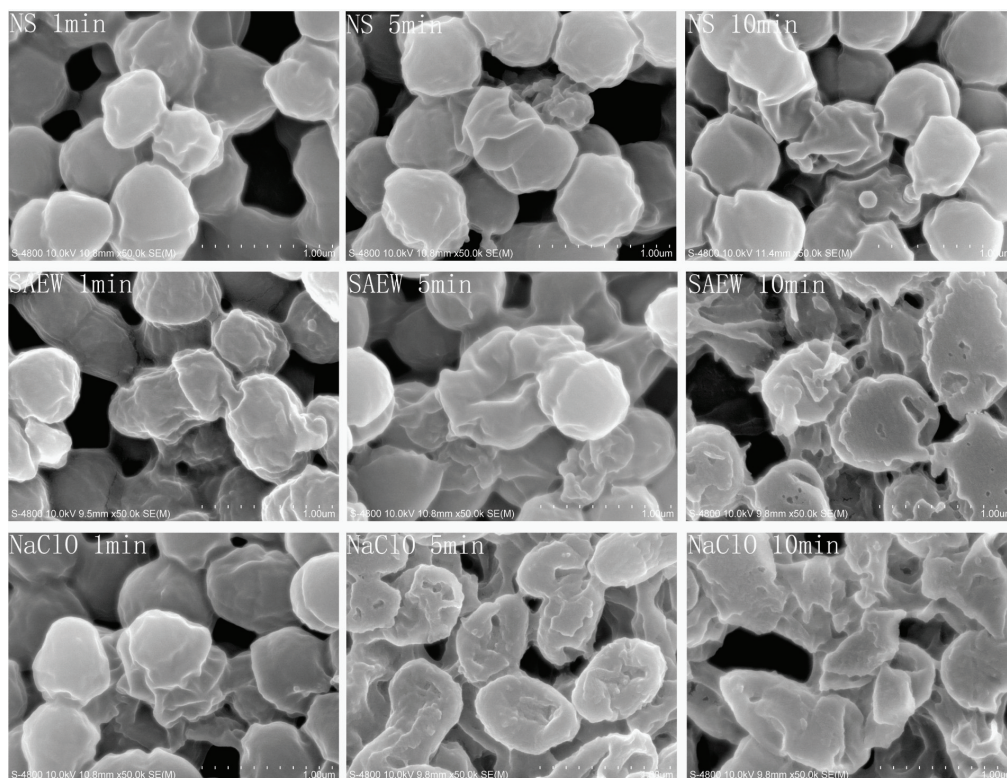
3 讨论

根管治疗术是临床治疗牙髓、根尖周病的常用手段^[14]。Sun J等^[15]的研究表明,在根管治疗失败的病例中粪肠球菌是主要的致病菌。经过严密的充填,根管内的营养物质匮乏、氧气稀少,这时候根管内没有被清理和杀灭的细菌微生物就会以饥饿的状态生存^[16-17]。粪肠球菌有一种长时间耐受饥饿的能力,只要环境中出现能被它利用的养分,它就可以很快吸收养分恢复活性并造成根管系统的再次感染^[18]。

现代观点认为,在根管治疗过程中根管系统没有有效地清理是治疗是否成功的重要步骤;通过

机械预备清理根管内的感染物质、化学冲洗作用对根管进行清洗消毒,两者结合以达到有效清理根管的目的^[19]。现在常用的根管冲洗剂次氯酸钠是应用的最多的冲洗剂^[20]。Siqueira等^[21]的研究表明,只要根管治疗过程用次氯酸钠进行根管冲洗,粪肠球菌的检出率就显著降低。但是次氯酸钠作为根管冲洗剂其杀菌的最佳浓度、温度、作用时间等都不确定^[20,22]。而且次氯酸钠冲洗后牙本质的胶原纤维会被去除,从而降低牙本质的粘接性能^[23]。此外,较高浓度的次氯酸钠有一定的细胞毒性和刺激性作用,可能会造成根尖周组织的损伤^[24-26]。次氯酸钠还可能引起病人的过敏反应^[27]。所以次氯酸钠虽然应用广泛但并不是最理想的。Cheng X等^[11]的实验发现SAEW安全性好且对粪肠球菌(非饥饿态)有杀灭作用,本研究就在原有研究的基础上研究SAEW对饥饿态粪肠球菌生物膜的杀菌作用。

本研究的活菌计数法实验表明,SAEW对饥饿态粪肠球菌生物膜具有有效的杀灭作用,且作用10 min的杀菌效果和5.25%次氯酸钠作用10 min的杀菌效果接近。SEM实验表明,SAEW和5.25%次氯酸钠处理饥饿态粪肠球菌生物膜后,细菌细胞皱缩失水现象加重,此外有的细胞发生溶解、破坏,细胞膜表面有穿孔和碎片样改变,而且这种变化随着处



注: NS、SAEW、NaClO 分别表示用0.9%氯化钠溶液、强酸性电解质水以及5.25%次氯酸钠处理后的饥饿态粪肠球菌生物膜

图2 处理后的饥饿态粪肠球菌生物膜扫描电子显微镜图片(×50 000)

理时间地延长而更加明显。研究表明,未解离的次氯酸是次氯酸钠主要的杀菌成分^[21]。次氯酸、氯气、过氧化氢以及氢氧根离子的共同作用使SAEW有一定的杀菌作用^[11]。相似的酸性成分使次氯酸钠和SAEW处理后有相似的细菌形态的变化。

综上,SAEW对饥饿态粪肠球菌生物膜有有效的杀灭作用,且杀菌效果与5.25%次氯酸钠的杀菌效果接近,杀菌机制也类似。联合以往研究,SAEW对多种微生物有杀灭作用^[28]。此外,SAEW在根管冲洗过程中还可以去除根管玷污层、对根尖周组织的细胞毒性低、使用后还原成水不会对环境造成污染等优点^[28-30]。因此可以考虑用SAEW作为根管冲洗剂替代5.25%次氯酸钠,但是目前还没有实验证明SAEW具有组织溶解性,所以SAEW作为根管冲洗剂还需要进一步的研究。

参考文献

- [1] SIQUEIRA JF. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail[J]. *Int Endod J*, 2001, 34(1): 1-10.
- [2] WANG L, DONG M, ZHENG J, et al. Relationship of biofilm formation and gelE gene expression in *Enterococcus faecalis* recovered from root canals in patients requiring endodontic retreatment[J]. *J Endod*, 2011, 37(5): 631-636.
- [3] PETERS LB, WESSELINK PR, MOORER WR. Penetration of bacteria in bovine root dentine in vitro[J]. *Int Endod J*, 2000, 33(1): 28-36.
- [4] STUART CH, SCHWARTZ SA, BEESON TJ, et al. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment[J]. *J Endod*, 2006, 32(2): 93-98.
- [5] COSTERTON JW, STEWART PS, GREENBERG EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections[J]. *Science*, 1999, 284(5418): 1318-1322.
- [6] EVANS M, DAVIES JK, SUNDQVIST G, et al. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide[J]. *Int Endod J*, 2002, 35(3): 221-228.
- [7] LIU H, WEI X, LING J, et al. Biofilm formation capability of *enterococcus faecalis* cells in starvation phase and its susceptibility to sodium hypochlorite[J]. *J Endod*, 2010, 36(4): 630-635.
- [8] KUBOTA A, GODA T, TSURU T, et al. Efficacy and safety of strong acid electrolyzed water for peritoneal lavage to prevent surgical site infection in patients with perforated appendicitis[J]. *Surg Today*, 2015, 45(7): 876-879.
- [9] NAGAMATSU Y, CHEN KK, TAJIMA K, et al. Durability of bactericidal activity in electrolyzed neutral water by storage[J]. *Dent Mater J*, 2002, 21(2): 93-104.
- [10] HATA G, UEMURA M, WEINE FS, et al. Removal of smear layer in the root canal using oxidative potential water[J]. *J Endod*, 1996, 22(12): 643-645.
- [11] CHENG X, TIAN Y, ZHAO C, et al. Bactericidal effect of strong acid electrolyzed water against flow *enterococcus faecalis* biofilms[J]. *J Endod*, 2016, 42(7): 1120-1125.
- [12] HEIM S, LLEO M, BONATO B, et al. The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis[J]. *J Bacteriol*, 2002, 184(23): 6739-6745.
- [13] 赵春苗, 程小刚, 余擎. 电解质水对粪肠球菌生物膜杀菌机制的初步探索[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2018, 28(6): 327-331.
- [14] 王莉. 盐酸米诺环素软膏和热牙胶根管充填治疗重度牙周-牙髓联合病变48例[J]. *安徽医药*, 2018, 22(6): 1159-1162.
- [15] SUN J, SONG X, KRISTIANSEN BE, et al. Occurrence, population structure, and antimicrobial resistance of enterococci in marginal and apical periodontitis[J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(7): 2218-2225.
- [16] NARAYANAN LL, VAISHNAVI C. Endodontic microbiology[J]. *J Conserv Dent*, 2010, 13(4): 233-239.
- [17] PORTENIER I, WALTIMO T, ØRSTAVIK D, et al. The susceptibility of starved, stationary phase, and growing cells of *Enterococcus faecalis* to endodontic medicaments[J]. *J Endod*, 2005, 31(5): 380-386.
- [18] FIGDOR D, DAVIES JK, SUNDQVIST G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum[J]. *Oral Microbiol Immunol*, 2003, 18(4): 234-239.
- [19] 樊明文. 牙体牙髓病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 268-269.
- [20] ESTRELA C, ESTRELA CR, BARBIN EL, et al. Mechanism of action of sodium hypochlorite[J]. *Braz Dent J*, 2002, 13(2): 113-117.
- [21] SIQUEIRA JF JR, RÔÇAS IN, SANTOS SR, et al. Efficacy of instrumentation techniques and irrigants regiments in reducing the bacterial population in root canals[J]. *J Endod*, 2002, 28(3): 181-184.
- [22] ZEHNDER M, KOSICKI D, LUDER H, et al. Tissue-dissolving capacity and antibacterial effect of buffered and unbuffered hypochlorite solutions[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2002, 94(6): 756-762.
- [23] GUIDA A. Mechanism of action of sodium hypochlorite and its effects on dentin[J]. *Minerva Stomatol*, 2006, 55(9): 471-482.
- [24] KAVANAGH CP, TAYLOR J. Inadvertent injection of sodium hypochlorite into the maxillary sinus[J]. *Br Dent J*, 1998, 185(7): 336-337.
- [25] BALDWIN VE, JARAD FD, BALMER C, et al. Inadvertent injection of sodium hypochlorite into the periradicular tissues during root canal treatment[J]. *Dent Update*, 2009, 36(1): 14-16, 19.
- [26] CRINCOLI V, SCIVETTI M, DI BISCEGLIE MB, et al. Unusual case of adverse reaction in the use of sodium hypochlorite during endodontic treatment: a case report[J]. *Quintessence Int*, 2008, 39(2): e70-e73.
- [27] CALISKAN MK, TURKUN M, ALPER S. Allergy to sodium hypochlorite during root canal therapy: a case report[J]. *Int Endod J*, 1994, 27(3): 163-167.
- [28] HATA G, HAYAMI S, WEINE FS, et al. Effectiveness of oxidative potential water as a root canal irrigant[J]. *Int Endod J*, 2001, 34(4): 308-317.
- [29] MARAIS JT, WILLIAMS WP. Antimicrobial effectiveness of electro-chemically activated water as an endodontic irrigation solution[J]. *Int Endod J*, 2001, 34(3): 237-243.
- [30] EL KARIM I, KENNEDY J, HUSSEY D. The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2007, 103(4): 560-569.

(收稿日期: 2019-06-28, 修回日期: 2019-07-26)