

Progress on Bacterial Biofilm Formation and Antibiotics Resistance Mechanisms*

Min Zhou, Lixiang You, Qing Zhao, Yuanyuan Li[#], Shuyan Wu[#], Rui Huang

Department of Microbiology, School of Medicine and Bioscience, Soochow University, Suzhou
Email: [#]liyuan yuan@suda.edu.cn, [#]shuyan zw@aliyun.com

Received: Nov. 24th, 2013; revised: Dec. 8th, 2013; accepted: Dec. 12th, 2013

Copyright © 2013 Min Zhou et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. In accordance of the Creative Commons Attribution License all Copyrights © 2013 are reserved for Hans and the owner of the intellectual property Min Zhou et al. All Copyright © 2013 are guarded by law and by Hans as a guardian.

Abstract: Bacterial resistance to antibiotics has become a global medical and social issue. Bacterial biofilm (BBF) is an important aspect of bacterial resistance. It is a special bacterial community formed by bacteria and their extracellular polymeric matrix. It has a special spatial structure that can produce a strong barrier to resist antibiotics, enhance the communication among bacteria and transfer the resistance genes. In the process of the transmission of resistance genes, plasmid plays a great role as gene vector. Meanwhile, BBF interacts closely with gene expression. The research on BBF, plasmid and drug resistance genes can facilitate understanding of the spread and prevention of BBF resistance.

Keywords: Bacterial Biofilm; Antibiotic Resistance; Drug Resistance Genes; Plasmid

细菌生物膜的形成及耐药机制研究进展*

周 敏, 尤理想, 赵 青, 李媛渊[#], 吴淑燕[#], 黄 瑞

苏州大学基础医学与生物科学学院病原生物学系, 苏州
Email: [#]liyuan yuan@suda.edu.cn, [#]shuyan zw@aliyun.com

收稿日期: 2013年11月24日; 修回日期: 2013年12月8日; 录用日期: 2013年12月12日

摘 要: 细菌对抗生素的耐药性已成为全球关注的医学及社会问题, 细菌生物被膜(Bacterial biofilm, BBF)是细菌耐药性产生的一个重要方面。BBF 是由细菌及其产生的胞外大分子多聚物形成的一种特殊细菌群落。这种细菌群落具有特殊的空间结构, 能产生很强的屏障作用, 抵抗抗生素的杀菌作用, 并且可以加强群落内细菌的交流, 传递耐药基因。在耐药基因的传递过程中, 质粒作为基因的载体起到了极大的作用。同时, BBF 与基因表达存在相互影响的关系。对 BBF、耐药基因及质粒的研究, 可以提高对 BBF 耐药性播散的认识, 有助于防治细菌耐药性。

关键词: 细菌生物膜; 耐药性; 耐药基因; 质粒

1. 引言

细菌生物被膜(Bacterial biofilm, BBF)是指多个细

菌不可逆地黏附于机体或物体表面, 被自身细胞分泌的基质所包裹, 是与浮游细菌不同的新表型^[1]。BBF 可谓是无处不在, 在一定条件下几乎所有的细菌都能形成 BBF, 目前认为 99% 的细菌以 BBF 的形式存在, 65%~80% 的人类感染性疾病与 BBF 有关^[2]。细菌可以

*基金项目: 江苏省自然科学基金(No.2011286); 苏州大学大学生创新创业训练计划项目(No.2012yb017)。

[#]通讯作者。

在水管内面、水流过滤器表面等物品上形成 BBF，给人类的生活带来极大的危害，甚至可黏附在临床医疗器械如导尿管、内窥镜管腔、呼吸机导管中形成 BBF，这已成为介入性医源性感染的主要感染源。细菌形成 BBF 后，不但难以清除，而且对抗生素的抵抗力也有了极大提高，同时可逃避宿主免疫作用和抗菌药物的杀伤作用。质粒(Plasmid)是细菌染色体外能够自主复制的较小的 DNA 分子，可作为基因的载体参与细菌间耐药基因的传递，与细菌耐药性有着密切关联。研究 BBF 的形成及质粒的高表达对探索耐药性的作用机制具有重要的临床意义。

2. BBF 的特殊空间结构

BBF 为细菌提供了一个特殊的空间结构，BBF 均由胞外聚合物(Extracellular polymeric substances, EPS)和不同程度地包绕于其中的细菌所组成，BBF 内细菌密度高，使细菌间的空间结构狭小，构成了一种特殊的三维结构^[3]。通过 BBF 的空间结构而建立的底物和营养梯度，使得 BBF 中细菌的活动度不同。根据细菌在 BBF 内位置的不同可将其分为表层菌和深层菌。表层菌容易获得营养和氧气，代谢产物也容易排出，因而生理代谢比较活跃，分裂较快；深层菌则处于休眠或静止状态，缺乏营养和氧气，代谢缓慢。由于大多数多糖蛋白复合物带负电荷，可从周围环境中吸引各种有机物和无机物，所以不同细菌及不同环境下 BBF 形态有所不同，如铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)表面形成一种柔韧的、有一定厚度的并突向介质内的多糖蛋白复合物；而肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)的多糖复合物则僵硬且均匀完整地分布于细菌表面。BBF 并非一层致密的膜结构，而是内含水通道，对流的水分可输送养料、酶、代谢产物及其他排泄废物，以满足细菌生存的需要。BBF 如此复杂的结构有助于其适应物理的、化学的等多样性变化的环境。

BBF 对细菌的作用表现在很多方面。BBF 内细菌代谢状态的不同，使得细菌在任何状态下都能存活一部分。当浮游细菌活性高、分裂频繁时，质粒丢失的速度增加，会导致缺失质粒的细菌增多；而 BBF 内的细菌相比同类浮游菌，其活性低，分裂减少，使质粒缺失较少发生。同时由于用于质粒复制的能量减少，

使得细菌维持质粒代谢的负担相应减少^[4]。BBF 中细菌质粒的存活率增高，加强了对耐药基因的保护和传递作用。此外，由于细菌的代谢率降低，抗生素通过作用于代谢环节影响细菌活性的概率也降低。研究发现 BBF 的微环境发生了改变，氧气在 BBF 表面被消耗殆尽，导致其深处为厌氧环境，而氨基糖苷类抗生素对微生物的作用在厌氧条件下要明显低于有氧条件。BBF 中 pH、渗透压环境等改变也会导致细菌胞膜对抗生素敏感性的下降^[5]。BBF 的异质性指不同部位 BBF 的细菌展现不同的基因表达模式，发挥不同的功能，这是 BBF 最大的特点。BBF 垂直方向不同层面的细菌 RNA 含量、呼吸活性和蛋白质合成均不同，同时由于细菌所处微环境的 pH 和氧化还原电位等不同，可使遗传学上一致的细菌个体表现不同的特征，如产生毒素的不同可使 BBF 内一些细菌个体对宿主无害，而另一些细菌则可能对宿主产生致命威胁^[6]。BBF 中细菌微环境和生理状态的不同，使得细菌对质粒的反应不同，质粒更容易进入适合其表达的宿主菌，促使耐药基因的出现与播散。

3. BBF 的屏障作用

BBF 内的细菌对不利条件如干燥、极端温度、抗菌药物和消毒剂等的抵抗力均明显增强^[7]。与浮游细菌相比，处于 BBF 中的细菌对抗生素的抵抗力可提高 10~1000 倍。BBF 主要由大量胞外多聚物构成，可阻碍抗生素的渗透，促进其耐药性。BBF 的特殊结构，也能有效地阻止抗微生物蛋白酶和补体等大分子的进入。有研究表明，BBF 可限制氧自由基的扩散，抵抗氧自由基的损害。此外，BBF 内的胞外黏质物是带负电荷的，可与大量的抗生素分子结合；同时许多抗生素水解酶可以固定在 BBF 上，使进入膜内的抗生素被灭活，从而使渗入并接触到 BBF 内细菌的抗菌药物大大减少，达不到抑菌、杀菌浓度而使药物失效。BBF 中多糖蛋白复合物的聚积，可减慢抗生素渗透速度，延长其渗透时间，使得细菌有足够的时间启动耐药基因来抵抗抗生素。但是，渗透障碍并不可能是 BBF 耐药的唯一机制，如利福平、克林霉素和大环内酯类等药物，就能顺利地通过 BBF 进而渗透入细胞内。

BBF 还可以通过抵抗吞噬细胞的作用等多种方式对抗机体免疫防御机制。对呼吸机导管内的 BBF

研究发现,超声波洗脱下的 BBF 碎片与吞噬细胞共育时,虽然吞噬细胞对 BBF 有趋化作用,但吞噬细胞不能通过吞入过程直接清除 BBF。BBF 不仅具有明显抗吞噬作用,甚至可以包裹吞噬细胞限制其自身吞噬功能^[8]。在小鼠巨噬细胞对铜绿假单胞菌作用的实验中发现,巨噬细胞可通过吞噬作用阻止细菌的入侵,但当铜绿假单胞菌形成 BBF 时,细菌可分泌大剂量的藻酸盐抑制巨噬细胞对细菌的吞噬作用,逃避宿主的免疫反应^[9]。BBF 的抗吞噬作用,保护了细菌及其耐药基因,导致细菌耐药性的播散,易于造成更大的危害。

4. BBF 与细菌基因表达的相互影响

耐药基因的表达可影响 BBF 的形成。这些基因主要是通过促进细菌间的黏附,促进 BBF 的形成。大肠杆菌(*Escherichia coli*)的 *luxS* 基因,可合成 AI-2 信号分子,通过促进鞭毛的表达、增强细菌的活力,促进 BBF 的形成^[10]。肠炎沙门氏菌(*Salmonella enterica*)鸡源株 *ompR* 基因缺失,影响菌毛和纤维素的表达导致其不能形成 BBF^[11]。Ghigo 等发现所有已知的接合质粒,都能通过合成细胞表面黏附物质,启动表面相关的 BBF 形成^[12]。本实验室的研究也证实了伤寒沙门菌质粒 *pR_{ST98}* 可促进生物膜的形成。而部分基因对 BBF 的形成有抑制作用,表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)中 *ica R* 基因对 *ica/Aica D* 的表达有抑制作用,可减少 PIA 的合成,从而抑制 BBF 的形成^[13]。铜绿假单胞菌 *pvdQ* 基因所编码的蛋白可促使细菌进入静止状态,也会抑制 BBF 的形成^[14]。

BBF 内细菌与浮游菌相比,出现了特有的基因表达模式,使其生物学行为也随之改变。BBF 特有的表型能够激活其耐药机制。实验研究中发现,铜绿假单胞菌形成 BBF 后,基因表达发生了变化。*ropS* 基因与细菌形态结构及对抗生素敏感性有关,在 BBF 中 *ropS* 基因的表达被抑制,使其形成的 BBF 比野生株更厚更坚固,耐药性也更强;*tolA* 基因的高度表达引起氨基糖苷类药物与细菌外膜的结合力下降,使其耐药性增强;该菌还存在一种调控相位变异的蛋白质(Phenotype variant regulator, PvrR),控制着细菌对抗生素敏感和耐药的转化,其相应基因在生物膜细菌中转录活跃,通过抑制或激活 PvrR 的表达来调控铜绿假单胞菌 BBF 的耐药性^[15]。

5. BBF 中耐药基因的传递作用

耐药基因的表达是细菌耐药性的重要机制,而 BBF 中耐药基因的传递是细菌获得耐药性及其播散的主要途径。水平基因转移(Horizontal gene transfer, HGT)为供体和受体之间的非亲代到子代的遗传物质交换。这种机制帮助了 BBF 中耐药基因的传递。耐药基因可存在于质粒上,质粒易作为耐药基因载体参与基因转移,其原因可能有:1) 质粒的表达依赖于细菌的存活,因此质粒帮助细菌进化完善,适应环境的变化,使其群体保持稳定;2) 当基因从细菌染色体转移到质粒中时,新的更强的启动子也会和基因一并转移;3) 相较于细菌染色体,质粒更易在细菌之间传递,因此质粒上的编码基因可能存在更多的相同序列,使其基因数量占优势^[16]。

质粒参与的 HGT 主要有接合和转化两种形式。接合是供体菌通过性菌毛将遗传物质(主要是质粒 DNA)传递给受体菌的过程。本实验室以往的研究表明,伤寒沙门菌可通过 R 质粒把耐药基因传递给人体的正常菌群大肠杆菌,而接受耐药基因后的大肠杆菌也可以把耐药基因传递给其他肠道致病菌^[17]。在 BBF 的形成过程中,菌毛促进细菌的聚集,在这种高密度聚集的菌群中,细菌间通过接合发生基因转移的效率较高。研究表明,BBF 中细菌间的接合频率远大于浮游细菌^[18]。转化是受体菌直接摄取供体菌的游离 DNA 获得新的遗传性状的过程。在天然发生的转化体系中,细菌一般在进入一种被称为感受态的特殊生理状态时,才能够捕获外源的转化 DNA。BBF 基质中存在大量的细胞外 DNA(extra DNA, eDNA),这些 eDNA 对 BBF 基质的稳定起着重要的作用^[19]。有实验证明,BBF 中的 eDNA 可以触发细胞进入感受态,从而使得质粒转化的宿主范围扩大^[20]。由此可见,HGT 的增强加快耐药基因在 BBF 内的传递,从而提高了细菌的耐药性。

6. 展望

伴随着抗生素的大量应用,细菌耐药性日益成为严重威胁人类健康的重要问题,人们对细菌耐药性的研究也越来越深入。BBF 的形成使细菌更能适应多样化的生存环境,并且较浮游菌具有更强的耐药性和抵抗能力。对 BBF 的研究是微生物学发展的重要一步,

BBF 内的基因传递也可能是细菌获得耐药基因的主要途径。随着 BBF 的解离, 获得耐药基因的菌株将导致细菌耐药性的播散, 造成更大危害。随着对耐药机制研究的深入, 必然会出现新的理论与技术, 创造出抵抗细菌耐药性的有效方法, 进而对解决 BBF 相关耐药性这一难题产生重要的影响。

参考文献 (References)

- [1] Qu, Y., Daley, A.J., Istivan, T.S., *et al.* (2010) Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from very low birth weight babies: Comprehensive comparisons of bacteria at different stages of biofilm formation. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, **9**, 16.
- [2] Mellata, M., Maddux, J.T., Nam, T., *et al.* (2012) New insights into the bacterial fitness-associated mechanisms revealed by the characterization of large plasmids of an avian pathogenic *E. Coli*. *PLoS One*, **7**, e29481.
- [3] Burmølle, M., Thomsen, T.R. and Fazli. (2010) Biofilms in chronic infections—A matter of opportunity—Monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **59**, 324-336.
- [4] O'Connell, H.A., Niu, C. and Gilbert, E.S. (2006) Enhanced high copy number plasmid maintenance and heterologous protein production in an *Escherichia coli* biofilm. *Biotechnology and Bioengineering*, **97**, 439-446.
- [5] Moons, P., Michiels, C.W. and Aertsen, A. (2009) Bacterial interactions in biofilms. *Critical Reviews in Microbiology*, **35**, 157-168.
- [6] Lenz, A.P., Williamson, K.S., Pitts, B., *et al.* (2008) Localized gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**, 4463-4471.
- [7] He, X. and Ahn, J. (2011) Differential gene expression in planktonic and biofilm cells of multiple antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, **325**, 180-188.
- [8] 王欢, 刘新, 张佩等 (2012) 呼吸机导管内细菌生物被膜抗吞噬作用. *中国公共卫生*, **28**, 644-646.
- [9] 白丹, 余加林, 万珍艳等 (2008) 铜绿假单胞菌生物膜悬液和藻酸盐对小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响. *中国微生态学杂志*, **20**, 337-342.
- [10] Yamaguchi, Y., Park, J.H., Inouye, M., *et al.* (2009) A crucial regulator for quorum sensing and biofilm formation, is a GCU-specific mRNA interferase in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, **284**, 28746-28753.
- [11] 董洪燕, 彭大新, 焦新安等 (2011) 肠炎沙门氏菌鸡源株 *ompR* 基因缺失株的构建及生物学特性与亲本株的比较. *微生物学报*, **51**, 1256-1262.
- [12] Ghigo, J.M. (2001) Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*, **412**, 442-445.
- [13] 龚风云, 刘丽娜, 邢铭友等 (2011) 表皮葡萄球菌耐药与生物膜的相关研究. *中华医院感染学杂志*, **21**, 21-23.
- [14] 王丽丽, 龚风云, 谢旭等 (2011) *pvdQ* 基因对铜绿假单胞菌生物膜形成的影响. *华中科技大学学报(医学版)*, **40**, 147-150.
- [15] Estrela, A.B., Heck, M.G. and Abraham, W.R. (2009) Novel approaches to control biofilm infections. *Current Medicinal Chemistry*, **16**, 1512-1530.
- [16] Jonas, S.M., Mette, B., Lars, H.H., *et al.* (2012) The interconnection between biofilm formation and horizontal genetransfer. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **65**, 183-195.
- [17] 黄瑞, 秦爱兰, 闻玉梅 (2000) 耐药质粒 pR_{ST98} 在不同种属肠道杆菌间的接合和表达. *中国微生物学和免疫学杂志*, **20**, 323-326.
- [18] Sørensen, S.J., Bailey, M., Hansen, L.H., *et al.* (2005) Studying plasmid horizontal transfer *in situ*: A critical review. *Nature Reviews Microbiology*, **3**, 700-710.
- [19] Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., *et al.* (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, **295**, 1487.
- [20] Molin, S. and Tolker-Nielsen, T. (2003) Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilization of the biofilms structure. *Current Opinion in Biotechnology*, **14**, 255-261.