论著

文章编号:1000-5404(2008)05-0390-03

# SYTO9/PI 荧光探针标记的铜绿假单胞菌 PAO1 菌株生物被膜形成的动态观察

陈波曼[1,2],余加林[2],刘官信[2],胡琳燕[2],李 芳[2],杨 华[2] ([1]浙江大学医学院附属妇产科医院新生儿科,杭州 310006;[2]重庆医科大学附属儿童医院新生儿科,重庆 400014)

**摘 要**:**目的** 探讨铜绿假单胞菌细菌生物被膜(biofilm,BF)形成发展过程中空间立体结构变化。**方法** SYTO9/PI 荧光探针标记 PAO1 菌株,体外建立 6h、1d、3d 及 6d 时间组铜绿假单胞菌 PAO1 菌株 BF 模型,激光共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscopy, CLSM)摄取 BF 形成发展各阶段不同层面的图片堆,经图像结构分析软件(image structure analyzer, ISA)分析获得 PAO1 菌株 BF 相关空间结构参数定量化数据。**结果** ①CLSM 结合 SYTO9/PI 荧光探针标记,实现了对 PAO1 菌株 BF 动态形成过程的观察。②随着 BF 形成时间的延长,各层死菌比例逐渐增加,且死菌多分布于微菌落中心。③ISA 软件定量化分析显示,随着 BF 发展,厚度显著增加,前 3d 增加程度显著大于后 3 d;区域孔率显著下降趋势;平均扩散距离呈逐渐增加趋势;结构熵呈显著上升趋势。**结论** 利用 ISA 程序结合 SYTO9/PI 荧光探针可以表征 PAO1 菌株 BF 的空间结构特征和 BF 各层细菌的生存状态。

**关键词**:生物被膜;铜绿假单胞菌;定量分析;结构

**中图法分类号**:Q93-31;Q935;Q939.112 **文献标识码**:A

# Sequential development of biofilm spatial structure of *Pseudomonas Aeruginosa* tagged with SYTO9/PI

CHEN Bo-man[1,2], YU Jia-lin[2], LIU Guan-xin[2], HU Lin-yan[2], LI Fang[2], YANG Hua[2] ([1]Department of Neonatology, Women Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006; [2]Department of Neonatology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

**Abstract**: Objective To investigate the sequential development of spatial structure of biofilm with Image Structure Analyzer (ISA) software so as to found a basis for further research on biological behavior of biofilm. Methods *In vitro* biofilm model of *Pseudomonas Aeruginosa* (P. aeruginosa) PAO1 tagged with SYTO9/PI was established on glass slice, and its biofilm development was monitored at different time points (6 h, 1, 3, and 6 d). The fluorescence images stack of different layers in biofilm model were obtained by confocal laser scanning microscopy (CLSM) based on fluorophores from PAO1. Quantitative parameters describing biofilm spatial structure were acquired after the image information was calculated by ISA software. Results ①The PAO1 biofilm process was investigated successfully by CLSM after genetically tagged with GFP. ②With the development of biofilm, the ratio of died bacteria was increased gradually in each layer and most of them were distributed in the core of microcolony. ③The quantitative data from ISA software showed that the thickness of biofilm was increased significantly during biofilm growth; meanwhile the areal porosity (AP) was decreased significantly, the average diffusion distance (ADD) indicated an increased tendency; and the textural entropy (TE) increased significantly. Conclusion The ISA software combined with SYTO9/PI tagging provide useful information of bacterial biofilm spatial structure in PAO1 biofilm process. Quantifying bacterial biofilm structure permits correlating biofilm development with biofilm performance.

**Key words**: biofilm; *Pseudomonas Aeruginosa*; quantitative analysis; structure

细菌生物被膜(biofilm,BF)是近 20 年来逐渐受到重视的一种细菌生物学特性,是细菌在生长过程中,为适应生存环境而吸附于惰性或活性材料表面形成的一种与浮游细胞相对应的生长方式。它由细菌和自身分泌的细胞外基质组成,是一个三维立体空间结构的生态系,BF 的许多特性均与其特殊形态结构有关。铜绿假单胞菌(*Pseudomonas Aeruginosa*,PA)是我国医院和社区获得性感染及重症监护病房感染的重要条件致

基金项目:国家自然科学基金(30772363);重庆市科委项目([2001]215 号-340)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30772363) and the Sci & Tech Research Project Foundation of Scientific Committee of Chongqing ([2001]215-340)

作者简介:陈波曼,女,浙江省温州市人,硕士,医师,主要从事新生儿感染性疾病方面的研究。电话:13883565453,E-mail:sailingcbm@yahoo.com.cn
通信作者:余加林,电话:(023)63635567,E-mail:yujialin486@sohu.com

收稿日期:2007-01-31 修回日期:2007-08-30

病菌。近年来研究证明，该菌极易形成 BF[1]，BF 形成后，能阻止药物渗透到细菌体内。临床上，有 BF 表型的 PA 往往引起难以治愈的严重感染。以往研究多采用光镜、扫描或透射电镜等观察细菌 BF 结构，但样本在脱水、固定、染色等处理过程中，易发生结构扭曲，造成假相，从而掩盖真实结构。本实验通过建立体外 PAO1 菌株 BF 模型，结合 SYTO9/PI 荧光探针标记技术，运用激光共聚焦显微镜（confocal laser scanning microscopy，CLSM）摄取 BF 发展各阶段不同层面的图像，保证 BF 结构的完整性，所获图片堆经 ISA 软件分析，获得 PAO1 菌株 BF 发展过程相关空间结构变化的数据，对 BF 空间结构的定量化分析进行了初步探索。

## 1　材料与方法

### 1.1　试剂和菌株

铜绿假单胞菌 PAO1 菌株（本实验室保存），L13152 LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits（Molecular Probes），ISA 软件（美国 Montana 州立大学 Haluk Beyenal 教授提供）

### 1.2　体外模型构建

挑取 PAO1 菌株单菌落接种 L-Broth 培养液，37℃，180 r/min 振荡培养 10～12 h 过夜；分光光度计测定菌液吸光度值[$D$(600)]，调整 $D$(600) 值至 0.5；接种 PAO1 菌液于预先放置灭菌盖玻片（8 mm×8 mm，作为黏附载体）的 24 孔细胞培养板中，每孔 1 ml；37 ℃，分 6 h、1、3、6 d 4 个不同时间段孵育，隔日换液，每个时间段均重复 5 次。

### 1.3　荧光探针标记 BF

将上述 6 h、1、3、6 d 各组模型从培养液中取出，去离子水轻轻洗涤，除去未黏附细菌；在 BF 表面滴加 50 μl 配制好的荧光染液，37 ℃避光条件下孵育 15 min，置 CLSM 进行检测。

### 1.4　CLSM 和普通荧光显微镜观察

活细胞具有完整的细胞壁，而死细胞的细胞壁具有不完整性。L13152 LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits 试剂盒中含有 SYTO9 和 PI 两种荧光染料，前者可以快速穿透任何细胞壁与 DNA 结合，后者则对完整细胞壁不能穿透，但透过不完整细胞壁与 DNA 有更大亲和力，在死细胞中 PI 可以取代 SYTO9 与 DNA 结合。在氩激光（488 nm）激发下，SYTO9 呈明亮绿色荧光，表征活菌，而 PI 呈红色荧光，表征死菌，故通过 SYTO9/PI 标记不但可以反映细菌形态，还可表征细菌的存活状态[2]。

氩激光（488 nm）激发，分别采用绿色通道接收绿色信号，红色通道接收红色信号，物镜×20，由外（BF 游离的一面）向内（BF 和玻片相贴的一面）逐层扫描（沿 Z 轴扫描），每个标本扫描 8～16 张。

对 3 d 和 6 d 模型组，在普通荧光显微镜下，采用蓝光激发，拍照，观察微菌落形成的大致情况。

### 1.5　运用 ISA 软件对 PAO1 菌株 BF 结构定量化分析

将上述获得的各时间组模型图片堆调入 ISA3D 软件，确认图片的完整性及顺序后运行 ISA 及 ISA3D 命令，运行结果包括：①结构参数：如结构熵（textural entropy，TE）、结构能（energy，E）、均一性（homogeneity，H）；②平面参数：区域孔率（areal porosity，AP）、平均扩散距离（average diffusion distance，ADD）、最大扩散距离（maximum diffusion distance，MDD）等指标；③其他参数：如生物量（biovolume，BV）、比表面积（surface area between biomass and void，SA）、单位面积生物被膜体积（biomass volume to surface area ratio，V2SA）等。输出数据以 Excel 格式保存。

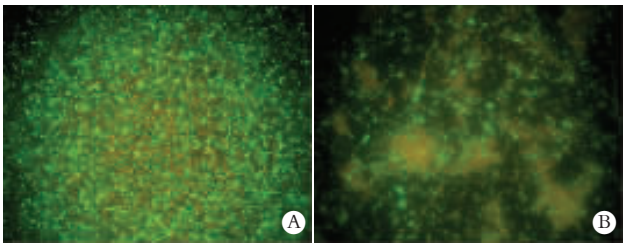
### 1.6　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SAS 8.0 统计软件，SNK 法进行均数间的多重比较及双样本 $t$ 检验。

## 2　结果

### 2.1　CLSM 观察 SYTO9/PI 荧光探针标记的 PAO1 菌株 BF

建立的模型组经 SYTO9 和 PI 荧光染色后，CLSM 下可见细菌分别被染成绿色和红色，部分呈橙色或橘黄色，一般认为是死菌和活菌重叠造成。从不同时间段来看，6 h 左右，PAO1 已经在玻片上黏附聚集，发出绿色荧光；1 d 组模型多为绿色荧光，细菌呈微菌落聚集，已具有一定厚度；随着时间延长，BF 变厚，3 d 组及 6 d 组模型肉眼可见一层灰白色膜状物平铺于玻片上，镜下可见大片状 BF，细菌密集，层叠如积云状，棉絮样，细菌之间有许多不能被 SYTO9 和 PI 着色的黑色区域，呈管道或泡状。各层 CLSM 扫描图像还显示，底层大部分由死菌组成，活菌较少；中间层主要由活菌组成；顶端表层，虽然细菌较稀疏，但绝大多数发出绿色荧光，偶见红色荧光的死菌；6 d 组模型与 3 d 组模型相比，各层死菌比例增加。SYTO9/PI 染色还显示，BF 结构中的死菌多分布于微菌落中心（图 1）。




A：3 d 组 BF 菌落，绿色为活菌，红色为死菌，死菌多分布在微菌落中心；B：6 d 组 BF 菌落，微菌落中死菌进一步增多

**图 1　PAO1 菌株 BF 菌落**　（SYTO9/PI×400）

### 2.2　ISA 软件结构定量化分析

对各时间组模型的平均厚度、AP、ADD 及 TE 进行统计，结果显示：随着培养时间延长，各时间组 PAO1 菌株 BF 的平均厚度均较前一时间点显著增加，增加程度在前 3 d 相对明显，每个时间组之间增加 10 μm 以上，3 d 后增加速度减慢，前 3 d 增加的厚度为 27.8 μm，显著大于后 3 d 增加厚度（4.1 μm）（$P<0.05$）；随着培养时间延长，各时间组模型的 AP 值均较前一时间点显著降低，由最初的 0.97 下降到 0.82；3 d 之内，ADD 呈显著增加趋势，而 3 d 组和 6 d 组的 ADD 值无显著差别（$P>0.05$）；随着培养时间延长，各时间组模型的 TE 值均较前一时间点显著升高，TE 值由最初的 2.1 上升到 6.7，增幅接近 3 倍。见表 1。

表1 各时间组 PAO1 菌株 BF 的平均厚度、AP、ADD 及 TE 值($\bar{x} \pm s$)

| 时间 | 厚度(μm) | AP | ADD | TE |
|---|---|---|---|---|
| 6 h | 8.5 ± 1.3 | 0.97 ± 0.01 | 1.00 ± 0.001 | 2.1 ± 0.5 |
| 1 d | 20.1 ± 2.3[a] | 0.96 ± 0.01[a] | 1.00 ± 0.002[a] | 3.7 ± 0.5[a] |
| 3 d | 36.3 ± 2.7[ab] | 0.88 ± 0.02[ab] | 1.01 ± 0.006[ab] | 5.7 ± 0.5[ab] |
| 6 d | 40.4 ± 3.7[abc] | 0.82 ± 0.07[abc] | 1.04 ± 0.028[ab] | 6.7 ± 0.7[abc] |

a：$P < 0.05$，与 6 h 组比较；b：$P < 0.05$，与 1 d 组比较；c：$P < 0.05$，与 3 d 组比较

## 3 讨论

细菌 BF 是具有高度结构性、协调性和功能性的组织群体，BF 结构的维持对 BF 生物学行为具有重要意义。BF 生长周期一般分为 5 个阶段：最初的定植阶段、不可逆黏附阶段、结构分化阶段、发展成熟阶段和解聚再定植阶段[3]。本实验采用平板培养法构建 BF 体外模型，通过 CLSM 连续动态观察 PAO1 菌株 BF 形成，亦基本反映了如下过程：6 h 左右 PAO1 菌株开始在玻片表面黏附聚集，1 d 左右初步形成 BF，3 d 时基本具备三维结构，此后 BF 逐渐发展达到平衡状态，6 d 时 BF 中死菌数量逐渐增多，活菌数量逐渐减少，可能已处于解聚阶段，这与文献[2]报道基本一致。

本实验利用 CLSM 结合 SYTO9/PI 荧光染色直观地反映出 BF 立体结构中死菌/活菌的不均衡分布。BF 中细菌不均衡分布特点，可能与 BF 营养物质渗透屏障有关，表层菌容易获得营养和氧气，代谢产物也容易排出，故比较活跃，分裂较快，活菌也较多，而里层菌处于营养和氧气相对缺乏的局部环境，生长缓慢，处于休眠或静止状态，死菌也较多，这也可能是 BF 结构中细菌逃避抗生素作用的一种自身防御手段[4]。

本实验还采用了 ISA 软件成功获得 BF 空间结构参数的定量化数据，实现了对 BF 基础结构特征的定量化分析。该软件采用自动定阈系统[5]，具有强大的分析功能。平面参数中以区域孔率(AP)和平均扩散距离(ADD)这两个参数能直观反映 BF 结构中间隙孔道及营养物质供应距离情况；而结构参数中结构熵(TE)反映了 BF 结构发展过程中不均一性的变化，可用于不同 BF 的比较分析[6]。

本实验结果显示，SYTO9/PI 荧光探针标记 BF 的厚度在前 3 d 增加程度显著大于后 3 d，生长速度具有不均一性。其原因除与营养限制有关外，也可能与 BF 增加到一定厚度后，为保证底层细菌获得一定的营养物质而维持自身结构，对自身发出密度感应(quorum sensing，QS)信号产生反应，以达到平衡状态有关。

本实验在 CLSM 对 BF 的观察中还发现 BF 并非一层单纯的致密膜，其内部存在很多黑色相互交通的间隙及孔道。Stoodley 和 Debeer 等[7]认为这些大小不一的间隙和通道是 BF 结构的重要组成部分，其中充满了胞外多糖和蛋白质等营养物质，与深层 BF 中的细菌生长关系密切。Wood 等[8]在牙菌斑 BF 也发现类似的间隙和通道贯穿于整个 BF 之中，其功能类似初级循环系统，活菌紧紧围绕在这些孔和通道的周围，从而保证了营养获取和代谢废物排除，对于维持自身稳定有重要意义。本实验结果显示，随着培养时间延长，BF 厚度逐渐增加，AP 值显著减低，ADD 在前 3 d 内呈显著增加趋势，3 d 后达平台期，与 6 d 组相比无显著性差异，提示 BF 逐渐发展，细菌聚集越来越致密，BF 结构中间隙及通道的孔径和数目减少，相应营养物质的供应距离增加，细菌物质代谢受到一定限制而将逐渐发展达到一个相对稳态。

BF 不仅在结构上存在多样、开放、不均一性特点，而且环境中营养物质、代谢产物、信号分子等物质在 BF 各个层面也呈现不均一性，这种不均一性可能是 BF 的“保护效应”，是细菌生存的重要策略[9]，它使 BF 无论受到作用于那个代谢环节的抗微生物因子的攻击，都会有一些细菌存活“重建家园”。实验结果显示随着培养时间延长，TE 值显著增大，说明在一定范围内，伴随 BF 发展成熟，BF 的不均一度愈来愈强，结构越来越复杂，这种结构特点决定 BF 具有一个能适应多种理化变化的内环境。

因此，本实验通过体外建立 PAO1 菌株 BF 模型，运用 SYTO9/PI 荧光探针标记方法，结合 CLSM 成功实现了对 PAO1 菌株 BF 的原位、动态观察，进而利用 ISA 软件对获得的图片堆进行 BF 空间结构特点的定量分析，比较客观地说明 BF 形成过程中空间结构变化，为进一步认识细菌 BF 结构及有效控制细菌 BF 形成提供新的研究思路和技术平台，这对于临床上控制生物材料相关性感染具有一定意义。

## 参考文献：


[1] Bauer T T, Torres A, Ferrer R, *et al*. Biofilm formation in endotracheal tubes. Association between pneumonia and the persistence of pathogens [J]. Monaldi Arch Chest Dis, 2002, 57(1): 84 - 87.

[2] Mai-Prochnow A, Evans F, Dalisay-Saludes D, *et al*. Biofilm development and cell death in the marine bacterium Pseudoalteromonas tunicata [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(6): 3232 - 3238.

[3] O'Toole G, Kaplan H B, Kolter R. Biofilm formation as microbial development [J]. Annu Rev Microbiol, 2000, 54: 49 - 79.

[4] Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas Aeruginosa* biofilms [J]. Microbes Infect, 2003, 5(13): 1213 - 1219.

[5] Yang X, Beyenal H, Harkin G, *et al*. Evaluation of biofilm image thresholding methods [J]. Water Res, 2001, 35(5): 1149 - 1158.

[6] Beyenal H, Lewandowski Z, Harkin G. Quantifying biofilm structure: facts and fiction [J]. Biofouling, 2004, 20(1): 1 - 23.

[7] Stoodley P, Debeer D, Lewandowski Z. Liquid Flow in Biofilm Systems [J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60(8): 2711 - 2716.

[8] Wood S R, Kirkham J, Marsh P D, *et al*. Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy [J]. J Dent Res, 2000, 79(1): 21 - 27.

[9] Boles B R, Thoendel M, Singh P K. Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(47): 16630 - 16635.


(编辑 王小寒)