



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2022 00310**

(22) Data de depozit: **08/06/2022**

(41) Data publicării cererii:  
**28/10/2022** BOPI nr. **10/2022**

(71) Solicitant:

- UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI,  
ȘOS.PANDURI NR.90, SECTOR 5,  
BUCUREȘTI, B, RO;
- INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
FIZICA LASERILOR, PLASMEI ȘI  
RADIAȚIEI - INFLPR, STR. ATOMIȘTILOR  
NR. 409, MĂGURELE, IF, RO;
- UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN  
BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI  
NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI  
FARMACIE "CAROL DAVILA" DIN  
BUCUREȘTI, STR.DIONISIE LUPU NR.37,  
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:

- HOLBAN ALINA MARIA,  
SPLAIUL INDEPENDENȚEI 313B, C7, SC.1,  
ET.11, AP.115, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,  
RO;
- ZARIF MARIA-ELENA,  
STR.PETRE ISPIRESCU, NR.38, BL.P72B,  
SC.1, ET.2, AP.10, SECTOR 5,  
BUCUREȘTI, B, RO;

- VIZIREANU SORIN, STR. VEDEA NR.6,  
BL.86AB, SC.1, AP.8, SECTOR 5,  
BUCUREȘTI, B, RO;
- YEHIA SAȘA ALEXANDRA,  
STR.MIHAI VITEAZU, NR.266,  
CĂLIMĂNEȘTI, VL, RO;
- BIRCA ALEXANDRA, ALEEA REȘIȚA D,  
NR.8, BL.A1, SC.2, ET.2, AP.22, SECTOR 4,  
BUCUREȘTI, B, RO;
- GRUMEZESCU ALEXANDRU MIHAI,  
SPLAIUL INDEPENDENȚEI, NR.313D, SC.1,  
AP.115, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- FARCASIU ALEXANDRU-TITUS,  
STR.SERGHEI V. RAHMANINOV, NR.76-80,  
BUCUREȘTI, B, RO;
- CURUTIU CARMEN, STR.DRUMUL  
FERMEI, NR.73, C25, POPEȘTI-  
LEORDENI, IF, RO;
- DITU LIA MARA, BD.REPUBLICII, NR.183,  
BL.8C1, AP.35, PLOIEȘTI, PH, RO;
- CHIFIRIUC MARIANA CARMEN,  
STR. COSTACHE STAMATE NR. 5, BL. A8,  
SC. 1, ET. 9, AP. 37, SECTOR 4,  
BUCUREȘTI, B, RO;
- DINESCU GHEORGHE, STR. BARCA  
NR. 17, BL. M8, AP. 17, SECTOR 5,  
BUCUREȘTI, B, RO

(54) **METODĂ CU PLASMĂ LA PRESIUNE ATMOSFERICĂ  
PENTRU ÎNDEPĂRTAREA BIOFILMELOR MICROBIENE  
DEZVOLTATE PE DIFERITE SUBSTRATURI**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de tratare a unor substraturi de dispozitive și implanturi medicale împotriva formării biofilmelor bacteriene sau de îndepărtare a biofilmelor pre-formate sau dezvoltate pe substraturile contaminate cu aplicabilitate în medicina dentară. Metoda, conform invenției, constă în generarea unui jet de plasmă cu lungimea de 1...3 mm de la o sursă planară de plasmă de tip DBD (Dielectric Barrier Discharge) cu Ar drept gaz de lucru, la un flux de gaz de 2000 sccm și o putere de 20 W și aplicarea prin scanare non-contact a substratului de tip sticlă sau

hidroxiapatită, care conține biofilme microbiene, prin trecerea jetului de plasmă în reprize de 5...10 scanări, la o distanță de 0,8 mm dintre capătul sursei de plasmă și substrat, în condiții atmosferice, rezultând o eficiență crescută de inactivare/îndepărtare a biofilmelor de pe substrat, prin cuantificarea viabilității celulelor incluse în biofilm (UFC/ml) și evidențierea celulelor la microscopul electronic de scanare (SEM).

Revendicări: 3  
Figuri: 8

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



**Descrierea brevetului de invenție cu titlul:**

**METODĂ CU PLASMĂ LA PRESIUNE ATMOSFERICĂ PENTRU ÎNDEPĂRTAREA BIOFILMELOR MICROBIENE DEZVOLTATE PE DIFERITE SUBSTRATURI**

elaborat de:

**Alina-Maria Holban, Maria-Elena Zarif, Sorin Vizireanu, Sasa Alexandra Yehia, Alexandra Birca, Alexandru Mihai Grumezescu, Alexandru Titus Farcasiu, Carmen Curutiu, Lia Mara Ditu, Mariana Carmen Chifiriuc, Gheorghe Dinescu**

**1. Stadiul tehnicii**

Microorganismele sunt cele mai versatile forme de viață de pe Terra, adaptându-se la orice condiții de mediu. Dintre strategiile cele mai de succes pe care acestea le-au dezvoltat, capacitatea de a crește în biofilme reprezintă forma de existență optimă pentru asigurarea unei rezistențe îndelungate. Biofilmele microbiene sunt comunități multicelulare complexe, ce conțin celule aderate la o suprafață sau interfață, dar și între ele, și care prezintă modificări fenotipice datorate în principal unei rate diferite de transcriere a genelor [Lazar V, 2011, *Anaerobe*, 17(6):280-5. doi: 10.1016; Ratajczak si colab., 2021, *Pathogens*, 10(2):130. doi:10.3390/pathogens10020130]. Biofilmele microbiene sunt responsabile de peste 65% din totalul infecțiilor severe și dificil de tratat, bacteriile incluse în biofilme fiind rezistente la orice agent antimicrobian dezvoltat, dar și la mecanismele de apărare ale gazdei. Cele mai frecvente infecții cu biofilme sunt cele asociate dispozitivelor și implanturilor medicale, acestea determinând peste 50% mai multe cazuri de mortalitate și morbiditate în rândul pacienților, comparativ cu infecțiile fără biofilme [Barsoumian AE și colab., 2015, *BMC Infect Dis*, 15:223. doi:10.1186/s12879-015-0972-2]. Microorganismele din biofilme prezintă diferențe semnificative comparativ cu bacteriile planctonice (plutoare), creșterea în stare aderată oferind o rezistență fenotipică (comportamentală), fenomen denumit toleranță, care se aplică tuturor microorganismelor din structura biofilmului. Toleranța bacteriilor incluse în biofilme este diferită de rezistența genotipică la antibiotice a bacteriilor, caz în care rezistența este condiționată de prezența unor gene de rezistență. Existența unor gene de rezistență



în genomul bacteriilor incluse în biofilme nu este o condiție obligatorie care să asigure toleranța acestora la antibiotice sau la mecanismele de apărare ale gazdei. Principalele mecanisme ale rezistenței bacteriilor în biofilme sunt: i) prezența unei matrici de natură polizaharidică ce protejează celulele biofilmului de agenți antimicrobieni și de detecția imunologică, ii) metabolism celular modificat comparativ cu celulele planctonice ale aceleiași specii, iii) dezvoltarea de celule persistente care nu se divid în general și rezistă în prezența unor concentrații mari de antibiotice, iv) schimbul pe orizontală de gene de rezistență (dacă există) este favorizat în biofilme, v) mecanismul de comunicare moleculară Quorum Sensing (QS), ce controlează virulența și rezistența bacteriilor, este „optimizat” în biofilme, astfel că asigură transcrierea coordonată a unor gene utile pentru bacteriile din biofilm în funcție de condiții [Holban AM și colab., 2016, Int J of Pharm, 510(2):409-18. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.02.044; Yan J și Bassler BL, 2019, Cell Host Microbe, 26(1):15-21. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.06.002>; Ciofu O și colab., 2022, Nat Rev Microbiol. doi: 10.1038/s41579-022-00682-4]. Având în vedere mecanismele foarte diverse prin care este asigurată supraviețuirea bacteriilor incluse în biofilme, precum și ineficiența tot mai accentuată a antibioticelor și biocidelor actuale, cercetătorii studiază alternative pentru îndepărtarea sau limitarea dezvoltării de biofilme. Strategiile antimicrobiene bazate pe metode fizice, precum tratamentele cu plasmă, ultrasunete sau cele fotodinamice, reprezintă alternative de înalt interes pentru comunitatea științifică [Muro-Fraguas I și colab, 2020, Innov Food Sci Emerg Technol, 64. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102404>; Zarif ME și colab., 2021, Int. J. Mol. Sci, 22(23). <https://doi.org/10.3390/ijms222313103>]. În ultimi 10 ani s-a observat o tendință accentuată de investigare și aplicare a plasmelor generate la presiune atmosferică în domeniul biomedical, inclusiv pentru proprietățile lor antimicrobiene. Astfel, studiile recente indică utilizarea plasmelor pentru obținerea de substraturi antimicrobiene [Muro-Fraguas I și colab, 2020, Innov Food Sci Emerg Technol, 64. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102404>; Zarif ME și colab., 2021, Int. J. Mol. Sci, 22(23). <https://doi.org/10.3390/ijms222313103>], precum și pentru îndepărtarea directă a biofilmelor microbiene dezvoltate pe diferite substraturi, precum titan [Ulu M și colab., 2018, Niger J Clin Pract, 21(6):758-765. doi: 10.4103/njcp.njcp\_261\_17] sau utilizarea PAW (plasma-activated water) [Mai-Prochnow A și colab., 2021, Biofilms Microbiomes, 7(1):11. doi: 10.1038/s41522-020-00180-6]. Îndepărtarea biofilmelor microbiene prin tratament cu plasmă de temperatură joasă prezintă un interes crescut în medicina dentară, unde biofilmul plăcii dentare

reprezintă principala sursă a celor mai frecvente afecțiuni din sfera orală, caria dentară și periodontita.

## 2. Problema

În literatura recentă au fost raportate câteva tipuri de plasmă care, operate în condiții atmosferice, prezintă efecte antimicrobiene și antibiofilm. Cu toate acestea, majoritatea metodelor aplicate se referă la modificarea substratului pentru a imprima acestuia proprietăți antimicrobiene care să inhibe sau să reducă formarea biofilmelor [Zarif ME și colab., 2021, Int. J. Mol. Sci, 22(23). <https://doi.org/10.3390/ijms222313103>; Muro-Fraguas I și colab, 2020, Innov Food Sci Emerg Technol, 64. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102404>]. Spre exemplu, brevetul **WO 2017/214166 / US 2018/0050120 A1** descrie o metodă de obținere a unor nanoparticule metalice prin aplicarea unei substanțe ce conține ioni metalici ( $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Au}^+$ ,  $\text{Cu}^+$  și/sau  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pt}^+$ , precum și combinații ale acestora) într-o zonă de interes, aplicarea plasmă și sinteza nanoparticulelor din substanță în urma unui tratament cu plasmă.. Brevetul **US 2013/0183435 A1 / WO 2013/106862 A1** descrie un proces de acoperire a unor dispozitive ce intră în contact cu fluide, utilizând o tehnică de depunere cu plasmă de temperatură joasă, la presiune scăzută sau la presiune atmosferică. Suprafețele tratate inhibă atașarea bacteriilor și implicit, formarea biofilmelor. De asemenea, brevetul **WO 2017/085482 A1** descrie metode de acoperire a dispozitivelor medicale cu straturi ce determină inhibarea formării biofilmelor, iar brevetul **US 2012/0219697 A1** descrie metode cu plasmă ce atașează covalent molecule pe diferite suprafețe în vederea obținerii unor proprietăți anti-biofilm, prin modificarea structurii chimice a suprafețelor tratate.

Referitor la îndepărtarea biofilmelor preformate, studiile disponibile sugerează metode de împrăștiere a jetului de plasmă aplicat pe o porțiune redusă a materialului tratat, fie contactul direct între sursa de plasmă și materialul țintă ce conține biofilmul [Ulu M și colab., 2018, Niger J Clin Pract, 21(6):758-765. doi: 10.4103/njcp.njcp\_261\_17]. Ambele abordări implică dezavantaje precum: i) tratamentul neuniform al întregii suprafețe pe care este dezvoltat biofilmul în cazul aplicării locale/punctuale a jetului de plasmă, aspect ce sugerează faptul că respectivul tratament nu poate fi util sau eficient pentru suprafețe mari; ii) aplicarea prin contact direct (atingerea biofilmului cu sursa de plasma) presupune o intervenție mecanică asupra acestuia, cu modificarea arhitecturii tipice care poate influența eficiența ulterioară a tratamentului aplicat și în plus reprezintă o sursă de contaminare cu bacteriile care pot supraviețui pe materialele din care este

confectionată sursa de plasmă. Brevetele US 2014/0276784 A1 si US 9.555.145 B2 descriu metode de îndepărtare cu plasmă a biofilmelor formate în sistem tubular (ex. cavitate a unui implant medical). Metoda presupune inserarea unui aplicator cu plasmă în interiorul unei cavități și îndepărtarea biofilmului format, după sigilarea capătului deschis al cavității, etapă ce precede generarea plasmei. Principalul dezavantaj al acestei metode raportate în cele 2 brevete este necesitatea aplicării plasmei în sistem tubular închis în vederea obținerii efectului antimicrobian

### 3. Soluția

Soluția propusă de această invenție este dezvoltarea unei surse de plasmă, care funcționează în condiții de presiune atmosferică și la temperaturi joase și are efect biocid asupra biofilmelor preformate atunci când este aplicată prin scanarea non-contact a substratului.

### 4. Avantajele invenției:

Invenția prezintă avantaje esențiale în îndepărtarea biofilmelor microbiene cu impact biomedical, precum: i) riscuri minime de contaminare; ii) aplicarea prin scanarea suprafeței, ce asigură uniformitatea și eficiența tratamentului; iii) aplicare rapidă în condiții normale de presiune și temperatură; iv) posibilitatea de adaptare a tratamentului în funcție de suprafață sau tipul de biofilm, prin utilizarea unui număr variabil de scanări.

### 5. Prezentarea pe scurt a figurilor

**Figura 1.** Sursa de plasmă de tip DBDp cu descărcare în Argon. A. Schema sursei de plasmă; B. Imaginea sursei obținute, în timpul tratamentului cu plasmă pe un substrat. RF= radiofrecvență.

**Figura 2.** Tratamentul cu plasmă de Argon al biofilmelor microbiene monospecifice dezvoltate pe sticlă, aplicând metoda scanării substratului. Imaginile A-C ilustrează diferite poziții ale sursei de plasmă față de suprafața substratului de sticlă cu biofilme preformate în timpul scanării.

**Figura 3.** Aspectul coloniilor obținute după realizarea experimentului de îndepărtare a biofilmelor dezvoltate pe suprafețe de sticlă timp de 24h prin scanare cu plasmă (1 scanare, 5 scanări și 10 scanări) pentru *S. aureus*.

**Figura 4.** Reprezentare grafică a valorilor  $\log_{10}UFC/mL$  obținute după tratamentul cu plasmă al biofilmelor dezvoltate pe suporturi de sticlă timp de 24h în condiții standard.

**Figura 5.** Aspectul sursei DBDp în timpul tratamentului cu plasmă a suportului de HAP.

**Figura 6.** Reprezentare grafică a valorilor  $\log_{10}UFC/mL$  obținute după tratamentul cu plasmă al biofilmelor dezvoltate pe suporturi de hidroxiapatită (HAP) timp de 24h în condiții standard.

**Figura 7.** Imagini SEM ale biofilmelor de *S. aureus* dezvoltate pe probe de HAP. A) control netratat cu plasmă, B) după 5 scanări cu plasmă și C) după 10 scanări cu plasmă.

**Figura 8.** Imagini SEM ale biofilmelor de *P. aeruginosa* dezvoltate pe probe de HAP. A) control netratat cu plasmă, B) după 5 scanări cu plasmă și C) după 10 scanări cu plasmă.

**6. Prezentarea în detaliu a unor exemple de realizare a invenției cu referire la figuri**

#### **EXEMPLUL 1: OBTINEREA SURSEI DE PLASMĂ DE TIP DBD (Dielectric Barrier Discharge)**

Sursa planară de plasmă, de tip DBD (Dielectric Barrier Discharge), constă într-un tub de sticlă aplatizat, cu o grosime a pereților de aproximativ 1 mm. Pe suprafața exterioară a tubului sunt atașați electrozi de cupru (Cu) cu dimensiune de aproximativ 7 mm x 70 mm, dispuși față în față, longitudinal, pe părțile aplatizate ale tubului, iar sursa de plasmă este cuplată capacitiv la un generator de putere de radiofrecvență (RF, 13.56 MHz). Condițiile de funcționare pentru generarea unui jet de plasmă cu lungimea de 1 mm (minim) – 3 mm (maxim) presupun utilizarea argonului (Ar) drept gaz de lucru, la un flux de gaz de 2000 sccm (*standard cubic centimeters per minute*) și o putere de 20 W. Sursa planară de tip DBD (DBDp) este prezentată în figura 1.

Eficiența antibiofilm a plasmelor obținute a fost analizată ulterior prin tratamentul unor biofilme monospecifice dezvoltate pe suport de sticlă sau pe hidroxiapatită (HAP).

#### **EXEMPLUL 2: EVALUAREA POTENȚIALULUI PLASMEI DEZVOLTATE DE A ÎNDEPĂRTA/DISTRUGE BIOFILMELE MICROBIENE DEZVOLTATE PE SUPORT DE STICLĂ**

Tulpinile utilizate pentru acest studiu, o bacterie gram-pozitivă (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) și una gram-negativă (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) au fost obținute de la American Type Cell Collection (USA) și se găsesc stocate în colecția de tulpini a laboratorului de Microbiologie, Facultatea de Biologie, Universitatea din București. Ambele specii microbiene

sunt patogeni oportuniști umani, recunoscuți pentru dezvoltarea de biofilme dificil de tratat, mai ales în mediul intraspitalicesc [Li X și colab., 2021, Coatings, 11(3):294. <https://doi.org/10.3390/coatings11030294>].

Primul exemplu se referă la dezvoltarea biofilmelor monospecifice pe suprafețe inerte cu structură și dimensiune standardizată. Au fost utilizate plăcuțe de sticlă, cu dimensiuni de 1 cm/1cm și grosime de 2 mm. Plăcuțele au fost sterilizate prin expunere la radiații UV timp de 20 min pe fiecare parte. Eșantioanele de sticlă sterilizate au fost depuse individual în plăci cu 24 godeuri sterile. Peste acestea s-a adăugat un volum de 100μL de mediu lichid (bulion simplu) inoculat cu 10<sup>6</sup>UFC/mL din fiecare microorganism testat. Plăcile cu 24 godeuri astfel pregătite, au fost incubate la 37°C timp de 24h, în atmosferă umedă. După incubare eșantioanele de sticlă au fost spălate cu apă fiziologică sterilă (AFS) pentru îndepărtarea celulelor microbiene neaderate, iar plăcuțele de sticlă ce conțin biofilmele monospecifice au fost supuse tratamentului cu plasmă prin scanare, executându-se mai multe variante de tratament, respectiv: 1, 5 și 10 scanări.

Experimentele de îndepărtare/ inactivare a biofilmelor au fost efectuate cu sursa de plasmă DBDp prezentată în figura 1, la presiune atmosferică. Gazul de lucru a fost Ar, fluxul utilizat a fost de 2000 sccm, puterea de 20 W, viteza de scanare este de 5 mm/s, distanța între trasee de aproximativ 1 mm și distanța sursă-probă de 0.8 mm (figura 2). Această modalitate de scanare este utilă atunci când se tratează suprafețe mai mari decât dimensiunea jetului de plasmă planar .

După tratamentul cu plasmă, setul de plăcuțele de sticlă destinat evaluării viabilității celulelor din biofilme (cuantificarea UFC/mL) a fost prelucrat astfel: plăcuțele au fost transferate într-un tub falcon cu volum de 15mL ce conține 1mL AFS. Tuburile astfel obținute au fost vortexate energic timp de 20 minute și supuse tratamentului cu ultrasunete timp de 15 min pentru desprinderea celulelor din biofilmul format pe plăcuțele de sticlă. Suspensia celulară obținută a fost diluată și diluțiile seriale zecimale au fost însămânțate pe plăci cu mediu de cultură nutritiv solidificat (geloză nutritivă) în vederea obținerii și cuantificării numărului de unități formatoare de colonii (UFC/mL). Au fost utilizate controale reprezentate de biofilme monospecifice formate din fiecare microorganism selectat, însă fără ca eșantioanele de sticlă respective să fie supuse tratamentului cu plasmă.

Rezultatele indică eficiența crescută a tratamentelor cu 5 și cu 10 scanări, deși numărul de unități formatoare de colonii (UFC)/mL se reduce încă de la prima scanare. În figura 3 se pot

observa coloniile dezvoltate pe mediu nutritiv solid după 1, 5 și 10 scanări, precum și pentru proba control (fără scanare cu plasmă) pentru *S. aureus*.

Figura 4 prezintă grafic valorile UFC/mL logaritmice pentru a evidenția clar diferențele obținute cu privire la celulele viabile recuperate din biofilmele tratate cu plasmă. Se observă o reducere semnificativă de aproximativ 2 log între viabilitatea celulelor biofilmului dezvoltat pe proba de sticlă control (fără tratament cu plasmă) și proba scanată o singură dată cu plasmă, de 3 log atunci când comparăm controlul cu biofilmul scanat de 5 ori cu plasmă, și de aproximativ 7 log (în cazul *P. aeruginosa*), atunci când se compară controlul cu proba scanată de 10 ori cu plasmă.

Rezultatele obținute pe probele de sticlă au determinat selectarea condițiilor pentru tratamentele de îndepărtare/ inactivarea a biofilmelor depuse pe probe de hidroxiapatită (HAP). În acest sens, tratamentele cu 5 și 10 scanări cu plasmă au fost selectate, rezultatele fiind prezentate în exemplul 3.

### **EXEMPLUL 3: METODĂ DE ÎNDEPĂRTARE A BIOFILMELOR MICROBIENE DEZVOLTATE PE SUPORT DE HIDROXIAPATITĂ PRIN SCANARE CU PLASMĂ**

Eficiența antibiofilm a plasmei optimizate din punct de vedere al numărului de scanări a fost analizată prin determinarea unităților formatoare de colonii (UFC/mL) și analiza SEM (*scanning electron microscopy*), utilizând biofilme preformate pe suport de hidroxiapatită.

Stabilirea numărului UFC/mL ce indică celulele din biofilmele dezvoltate pe HAP care își păstrează viabilitatea după tratamentul prin scanare cu plasmă, s-a realizat după un protocol asemănător celui descris în exemplul 1. Pe scurt, eșantioane de HAP comercial cu forma de discuri cu diametrul de 6mm și grosime de 2,2 mm au fost sterilizate prin expunere la radiații UV timp de 20 minute pe fiecare parte. Eșantioanele sterile de HAP au fost depuse individual în plăci cu 24 godeuri. Peste acestea s-a adăugat un volum de 100μL de mediu lichid (bulion simplu) inoculat cu 10<sup>6</sup>UFC/mL din fiecare microorganism testat, respectiv suspensie în AFS (apă fiziologică sterilă) din *S. aureus* ATCC 25923 și *P. aeruginosa* ATCC 27853. Plăcile cu 24 godeuri astfel pregătite, au fost incubate la 37°C timp de 24h, în atmosferă umedă. După incubare eșantioanele de HAP au fost spălate cu AFS pentru îndepărtarea celulelor microbiene neaderate, iar plăcuțele de sticlă ce conțin biofilmele monospecifice au fost supuse tratamentului cu plasmă prin scanare, executându-se mai multe variante de tratament, respectiv: 5 și 10 scanări. O scanare completă a substratului de



HAP presupune trecerea de două ori cu jetul de plasmă pe suprafața de interes, păstrând o distanță dintre capătul sursei de plasmă și substrat de 0.8 mm. Aceasta metodă de scanare suprapusă este aplicată în cazul probelor de HAP datorită formei și a dimensiunilor reduse ale acestora (disc cu diametru de aproximativ 6mm) (figura 5).

După tratamentul cu plasmă, setul de eșantioane HAP destinat evaluării viabilității celulelor din biofilme (cuantificarea UFC/mL) a fost prelucrat astfel: probele HAP ce conțin biofilme monospecifice cu vârsta de 24h au fost transferate într-un tub falcon cu volum de 15mL ce conține 1mL AFS. Tuburile astfel obținute au fost vortexate energetic timp de 20 minute și supuse tratamentului cu ultrasunete timp de 15 min pentru desprinderea celulelor din biofilmul format pe eșantioanele de HAP. Suspensia celulară obținută a fost diluata și diluțiile seriale zecimale au fost însămânțate pe plăci cu mediu de cultură nutritiv solidificat (geloză nutritivă) în vederea obținerii și cuantificării numărului de unități formatoare de colonii (UFC/mL).

Pentru analiza SEM a biofilmelor tratate cu plasmă, plăcuțele ce conțin biofilmele microbiene monospecifice (control netratat sau cele tratate cu plasma) au fost fixate 5 minute în metanol rece, imediat după tratamentul cu plasmă. După fixare, eșantioanele obținute au fost uscate la temperatura camerei și apoi analizate la microscopul electronic cu baleiaj (SEM). Au fost utilizate controale reprezentate de biofilme monospecifice formate din fiecare microorganism selectat, fără ca acestea să fie supuse tratamentului cu plasmă.

Rezultatele au arătat că viabilitatea celulelor incluse în biofilm scade exponențial după scanarea cu plasmă, numărul de UFC/mL fiind invers proporțional cu numărul de scanări aplicat. Astfel, dacă după aplicarea unui număr de 5 scanări cu plasmă viabilitatea biofilmelor produse de *S. aureus* este redusă cu 1,9 log, iar a *P. aeruginosa* cu 4 log, după aplicarea unui număr de 10 scanări viabilitatea biofilmelor de *S. aureus* este redusă cu aproximativ 2,1 log, pe când a *P. aeruginosa* este redusă cu aproximativ 5,1 log (figura 6).

Rezultatele obținute prin cuantificarea UFC/mL (viabilității celulelor incluse în biofilme) au fost confirmate și prin evidențierea la microscopul electronic de scanare (SEM). Imaginile SEM sugerează o un număr scăzut de bacterii rămase aderate pe substraturile de HAP scanate cu plasmă de Ar, afectarea aspectului biofilmului, precum și alterarea integrității celulare. Săgețile verzi indică modificări ale formei celulare (figurile 7 B și C), bacteriile având forme neregulate și dimensiuni mai mari. Aceste aspecte se pot corela cu afectarea permeabilității membranei celulare,

care poate afecta procesul de osmoza celulară. Imaginile SEM sugerează de asemenea aplatizarea și alungirea bacteriilor.

Figura 8 prezintă imaginile SEM obținute pe probe de HAP cu biofilme de *P. aeruginosa* dezvoltate timp de 24 h la 37°C, fără scanare cu plasmă (figura 8A), după 5 scanări cu plasmă (figura 8B) și după 10 scanări cu plasmă (figura 8C). Similar rezultatelor obținute pentru tulpina *S. aureus*, imaginile SEM confirmă eficiența scanărilor cu plasmă pentru îndepărtarea/ inactivarea biofilmelor de *P. aeruginosa*. După 5 scanări cu plasmă (figura 8B), bacteriile par să fie alipite, sugerând astfel afectarea membranelor celulare. Spre deosebire de tulpina *S. aureus* (figura 7B), unde alipirea celulelor permite identificarea individuală a acestora, în cazul tulpinii *P. aeruginosa*, celulele par să formeze o masă compactă, nediferențiată. După 10 scanări cu plasmă (figura 8C), membrana celulară este puternic afectată, aspect indicat în imaginile SEM prin săgeți galbene.

Rezultatele obținute indică astfel o puternică influență a tratamentelor cu plasmă în ceea ce privește afectarea membranei celulare și îndepărtarea/distrugerea biofilmelor, în mod special pentru bacteriile gram-negative (ex. *P. aeruginosa*). Reducerea semnificativă a atașării bacteriene a fost observată după 5 scanări cu plasmă, atât pentru *S. aureus*, cât și pentru *P. aeruginosa*. Cu toate acestea, scanarea de 10 ori a suprafețelor determină o scădere mult mai semnificativă a formării biofilmelor, de peste 50 %.

### Bibliografie

- Barsoumian AE și colab., 2015, *BMC Infect Dis*, 15:223. doi:10.1186/s12879-015-0972-2;
- Ciofu O și colab., 2022, *Nat Rev Microbiol*. doi: 10.1038/s41579-022-00682-4;
- Holban AM și colab., 2016, *Int J of Pharm*, 510(2):409-18. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.02.044;
- Lazar V, 2011, *Anaerobe*, 17(6):280-5. doi: 10.1016/;
- Li X și colab., 2021, *Coatings*, 11(3):294. <https://doi.org/10.3390/coatings11030294>
- Mai-Prochnow A și colab., 2021, *Biofilms Microbiomes*, 7(1):11. doi: 10.1038/s41522-020-00180-6;
- Muro-Fraguas I și colab., 2020, *Innov Food Sci Emerg Technol*, 64. doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102404;
- Ratajczak si colab., 2021, *Pathogens*, 10(2):130. doi:10.3390/pathogens10020130;
- Ulu M și colab., 2018, *Niger J Clin Pract*, 21(6):758-765. doi: 10.4103/njcp.njcp\_261\_17;

Yan J și Bassler BL, 2019, *Cell Host Microbe*, 26(1):15-21.[doi.org/10.1016/j.chom.2019.06.002](https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.06.002);

Zarif ME și colab., 2021, *Int. J. Mol. Sci*, 22(23). [doi.org/10.3390/ijms222313103](https://doi.org/10.3390/ijms222313103);

Patent WO 2017/214166

Patent US 2018/0050120 A1

Patent WO 2013/106862 A1

Patent US 2013/0183435 A1

Patent WO 2017/085482 A1

Patent US 2012/0219697 A1

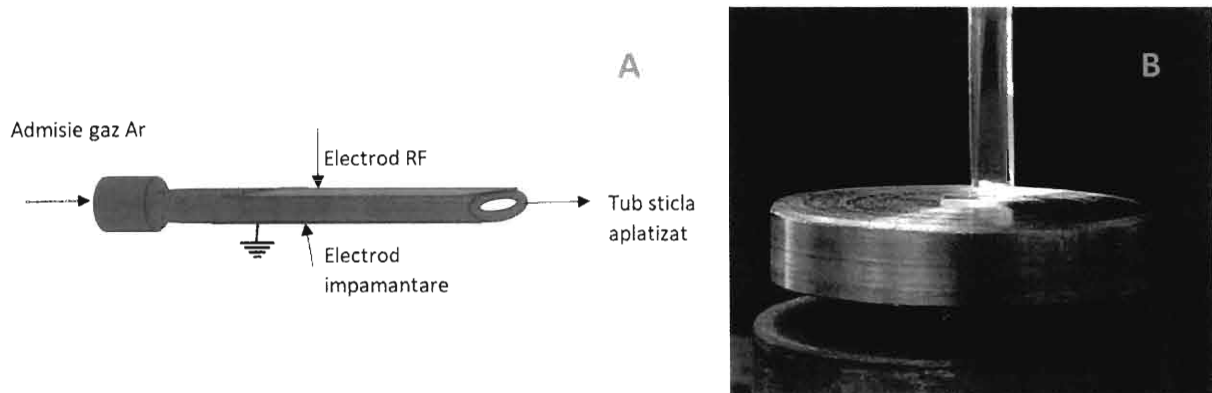
Patent US 2014/0276784 A1

Patent US 9.555.145 B2

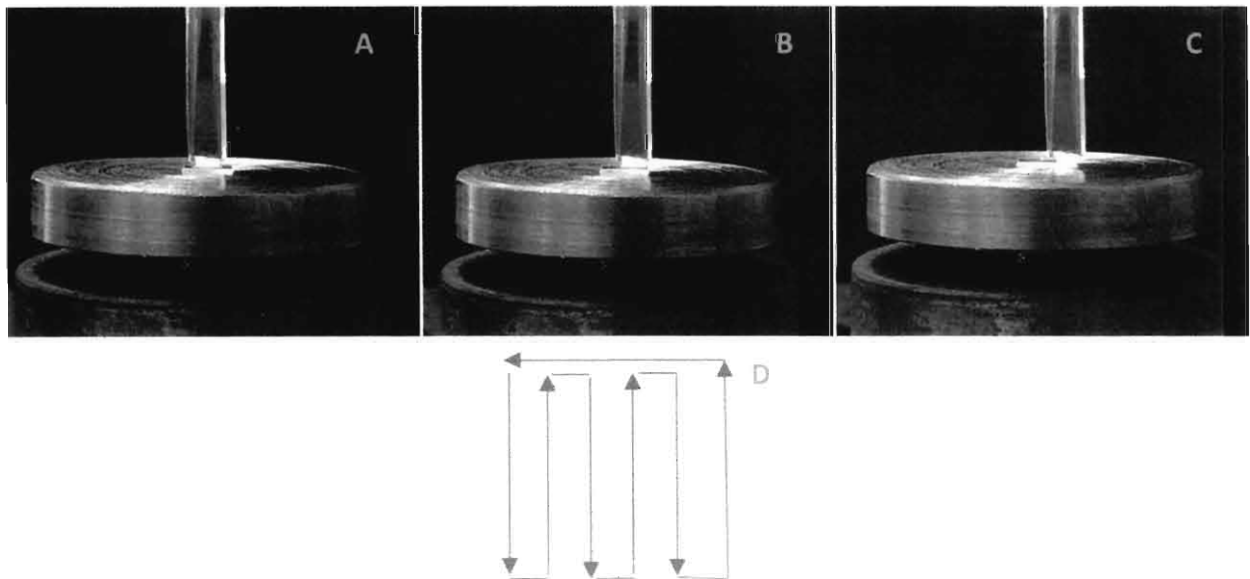
**REVENDICĂRILE INVENȚIEI**

1. Procedeu de obținere a unei plasmă bioactive care are efect antibiofilm când este utilizată prin scanarea substratului în condiții atmosferice de presiune și la temperatura camerei.
2. Metodă de eradicare a biofilmelor bacteriene monospecifice preformate de *Staphylococcus aureus* și *Pseudomonas aeruginosa* pe suport de sticlă, prin tratament cu plasmă, obținută conform revendicării 1, aplicată prin scanarea non-contact substratului.
3. Metodă de îndepărtare/distrugere a biofilmelor microbiene dezvoltate pe suport de hidroxiapatită prin scanarea non-contact cu plasmă.

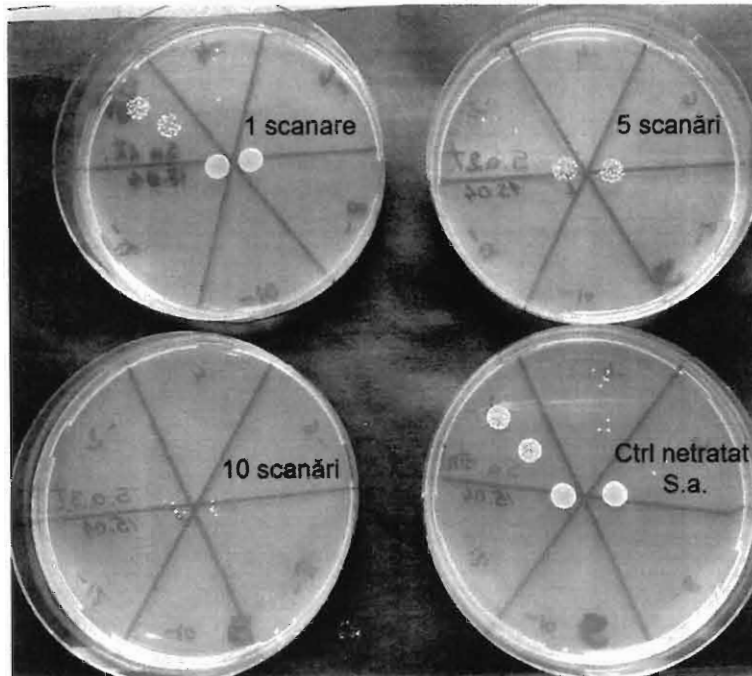
### Figuri explicative pentru invenție



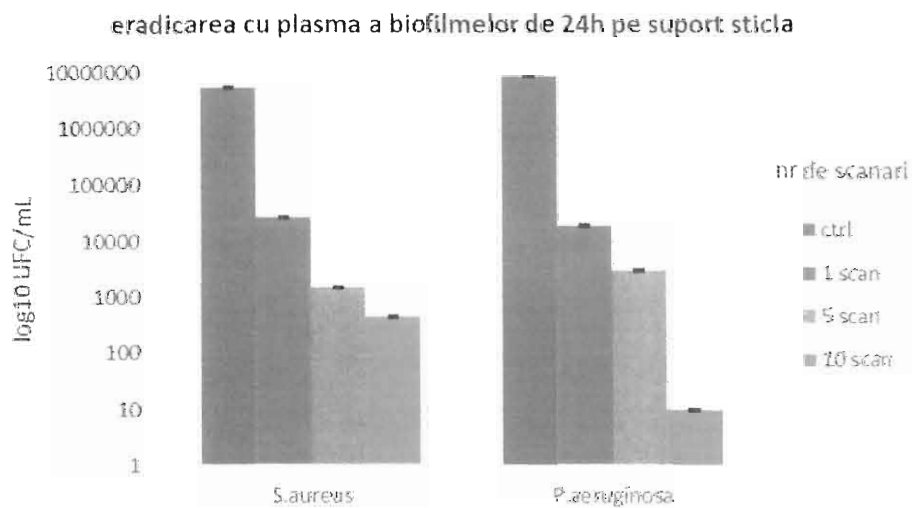
**Figura 1.** Sursa de plasmă de tip DBDp cu descărcare în Argon. A. Schema sursei de plasmă; B. Imaginea sursei obținute, în timpul tratamentului cu plasmă pe un substrat. RF= radiofrecvență.



**Figura 2.** Tratamentul cu plasmă de Argon al biofilmelor microbiene monospecifice dezvoltate pe sticlă, aplicând metoda scanării substratului. Imaginile A-C ilustrează diferite poziții ale sursei de plasmă față de suprafața substratului de sticlă cu biofilme preformate în timpul scanării. Schema din poziția D indică direcția de aplicare a plasmei pe substrat în timpul unei scanări complete. Scanarea se face prin mișcarea substratului cu ajutorul unei mese de translație XY.



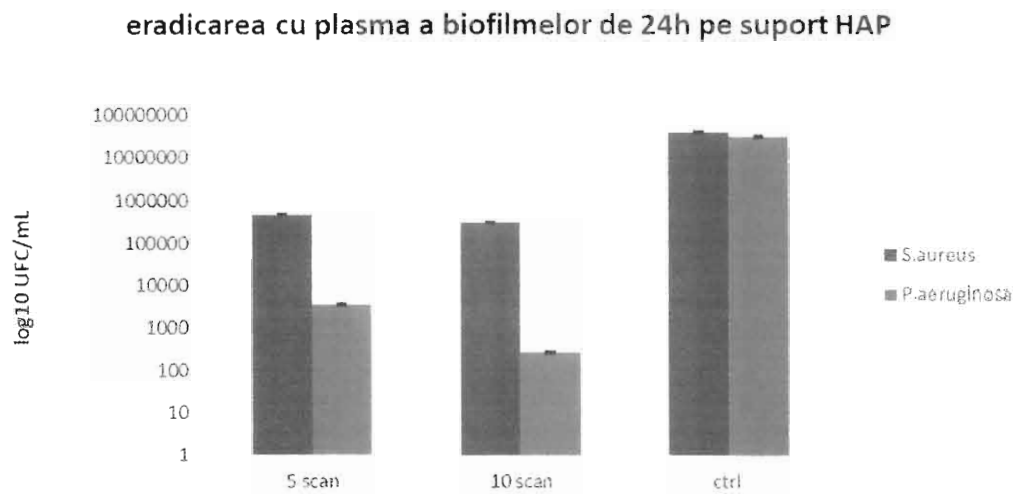
**Figura 3.** Aspectul coloniilor obținute după realizarea experimentului de îndepărtare a biofilmelor dezvoltate pe suprafețe de sticlă timp de 24h prin scanare cu plasmă (1 scanare, 5 scanări și 10 scanări) pentru *S. aureus*.



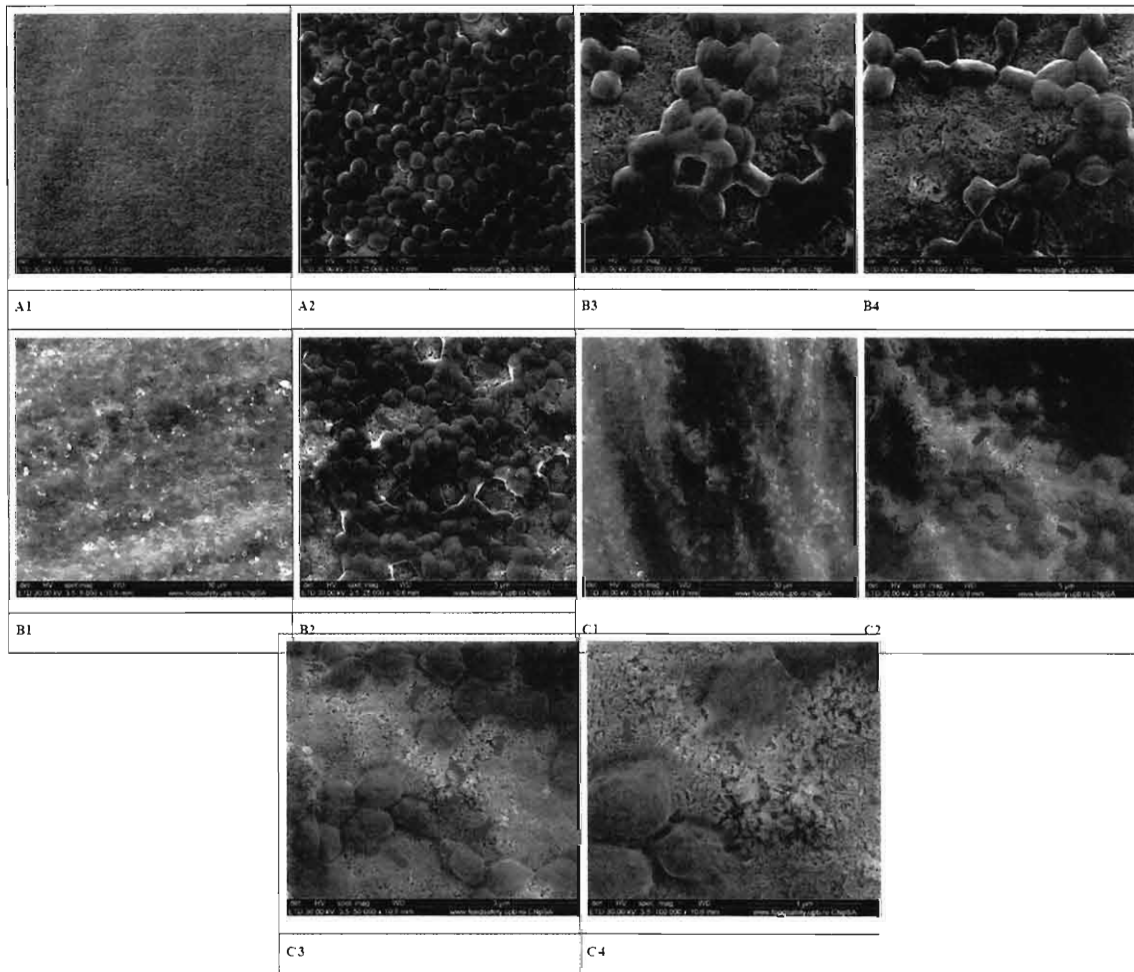
**Figura 4.** Reprezentare grafică a valorilor  $\log_{10} \text{UFC/mL}$  obținute după tratamentul cu plasmă al biofilmelor dezvoltate pe suporturi de sticlă timp de 24h în condiții standard.



**Figura 5.** Aspectul sursei DBDp în timpul tratamentului cu plasmă a suportului de HAP.

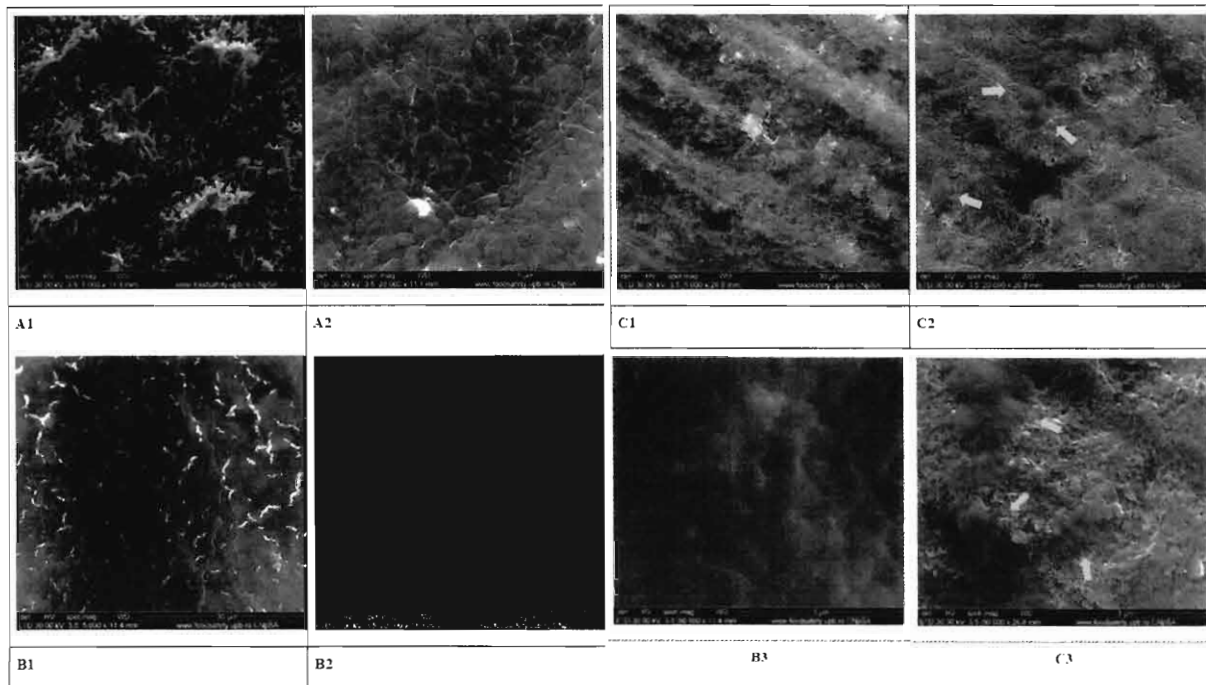


**Figura 6.** Reprezentare grafică a valorilor log<sub>10</sub>UFC/mL obținute după tratamentul cu plasmă al biofilmelor dezvoltate pe suporturi de hidroxiapatită (HAP) timp de 24h în condiții standard.



**Figura 7.** Imagini SEM ale biofilmelor de *S. aureus* dezvoltate pe probe de HAP. A) control netratat cu plasmă, B) după 5 scanări cu plasmă și C) după 10 scanări cu plasmă. Săgețile verzi indică celule bacteriene cu modificări.





**Figura 8.** Imagini SEM ale biofilmelor de *P. aeruginosa* dezvoltate pe probe de HAP. A) control netratat cu plasmă, B) după 5 scanări cu plasmă și C) după 10 scanări cu plasmă. Săgetile galbene indică celule bacteriene cu modificări.