

# 基于 QCM-D 技术的细菌生物膜研究\*

韦晓兰\*

(重庆工商大学 环境与生物工程学院, 重庆 400067)

**摘要:**近年来,耗散型石英晶体微天平(QCM-D)技术已经广泛用于细胞黏附行为的实时动态监测与研究,细菌生物膜(BBF)因其在临床治疗、食品工业、船体腐蚀和水环境污染等诸多领域给人类社会带来严重危害,造成巨大经济损失而备受关注。文章综述了近3年来将QCM-D技术应用于BBF研究的最新进展,主要包括BBF形成过程的动态监测与动力学信息分析;BBF形成过程的影响因素与生长参数研究;与其他分析技术结合,对BBF形成过程与性质的定性定量研究等。该研究可以进行动态、无损、实时的BBF生长研究,特别是进行BBF的生长动力学分析,但对于量化分析还需结合其他技术手段。

**关键词:**耗散型石英晶体微天平;细菌生物膜;进展

**中图分类号:**Q819

**文献标志码:**A

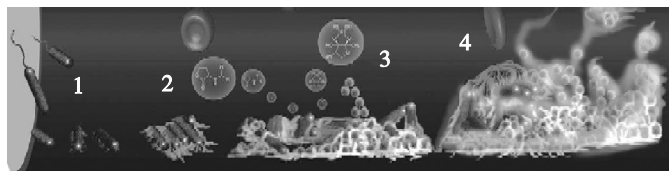
**文章编号:**1672-6693(2014)04-0136-05

## 1 背景介绍

### 1.1 细菌生物膜

细菌生物膜(Bacteria Bio-Film, BBF),是指附着于有生命或无生命物体表面的有组织的细菌群体。其利用胞外基质(Extracellular Polymeric Substances, EPS)<sup>[1]</sup>,结合群体内部良好的营养传输方式,使得BBF具有很强的抵抗机体免疫和抗生素的能力,与浮游细菌相比,其抗性可提高10~1000倍。因此,BBF是细菌适应生存环境而形成的与游离态细胞相对应的存在形式。现在已知,细菌可在人体组织如牙齿、牙龈、皮肤、肺、尿道及其他器官的表面形成生物膜,引起诸如牙周病、龋齿、慢性支气管炎、败血症、血栓性静脉炎、难治性肺部感染和内膜炎等疾病<sup>[2]</sup>。细菌还可在人体内人工医疗装置(如隐形眼镜、人工关节和心脏人工瓣膜)等无生命物体的表面形成生物膜<sup>[3]</sup>。此外,生物膜细菌还可污染与人类生活相关的设施,如空调系统、供水系统<sup>[4]</sup>和食品加工<sup>[5]</sup>设备等,由此造成传染病的流行。总之,BBF因其在医疗、食品、工业、军事和环境等诸多领域给人类社会带来严重危害,造成巨大经济损失而备受关注。

自20世纪80年代中期发现单核细胞增生李斯特菌<sup>[6]</sup>能粘着在不锈钢表面形成生物膜以来,从提出细菌生物膜的概念到被证实,直至现在受到重视,不足20年,国内外越来越多的学者开始从事BBF研究,以期了解BBF形成的分子机制、生理生化特点及其调控机理,以及相关EPS的组成、黏附及其影响因素<sup>[7]</sup>等(图1),目的是控制BBF的相关感染和加速其有效清除<sup>[8]</sup>。目前,关于BBF的研究方法主要集中在表面载体支持的人工生物膜发生装置,如微孔板、平板膜片和旋碟



1. 最初的黏附;2. 不可逆的黏附;3. 微菌落的产生;4. 生物膜的形成

图1 BBF的形成<sup>[20]</sup>

等,与显微镜、染色以及荧光等分析技术结合,对生物膜进行菌体数量、生物膜的生物量、形态、结构等信息的分析。这些研究方法简单方便,灵活快捷,可以直观地比较细菌生物膜的生长状况,甚至可以进行批处理,至今仍在实验室被广泛应用。如Silva B R等<sup>[9]</sup>利用微孔板验证合成肽分子Lys-a1对口腔内的Streptococcus系列菌株生物膜形成过程中的抑制情况等,但是随着生物膜研究的深入,发现大多数的研究方法是利用微生物样本和显微图象,微生物样本实验只在单一的时间点提供细菌克隆的数量,显微图象只提供BBF的形态特征,且需要特

\* 收稿日期:2013-10-17 修回日期:2014-01-03 网络出版时间:2014-7-3 23:03

资助项目:国家自然科学基金(No. 31070830);重庆市自然科学基金(No. CSTC2012jjA1501)

作者简介:韦晓兰,女,副教授,研究方向为细胞传感器,E-mail: weishine@ctbu.edu.cn

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20140703.2303.027.html>

殊的观察装置和特定的实验距离,无法实现动态检测,更不用说获取动力学信息了。因此 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变化的动力学信息,同时可以量化生物膜的重要参数,如粘弹性性质、剪切模量、黏附强度、生物密度等,耗散型石英晶体微天平(Quartz Crystal Microbalance-Dissipation, QCM-D)技术应运而生。

## 1.2 关于 QCM-D

传统的 QCM 已经使用近 50 年,它分析刚性表面的质量改变,质量负载与谐振晶体的频率变化,其相关性符合 Sauerbrey<sup>[10]</sup> 方程,但此方程对刚性、均匀分散和薄的吸附层有效,对于柔软或具有粘弹性质的膜,由于不能完全耦合谐振晶体, Sauerbrey 方程会明显低估实际质量,且无法提供粘弹性吸附层性质的信息。QCM-D 既继承了常规 QCM 的在线实时、无需标记、操作简单、灵敏度高优点,还增加耗散因子(Dissipation factor)的检测功能,通过记录耗散因子,可以知道吸附在表面的是粘性很大的软质膜,还是刚性结构,因此可以反映更多的结构信息如膨胀、聚合、胶束双分子层、折叠、吸附和脱附等的动力学特性,从而感知在不同材料表面上发生的质量及结构等方面的细微变化,能够检测材料表面物质的质量、厚度、密度、粘度、弹性模量、耗散因子、构象变化,同时能够进行反应动力学模拟。目前, QCM-D 已经被用来研究聚合物的聚合过程<sup>[11]</sup>、药物分子的开发<sup>[12,13]</sup>、纳米材料<sup>[14]</sup>、以及细胞黏附过程<sup>[15]</sup>,特别是针对细菌细胞的表面黏附过程<sup>[16]</sup>,能够提供细菌与表面结合的性质特点,以及与不同表面的相互作用、BBF 的抑制情况<sup>[17,18]</sup>等。频率和能耗的结合测量,为生物膜的研究,特别是动态、无损地进行表面相互作用的动力学信息的分析,如剪切模量、粘弹性质等提供了新的视角。

## 2 QCM-D 技术应用于 BBF 的研究进展

作为相对新的研究方向, QCM-D 技术应用于 BBF 的研究主要包括以下几个方面: BBF 形成过程的动态监测与动力学信息分析; BBF 形成过程的影响因素与生长参数研究; 与其他分析技术结合,对 BBF 形成过程与性质的定性定量研究等。

### 2.1 BBF 形成过程的动态研究与动力学信息分析

目前,学者们普遍认为 BBF 形成过程包括 3 个阶段<sup>[19]</sup>,细菌的起始粘附阶段,即细菌对宿主表面的粘附; BBF 的发展阶段,即细菌粘附到表面后,调整其基因表达,在生长繁殖的同时分泌大量 EPS。EPS 粘结单个细菌而形成微菌落(microcolony)的阶段; BBF 的成熟阶段,即形成高度有组织的结构,它是由类似蘑菇形状的微菌落组成的,在这些微菌落之间围绕着输水通道,可以运送养料、酶、代谢产物和排出废物等。也有的研究者认为 BBF 形成过程分为 5 个阶段<sup>[20]</sup>,即细菌细胞的可逆黏附阶段;分泌 EPS,完成细菌细胞的不可逆黏附阶段;细菌细胞的生长繁殖,形成微菌落阶段;微菌体形成三维结构, BBF 的形成阶段;以及一些细菌细胞从 BBF 中脱出迁移至液体环境中的第五阶段。由于细菌生长过程中细胞的黏附作用,即表面相互作用的存在,研究者们尝试使用 QCM-D 技术实时动态研究 BBF 的形成过程,已经成功用于 *E. coli*, *S. mutans*, *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *P. putida* 和 *B. subtilis*<sup>[21]</sup> 等细菌的黏附以及它们生长发展形成 BBF 的过程(图 2)。

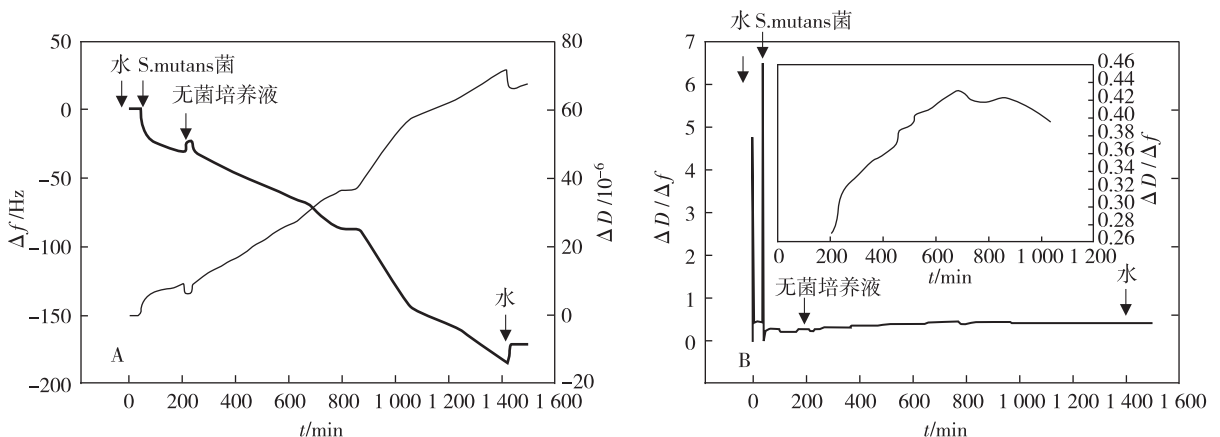


图 2 基于 QCM-D 技术的 BBF 形成过程研究<sup>[22]</sup>

Adam L<sup>[21]</sup>等利用 QCM-D 技术实时动态研究 BBF 的形成过程获得的结果如图 2 所示,对于基本参数谐振频率  $f$ ,由于细菌细胞的生长、繁殖和成膜的发展过程发生而不断下降,说明表面负载生物量的增加;但是由于 BBF 生长液相体系的复杂性,如表面功能层的厚度远大于晶体的响应深度,以至于剪切波不能穿透,进入溶液

中,故溶液的影响可以忽略不计。则  $f$  的下降是固化水层和膜负载联合贡献的结果,符合何建安等建立的此种条件下的数学模型<sup>[23]</sup>。

而表征晶体表面粘弹性质的耗散因子  $D$ ,则是不断增大,说明在 BBF 的形成过程中,膜的结构逐渐形成、发展和成熟,粘弹性质逐渐增强;而表征晶体表面负载结构性质的特征参数  $D/f$ ,也是研究者们经常分析的对象,如图 2 右,它反映的是单位频率变化所产生的粘弹性质的改变,粘弹性质的改变速率是先逐渐增大后又逐渐减小,反映的是随着细菌细胞的黏附和 BBF 的逐渐形成,膜的结构和粘弹性质逐渐成熟和增强,到了 BBF 形成的第四和第五阶段,BBF 继续调整其结构,使得膜结构成熟并趋于稳定,由于膜结构的调整,负载层的膜密度发生改变,所以我们看到谐振频率  $f$  继续下降,即  $D/f$  数值继续减小。

作者实验室所做的结果与其类似,不同的是  $D/f$  减小后期有明显的稳定趋势,即粘弹结构逐渐稳定。根据该体系的使用模型,如果可以根据其他手段获取膜的密度,我们便可以获得剪切模量、黏性等力学数据,但由于该模型还不够完美,过于复杂,使目前的研究只能实现定性和半定量的结果。

## 2.2 BBF 形成过程的生长参数与影响因素研究

应用 QCM-D 技术研究 BBF,研究者们还探索了一些生长参数的变化对 BBF 形成过程的影响,如不同生物膜发生方法、温度、蔗糖浓度、流体速度和表面修饰等条件对 BBF 形成的延迟期、倍增时间和生物量的影响等,以获得更丰富的细菌黏附和 BBF 形成的条件和影响因子信息。

Adam L 等使用这种体系比较了 2 种不同生物膜的发生方法,即持续流和黏附流发生方法,对 BBF 形成的 QCM-D 响应信号的影响。持续流的发生方法是利用带阀的三通装置,进行水、纯培养液和细菌悬液的输入,流速恒定、液流持续、从不间断,该方法没有静止的黏附期,晶体室内的液体一直处于流动状态,由于流速较低,所以有着比较低的剪切力,细菌的黏附与 BBF 的形成一直处于这种流体环境。与持续流方法不同,黏附流方法是在运行细菌悬液的阶段,将指数生长期的细菌悬液只通入 20 min 关闭该通道,然后静止 120 分钟进行细菌黏附,再开通纯培养液过夜流通以形成 BBF,最后开通水流通道直至信号稳定。其中流速恒定,有 120 min 的细菌黏附静止黏附期。与黏附流方法相比较而言,在细菌的黏附和 BBF 形成的过程中,持续流方法产生了更为严重的  $f$  降低,这是因为在不同的流体条件下的细菌黏附和 BBF 的形貌、结构和性质等均有差异的原因, $D/f$  变化更大,因为持续流方法形成了更有利于 BBF 生长的状态,更有利于营养成分在系统中的传递和运输,使 BBF 更易形成,且表现出粘弹性质更强烈,结构更稳固。而黏附流的参数测量结果表明:虽然设计一个 2 h 的初始黏附期,但后期的黏附对 BBF 的形成更重要,故在黏附流的发生方法中,BBF 的形成是不稳定的,粘弹性质也较弱一些。

Tam K<sup>[17]</sup>等则发现,调整温度 37℃ 到 40℃,BBF 的生长速度减慢,不仅延迟期延长,细菌的倍增时间也远远长于 37℃ 条件,所形成的生物量比 37℃ 时减少近 19%,即 37℃ 以上的温度升高对 BBF 的形成是不利的;同时 0.05 mL/min,0.13 mL/min 与 0.21 mL/min 的不同流速比较,最后 0.05 mL/min 流速下形成的 BBF 生物量比 0.21 mL/min 流速下的结果减少 25%,且形成的 BBF 易脱附,参数  $f$  和  $D$  出现一定程度的回升和下降,说明 BBF 的结构不稳定,所以对于流速而言,流速低,则剪切力小,形成的生物量也减少。J Kretz 等<sup>[24]</sup>则研究了不同蔗糖浓度下 BBF 的生长情况,随着蔗糖浓度的增加,细菌生长的延迟期、倍增时间均大大缩短,BBF 的湿重也显著增加,所以在一定的温度和流速下,蔗糖浓度的增加是有利于 BBF 的生长的,这也和普通生物验证所取得的结果是一致的。此外,研究者们还分别对 QCM-D 的表面进行了修饰处理,以研究不同基底表面促进或阻碍 BBF 形成的影响。如研究者研究了氧化铝、钛<sup>[25]</sup>表面修饰抗生素可以有效抑制 BBF 在钛表面形成, Marcus IM 等<sup>[26]</sup>利用 QCM-D 技术研究在不同的修饰表面,如 PVDF(Polyvinylidene Fluoride)和 SiO<sub>2</sub> 对 BBF 的形成情况的影响等。

就目前的研究情况而言,由于 QCM-D 是对界面敏感的技术,所以对于不同基底表面对 BBF 形成和特性<sup>[27]</sup>,特别是 EPS 的影响,以及抗菌分子的筛选已经成为 QCM-D 技术应用于 BBF 研究的热点。

## 2.3 与其他技术结合的定量研究

研究者们结合了一些分析技术,如 AFM、CLSM、荧光染色和反射光的测定 MJI 等对 BBF 进行了结果的定量分析与验证,主要对 BBF 的生物量、形貌特征、结构性质的膜、厚度等进行了定量分析研究。

### 2.3.1 AFM (Atom Force Microscope)

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。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,目前在生物膜研究领域也有所建树。如 Adam L 等利用 QCM-D 技术研究 BBF,同时结合 AFM 技术观察 BBF 的形貌特征,如膜的厚度和不均匀性,以及边界上特定的粒径检测,也可以计算一定面积下的区域所含粒子的平均

数量,即可以计算 QCM-D 上负载的膜的覆盖率。

2.3.2 CLSM(Confocal Laser Scanning Fluorescence Microscope) 与普通显微镜相比,激光共聚焦显微镜可进行无损伤的横纵向双向“光学切片”,并可以进行非透明,甚至较厚样品的扫描观测,再通过三维重构得到样品的立体结构,我们就可以通过图象软件,如 COMSTAT、MATLAB 等,将三维图象数据化,从而使生物膜的特征,如表面覆盖率、表面厚度、三维体积等量化。如 A Sweity 等利用此方法研究金表面修饰 PVDF 后,EPS 的黏附吸附的动力学以及生物膜的 SRT 等参数的定量测定。

2.3.3 荧光染色和其他光学技术 用显示不同颜色的荧光试剂和染料与生物膜内物质结合,可以区分生物膜中的死菌与活菌,可以用分光光度计或酶标仪测定 590/600 纳米处有色溶液的吸光值,对生物膜进行定量检测。这对于生物膜的清除研究意义重大。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,进一步而言,荧光原位杂交的应用使我们了解生物膜内的物质分布有所了解。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。

有的研究者还利用 BBF 形成过程中,不同菌株的黏附情况和 EPS 的分泌量及厚度的差异,使用 DLS (Dynamic Light Scattering) 来研究 BBF 在晶体表面的覆盖率<sup>[28]</sup>。但这些技术均为辅助手段,他们只能对某一个时间点进行观测研究,且往往需要标记与染色,所以无法实现无损的动态研究。

### 3 展望

综上所述,细菌生物膜广泛存在于地球上,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的研究兴起,人们逐渐认识到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。而 QCM-D 是一个很好的在线灵敏检测 BBF 生长的动态检测工具。参数  $D$  和  $f$  的同时测量,使 BBF 的形成过程可以实时动态检测,可以获取 BBF 的性质和形貌的信息,参数  $D/f$  的变化可以提供与粘弹性质有关的结构动力学生物信息,同时结合其他有效的分析手段也为 BBF 的定量研究提供了有力的支撑。近年来,研究者经过不懈努力,发展了一套相对完整的分析方程,实现了 QCM-D 数据的定量描述,这使得 QCM-D 的研究工作受到广泛重视。目前 QCM-D 的应用已涉及生物、化学、医学、物理等众多领域,其应用前景被广泛看好。我们将应用 QCM-D 技术获取更有价值的动力学信息,推动 BBF 的研究深入发展。

#### 参考文献:

- [1] Flemming H C, Wingender J. The biofilm matrix[J]. Nature Reviews Microbiology, 2010, 8:623-633.
- [2] Archer N K, Mazaitis M J, Costerton J W, et al. Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease[J]. Virulence, 2011, 2(5):445-459.
- [3] Seddiki S M, Boucherit-Otmani 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]. Int J Gen Med, 2013, 6:1-7.
- [4] Williams M M, Armbruster C R, Arduino M J. Plumbing of hospital premises is a reservoir for opportunistically pathogenic microorganism[J]. Biofouling, 2013, 29(2):147-162.
- [5] Houdt R V, Michiels C W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 109(4):1117-1131.
- [6] Da-Silva E P, De-Martinis E C. Current knowledge and perspectives on biofilm formation: the case of Listeria monocytogenes[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 12(3):957-968.
- [7] Sweity A, Ying W, Ali-Shtayeh M S, et al. Relation between EPS adherence, viscoelastic properties, and MBR operation: Biofouling study with QCM-D[J]. Water Res, 2011, 45(19):6430-6440.
- [8] Garnett J A, Matthews S. Interactions in Bacterial Biofilm Development: a structural perspective [J]. Curr Protein Pept Sci, 2012, 13(8):739-755.
- [9] Silva B R, Freitas V A, Carneiro V A, et al. Antimicrobial activity of the synthetic peptide Lys-a1 against oral streptococci[J]. Peptides, 2013, 42:72-83.
- [10] Ferreira G N, da-Silva A C, Tomé B, et al. Acoustic wave biosensors: physical models and biological applications of quartz crystal microbalance[J]. Trends in Biotechnology, 2009, 27(12):689-696.
- [11] Baranova N S, Nilebäck E, Haller F M, et al. The inflammation-associated protein TSG-6 cross-links hyaluronan via hyaluronan-induced TSG-6 oligomers[J]. J Biol Chem, 2011, 286(29):25675-25686.
- [12] Nilebäck E, Westberg F, Deinum J, et al. Viscoelastic sensing of conformational changes in plasminogen induced up-

- on binding of low molecular weight compounds[J]. *Anal Chem*, 2010, 82(20):8374-8376.
- [13] Hyun-Su Lee, Mark Contarino, M Umashankara, et al. Use of the quartz crystal microbalance to monitor ligand-induced conformational rearrangements in HIV-1 envelope protein gp120 [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 396: 1143-1152.
- [14] Johannsmann D, Reviakine I, Richter RP. Dissipation in films of adsorbed nanospheres studied by quartz crystal microbalance (QCM) [J]. *Anal Chem*, 2009, 81: 8167-8176.
- [15] Saitakis M, Gizeli E. Acoustic sensors as a biophysical tool for probing cell attachment and cell/surface interactions [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69:357-371.
- [16] Adam L J, Olsson Henny 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.
- [17] Tam K, Kinsinger N, Ayala P, et al. Real-time monitoring of streptococcus mutans biofilm formation using a quartz crystal microbalance[J]. *Caries Res*, 2007, 41:474-483.
- [18] Nune V, Sharon L, Walker 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, 26:12089-12094.
- [19] Orgad O, Oren Y, Walker S L, et al. The role of alginate in *Pseudomonas aeruginosa* EPS adherence, viscoelastic properties and cell attachment [J]. *Biofouling*, 2011, 27(7):787-798.
- [20] Vertes A, Hitchins V, Phillips V S, et al. Analytical challenges of microbial biofilms on medical devices[J]. *Anal Chem*, 2012, 84:3858-3866.
- [21] Adam L J, Olsson H C, et al. Acoustic sensing of the bacterium - substratum interface using QCM-D and the influence of extracellular polymeric substances[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2011, 35(1):135 - 138.
- [22] Schofield A L. Real-time monitoring of the development and stability of biofilms of *Streptococcus mutans* using the quartz crystal microbalance with dissipation monitoring [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 23:407-413.
- [23] 何建安, 付龙, 黄沫, 等. 石英晶体微天平的新进展[J]. *中国科学*, 2011, 41(11):1679-1698.  
He J A, Fu L, Huang M, et al. The development of quartz crystal microbalance[J]. *Scientia Sinica Chimica*, 2011, 41(11):1679-1698.
- [24] Krethl J, Hagerman E, Tam K, et al. Quantitative analyses of *Streptococcus mutans* biofilms with quartz crystal microbalance, microjet impingement and confocal microscopy[J]. *Biofilms*, 2004, 1(4):277-284.
- [25] Yoshinari M, Kato T, Matsuzaka K. Prevention of biofilm formation on titanium surfaces modified with conjugated molecules comprised of antimicrobial and titanium-binding peptides[J]. *Biofouling*, 2010, 26(1):103-110.
- [26] Marcus I M, Herzberg M, Walker S L, et al. *Pseudomonas aeruginosa* attachment on QCM-D sensors: the role of cell and surface hydrophobicities[J]. *Langmuir*, 2012, 28(15):6396-6402.
- [27] Broderick A H, Breitbach A S, Frei R, et al. Surface-mediated release of a small-molecule modulator of bacterial biofilm formation: a non-Bactericidal approach to inhibiting biofilm formation in *pseudomonas aeruginosa* [J]. *Adv Healthc Mater*, 2013, 2(7):93-100.
- [28] Renner L D, Weibel D B. Physicochemical regulation of biofilm Formation[J]. *Mrs Bulltin*, 2011, 36(5):347-355.

## The Improvement of the Study on Bacteria Bio—Film (BBF) by Quartz Crystal Microbalance with Dissipation (QCM—D)

WEI Xiaolan

(Environmental and Bioengineering Institute, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China)

**Abstract:** In recent years QCM—D has been used to study cell adhesive behaviors in real—time. Bacteria Bio—Film has also been focused because of its wide and huge influence on medical, food, technology, military and environmental fields. This paper reviewed the study on BBF using QCM—D technology in recent 3 years, including the dynamic study on the formation process of BBF, the influential factors study in the formation of BBF, combination with other analysis technologies, study BBF property qualitatively and quantitatively. QCM—D gave a novel insight to study BBF in real—time, non—invasive method, even the mechanic information on BBF formation. Other technology was needed to analysis on BBF formation using QCM—D punitively.

**Key words:** QCM—D; BBF; improvement

(责任编辑 李若溪)