

Advances on Research of *Mycobacterium tuberculosis* Biofilms

Menglan Gan, Renfeng Wang, Zaichang Yang*

School of Pharmacy, Guizhou University, Guiyang Guizhou
Email: 997189575@qq.com, 602780177@qq.com, *yangzaichang@126.com

Received: Aug. 1st, 2018; accepted: Aug. 15th, 2018; published: Aug. 22nd, 2018

Abstract

Biofilms refer to a microbial community that is surrounded by a self-generated extracellular polymer and attached to the cell surface, but the physiology and genetics definition of the *M. tuberculosis* biofilm have not yet been described. Because of its unique physiological state, *M. tuberculosis* biofilms limit the therapeutic effect of anti-tuberculosis drugs, prolong the cycle of tuberculosis treatment, and seriously endanger human health. This article reviewed the formation mechanism, structural composition and related functions and quantitative methods of *M. tuberculosis* biofilms, and discussed the research ideas of using *M. tuberculosis* biofilms as novel anti-tuberculosis drugs to shorten the treatment of tuberculosis and provide a new direction for improving the therapeutic effect of tuberculosis.

Keywords

Mycobacterium tuberculosis, Biofilms, Tolerance

结核分枝杆菌生物膜研究进展

甘梦兰, 王仁凤, 杨再昌*

贵州大学药学院, 贵州 贵阳
Email: 997189575@qq.com, 602780177@qq.com, *yangzaichang@126.com

收稿日期: 2018年8月1日; 录用日期: 2018年8月15日; 发布日期: 2018年8月22日

摘要

生物膜是指被自我产生的细胞外聚合物包裹, 并附着在细胞表面的微生物群落, 但结核分枝杆菌生物膜

*通讯作者。

的生理学和遗传学定义至今尚未被描述。抗菌药物耐受性通常与之形成的生物膜有关，结核分枝杆菌生物膜因其独特的生理状态，限制了抗结核药物的治疗效果，延长了结核病治疗的周期，严重危害人类健康。该文就结核分枝杆菌生物膜的形成机制、结构成分及相关功能、定量测定方法进行了综述，讨论了以结核分枝杆菌生物膜为靶点新型抗痨药物的研究思路，为缩短结核病治疗时间，提高结核病的治疗效果提供一个新方向。

关键词

结核分枝杆菌，生物膜，耐受性

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

细菌形成生物膜可导致表型耐药(Phenotypic resistance)，大约 65%~80%的人类细菌感染与生物膜相关[1]。20 世纪 90 年代，Hall-Stoodley 等[2]发现形成生物膜能使分枝杆菌逃避抗菌药物的杀菌作用，因此生物膜是分枝杆菌长期栖居的场所。2008 年 Ojha 等[3]证实结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)生物膜内存在对异烟肼、利福平等一线抗结核药物高度耐药的 MTB，而破坏生物膜后，这些耐药菌重新恢复对抗痨药物的敏感性，因此认为生物膜内的耐药菌为表型耐药。随着对 MTB 生物膜的不断探索，认为 MTB 生物膜能屏蔽抗痨药物的作用，是导致结核病治疗周期长的原因之一，学术界对 MTB 生物膜的研究得到越来越多的关注。本文就 MTB 生物膜的形成机制、结构成分及相关功能、定量测定方法以及以 MTB 生物膜为靶点新型抗痨药物的研究思路进行了综述。

2. MTB 生物膜的形成机制

生物膜形成是一个动态的过程，各种不同的物理、化学、遗传、生物作用都参与生物膜成熟的整个过程[4]。虽然生物膜形成机制尚未清楚，但生物膜在非生物或生物表面形成过程中，可以分为可逆性粘附和不可逆性粘附两个阶段[5]。MTB 生物膜的形成机制与一般细菌生物膜的形成机制相似，每个阶段都通过严格的基因调控，其生物膜的形成过程主要涉及以下四个步骤[6]。

2.1. 附着(Attachment)

附着是细菌生物膜形成过程中最关键的一步，主要取决于营养条件、疏水性、细胞表面电荷、细菌与细菌的相互作用等因素[7]。表面附着触发促进生物膜生长的基因表达，例如：大肠杆菌中的主调控因子(CsgD)通过抑制鞭毛的合成来促进生物膜的形成，并通过激活 *adrA* 来诱导 c-di-GMP (EPS 合成的第二信使) [8]。在此阶段，细菌可以松散地聚集，也可以分离成浮游形式。

2.2. 固着生长(Sessile Growth)

待细菌附着于生物或非生物表面变得稳定后，细菌开始增殖和分裂，大量分泌细胞外聚合物(Extracellular Polymeric Substances, EPS)，并通过 EPS 发出特定的化学信号，诱导微菌落的形成[9] [10]。形成的 EPS 可保护细菌免受抗生素、消毒剂或者自然条件下的辐射等条件的影响[11]。

2.3. 生物膜成熟(Biofilm Maturation)

最终成熟的生物膜是由 EPS 和 EPS 所包围的微菌落组成, 其结构是三维立体结构, 包括营养和水分的运输通道[12]。在这一阶段, 微环境中生物膜形成自组织结构, 信号分子分泌出自诱导物(Auto Inducer, AI), 微生物细胞通过 AI 信号相互交流, 以达到微生物所需的细胞密度[13] [14]。

2.4. 分散(Dispersal)

在这一阶段, 生物膜内的微生物细胞进行快速增殖和分散, 以使其转化为运动形态, 同时生物膜内的细菌产生不同的糖分解酶(Saccharolytic Enzymes)帮助其表面的释放, 例如大肠杆菌产生 n-乙酰杆菌酶、铜绿假单胞菌产生海藻酸裂解酶、链球菌产生透明质酸, 继而自然发生分散[9] [15]。分散后又附着于别处并重新开始该过程。

3. MTB 生物膜结构成分及相关功能

MTB 生物膜是由 EPS 和微菌落共同组成, EPS 主要包括多糖、蛋白质、脂质以及细胞外 DNA 等; 微菌落是由包裹在 EPS 中的大量细菌组成。Ojha 等[3]研究发现, MTB 生物膜被包埋在富含脂质的 EPS 中, 其中含有丰富的分枝菌酸。Trivedi 等[16]研究发现, MTB 生物膜的 EPS 含有大量的多糖, 纤维素是 MTB 生物膜 EPS 中的关键多糖。

细菌生物膜具有高度复杂性, 其基本结构主要由多糖的成分和结构决定[13]。MTB 生物膜结构及相关功能涉及如下两个部分。

3.1. 孔隙、通道

生物膜是紧密结合、相互连接的三维立体结构, 产生的孔隙和通道用于分配重要的营养物质, 并从中除去生物膜微菌落中的代谢废物[17]。Trivedi 等[16]使用扫描电子显微镜(SEM)观察 MTB 生物膜的超微结构, 可知 MTB 生物膜是由大量的生物材料组成, 包括密集的孔隙和通道。产生的孔隙和通道促进营养物质在 MTB 生物膜中整个细菌群体的分布及扩散。

3.2. 厚度

生物膜厚度受微生物种类影响, 不同微菌落的生物膜厚度不同。影响 MTB 生物膜厚度原因主要有: 1) 生长代数: 随着 MTB 生长代数的增加, EPS 累积增多, MTB 生物膜的厚度也随之增加; 2) 表面活性剂: MTB 生物膜厚度受表面活性剂的影响。Trivedi 等[16]研究了在添加或没有添加吐温 80 的条件下 MTB 生物膜的生长情况, 实验表明在没有添加吐温 80 的条件下, MTB 生物膜就像一层薄薄的生物材料包裹着细菌细胞, 与添加吐温 80 的生物膜的厚度显著不同。

4. MTB 生物膜定量测定方法

生物膜通过多种体外模型进行定量测定, 其中最简单和最常用的方法是基于 96 孔板的静态模型[1] [18]。其定量测定原理可分为三类: 1) 生物膜生物量(biomass)测定(基于基质、活细胞和死细胞的定量); 2) 活力(viability)测定(基于活细胞的定量); 3) 基质定量测定(基于基质组分的特异性染色)。近年来, 用于生物膜定量测定方法主要有[19]: 结晶紫(CV)测定、XTT 测定、Syto9 测定、二乙酸荧光素(FDA)测定、刃天青测定和二甲基亚甲蓝测定等, 其中 MTB 生物膜定量测定实验中较为常用的方法有 CV 测定、XTT 测定以及刃天青测定等。

4.1. 结晶紫染色法(CV Assay)

Christensen 等[20]首先提出 CV 染色法, 经过不断改进以适用于所有生物膜的定量测定。CV 是一种

碱性染料, 可与细菌表面和生物膜细胞外基质上带负电分子结合, 然后用乙醇或醋酸洗脱后进行定量分析[19]。该方法用于定量生物膜的生物量, 其局限性是[21]: 1) 具有低重现性: 这与生物膜生长的实验条件、溶剂的具体性质和浓度、洗脱时间有关; 2) 活细胞和死亡细胞以及生物膜基质都会被 CV 染色, 不能测定活菌实际数量, 因此不适合评估抗菌物质的抗生物膜的效能。

Mothiba 等[22]将结晶紫测定法基于 96 孔板中进行, 待 MTB 生物膜形成后除去上清液, 并用蒸馏水将残留的生物膜洗涤并风干, 加入 1% CV 溶液并在室温下温育 30 分钟后, 用蒸馏水洗涤除去未结合的染料, 空气干燥后使用 70%乙醇提取剩余物中的 CV, 在 570 nm 处测量其吸光度值, 进行定量分析。Trivedi 等[16]将结晶紫测定基于 24 孔板中进行, MTB 生物膜形成后除去培养基, 加入 1% CV 溶液并温育, 除去 CV 溶液后, 用 95%乙醇提取 MTB 生物膜中的 CV, 温育后在 600 nm 处测量提取的 CV 的紫外吸收, 进行定量分析。

4.2. XTT 测定法(XTT Assay)

XTT 测定法是目前为止使用最多的生物膜定量测定方法之一。XTT 是一种四唑盐, 也是线粒体脱氢酶的底物, 可通过线粒体酶将其还原成水溶性橙色甲臞, 测量 492 nm 处的吸光度值显示细胞的代谢活性与甲臞产物成正比[23] [24] [25]。该方法用于细菌活力定量测定, 通过测量代谢减少的 XTT 吸光度推断生物膜中活细菌的数量[26]。该方法的局限性是与生物膜结构、成分的复杂性和异质性相关, 不同结构、成分的生物膜表现出不同的代谢物梯度, 成熟生物膜有减缓 XTT 的还原或部分保留甲臞释放的倾向[27]。

Trivedi 等[16]使用 XTT 测试经抗生素和抑制剂处理后的 MTB 生物膜内细菌生存活力, 通过在 490 nm 处吸光度值的改变来监测 XTT 的减少。

4.3. 刃天青测定法(Resazurin Assay)

蓝色非荧光刃天青也被称为阿拉玛蓝(Alamar Blue, AB), 是一种不会破坏活细胞的生物染料, 作为一种蓝色非荧光氧化还原指示剂, 它可以通过细胞膜并由线粒体作用来量化代谢活性, 从而将化合物还原成粉红色荧光试卤灵, 转化程度同时也是细胞活力的反映, 因此细胞呼吸水平与荧光水平相关[28]。该方法的局限性是[21]: 1) 容易受到细菌呼吸效率(Bacterial Respiratory Efficiency)的影响, 细菌呼吸效率又与生物膜的生长阶段、生长代数和厚度有关; 2) 由于刃天青还原的时间与菌种有关, 某些实验条件难以标准化; 3) 在抗菌化合物存在情况下, 刃天青还原能力降低, 因此降低了该方法在抗生物膜研究中的可靠性[29] [30] [31] [32]。

刃天青已被用于检测活微生物以及对生物膜中活细胞实际数量的定量分析。对 MTB 的定量测定已有相关文献, 但 MTB 生物膜的定量测定还未有详细记载。

5. 以 MTB 生物膜为靶点新型抗痨药物的研究思路

MTB 生物膜形成过程中受多种因素影响, 包括环境因素(营养成分、温度、渗透压、pH 值、铁离子浓度和氧化还原电位等)、化学因素以及基因调控等。MTB 生物膜形成对空气介质界面的气体环境很敏感。Ojha 等[3]将 MTB 于聚乙烯瓶中加盖培养, 通过气相色谱/质谱(GC/MS)分析表明, 二氧化碳的积累可能影响 MTB 生物膜的形成。铁在生物膜形成过程中起着核心作用[33], Ojha 等[3]研究 MTB 生物膜对铁的依赖性, 设计了 MTB 生物膜体外生长模型, 通过减少正常量的铁, 观察发现严重阻碍了 MTB 生物膜的生长。目前已知基因 *pks16* 和 *helY* 与 MTB 生物膜发育有关, 两种基因的突变体都不能形成成熟的生物膜, 但不影响浮游细菌的正常生长。Pang 等[34]研究发现, 聚酮合成酶基因 *pks1* 有助于 MTB 生物膜的形成。

目前正在开发防止生物膜形成的方法或针对已形成生物膜的细菌采取治疗措施, 主要集中在寻求抗粘附的界面和研究具有抑制细菌产生粘附的化合物两个方面[35] [36]。MTB 生物膜对抗结核药物的屏蔽作用与其物理完整性密切相关, 所以影响 MTB 生物膜形成或解离的因素可作为更快清除 MTB 的潜在靶点。大概总结为以下几点。

5.1. 纤维素

纤维素是 MTB 生物膜 EPS 的关键多糖, 并以微丝形式存在于 EPS 中, 在 MTB 生物膜的形成初始阶段, 纤维素为连接微菌落和招募浮游细菌起着重要作用。Trivedi 等[16]分别用脱氧核糖核酸酶 I、蛋白酶 K、脂肪酶、纤维素酶和 α -淀粉酶对 MTB 生物膜进行处理, 研究表明, 绿色木霉(*Trichoderma viride*) 中的纤维素和蛋白酶 K 将 MTB 生物膜分解成细菌悬浮液, 确定了纤维素是 MTB 生物膜形成的关键组分, 它的降解会导致 MTB 生物膜的破坏。

5.2. 分枝菌酸

MTB 生物膜 EPS 中富含丰富的分枝菌酸, 可以赋予生物膜细胞群落内聚力, 故分枝菌酸的合成与 MTB 生物膜的形成密切相关。Ojha 等[37]发现基因 GroEL1 在耻垢分枝杆菌生物膜形成过程中, 参与了分枝菌酸合成, 通过使基因 GroEL1 失活, 可以阻碍成熟生物膜的形成, 但不影响浮游细菌生长。MTB 编码与耻垢分枝杆菌相似的 GroEL1 蛋白, 由于已知 MTB 突变体在合成分枝菌酸过程中具有缺陷, 故推测 GroEL1 的突变可能会导致 MTB 毒力的衰减。分枝菌酸作为生物膜形成的重要组成部分, 抑制分枝菌酸的合成可影响生物膜的形成。Vilcheze 等[38]研究发现, 一线抗结核药物异烟肼以分枝菌酸合成中的必需基因 *InhA* 为主要靶点。

5.3. 细胞外聚合物

MTB 粘附于表面后, 通过基因调控, 产生大量的多糖、脂质等 EPS 包裹 MTB, 形成天然的屏障作用, 对抗结核药物产生高度耐药性, 其耐药性远远高于浮游细菌。不同的细菌、真菌和植物会分泌抗粘附的多糖或蛋白质, 从而减少生物膜的形成[4]。由于 EPS 中包含脂质, 使生物膜表面带负电荷。表面活性剂同为表面带有电荷的物质, 可能与带负电的生物膜相互作用, 影响 EPS 的结构和功能, 从而导致生物膜的瓦解。Xavier 等[39]发现多糖解聚酶、酯酶和 Dispersin B (DspB) 的促解离剂可能破坏 EPS。林丽华等[40]研究了大蒜素对铜绿假单胞菌菌株生物膜早期粘附及 EPS 的影响, 发现高浓度的大蒜素使 EPS 的形成明显降低, 从而抑制生物膜形成。

5.4. 群体感应

群体感应(Quorum Sensing, QS)是微生物细胞之间一种特殊信号。事实上, 群体感应过程协调生物膜形成机制, 当细菌附着于表面后, 它们通过 QS 相互沟通协调用于基因调控。许多细菌、植物和真菌可以分泌抗群体感应分子, 这些分子可以抑制病原体 QS 的产生[4]。例如红藻释放的卤代呋喃化合物以及人工合成的卤代呋喃酮衍生物都是很好的 QS 抑制剂[41]。

6. 小结

由于耐药菌的出现, 结核病至今仍是传染病中的头号杀手。MTB 生物膜的形成, 使 MTB 具有天然的保护屏障, 增强了 MTB 的耐药性, 并延长了结核病的治疗周期, 使结核病成为世界范围内的重大公共卫生问题, 以致迫切需要新的抗结核药物可以有效治疗结核病, 并缩短药物敏感结核病和耐药结核病的治疗时间。MTB 生物膜为新药研发提供一个新思路, 抑制 MTB 生物膜的形成, 可以有效提高结核病治

愈的可能性,同时,结核分枝杆菌生物膜可作为一种潜在的新药物靶点,促进目前在超短疗程中使用的抗结核抗生素的疗效,以缩短治疗时间。

基金项目

国家自然科学基金(NSFC 81460531); 国家自然科学基金(NSFC 81760629)。

参考文献

- [1] Coenye, T. and Nelis, H.J. (2010) *In Vitro* and *in Vivo* Model Systems to Study Microbial Biofilm Formation. *Journal of Microbiological Methods*, **83**, 89-105. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.08.018>
- [2] Hall-Stoodley, L. and Lappin-Scott, H. (1998) Biofilm Formation by the Rapidly Growing Mycobacterial Species *Mycobacterium fortuitum*. *FEMS Microbiology Letters*, **168**, 77-84. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13258.x>
- [3] Ojha, A.K., Baughn, A.D., Sambandan, D., *et al.* (2008) Growth of *Mycobacterium tuberculosis* Biofilms Containing Free Mycolic Acids and Harboring Drug-Tolerant Bacteria. *Molecular Microbiology*, **69**, 164-174. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06274.x>
- [4] Jahid, I.K. and Ha, S.-D. (2012) A Review of Microbial Biofilms of Produce: Future Challenge to Food Safety. *Food Science and Biotechnology*, **21**, 299-316. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0041-1>
- [5] Kumara, A., Alama, A., Rani, M., *et al.* (2017) Biofilms: Survival and Defense Strategy for Pathogens. *Journal of Medical Microbiology*, **307**, 481-489. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.09.016>
- [6] Islam, M.S., Richards, J.P. and Ojha, A.K. (2012) Targeting Drug Tolerance in Mycobacteria: A Perspective from Mycobacterial Biofilms. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, **10**, 1055-1066. <https://doi.org/10.1586/eri.12.88>
- [7] Ukuku, D.O. and Fett, W.F. (2002) Relationship of Cell Surface Charge and Hydrophobicity to Strength of Attachment of Bacteria to Cantaloupe Rind. *Journal of Food Protection*, **65**, 1093-1099. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.7.1093>
- [8] Ogasawara, H., Yamamoto, K. and Ishihama, A. (2011) Role of the Biofilm Master Regulator CsgD in Cross-Regulation between Biofilm Formation and Flagellar Synthesis. *Journal of Bacteriology*, **193**, 2587-2597. <https://doi.org/10.1128/JB.01468-10>
- [9] Costerton, J.W., Stewart, P.S. and Greenberg, E.P. (1999) Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*, **284**, 1318-1321. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- [10] Mckenney, D., Hubner, J., Muller, E., *et al.* (1998) Theica Locus of *Staphylococcus epidermidis* Encodes Production of the Capsular Polysaccharide/Adhesin. *Infection and Immunity*, **66**, 4711-4720.
- [11] Stewart, P.S., McFeters, G.A. and Huang, C.T. (2000) Biofilm Control by Antimicrobial Agents. In: Bryers, J.D., (Ed.), *Biofilms*, 2nd edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, 373-405.
- [12] Stoodley, P., DeBeer, D. and Lewandowski, Z. (1994) Liquid flow in Biofilm Systems. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**, 2711-2716.
- [13] Vasudevan, R. (2014) Biofilms: Microbial Cities of Scientific Significance. *Journal of Microbiology and Experimentation*, **1**, 1-16. <https://doi.org/10.15406/jmen.2014.01.00014>
- [14] Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., *et al.* (1998) The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Science*, **280**, 295-298. <https://doi.org/10.1126/science.280.5361.295>
- [15] Sutherland, I.W. (1999) Polysaccharases for Microbial Exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, **38**, 319-328. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(98\)00114-3](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00114-3)
- [16] Trivedi, A., Mavi, P.S., Bhatt, D., *et al.* (2016) Thiol Reductive Stress Induces Cellulose-Anchored Biofilm Formation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Communications*, **7**, Article No. 11392. <https://doi.org/10.1038/ncomms11392>
- [17] Sun, D., Accavitti, M.A. and Bryers, J.D. (2005) Inhibition of Biofilm Formation by Monoclonal Antibodies against *Staphylococcus epidermidis* RP62A Accumulation-Associated Protein. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **12**, 93-100.
- [18] Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., *et al.* (2007) Quantification of Biofilm in Microtiter Plates: Overview of Testing Conditions and Practical Recommendations for Assessment of Biofilm Production by Staphylococci. *APMIS*, **115**, 891-899. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
- [19] Peeters, E., Nelis, H.J. and Coenye, T. (2008) Comparison of Multiple Methods for Quantification of Microbial Biofilms Grown in Microtiter Plates. *Journal of Microbiological Methods*, **72**, 157-165. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.11.010>
- [20] Christensen, G.D., Simpson, W., Younger, J., *et al.* (1985) Adherence of Coagulase-Negative Staphylococci to Plastic

- Tissue Culture Plates: A Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices. *Journal of Clinical Microbiology*, **22**, 996-1006.
- [21] Pantanella, F., Valenti, P., Natalizi, T., *et al.* (2013) Analytical Techniques to Study Microbial Biofilm on Abiotic Surfaces: Pros and Cons of the Main Techniques Currently in Use. *Ann Ig*, **25**, 31-42.
- [22] Mothiba, M.T., Anderson, R., Fourie, B., *et al.* (2015) Effects of Clofazimine on Planktonic and Biofilm Growth of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, **3**, 13-18. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2014.12.001>
- [23] Gabrielson, J., Hart, M., Jarelöv, A., *et al.* (2002) Evaluation of Redox Indicators and the Use of Digital Scanners and Spectrophotometer for Quantification of Microbial Growth in Microplates. *Journal of Microbiological Methods*, **50**, 63-73. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00011-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00011-8)
- [24] Ginouves, M., Carne, B., Couppie, P., *et al.* (2014) Comparison of Tetrazolium Salt Assays for Evaluation of Drug Activity against *Leishmania* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, **52**, 2131-2138. <https://doi.org/10.1128/JCM.00201-14>
- [25] Xu, Z., Liang, Y., Lin, S., *et al.* (2016) Crystal Violet and XTT Assays on *Staphylococcus aureus* Biofilm Quantification. *Current Microbiology*, **73**, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1081-1>
- [26] Adam, B., Baillie, G.S. and Douglas, L.J. (2002) Mixed Species Biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Medical Microbiology*, **51**, 344-349. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-51-4-344>
- [27] Honraet, K., Goetghebeur, E. and Nelis, H.J. (2005) Comparison of Three Assays for the Quantification of *Candida* Biomass in Suspension and CDC Reactor Grown Biofilms. *Journal of Microbiological Methods*, **63**, 287-295. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.03.014>
- [28] Pettit, R.K., Weber, C.A., Kean, M.J., *et al.* (2005) Microplate Alamar Blue Assay for *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Susceptibility Testing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49**, 2612-2617. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.2612-2617.2005>
- [29] Mariscal, A., Lopez-Gigosos, R.M., Carnero-Varo, M., *et al.* (2009) Fluorescent Assay Based on Resazurin for Detection of Activity of Disinfectants against Bacterial Biofilm. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **82**, 773. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1879-x>
- [30] Sandberg, M.E., Schellmann, D., Brunhofer, G., *et al.* (2009) Pros and Cons of Using Resazurin Staining for Quantification of Viable *Staphylococcus aureus* Biofilms in a Screening Assay. *Journal of Microbiological Methods*, **78**, 104-106. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.04.014>
- [31] O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., *et al.* (2000) Investigation of the Alamar Blue (Resazurin) Fluorescent Dye for the Assessment of Mammalian Cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, **267**, 5421-5426. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>
- [32] Skogman, M.E., Vuorela, P.M. and Fallarero, A. (2012) Combining Biofilm Matrix Measurements with Biomass and Viability Assays in Susceptibility Assessments of Antimicrobials against *Staphylococcus aureus* Biofilms. *The Journal of Antibiotics*, **65**, 453-459. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.49>
- [33] Banin, E., Vasil, M.L. and Greenberg, E.P. (2005) Iron and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, **102**, 11076-11081. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504266102>
- [34] Pang, J.M., Layre, E., Sweet, L., *et al.* (2012) The polyketide PksI contributes to biofilm formation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, **194**, 715-721. <https://doi.org/10.1128/JB.06304-11>
- [35] Renner, L.D. and Weibel, D.B. (2011) Physicochemical Regulation of Biofilm Formation. *MRS Bulletin*, **36**, 347-355. <https://doi.org/10.1557/mrs.2011.65>
- [36] Cegelski, L., Pinkner, J.S., Hammer, N.D., *et al.* (2009) Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation. *Nature Chemical Biology*, **5**, 913-919. <https://doi.org/10.1038/nchembio.242>
- [37] Ojha, A.K., Anand, M., Bhatt, A., *et al.* (2005) GroEL1: A dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in *Mycobacteria*. *Cell*, **123**, 861-873. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.012>
- [38] Vilch ze, C., Wang, F., Arai, M., *et al.* (2006) Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis* inhA resolves the target of isoniazid. *Nature Medicine*, **12**, 1027-1029. <https://doi.org/10.1038/nm1466>
- [39] Xavier, J.B., Picioreanu, C., Rani, S.A., *et al.* (2005) Biofilm-control strategies based on enzymic disruption of the extracellular polymeric substance matrix—A modelling study. *Microbiology*, **151**, 3817-3832. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28165-0>
- [40] 林丽华, 余加林, 林雅茵, 等. 大蒜素对铜绿假单胞细胞生物膜早期粘附及胞外多糖的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2009, 21(1): 9-12.
- [41] 段高飞, 韩峰, 李京宝, 等. 细菌生物膜相关感染的防治方法研究进展[J]. 中国海洋大学学报, 2010, 40(5): 107-111.

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2331-8287，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：hjmce@hanspub.org