

崔海英,张雪婧,赵呈婷,等. 细菌生物膜的研究进展[J]. 江苏农业科学,2015,43(8):11-14.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.08.004

# 细菌生物膜的研究进展

崔海英,张雪婧,赵呈婷,周 慧,李 伟,林 琳

(江苏大学食品与生物工程学院,江苏镇江 212013)

**摘要:**细菌生物膜是一种包裹在细胞外多聚物基质中的、黏附于有生命或无生命物体表面的细菌群体,相对于游离状态的细菌,生物膜状态下的耐药性更强,给临床治疗带来困难。近年来,细菌生物膜的研究得到了迅速发展,细菌生物膜的检测技术及清除方法日益完善且效果更佳。本文介绍了细菌生物膜研究的最新进展,包括细菌生物膜的耐药机理、检测技术、清除方法,并对生物膜的清除进行了展望,为研究细菌耐药性、控制生物膜感染提供了理论基础。

**关键词:**细菌生物膜;耐药机理;检测技术;清除方法

**中图分类号:** Q936 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)08-0011-04

抗生素的滥用导致细菌的耐药性增强,给临床治疗带来困难。美国疾病控制与预防中心的专家研究表明,65%~80%的人类细菌感染与生物膜相关,50%的院内感染与医疗器械装置上的生物膜相关联<sup>[1-2]</sup>。在惰性表面形成生物膜后,生物膜保护细菌免受宿主的获得性免疫应答以及吞噬细胞的捕食,使其耐药性提高 10~1 000 倍<sup>[3]</sup>,引起了人们极大的关注。

细菌生物膜(bacterial biofilm, BBF)是指细菌为了适应生存环境,黏附于有生命或无生命物体表面后,被细菌胞外自身产生的多聚物基质包裹的有组织的细菌群体<sup>[4-5]</sup>。细菌生物膜中水分含量可高达 97%;除了水和细菌外,生物膜中还含有蛋白质、多糖、肽聚糖、DNA、脂、磷脂等物质<sup>[6]</sup>。本文就细菌生物膜的研究进展进行综述,涉及细菌生物膜的耐药机理、检测技术以及清除方法,并对细菌生物膜清除方法的发展趋势进行了展望。

## 1 细菌生物膜的耐药机理

### 1.1 细菌生物膜的屏障作用

细菌吸附在惰性表面后,自身会产生大量的多糖、脂类等

多聚物包裹在细菌外,从而形成了 1 层天然的屏障,这是生物膜的显著特点之一,这种特点可以防止抗生素嵌入在细菌外壁上。革兰氏阴性细菌(如大肠杆菌)比革兰氏阳性菌细胞膜外多 1 层细胞外膜(多聚糖),就可以有效阻止抗生素的进入,或降低进入药物的杀菌性。Suci 等利用红外光谱研究表明,抗生素环丙沙星渗透进生物膜的速度与渗透进游离细菌内部的速度相比有明显降低,这是由于部分环丙沙星被结合到生物膜组分中<sup>[7]</sup>。还有研究表明,胞外多糖是带负电荷的,会吸收多肽链中带正电荷的氨基侧链,形成 1 道屏障,从而阻碍亲水性的抗生素渗透入菌体发挥杀菌作用,使抗生素的杀菌能力显著降低<sup>[8]</sup>。

但是现在有越来越多的试验证明,屏障作用不是生物膜的主要耐药机理。Walters 等研究表明,氟喹诺酮类抗生素环丙沙星是能够穿透铜绿假单胞菌生物膜的<sup>[9]</sup>。Anderl 等发现,尽管环丙沙星、氨基青霉素可以穿透整个有  $\beta$ -内酰胺酶突变体的肺炎克雷伯菌生物膜,但是这个突变体仍然耐氨基青霉素<sup>[10]</sup>。

### 1.2 细菌生物膜中表型的表达

一些细菌为了适应环境的改变,特定的基因表达能够使它们具有耐药性。生物膜细菌聚集、黏附以后,为了适应新的生存环境,特定的基因表达发生变化,使生物学行为发生改变,这称为生物膜表型。细菌特有的表型能够激发出生物膜的耐药机理,Beaudoin 等发现,铜绿假单胞菌 *ndvB* 基因与细胞外多聚糖的形成有关<sup>[11]</sup>,如果表达水平上发生了改变,多聚糖的形成会发生变化,就会导致抗生素远离生物膜外特定的靶细胞或者与其发生螯合反应,从而降低了抗生素的作用,提高了生物膜的耐药性。

另外,也有研究发现,大肠杆菌拥有编码群体感应的 2 个

收稿日期:2013-09-10

基金项目:国家自然科学基金(编号:31301573);教育部留学回国人员科研基金;中国博士后基金(编号:12M511223);江苏省自然科学基金(编号:BK20130493);江苏省教育厅高校自然科学基金(编号:12KJB550002);江苏大学高级人才引进启动基金(编号:11JDG050)。

作者简介:崔海英(1979—),女,吉林延边人,博士,副教授,研究方向为食品微生物。Tel:(0511)88780201;E-mail:cuihaiying@ujs.edu.cn。

[32] Miedzybrodzki R, Fortuna W, Weber - Dabrowska B, et al. Phage therapy of staphylococcal infections (including MRSA) may be less expensive than antibiotic treatment[J]. Postepy Hig Med Dosw, 2007, 61: 461-465.

[33] Tanji Y, Shimada T, Fukudomi H, et al. Therapeutic use of phage cocktail for controlling *Escherichia coli* O157:H7 in gastrointestinal tract of mice[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005,

100(3): 280-287.

[34] Smith H W, Huggins M B. Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage; its general superiority over antibiotics[J]. Journal of General Microbiology, 1982, 128(2): 307-318.

[35] Smith H W, Huggins M B, Shaw K M. The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves by means of bacteriophages[J]. Journal of General Microbiology, 1987, 133(5): 1111-1126.

重要调节基因 *LuxS*、*pga* 操纵子,在生物膜中表达有所增强,会引起信号合成酶  $\beta$ -1-6-*N*-乙酰-葡聚糖胺合成酶增多,使初始黏附和生物膜成熟效果增加,导致生物膜中的菌株表现出强的耐药性。人工去除细菌中的 *luxS* 基因,会使所培养的浮游菌株耐药性降低,而生物膜菌株耐药性下降不是很明显,表明耐药性并不是单一的耐药性基因所控制的<sup>[12]</sup>。

### 1.3 细菌生物膜的抗生素外排泵系统

抗生素外排泵系统就是指细菌能够产生外排系统将进入细胞生物膜的抗生素排出体外,这是细菌自我保护的一种手段。自从 1980 年 McMurray 等首次提出主动外排系统是大肠杆菌对四环素的基本耐药机理之后,主动外排系统得到了广泛深入的研究。Mah 认为,铜绿假单胞菌基因组中有 12 个 RND 外排泵编码<sup>[13]</sup>,主要起耐药作用的是 *MexAB-OprM*、*MexCD-OprJ*<sup>[14]</sup>。Gillis 等也发现,*MexCD-OprJ*、*MexXY* 基因是铜绿假单胞菌对大环内酯类抗生素阿齐霉素产生耐药性的机理<sup>[15]</sup>。此外,突变增加 *MexAB-OprM* 外排泵的活性也已被证明是铜绿假单胞菌对氨基糖苷类抗生素、氟喹诺酮类药物的主要抗性机理<sup>[16]</sup>。

国内也有学者研究发现,AdeABC 外排泵是鲍氏不动杆菌的主要外排系统,其过度表达可增加对  $\beta$ -内酰胺类、氨基糖苷类、四环素类、氟喹诺酮类等抗菌药物的耐药性;外排系统 *adeIJK* 的过度表达与鲍氏不动杆菌对四环素、氟喹诺酮类、克林霉素类、 $\beta$ -内酰胺类等抗菌药物的耐药性也有所相关<sup>[17-18]</sup>。

### 1.4 细菌密度感应效应(QS)

QS 系统是细菌间信息传递的一种机制,通过监测其群体的细胞密度来调节其特定的基因表达。此外,QS 信号分子的分子量低、化学种类广泛,包括:酰基高丝氨酸内酯、呋喃酮酯、顺式不饱和脂肪酸和肽<sup>[19]</sup>。Cristina 等研究发现,金黄色葡萄球菌的群体效应调控系统称为 Agr 系统,包括膜结合蛋白(AgrB)、QS 肽(AgrD)、双组分信号传输系统[包括传感器组氨酸激酶(AGrC)、响应调节器(AGrA)]<sup>[20]</sup>。在铜绿假单胞菌中,QS 系统由 2 个信号系统(*LasI/LasR*、*RhlI/RhlR*)组成,这 2 个信号系统又分别产生特征性的 *N*-酰基高丝氨酸内酯信号分子、*N*-丁酰基-*L*-高丝氨酸内酯(BHL)、*N*-(3-氧代十二酰)-*L*-高丝氨酸内酯(OdDHL),一起应对生存环境的改变。此外,这 2 个信号系统都由 *LuxI* 合成酶组成,并负责 AHL 的合成,AHL 是细菌 QS 系统中的关键因子,调节环境变化<sup>[21]</sup>。此外,贾宁等研究表明,AgrD、RNA III 系统在提高红霉素耐药性的过程中起着重要作用<sup>[22]</sup>。

### 1.5 其他机理

细菌生物膜耐药是多种机理共同参与的结果,除以上几种机理之外,还有营养及氧气的限制<sup>[23]</sup>、分泌抗生素水解酶<sup>[24]</sup>、免疫防御体制、普遍应激反应<sup>[25-26]</sup>等机制也可影响生物膜的耐药性。

## 2 细菌生物膜的检测技术

### 2.1 染色法

染色法就是利用生物膜内的物质能够与某些染料结合的性质,通过染色的方法对细菌的生物膜进行定量,最常见的染色剂为结晶紫、刚果红、银盐。结晶紫法的操作为:先用 1%

的结晶紫溶液浸润生物膜生成的表面,静置 30 min 后,用清水洗去多余的染料,将剩余的水吸干并除去后,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 nm 处的吸光度<sup>[27]</sup>。这种方法简便快捷,适用于试管法及 96 孔板法形成的生物膜的检测。王业梅等用银染法动态观察了铜绿假单胞菌生物被膜的形成及形成后的生物被膜,结果初步显示了生物被膜形成的过程及形成后清晰完整的生物被膜<sup>[28]</sup>。银染法的优点是试剂价格低廉,同时易于试验操作,试验条件要求不高,并且敏感性较好,普通的微生物实验室就可进行操作。

### 2.2 荧光法

荧光染色剂主要是由 SYTO9、碘化丙啶构成,SYTO9 能够穿透所有的细菌膜,使细胞染为绿色;而碘化丙啶只能穿透受损细胞的细胞膜,这样 2 个物质结合反应,使细胞染为红色<sup>[29]</sup>。这样就使观察细菌生物膜有了选择性:通过观察不同颜色的细胞,能够区分死细胞与活细胞;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使其显色<sup>[30]</sup>。目前出现了一种新的荧光法——肽核酸(PNA)探针荧光原位杂交技术,能够检测和鉴定慢性伤口生物膜中的细菌种类及细菌的分布情况<sup>[31]</sup>。PNA 探针比 DNA 探针有更高的疏水性,使其更容易穿透疏水性的细胞壁,从而进入靶细胞的内部。肽核酸荧光原位杂交(PNA FISH)技术作为一种准确、快速的检测技术,对实验室的设置条件要求也不高,易于操作。

### 2.3 激光共聚焦显微镜(CLSM)

激光共聚焦显微镜拥有电镜和普通光镜均没有的优势,被认为是目前研究细菌较为理想的方法。该方法可以对细菌及生物膜中各种成分进行不同颜色的荧光染色,且能够避免对细菌生物膜结构的破坏;能够对细菌及其生物膜进行无损伤的连续断层扫描,并且所得生物膜的各种平面图像可以进行 3D 图像重建。同时使用激光共聚焦显微镜,我们可以对生物膜的各种指标如生物膜的厚度、比表面积、各种荧光的强度等参数进行量化,能够较为方便地得到细菌形成生物膜的动态过程中的各种量化数据<sup>[32]</sup>。激光共聚焦显微镜不仅提高了分辨率,显著改变了视野的深度和广度,并且其所观察的样品无须进行脱水等处理,而且能够最大程度地保持观察对象的完整性,从而使结果更接近真实情况。宋非等采用免疫荧光标记技术对细菌及生物膜的菌体和多糖成分分别标记,从而实现对细菌及其生物膜形成过程中的多糖形成及细菌分布情况的观察,并且这种方法可以在操作过程中大大降低生物膜的减少与缺损程度<sup>[33]</sup>。

### 2.4 原子力显微镜(AFM)

原子力显微镜是利用微悬臂感受和放大悬臂上尖细探针与受测样品原子之间的作用力而达到检测的目的,具有原子级的分辨率。由于原子力显微镜既可以观察导体,又可以观察非导体,从而弥补了电镜的不足<sup>[34]</sup>。与电子显微镜相比,原子力显微镜有很多优势:样品制备简便,样品导电与否都适用于该仪器;操作环境不受限制,既可以在真空,又可以在大气中进行;可以对所测区域的面粗糙度值进行统计等<sup>[35]</sup>。Abe 等利用原子力显微镜来测量饮用水中的生物膜;用原子力显微镜来测量机械剪应力,从而估计生物膜的纠缠率<sup>[36]</sup>。

Ansari 等利用原子显微镜观察枣蜜对白色念珠菌的细胞膜,结果表明枣蜜可以影响白色念珠菌的细胞形态、减少其形成生物膜的厚度<sup>[37]</sup>。

### 3 清除生物膜的方法

目前细菌生物膜已成为人们关注的话题,而清除细菌生物膜的方法也已成为人们研究的热点,主要有以下几点。

#### 3.1 物理方法

清除细菌生物膜的物理方法主要有机械法、超声波法、电击法等。机械法为最原始的方法,但也是最有效的方法。

例如每天的刷牙活动,就是通过不断地摩擦而去除牙齿菌斑;用眼镜布擦眼镜也是类似的机械方法。超声波可以通过空穴和起泡作用来消除生物膜<sup>[38]</sup>。朱秀菊研究发现,高强度聚焦超声(HIFU)能在一定程度上杀灭铜绿假单胞菌并且破坏其生物膜结构<sup>[39]</sup>。HIFU 的生物学效应主要是热效应、空化效应、机械效应,而且高强度者杀菌作用强。同样,Wirthlin 等也发现,电击能够减少牙模型上污染的细菌数量<sup>[40]</sup>。Kang 等还发现,可以通过高压的 CO<sub>2</sub> 气体的绝热膨胀,使 1 个喷嘴中产生的气溶胶喷射到在硅芯片上已生长了 24h 的大肠杆菌的生物膜上,可以明显清除生物膜<sup>[41]</sup>。

#### 3.2 化学方法

化学方法就是指通过某些化合物来清除生物膜,是最常用的清除生物膜的方法。一般用的有酶、活性肽、精油及其他化学试剂。

Son 等研究发现,细胞壁降解酶 SAL-2 对金黄色葡萄球菌有特异性裂解活性,也包括耐甲氧西林菌株,并且约 1 μg/mL 的最小抑制浓度就可以降解生物膜<sup>[42]</sup>。Borges 等表明,异硫氰酸酯可以降低大肠杆菌、铜绿假单胞菌的黏附能力,并在生物膜上呈现出较高的电位,以减小由革兰氏阴性细菌形成的生物膜质量<sup>[43]</sup>,可以使大肠杆菌降低 60% 的生物膜活性。五倍子不同提取组分对 5 种口腔浮游细菌均有良好的抑制作用,其中五倍子多酚性化合物、五倍子 B 对 5 种口腔生物膜细菌的抑制作用最好,其次为五倍子 C、五倍子 D<sup>[44]</sup>。

乳铁蛋白对铜绿假单胞菌有杀菌活性,同时还能抑制其生物被膜的形成,其作用与浓度呈正相关;FeCl<sub>3</sub> 促进铜绿假单胞菌生长和生物被膜的形成;乳铁蛋白与铁结合后,对其生物被膜的形成有抑制作用<sup>[45]</sup>。纳米银离子对表皮葡萄球菌的生物膜形成和形态、结构的完整性有抑制作用,但是随着时间的推移,其抗菌作用逐渐减弱。高浓度组较低浓度组抗菌效果更加明显,持续时间更长<sup>[46]</sup>。

#### 3.3 协同方法

所谓协同方法,就是将物理方法与化学方法或物理方法或其他的一些方法所结合起来的方法。Oulahal - Lagsir 等通过尝试将超声波、蛋白水解酶、糖醇解酶制剂互相配合来清除生物膜,结果发现它们之间具有协同效果,可以清除 61% ~ 96% 的细菌生物膜,效果是单独超声波处理(30%)的 2 ~ 3 倍<sup>[47]</sup>。

除此之外,Pechaud 等将酶和机械(剪切应力)一起应用来处理异养需氧生物膜,发现最佳剪切应力为 2.5 Pa,以便最大限度地使生物膜脱落,同时避免由于机械处理而出现压缩现象<sup>[48]</sup>。这样协同处理比单独酶处理增加了 80% 的生物膜

去除量(COD),并且能够除去基底层生物膜。

国内也有学者发现,低频超声、环丙沙星单独作用对铜绿假单胞菌的生物膜无杀菌作用;低频超声联合环丙沙星后,对生物膜有很好的杀菌作用,而且低频超声对铜绿假单胞菌的生物膜结构无影响,联合环丙沙星后,能破坏生物膜的结构<sup>[49]</sup>。

### 4 结论

细菌生物膜是细菌为了适应新的生存环境而存在的,有很强的耐药性。对细菌生物膜耐药机制的了解,有利于更合理地选择抗生素,有效地控制好临床感染。随着技术的不断发展,新的理论不断被提出,我们有理由相信,将来可以很好地解决细菌生物膜这一问题。清除生物膜的发展趋势表现为:(1)我国资源丰富,今后应更深入地探索一些天然活性物质来清除生物膜;(2)生物方法目前还很少,可以探索一些如噬菌体等新的生物方法来抑制生物膜的生长;(3)目前微胶囊比较新颖,可以利用微胶囊定向靶位和控制释放等优点来清除生物膜。

#### 参考文献:

- [1] Paredes J, Alonso - Arce M, Schmidt C, et al. Smart central venous port for early detection of bacterial biofilm related infections[J]. Bio-medical Microdevices, 2014, 16(3): 365 - 374.
- [2] Epstein A K, Hochbaum A I, Philseok K, et al. Control of bacterial biofilm growth on surfaces by nanostructural mechanics and geometry [J]. Nanotechnology, 2011, 22(49): 494007 - 494014.
- [3] Ehrlich G D, Ahmed A, Earl J, et al. The distributed genome hypothesis as a rubric for understanding evolution in situ during chronic bacterial biofilm infectious processes[J]. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2010, 59(3): 269 - 279.
- [4] Høiby N. A personal history of research on microbial biofilms and bio-film infections[J]. Pathogens and Disease, 2014, 70(3): 205 - 211.
- [5] Donlan R M, Costerton J W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2002, 15(2): 167 - 193.
- [6] García A B, Percival S L. Zoonotic infections: The role of biofilms [J]. Biofilms and Veterinary Medicine, 2011, 6: 69 - 110.
- [7] Suci P A, Mittelman M W, Yu F P, et al. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1994, 38(9): 2125 - 2133.
- [8] 陈铁柱, 李晓声, 曾文魁, 等. 细菌生物膜耐药机制的研究与进展 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(12): 2205 - 2208.
- [9] Walters M C, Roe F, Bugnicourt A, et al. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003, 47(1): 317 - 323.
- [10] Anderl J N, Franklin M J, Stewart P S. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000, 44(7): 1818 - 1824.
- [11] Beaudoin T, Zhang Li, Hinz A J, et al. The biofilm - specific antibiotic resistance gene *ndvB* is important for expression of ethanol

- oxidation genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(12): 3128–3136.
- [12] 孙凤军. 大肠杆菌生物膜的形成及其耐药质粒传递和调控的研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2009.
- [13] Mah T F. Biofilm – specific antibiotic resistance[J]. Future Microbiology, 2012, 7(9): 1061–1072.
- [14] de Kievit T R, Parkins M D, Gillis R J, et al. Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001, 45(6): 1761–1770.
- [15] Gillis R J, White K G. Molecular basis of azithromycin – resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2005, 49(9): 3858–3867.
- [16] Islam S, Oh H, Jalal S, et al. Chromosomal mechanisms of aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2009, 15(1): 60–66.
- [17] 李明, 王超, 刘跃平, 等. 鲍曼不动杆菌耐药机制的研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 22(4): 449–452.
- [18] 杨凤春, 任爱民. 主动外排泵系统介导鲍氏不动杆菌多药耐药机制的研究进展[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(11): 2478–2480.
- [19] Chopp D L, Kirisits M J, Moran B, et al. A mathematical model of quorum sensing in a growing bacterial biofilm[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2002, 29(6): 339–346.
- [20] Cristina S G, Maite E, Inigo L. Biofilm dispersion and quorum sensing[J]. Current Opinion in Microbiology, 2014, 18: 96–104.
- [21] Jolivet – Gougeon A, Bonnaure – Mallet M. Biofilms as a mechanism of bacterial resistance[J]. Drug Discovery Today Technologies, 2014, 11: 49–56.
- [22] 贾宁, 徐志凯, 袁云娥, 等. 表皮葡萄球菌全面调节子的表达在生物被膜耐药性中的作用[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(7): 600–602.
- [23] Van Acker H, van Dijk P, Coenye T. Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms[J]. Trends in Microbiology, 2014, 22(6): 326–333.
- [24] Cloete T E. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2003, 51(4): 277–282.
- [25] Stewart P S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2002, 292(2): 107–113.
- [26] Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2010, 35(4): 322–332.
- [27] 杨朵, 张正. 两种检测肺炎克雷伯菌生物膜方法的比较[J]. 中国实验诊断学, 2008, 12(10): 1297–1298.
- [28] 王业梅, 程惠娟, 朱小明. 银染法观察铜绿假单胞菌生物被膜[J]. 中国微生态学杂志, 2012, 24(12): 1078–1079.
- [29] Wu P G, Imlay J A, Shang J K. Mechanism of escherichia coli inactivation on palladium – modified nitrogen – doped Titanium dioxide[J]. Biomaterials, 2010, 31(29): 7526–7533.
- [30] 何永贵. 肽核酸荧光原位杂交技术: 1 种检测慢性伤口感染生物膜的新工具[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(1): 85–86.
- [31] 李京宝, 韩峰, 于文功. 细菌生物膜研究技术[J]. 微生物学报, 2007, 47(3): 558–561.
- [32] Shukla S K, Rao T S. Effect of calcium on *Staphylococcus aureus* biofilm architecture: a confocal laser scanning microscopic study[J]. Colloids and Surfaces B – Biointerfaces, 2013, 103: 448–454.
- [33] 宋菲, 向军, 陆树良. 激光共聚焦显微镜和改良微孔板法观察细菌生物膜形成[J]. 中国感染与化疗杂志, 2010, 10(5): 368–372.
- [34] Ushiki T, Hitomi J, Ogura S, et al. Atomic force microscopy in histology and cytology[J]. Archives of Histology and Cytology, 1996, 59(5): 421–431.
- [35] 刘岁林, 田云飞, 陈红, 等. 原子力显微镜原理与应用技术[J]. 现代仪器, 2006, 12(6): 9–12.
- [36] Abe Y, Skali – Lami S, Block J C, et al. Cohesiveness and hydrodynamic properties of young drinking water biofilms[J]. Water Research, 2012, 46(4): 1155–1166.
- [37] Ansari M J, Al – Ghamdi A, Usmani S, et al. Effect of jujube honey on *Candida albicans* growth and biofilm formation[J]. Archives of Medical Research, 2013, 44(5): 352–360.
- [38] 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: 自然科学版, 2010, 40(5): 107–111.
- [39] 朱秀菊. 高强度聚焦超声对铜绿假单胞菌生物膜的影响[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2011.
- [40] Wirthlin M R, Gasper C, Hoover C I. Electrically enhanced biofilm removal in a contaminated model dental unit waterline[J]. The Journal of the Western Society of Periodontology/Periodontal Abstracts, 2011, 59(1): 4–9.
- [41] Kang M Y, Jeong H W, Kim J, et al. Removal of biofilms using carbon dioxide aerosols[J]. Journal of Aerosol Science, 2010, 41(11): 1044–1051.
- [42] Son J S, Lee S J, Jun S Y, et al. Antibacterial and biofilm removal activity of a podoviridae *Staphylococcus aureus* bacteriophage SAP – 2 and a derived recombinant cell – wall – degrading enzyme[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86(5): 1439–1449.
- [43] Borges A, Simões L C, Saavedra M J, et al. The action of selected isothiocyanates on bacterial biofilm prevention and control[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2014, 86, Part A: 25–33.
- [44] 赵今, 朱炳, 周学东, 等. 五倍子不同组分对口腔细菌生物膜的清除效应[J]. 实用口腔医学杂志, 2007, 23(1): 23–27.
- [45] 张书楠, 王砚颖, 廖素华, 等. 铁离子对隐形眼镜上铜绿假单胞菌生物膜的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(11): 1351–1353, 1356.
- [46] 刘维勤, 余加林, 刘官信, 等. 纳米银离子对表皮葡萄球菌生物膜形成过程的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2011, 23(10): 870–873.
- [47] Oulahal – Lagsir N, Martial – Gros A, Bonneau M, et al. “*Escherichia coli* – milk” biofilm removal from stainless steel surfaces: synergism between ultrasonic waves and enzymes[J]. Biofouling, 2003, 19(3): 159–168.
- [48] Pechaud Y, Marcato – Romain C E, Girbal – Neuhauser E, et al. Combining hydrodynamic and enzymatic treatments to improve multi – species thick biofilm removal[J]. Chemical Engineering Science, 2012, 80: 109–118.
- [49] 刘立婷. 低频超声联合环丙沙星对铜绿假单胞菌生物被膜的杀菌作用及其结构的影响[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2011.