

细菌生物膜研究技术

李京宝 韩 峰 于文功*

(中国海洋大学医药学院 青岛 266003)

摘 要 细菌生物膜是细菌生长过程中为适应生存环境而在固体表面上生长的一种与游走态细胞相对应的存在形式。只要条件允许,绝大多数细菌都可以形成生物膜。一旦形成了生物膜细菌就具有极强的耐药性,在医疗、食品、工业、军事等诸多领域给人类社会带来了严重的危害,造成巨大的经济损失。因此,细菌生物膜已成为全球关注的重大难题,也是目前科学界研究的前沿和热点。本文结合细菌生物膜研究技术的最新进展,重点介绍了几种常用生物膜发生装置及检测量化技术,并对其原理及优缺点进行了讨论。

关键词: 细菌 细菌生物膜 耐药性

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)03-0558-04

细菌生物膜是指由附着于惰性或者活性实体表面的细菌细胞和包裹着细菌的水合性基质所组成的结构性细菌群落^[1]。细菌生物膜广泛存在于含水和潮湿的各种表面上,包括自来水管、工业管道、通风设备、医疗器械甚至病理状态下的人体组织器官。据专家估计几乎所有的细菌在一定的条件下都可以形成生物膜^[2-4]。生物膜中细菌的代谢活动除了能够腐蚀管道和金属表面外,更可导致动植物及人类疾病发生。由于细菌在生物膜状态有着比游走态高出千百倍的抗药性,使得生物膜在临床更易引发难治性慢性感染,严重威胁人类健康^[5-7]。

虽然科学家们早在几个世纪以前就知道细菌可以在固体表面形成层膜状结构,但对于细菌生物膜或者说生物膜组织概念的形成及相关研究也只是在近 30 年来才有了重大的突破。从近十年来所检索到的细菌生物膜相关文献及专利数量的大幅提高可以看出,现在对细菌生物膜的关注程度更是达到了前所未有的高度并仍有上升趋势。一个新兴领域在初期的发展依赖于一系列有效方法的开发,而要想成为该领域的标准方法,则该方法所涉及的新知识就必须为大家所认可。细菌生物膜作为相对新兴的研究领域,并无多少被广泛认可的标准方法。本文将从细菌生物膜的人工发生装置和定性定量检测手段两方面来介绍近几年被普遍使用的生物膜相关技术。

1 人工生物膜发生装置

1.1 试管法

将细菌稀释至适当浓度装入小试管等容器,于适当的温度下静置培养,则该细菌的生物膜将会在试管壁上形成。根据菌种厌氧好氧的不同,生物膜分别倾向形成于试管的底部或者气液交界面。O Toole 等^[8]曾用该方法考察不同的材料包括聚苯乙烯、聚丙烯等对荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)生物膜生成的影响。由于该方法简单方便,灵活

快捷,至今仍在生物膜研究中发挥作用。

1.2 微孔板法

相对于试管而言,微孔板有着当然的批处理优势。尤其是在加快大批样品的操作速度同时还能保持试验一致性的优点,使得 96 孔板,乃至 384 孔板大量应用于细菌生物膜的研究^[9-11]。在实际操作中,由于微孔板边缘孔中的液体更易于挥发,从而导致这些孔的结果数值过高。为避免这种系统误差,可以在边缘的孔中仅加水,或者在微孔板上盖湿毛巾用以保湿。

在生物膜处理试验中,加入的抗生素等物质往往在完成处理后仍有部分残留而影响试验的结果。为了消除这些化学物质的继续作用,就必须彻底洗涤孔内的细菌生物膜,这显然是一件非常繁琐的工作。加拿大卡尔加里大学生物膜研究小组使用一种上盖带有小柱子的微孔板,可以很方便地处理或洗涤生长在小柱上的细菌生物膜^[12]。该装置已经商品化,称为卡尔加里生物膜装置(Calgary biofilm device, CBD)或直接称其为 MBEC,专门用于考察生物膜相对于其游离状态菌体的耐药性变化,以及寻找可以恢复生物膜对抗生素的敏感性的物质。该装置一经面世,立刻受到广大生物膜研究人员的欢迎,得到广泛应用^[13]。

1.3 置片法

置片法即在细菌培养液中加入玻璃片或其他片状、管状物静置共培养,以提供额外的可供生物膜附着并可移动处理的表面。Chigo 就曾用该方法分析了基因水平转移对生物膜生成的影响^[14]。由于加入玻片较大,可以直观地比较细菌生物膜的生长状况,甚至可以将其上生物膜刮下进行研究。另外还可将有生物膜附着的小管植入小鼠体内,观察生物膜相关的细菌感染状况^[15]。

1.4 平板膜片法

菌落在某种程度上也可以称为生物膜,即菌落生物膜(Colony biofilm)。将菌液稀释至一定程度,涂布于固体培养

* 通讯作者。Tel: 86-532-82031680 Fax: 86-532-82033054 E-mail: yuwg66@ouc.edu.cn

作者简介: 李京宝(1979-),男,甘肃兰州人,博士研究生,从事微生物生物膜方向研究。E-mail: alginate798@hotmail.com

收稿日期: 2006-10-08 接受日期: 2006-11-21 修回日期: 2007-02-08

基,待长出成片的菌落即可。通常该方法多应用于生物膜的通透性研究,如 Carmen 等发现超声波可以使庆大霉素更易通过铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)及大肠杆菌生物膜^[61]; Hatch 等研究了褐藻胶裂合酶对铜绿假单胞菌生物膜的影响^[71]。

1.5 管路法

同以上静置造膜的方法不同,管路法属于动态造膜方法。首先将适当密度的菌液注射入硅胶或其他材质管路中静置约 1 小时,使菌体可以贴附在管壁上,然后开启蠕动泵,使液体培养基以一定速度在管路中流动。流动的培养基使生物膜在生长过程中随时处在一种剪切力的作用下,而这种力对生物膜的发生、发育都起着相当重要的作用^[18]。并且该模型更加贴近水管或医用导管相关生物膜的形成。Bagge 等就用该方法分析了肺纤维化相关感染菌—铜绿假单胞菌在生物膜状态下 β -内酰胺酶及其褐藻胶合成相关基因的表达差异^[19]。

1.6 流室法 (Flow cell)

流室法与管路法原理基本一样,唯一的不同在于:细菌生物膜附着的面变成管路中嵌入的玻璃片,通过该玻片,研究者可以实时观测生物膜的生长状况,且不用损伤生物膜,这就是所谓的“在线观察”,如图 1。起初的流室由不锈钢等材料制成,有一定规格凹槽,上面覆盖玻璃片,两端连接管路^[20]。为了使形制保持一致而增加实验的稳定性,Stapper 等曾用微机化的机器工具制造流室的部件^[21]。现在该装置业已商品化,有数家公司生产,虽然外观结构略有不同,但其原理用途完全一致。由于在细菌生物膜结构观察方面的独到之处,流室法几乎成为目前在生物膜研究领域应用最广泛的生物膜发生装置。

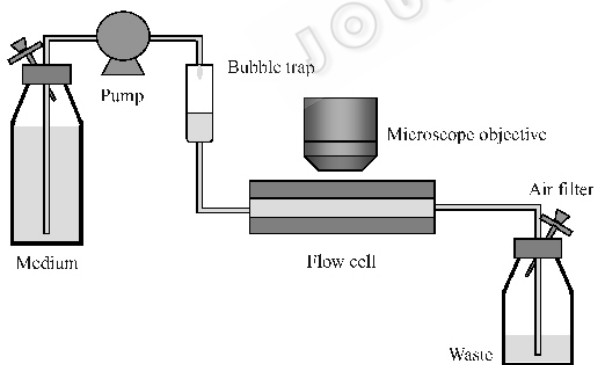


图 1 构成流室模型的主要部件

Fig.1 Schematic representing the main components of the flow cell system.

1.7 旋碟法 (Rotating disk reactor, RDR)

旋碟法不同于以上两种方法,它是利用搅拌子搅动培养基,使其处于涡旋状态而提供剪切力。生物膜的载体是多个圆形的小碟,由不同材料构成。它们镶嵌于该容器的底部或者侧壁上,生物膜形成后可以取下观察、处理。Teitzel 等曾用其考察重金属离子对生物膜细菌及其游离菌体的作用差别^[22];Mah 等在分析生物膜耐药的基因基础时用了旋碟法^[23]。

人工生物膜发生装置是生物膜研究的首要工具,根据研

究目的的不同而选择一个恰当的模式对试验的顺利开展至关重要。就同一个模型来说,实际应用当中仍有许多关键参数需要关注或调整,比如选用的菌种、培养基、培养的温度、流速的大小、生物膜形成表面的材料性质等等。以上方法的应用在细菌生物膜的研究过程中提供了大量有用的资料,相信将来还会有更多、更巧妙的方法将生物膜的研究步步向前推进。

2 生物膜检测技术

2.1 菌体计数

即通过计算生物膜中菌体对生物膜进行量化。为了将生物膜与其黏附的固体表面分离,通常使用一些机械方法,比如超声或涡旋,得到的菌液常用平板菌落法,通过计算菌落形成单位(Colony forming units, CFU)对生物膜内的活菌计数。另外,生物膜中包括死菌的总菌体数也可以通过显微镜直接计数。Banin 等^[24]就通过计算活菌与总菌数的变化,来评估 EDTA 对生物膜的清除及杀灭作用。

2.2 染色法

利用生物膜内物质对某些染料结合,可以通过染色的办法对生物膜进行定量。最常用的就是结晶紫^[8],先将 1% 的结晶紫溶液浸润生物膜生成的表面,静置 30min 后用水洗去未结合的染料,将剩余的水除去后,用乙醇或乙酸溶液溶解附着于生物膜上的染料,所得有色溶液用分光光度计或酶标仪测定 590 纳米处吸光值。该方法简便快捷,适用于试管及 96 孔板法造膜。Kaplan 等也曾用该法对在聚亚氨酯软管上的生物膜进行定量^[25]。

2.3 荧光法

荧光染料的应用使生物膜的观察有了选择性。用 Syto9 及碘化丙锭(Propidium iodide, PI)显示不同颜色的荧光可以区分生物膜中的死活菌,这对于生物膜的清除研究意义重大^[26]。另外用荧光标记的抗体或凝集素,更可以特异性地识别生物膜中的某些成分而显色^[27]。进一步而言,荧光原位杂交(Fluorescent in situ hybridization, FISH)的应用使我们对生物膜内的物质分布有所了解^[28]。除了外加荧光染料外,绿色或红色荧光蛋白,不论是质粒介导的还是重组入基因组的,都已成为生物膜检测领域中广泛运用的分子生物学工具^[29]。

2.4 激光共聚焦显微镜 (Confocal laser scanning microscope, CLSM)

普通荧光显微镜下,许多来自焦平面以外的光使观察到的反差和分辨力降低。而激光共聚焦显微镜则通过检测器前的小孔保证只有来自焦平面的光成像,其他散射光被挡住,从而使显微镜的分辨力得以提高。这里之所以将其与一般的荧光显微镜分开来讲,更主要是由于激光共聚焦显微镜可对较厚的样品进行无损伤“光学切片”,再通过三维重构得到样品的立体结构,如图 2 为表达绿色荧光蛋白的铜绿假单胞菌在流室中所形成生物膜的三维立体图像。除了通过图象软件我们可以得到各个角度的生物膜三维视图外^[30],更有一些计算软件可以将三维图象数据化,从而使生物膜的特征量化^[31]。其中以丹麦的 Heydom 撰写的 COMSTAT 最为常用,它运行于 Matlab 程序 5.3 以上版本,可以对生物膜的生物量、厚度、均匀性、比表面积等十几个参数进行测定^[32]。

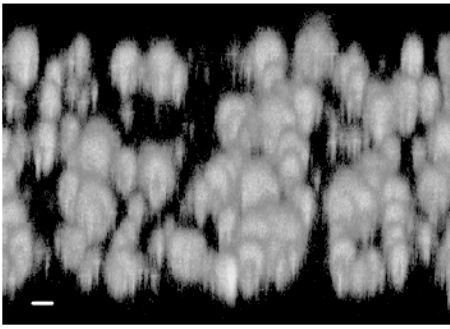


图2 由激光共聚焦显微镜得到的铜绿假单胞菌 FRD1 生物膜立体图像

Fig. 2 Three-dimensional view of *P. aeruginosa* FRD1 biofilm by CLSM. The strain expressing GFP was cultivated in flow cell system and the biofilm showed cell clusters like mushroom. Bar for 20 μ m

2.5 电子显微镜

电子显微镜是用电子束和电子透镜代替光束和光学透镜,使物质的细微结构在非常高的放大倍数下成像的仪器,其分辨力可达纳米级甚至更小。按照工作方式的不同分为透射电子显微镜(Transmission electron microscope, TEM)和扫描电子显微镜(Scanning electron microscope, SEM)。透射电子显微镜是把经加速和聚集的电子束投射到非常薄的样品上,电子与样品中的原子碰撞而改变方向,从而记录产生的立体角散射成像。Kaplan 等将伴放线放线杆菌(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*)形成的生物膜固定并切片,观察到该菌的内部放散特征^[33]。扫描式电子显微镜的电子束不穿过样品,仅在样品表面扫描激发出次级电子而成像,图像有很强的立体感,在生物膜研究初期提供了直接形象的外观资料^[34]。

由于电子显微镜需在真空条件下工作,所以很难观察活的生物,而且电子束的照射也会使生物样品受到辐照损伤。电子束在有结合水存在的真空条件下无法工作,但生物膜中95%的成分都是水,所以脱水的过程对样品的影响很大。另外昂贵的设备,相对繁琐的样品制备工作也使电子显微镜在生物膜研究领域的应用受到限制。

2.6 原子力显微镜(Atomic force microscopy, AFM)

原子力显微镜通过检测待测样品表面和一个微型力敏感元件之间的极微弱的原子间相互作用力来研究物质的表面结构及性质。将一对微弱力极端敏感的微悬臂一端固定,另一端的微小针尖接近样品,这时它将与样品相互作用,作用力将使得微悬臂发生形变或运动状态发生变化。扫描样品时,利用传感器检测这些变化,就可获得作用力分布信息,从而以纳米级分辨率获得表面结构信息。该技术诞生于1985年,近年来应用范围不断扩展^[35],目前在生物膜研究领域也有所建树。Steinberger 等^[36]利用原子力显微镜对临界维度纳米级测量发现铜绿假单胞菌在低营养条件下,为适应饥饿状态而菌体长度增加。Landry 等^[37]的研究表明,粘液素(Mucin)与铜绿假单胞菌的相互作用加剧了该菌的生物膜形成及其耐药性的提高。

细菌生物膜是地球生命系统的重要组成部分,它影响着人类健康、工业效率乃至环境稳定。虽然生物膜与细菌同时

被发现,但是长期以来,科学家仅对浮游细菌(或游离细菌)进行了深入研究,却忽视了作为细胞群体存在的细菌生物膜研究。近年来随着细菌生物膜研究的兴起,人们逐渐认识到与浮游的细菌相比,生物膜细菌有着更加复杂的结构、广泛的信息沟通、精密的调控机制和强化的社会效应,并且更多地影响着人类的生活。显然,数百年来建立的以浮游细菌为对象的经典微生物研究方法已经不能满足细菌生物膜研究的需要,因此生物膜研究方法的建立就显得尤为重要。随着相关技术的不断更新和发展,人们对细菌生物膜的认识和理解将越发深入和透彻,也就可以更好地控制甚至开发生物膜,造福社会。

参 考 文 献

- [1] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial Biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 1999, **284**: 1318–1322.
- [2] Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol*, 1987, **41**: 435–464.
- [3] Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol*, 2003, **57**: 677–701.
- [4] Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 2002, **15**: 167–193.
- [5] Arciola CR, Alvi FI, An YH, et al. Implant infection and infection resistant materials: a mini review. *Int J Artif Organs*, 2005, **28**: 1119–1125.
- [6] Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect*, 2003, **5**: 1213–1219.
- [7] Xu KD, McFeters GA, Stewart PS. Biofilm resistance to antimicrobial agents. *Microbiology*, 2000, **146**: 547–549.
- [8] O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathway: a genetic analysis. *Mol Microbiol*, 1998, **28**: 449–461.
- [9] Burton E, Yakandawala N, Lovetri K, et al. A microplate spectrofluorometric assay for bacterial biofilms. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2006, **7**: 1–4.
- [10] Head NE, Yu H. Cross-sectional analysis of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: biofilm formation, virulence, and genome diversity. *Infect Immun*, 2004, **72**: 133–144.
- [11] Musk DJ, Banko DA, Hergenrother PJ. Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem Biol*, 2005, **12**: 789–796.
- [12] Ceri H, Olson ME, Stremick C, et al. The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol*, 1999, **37**: 1771–1776.
- [13] Parahitiyawa NB, Samaranyake YH, Samaranyake LP, et al. Interspecies variation in *Candida* biofilm formation studied using the calgary biofilm device. *APMIS*, 2006, **114**: 298–306.
- [14] Ghigo JM. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*, 2001, **412**: 422–445.
- [15] Kadurugamuwa JL, Sin LV, Yu SJ, et al. Rapid direct method for monitoring antibiotics in a mouse model of bacterial biofilm infection. *Antimicrob Agents Ch*, 2003, **47**: 3130–3137.
- [16] Carmen JC, Nelson JL, Beckstead BL, et al. Ultrasonic-enhanced gentamicin transport through colony biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *J Infect Chemother*, 2004, **10**: 193

- [17] Hatch RA , Schiller NL. Alginate lyase promotes diffusion of aminoglycosides through the extracellular polysaccharide of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* . *Antimicrob Agents Ch* , 1998 , **42** : 974 – 977 .
- [18] Tsai YP , Pai TY , Qiu JM. The impacts of the AOC concentration on biofilm formation under higher shear force condition. *J Bacteriol* , 2004 , **11** : 155 – 167 .
- [19] Bagge N , Schuster M , Hentzer M , et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and β -Lactamase and alginate production. *Antimicrob Agents Ch* , 2004 , **48** : 1175 – 1187 .
- [20] Stoodley P , deBeer D , Lewandowski Z. Liquid flow in biofilm systems. *Appl Environ Microbiol* , 1994 , **60** : 2711 – 2716 .
- [21] Stapper AP , Narasimhan G , Ohman DE , et al. Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture , but is not essential for biofilm formation. *J Med Microbiol* , 2004 , **53** : 679 – 690 .
- [22] Teitzel GM , Parsek MR. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa* . *Appl Environ Microbiol* , 2003 , **69** : 2313 – 2320 .
- [23] Mah TF , Pitts B , Pellock B , et al. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* , 2003 , **426** : 306 – 310 .
- [24] Banin E , Brady KM , Greenberg EP. Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm. *Appl Environ Microbiol* , 2006 , **72** : 2064 – 2069 .
- [25] Kaplan JB , Ragunath C , Velliyagounder K , et al. Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Ch* , 2004 , **48** : 2633 – 2636 .
- [26] Webb JS , Thompson LS , James S , et al. Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* , 2003 , **185** : 4585 – 4592 .
- [27] Kaplan JB , Velliyagounder K , Ragunath C , et al. Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. *J Bacteriol* , 2004 , **186** : 8213 – 8220 .
- [28] Thumheer T , Gmur R , Guggenheim B. Multiplex FISH analysis of a six-species bacterial biofilm. *J Microbiol Meth* , 2004 , **56** : 37 – 47 .
- [29] Bloemberg GV , O ' Toole G , Lugtenberg BJ , et al. Green fluorescent protein as a marker for *Pseudomonas* spp. *Appl Environ Microbiol* , 1997 , **63** : 4543 – 4551 .
- [30] Neu TR , Woelfl S , Lawrence JR. Three-dimensional differentiation of photo-autotrophic biofilm constituents by multi-channel laser scanning microscopy (single-photon and two-photon excitation). *J Microbiol Meth* , 2004 , **56** : 161 – 172 .
- [31] Daims H , Lucker S , Wagner M. Daime , a novel image analysis program for microbial ecology and biofilm research. *Environ Microbiol* , 2006 , **8** : 200 – 213 .
- [32] Heydorn A , Nielsen AT , Hentzer M , et al. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* , 2000 , **146** : 2395 – 2407 .
- [33] Kaplan JB , Meyenhofer MF , Fine DH. Biofilm growth and detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* . *J Bacteriol* , 2003 , **185** : 1399 – 1404 .
- [34] Stickler D , Morris N , Moreno MC , et al. Studies on the formation of crystalline bacterial biofilms on urethral catheters. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* , 1998 , **17** : 649 – 652 .
- [35] Dufrene YF. Recent progress in the application of atomic force microscopy imaging and force spectroscopy to microbiology. *Curr Opin Microbiol* , 2003 , **6** : 317 – 323 .
- [36] Steinberger RE , Allen AR , Hansa HG , et al. Elongation correlates with nutrient deprivation in *Pseudomonas aeruginosa*-unsaturated biofilms. *Microb Ecol* , 2002 , **43** : 416 – 4123 .
- [37] Landry RM , An D , Hupp JT , et al. Mucin-*Pseudomonas aeruginosa* interactions promote biofilm formation and antibiotic resistance. *Mol Microbiol* , 2006 , **59** : 142 – 151 .

Model systems for bacterial biofilm research

LI Jing-bao , HAN Feng , YU Wen-gong*

(School of Medicine and Pharmaceutics , Ocean University of China , Qingdao 266003 , China)

Abstract : Contrast to planktonic cells , biofilms are complex communities of microorganisms that develop on biotic or abiotic surfaces. Most of bacteria can form biofilms under proper conditions. Once biofilm form , the inner bacteria cells often exhibit reduced antibiotic susceptibility than their free-floating counterparts , so conventional methods of killing bacteria , such as antibiotics and disinfections are often ineffective with them. Biofilms may cause huge economic loss in equipment damage , product contamination , energy losses and medical infections. Therefore , bacterial biofilm is evolving as a focal problem and an active area of research. As a relatively new area , the progress of biofilm science depends on the development of a satisfactory set of methods. But the classic methods to study planktonic bacteria cannot fulfill the biofilm research , one for which there are few widely accepted methodological standards. Even though biofilms are complicated physical-chemical-biological systems , experience demonstrates that accessible research methods are feasible. In this paper , the theories , principles , merits and limitations of some methods currently used in bacterial biofilm researches , involving artificial biofilm forming and biofilm measurement , were discussed.

Keywords : bacterium ; bacterial biofilm ; antibiotic resistance

* Corresponding author. Tel : 86-532-82031680 ; Fax : 86-532-82033054 ; E-mail : yuwg66@ouc.edu.cn

Received : 8 October 2006 / Accepted : 21 November 2006 / Revised : 8 February 2007