

变形链球菌生物膜生长的 QCM-D 原位动态研究*

高小丽¹, 祁媛媛², 韦晓兰³

(1. 重庆化工职业学院 制药工程系, 重庆 400020; 2. 重庆工商大学 计算机科学与信息工程学院;

3. 重庆工商大学 环境与资源学院, 重庆 400067)

摘要:细菌生物膜(Bacteria bio-films, BBF)会在各种表面引起腐蚀、环境污染、难治性感染以及传染病的爆发。采用耗散型石英晶体微天平(Quartz crystal microbalance with dissipation, QCM-D)技术,实时、无损地实现对变形链球菌(*Streptococcus mutans*)的 BBF 生长的原位动态研究。利用持续流生物膜发生方法,通过 QCM-D 获取 BBF 生长的动态信息,包括由频率(f)变化获得 BBF 生长动力学信息、由能耗因子(D)变化获得 BBF 粘弹性质变化、由 D/f 获得 BBF 结构与性质即 BBF 生长成熟的实时信息等。研究结果为研究和控制 BBF 生长提供了理论依据。

关键词:QCM-D; 变形链球菌; 细菌生物膜; 原位监测

中图分类号:Q819

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2016)06-0127-04

近些年来,科学家们发现细菌不仅可以游离生长,更多的情况下还会聚集成膜在各种表面上生长。例如,细菌可以在皮肤、牙齿、肺等人体组织器官的生物表面形成生物膜^[1],引起诸如牙周病、龋齿、慢性支气管炎、难治性肺部感染等疾病^[2];细菌也可以在隐形眼镜、人工关节、心脏人工瓣膜等安装于人体内的人工医疗装置的非生物表面上形成生物膜;细菌还可以在通风设备、自来水管、食品加工设备等与人类生活相关的设施表面形成生物膜,由此造成腐蚀、食品污染和传染病的流行^[3]。研究表明,细菌生物膜(Bacteria bio-film, BBF)一旦形成,便具有很强的抵抗机体免疫和抗生素的能力,比游走态细菌的抗药性高出千百倍。有鉴于此,对 BBF 的研究在国内外越来越得到关注,在 BBF 生长、组织结构、粘弹性质等方面的动力学研究更是其中的重点,相关研究有望为控制 BBF 的相关感染和加速对它的有效清除^[4]提供理论指导。

目前,研究 BBF 的方法主要是将人工生物膜发生装置和显微镜、染色、荧光等技术结合^[5],对生物膜进行菌体数量以及生物膜的物质分布、形态、结构等信息的分析。这些研究方法只能提供微生物样本在单一的时间点细菌克隆的数量,或 BBF 的形态特征,无法实现实验样本的动态检测,更无法获取其中的动力学信息。因此,对 BBF 的研究急需信息富集率更高的工具,可以进行实时、原位和无损的测量,并可以获得生物膜形成以及结构特征的动力学信息。为此,耗散型石英晶体微天平(Quartz crystal microbalance with dissipation, QCM-D)技术^[6]应运而生。QCM-D 可记录耗散因子变化,表征与表面相互作用的吸附层的结构性质及发展变化信息,如粘弹性质和聚合^[7]、胶束双分子层、折叠、吸附、脱附等过程变化,甚至能感知到蛋白质^[8]与不同结构 DNA^[9]结合后的细微变化。它能够检测石英晶体表面上的物质在质量、密度、粘度、厚度、弹性模量、构象等方面的变化,能够进行反应动力学模拟。目前, QCM-D 技术已经被应用到活体细胞表面黏附过程的检测^[10],特别是细菌细胞的研究^[11],提供细菌与表面结合的性质特点以及后续的生长和发展,即有关 BBF 的研究^[12-13],它对频率(f)和能耗因子(D)的结合测量为生物膜的形成过程、生物质量以及结构性质的变化提供了新的视角。为此,本研究以变形链球菌(*Streptococcus mutans*)为研究对象,采用 QCM-D 技术研究了 BBF 的生长过程,分析由 f 变化和 D 变化而获得的 BBF 生长动力学和粘弹性质等信息,为研究和控制 BBF 生长提供了理论依据。

1 实验部分

1.1 细菌培养及生长密度测定

供试菌种为 *S. mutans* UA159 细菌(ATCC # 6715),在 37 °C、CO₂ 体积分数为 5% 的培养箱中培养,培养

* 收稿日期:2016-05-12 修回日期:2016-07-30 网络出版时间:2016-11-02 13:34

资助项目:重庆市自然科学基金(No. cstc2012jjA10151)

作者简介:高小丽,女,讲师,研究方向为生物传感器,E-mail:15088504@qq.com

网络出版地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20161102.1334.059.html>

液为 THB(Todd Hewitt Broth, Sigma 公司)。该菌种的 BBF 培养基质是由 THYE(THB+酵母提取物)以及浓度为 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的蔗糖构成。培养细菌的试剂和材料均购自 Sigma 公司。细菌接种后过夜培养至对数生长期,用密度仪(Unico 1200, Products of united, Products and instrument Inc.)在 600 nm 波长处测定细菌悬浮液密度,此为储备液;再用 BBF 培养基质稀释至 OD_{600} 值为 0.01 。

1.2 QCM-D 系统

QCM-D 采用 Q-Sense(Q-Sense E4, Biolin Scientific AB, Sweden),蠕动泵、微流控传输导管均购自同一公司。基频为 5 MHz 的传感晶体放置于可调控温度的 $40 \mu\text{L}$ 的测量室,基本参数通过 Qsoft 401 获得,使用 Q-Tools 2.0 分析数据。

1.3 BBF 持续流方式发生和生长的动态研究

在对带阀的三通装置提前进行了 6 h 的 95% 乙醇- 75% 乙醇-无菌水的消毒和清洗处理后,将水、BBF 培养基质、细菌悬液依次输入该装置。首先打开水阀让水通过测量室至少 30 min 直至 QCM-D 的信号稳定,此时 f 和 D 的变化分别在 $\pm 5 \text{ Hz}$ 和 2×10^{-6} 水平上,关闭水阀;接着开通 BBF 培养基质,运行至少 30 min ,直至信号稳定,关闭培养液阀;再开通细菌悬液运行 120 min 然后关闭,再开通培养液流通测量室过夜,直至 24 h 后关闭;最后打开水阀流通 120 min ,直至信号稳定,其中流速恒定,约 $20 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$,液流持续,从不间断(图 1)。

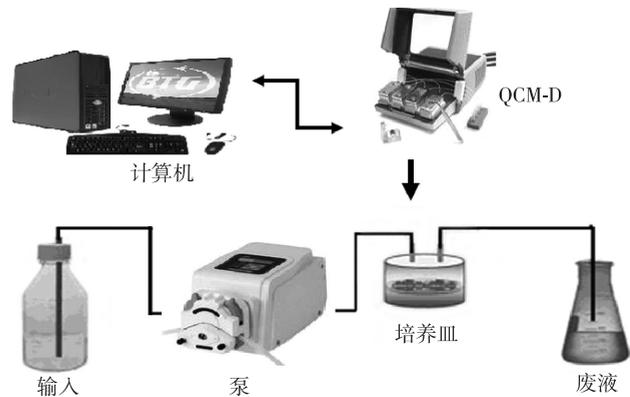


图 1 QCM-D 动态监测 BBF 装置

Fig. 1 Device of dynamic monitoring of BBF by QCM-D

2 结果

2.1 BBF 生长的 QCM-D 研究

采用持续流的生物膜发生方式,用 QCM-D 对 *S. mutans* UA159 的 24 h 生长过程进行研究,检测结果如图 2 所示。由图 2 可知,当溶液体系由水转换到培养液时, f 有 -20 Hz 的变化,相应的 D 也增加了 5×10^{-6} ,时长为 30 min ,这可能是由于培养液中的蛋白质、肽等物质吸附在晶体表面所致。接着由于细菌细胞进入测量室,到达晶体表面负载, f 和 D 在 $4 \sim 6 \text{ h}$ 内分别有 $150 \sim 200 \text{ Hz}$ 的下降和 280×10^{-6} 的升高, D 几乎达到一个最大值,然后 f 进入了一个变化缓慢的相对稳定期。这可能是由于微菌落已经形成,生物量的负载基本完成,BBF 开始进行结构的发展和成熟阶段;故 f 由于功能层的密度变化和调整继续下降至最后达到稳定,而 D 则出现略微的下降直至稳定。当体系的溶液又转换成水时, f 出现了小幅上升,同时 D 则出现相应的少量下降,直至再次稳定。

2.2 BBF 生长周期与 QCM-D 信号响应

随着 BBF 的生长的进行,QCM-D 的信号上也看到了类似的响应(图 2)。第一阶段为细菌细胞的可逆的黏附期。此时细菌细胞由于重力作用黏附在压电晶体的表面,但还会不时地重回悬浮状态,细胞密度较小,从显微镜照片也出现了这样的特点。第二阶段为细胞的不可逆黏附期即黏性基质(Extracellular polysaccharides, EPS)分泌期。在这个阶段细胞可分泌 EPS,使细胞大量黏附于晶体表面,且是不可逆的黏附。第三阶段是微菌落的形成阶段。在这个阶段,微菌落逐渐形成并成熟,细菌细胞开始进行生物膜发展与成熟的准备。第四阶段为 BBF 的形成阶段。此时 BBF 逐渐调节自身的结构和组成,使功能层的密度发生改变,而粘弹性质由于生物量的增大而有所下降并最终达到稳定状态。

2.3 BBF 的 D/f 的响应

D/f 反映了单位 f 变化所引起的粘弹性质的变化,即 f 与 D 两者变化速率的比较。将 D/f 与时间的关系绘制成图,其中的结果与前文的分析一致(图 3)。在 BBF 生长的第一和第二阶段,由于细胞大量的黏附与生长,于是功能层的生物量和粘弹性质都有大副的增加,于是 D/f 呈现快速上升的趋势。在进入第三阶段即微菌落的形成与发展阶段后,由于功能层只是进行结构和密度的调整, f 以缓慢的速度持续下降,而 D 则出现小幅下降,

于是 D/f 在这样的双重变化下降低。在第四阶段, BBF 形成并逐渐成熟, 故 D 和 f 都趋于稳定, D/f 也逐渐达到了一个稳定的平台期。

3 讨论

当前, QCM-D 已经成为研究细胞黏附, 特别是细菌黏附、生长、发展以至成膜过程的一个灵敏表面技术。由于 BBF 具有非均匀性、厚度大等复杂特点, 故本研究把焦点放在研究细菌的最初黏附阶段; 且特别关注后期在 BBF 的

形成过程中, 由于 EPS 的分泌所导致的细胞与晶体表面相互作用的产生以及膜的密度、结构和粘弹性质的变化情况; 同时也注重对 BBF 生长速率变化等动力学信息的获取。与纯培养液相比较, 变形链球菌的存在使 f 和 D 产生了明显变化, 这是由于在 BBF 的形成过程中细菌细胞的黏附引起的。经过过夜检测, f 和 D 继续变化证明黏附细菌的增殖, 从图 3 的图像中也可以证明。随着细胞的黏附和增殖, 能量在不断损耗; 变形链球菌在形成生物膜的过程中, 也会产生由黏性多糖和 97% 的水组成的 EPS; 所以加入变形链球菌后 D 的增加反映了 EPS 的产生, 同时也证明了细胞的存在和生物膜的发展。

f 和 D 的变化反映出细菌黏附和增殖过程中的动力学信息, 这对膜的形成也十分重要; 特别是最后转换到水相时 f 上升, 则可能因为一些结合不牢固的物质被洗掉, 从而导致与晶体结合的负载密度、粘弹性质等发生了相应的微小变化。 D/f 与时间的关系则反映了黏附细胞的变化。 D/f 在微菌落形成时到达峰值, 这可能反映了一个稳定状态的出现。鉴于 QCM-D 可同时检测 f 和 D , 实时动态监测生物膜的形成, 探知生物膜的柔性和潜在的形态结构特点, 也可以反映与粘弹性质有关的生物质量信息, 因而该技术提供了一种持续、动态、无损的 BBF 检测方法, 也为研究和控制 BBF 生长提供了理论依据。

参考文献:

[1] Archer N K, Mazaitis M J, Costerton J W, et al. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation and roles in human disease[J]. Virulence, 2010, 2(2): 445-459.
 [2] Seddiki S M, Boucherit O Z, Boucherit K, et al. Assessment

of the types of catheter infectivity caused by *Candida* species and their biofilm formation: first study in an intensive care unit in Algeria[J]. International Journal of General Medicine, 2013, 6: 1-7.

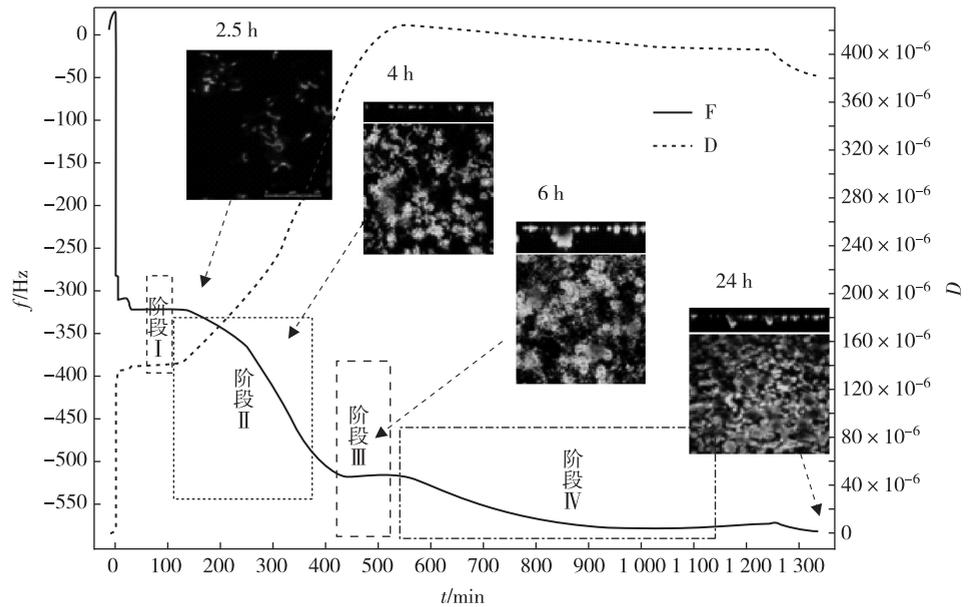


图 2 BBF 生长的 QCM-D 原位动态监测

Fig. 2 QCM-D in-situ dynamic monitoring of BBF growth

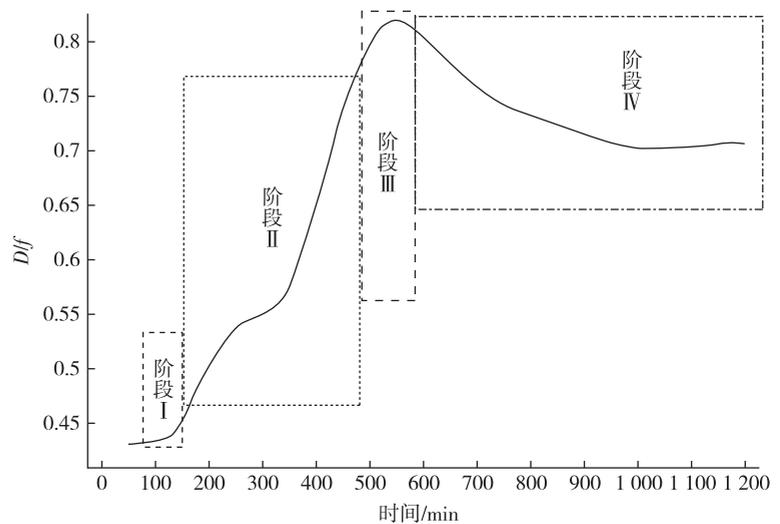


图 3 D/f 在 BBF 生长过程中随时间的变化

Fig. 3 The change of D/f during BBF cell growth over time

- [3] Williams M, Armbruster C R, Arduino M J, et al. Plumbing of hospital premise is a reservoir for opportunistically pathogenic microorganism[J]. *Biofouling*, 2013(29):147-162.
- [4] Garnett J A, Matthews S. Interactions in bacteria biofilm development: a structural perspective[J]. *Current Protein & Peptide Science*, 2012, 13(8):739-755.
- [5] Da S B, De Freitas V A, Carneiro V A, et al. Antimicrobial activity of the synthetic peptide Lys-alagaint against oral streptococci[J]. *Peptides*, 2013, 42(4):364-371.
- [6] Michael S, Electra G. Acoustic sensors as a biophysical tool for probing cell attachment and cell/surface interactions [J]. *Cellular & Molecular Life Sciences*, 2012, 69(3):357-371.
- [7] Baranova N S, Nilebác K E, Haller F M, et al. The inflammation associated protein TSG-6 cross-links hyaluronan via hyaluronan induced TSG-6 oligomers[J]. *Journal of Biological Chemistry*. 2011, 286(29):25675-25686.
- [8] Jennifer Y C, Ammar S, Marcela P G, et al. Dissipation monitoring for assessing EGF-induced changes of cell adhesion [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2012, 38(1):375-381.
- [9] Xi J, Chen J Y. Quartz crystal microbalance in cell biology studies[J]. *Biochip Tissue Chip*, 2013(S5):1-9.
- [10] Matthew C D. Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring: enabling real-time characterization of biological materials and their interactions[J]. *Journal of Biomolecular Techniques*, 2008, 19(3):151-158.
- [11] Adam L J, Olsson C, Henk J, et al. Novel analysis of bacterium substratum bond maturation measured using a quartz crystal microbalance[J]. *Langmuir*, 2010, 26(13):11113-11117.
- [12] Tam K, Kinsinger N, Ayala P, et al. Real-time monitoring of *Streptococcus mutans* biofilm formation using a quartz crystal microbalance[J]. *Caries Research*, 2007, 41(6):474-483.
- [13] Vanoyan N, Walker S L, Gillor O, et al. Reduced bacterial deposition and attachment by quorum-sensing inhibitor 4-nitro-pyridine-N-oxide: the role of physicochemical effects [J]. *Langmuir*, 2010, 26(14):12089-12094.

***In-situ* Dynamic Study on Bacterial Bio-film Growth of *Streptococcus mutans* Using QCM-D**

GAO Xiaoli¹, QI Yuanyuan², WEI Xiaolan³

(1. Department of Pharmaceutical Engineering, Chongqing Chemical Industry Vocational College, Chongqing 400020;

2. School of Computer Science and Information Engineering, Chongqing Technology & Business University;

3. School of Environment and Resource, Chongqing Technology & Business University, Chongqing 400067, China)

Abstract: The bacterial bio-film (BBF) would cause erosion of all kinds of surface, pollution to environment, infection difficult to cure and outbreak of infectious disease. The study on bacterial bio-film of *Streptococcus mutans* can be done in real-time nondestructively for 24 h using quartz crystal microbalance with dissipation, QCM-D. Results: By the continuous flow method to product BBF, we get dynamic information of BBF growth including the change in mechanic properties through the shift of frequency (f), the change in visco-elastic properties through the shift of dissipation (D) and the construction nature through D/f . These results provide the theoretic foundation of the study on inhibition and clearance of BBF.

Key words: QCM-D; *Streptococcus mutans*; BBFs; *in-situ* monitoring

(责任编辑 方 兴)