文章编号:1000-5404(2009)14-1337-04

论著

纳米银离子对铜绿假单胞菌生物被膜的细菌死亡率的影响

邹志慧,余加林,刘官信,李 芳,林丽华,林雅茵 (重庆医科大学附属儿童医院新生儿科,重庆 400014)

摘 要:目的 探讨纳米银离子对细菌生物被膜(biofilm,BF)的细菌死亡率的影响。**方法** 采用摇床法,以纳米银离子含量不同的乙烯-醋酸乙烯酯(Ethylene-Vinyl acetate, EVA)塑料为细菌粘附载体,模拟体内铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*,PA)BF形成的微环境,建立体外BF模型;将培养3 d的空白标本分别在扫描电子显微镜(SEM)下及用FITC-ConA染色后荧光显微镜下观察不含纳米银离子EVA中BF的形成情况;将生长0.5、1、2、3、5 d的BF模型行SYTO9/PI染色,激光共聚焦扫描电镜(CLSM)下摄取不同层面的图像,然后采用Image Pro Plus 6.0分析软件分析不同干预条件下BF的细菌的死亡率。**结果** 运用SEM及荧光显微镜的方法,在以不含纳米银离子EVA塑料的细菌粘附载体上培养3 d的标本中均观察到流线状的BF形成;纳米银离子含量、作用时间对BF的细菌死亡率均有明显影响(F值分别为84.62, 85.67,$P<0.01$);不同时间点含有纳米银离子材料的BF细菌死亡率均显著高于空白对照组($P<0.05$),但纳米银离子含量不同的2种材料上BF的细菌死亡率无明显影响($P>0.05$);纳米银离子含量不同的(0、0.05%、0.1%)材料上的BF,其第1、2、3天细菌死亡率均分别显著高于第0.5、5天的细菌死亡率($P<0.05$);含纳米银离子0.1%的材料上BF在作用的第2天其细菌死亡率最高[(88.53±1.88)%]。**结论** 运用摇床法成功建立了体外BF模型,纳米银离子对BF内的细菌有明显杀灭作用。

关键词: 细菌生物被膜;纳米银离子;模型
中图法分类号: R-332;R378.991;R977.5 **文献标识码:** A

Silver nanoparticles bactericide *P. aeruginosa* in *in vitro* biofilm

ZOU Zhi-hui, YU Jia-lin, LIU Guan-xin, LI Fang, LIN Li-hua, LIN Ya-yin (Department of Neonatology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To explore the bactericidal effect of silver nanoparticle on *P. aeruginosa* in an *in vitro* model of biofilms. **Methods** The ethylene-vinyl acetate (EVA) plastics with 0.01% or 0.05% silver nanoparticle in it were used as carriers for the bacteria adhesion, on which bacterial biofilm models *in vitro* were built by using shaking method to mimic the micro-environment *in vivo*. The samples not containing silver nanoparticle which had been cultured for 3 d were scanned by scanning electron microscopy (SEM) and were observed by fluorescence microscope after stained with FITC-ConA to observe biofilm formation. The model specimens which had been cultured for 0.5, 1, 2, 3 or 5 d with shaking method were stained by the fluorescent antibody SYTO9/PI, and then detected under confocal laser scanning microscopy (CLSM) to take the images at different levels. The image were were then analyzed by the software of Image-Pro Plus 6.0. The bacterial mortalities under the different conditions (concentration of silver nanoparticles and culture times) were calculated. **Results** SEM and fluorescence microscope displayed the linear flow of bacterial biofilm formation in the 3-day-cultured EVA plastic carriers, indicating the establishment of *in vitro* model of biofilm. Mortality of bacteria was obviously affected by the different concentrations of silver ion, duration of action (F = 84.62, 85.67,

基金项目: 国家自然科学基金(30772363);重庆市自然科学基金(2007BB5282)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30772363) and the Natural Science Foundation of Chongqing (2007BB5282)
作者简介: 邹志慧,男,江西省临川市人,硕士研究生,主要从事新生儿感染方面的研究。E-mail: zzh975613@yahoo.com.cn
通信作者: 余加林,电话:(023)63632756-3531,E-mail:yujialin486@sohu.com
收稿日期: 2008-12-26;**修回日期:** 2009-02-15

$P<0.0001$). The mortality of bacterial of silver nanoparticle was significantly higher than control group at different time points ($P<0.05$). However, there was no significant difference in the mortality between the concentration of 0.05% and 0.1% silver nanoparticle. The mortality of bacteria in the specimens cultured for 1, 2 and 3 d was significantly higher than those cultured for 0.5 and 5 d. The mortality rate of bacteria on 0.1% silver nanoparticle EVA plastic cultured for 2 d was the highest among all groups [(88.53 ± 1.88)%]. **Conclusion** *In vitro* model of bacterial biofilm is successfully established by using the shaking method. The bacteria in biofilm can be killed by silver nanoparticle.

Key words: biofilm; silver nanoparticle; model; shaking method

细菌生物被膜(biofilm,BF)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菌相对应的生长方式,由细菌和自身分泌的细胞外基质(extracellular polymeric substances,EPS)组成[1]。这类细菌群体与浮游菌在形态结构和生化特性方面有显著不同,耐药性极强,可以逃避宿主免疫作用和抗生素杀伤,且感染部位难以彻底清除,导致感染迁延不愈;细菌还可自 BF 处向外播散,引起急性感染,成为临床上难治性感染的重要原因之一[2]。我们前期研究发现,随着新生儿机械通气时间的延长,聚氯乙烯材料制作气管导管表面 BF 形成的发生率愈高,且分离得到的细菌的耐药率也逐渐增加[3]。寻找一种能够有效抑制 BF 形成的工程材料,来防治临床体内置管 BF 形成和减少细菌耐药,是解决这一难题的可能途径。近年来研究发现纳米银离子对浮游菌和其形成的 BF 都有着强大的杀灭作用。本课题以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病菌铜绿假单胞菌标准株(PAO1)为模式菌,建立体外 BF 模型,研究含量不同的纳米银离子对形成在乙烯-醋酸乙烯酯(Ethylene-Vinyl acetate,EVA)塑料上 BF 内的细菌死亡率的影响。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

L-Broth 培养液购自升博生物制品公司,PAO1 菌株由本实验室保存。EVA 塑料,含 0.05% 纳米银离子 EVA 塑料和含 0.1% 纳米银离子 EVA 塑料由北京崇高纳米科技有限公司提供。将材料裁剪为长 1 cm、宽 2 mm、厚 0.5 mm 的塑料片,作为实验模型粘附载体备用。荧光探针:FITC-ConA,SYTO9/PI(Sigma 公司提供)。实验相关仪器:SEM、荧光显微镜、CLSM、细菌恒温培养箱、细菌摇床、锥形瓶等。

1.2 方法

1.2.1 细菌生物被膜模型的构建 挑取 PAO1 菌株单菌落置于 37 ℃ LB 液体培养基中,200 r/min 振荡 13 h 后,用分光光度计测菌液光密度 $D(600)$ 值至 0.5。将 5 个消毒好实验用的厚 0.5 mm、长 1 cm、宽 2 mm 的粘附载体用丝线串起并固定在载玻片上。把载玻片放入高温消毒后的 250 ml 的锥形瓶中,加入 $D(600)$ 值为 0.5 的菌液,至没过材料为止。放入摇床,120 r/min,37 ℃,建立摇床法形成 BF 装置。隔日换液,取第 3 天的 EVA 粘附载体送行扫描电镜(SEM),荧光显微镜检测。第 0.5、1、2、3、5 天各标本送行激光共聚焦扫描电镜(CLSM)检查。

1.2.2 不同时间点 EVA 塑料上 BF 的检测

1.2.2.1 多糖染色行荧光显微镜检查 FITC-ConA 为 FITC 标记的刀豆蛋白,可以和 EPS 结合,在蓝光激发下为绿光。把配制好的 FITC-ConA 荧光抗体 30 μl 滴在用 PBS 洗涤好的标本上,37 ℃避光孵育 20 min,PBS 清洗 2 次后用 50% 甘油封片,置于荧光显微镜下观测。

1.2.2.2 SEM 检查 将孵育 3 d 的 EVA 粘附载体用 PBS 1 ml 轻轻洗涤 3 次,除去表面的游离细菌后用 2% 戊二醛固定,送 SEM 室观测。

1.2.2.3 CLSM 检查 不同时间点的标本在 PBS 轻轻洗涤后,滴加配制好的 SYTO9/PI 荧光染料,37 ℃避光孵育 20 min 后用 PBS 清洗 2 次,50% 甘油封片观测。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,由 BF 游离面向 BF 与粘附载体面逐层扫描(沿 Z 轴扫描),每个标本取 3 个视野,每次扫描的间隔距离为 2.0 μm。SYTO9/PI 荧光染料标记的 BF 在氩激光(488 nm)激发下,死菌表现为红色信号,活菌表现为绿色信号。

1.3 CLSM 图片处理

运用 Image Pro Plus 6.0 图像处理软件进行分析,计数每个视野各断层绿色通道中的活菌数和红色通道中的死菌数。视野各通道活菌数、死菌数相加,记为活菌总数和死菌总数,算出每个视野的细菌死亡率和标本上 3 个视野细菌死亡率的均值及标准差。

1.4 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SAS 8.0 统计软件进行双向方差分析,不同作用时间点之间以及含不同银离子材料之间 BF 细菌死亡率组间差异两两比较采用 SNK 法。

2 结果

2.1 铜绿假单胞菌 BF 体外模型的建立

荧光抗体 FITC-ConA 标记 BF 的多糖,在荧光显微镜的

488 nm 荧光激发下呈明亮的绿色荧光,层叠聚集成流线状向内延伸(图 1);进一步在 SEM 下观察培养 3 d PAO1 的 BF,可观察到细菌集聚成小片状,连接成流线形分布(图 2)。2 种检测方法都提示有 BF 结构形成。

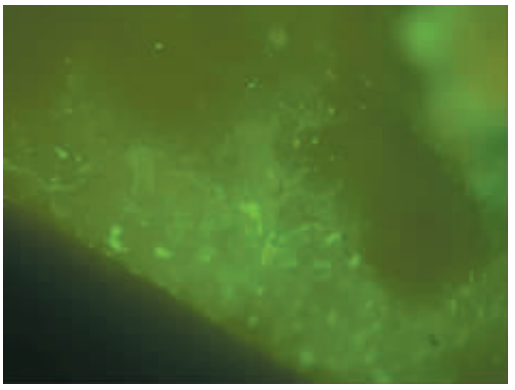


图 1　培养 3 d 的 PAO1 的细菌生物被膜荧光显微镜观察　(×400)

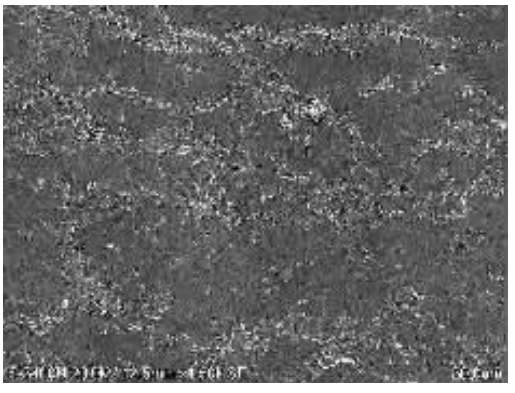


图 2　培养 3 d 的 PAO1 的细菌生物被膜超微结构观察　(SEM×1 500)

2.2　含纳米银离子的粘附材料对 BF 内细菌存活的影响

标本经 SYTO9 和 PI 荧光染色后,CLSM 下可见表征为绿色的活菌和红色的死菌,层叠如积云状,棉絮样,较密集,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。含纳米银离子材料的 BF 扫描断层中的死菌数要多于活菌数。尤其在第 2 天时明显(图 3)。银离子含量、作用时间对 BF 的细菌死亡率均有明显影响;其中,含量为 0.1% 银离子材料上 BF 在作用第 2 天其细菌死亡率最高。不同时间点含有纳米银离子材料上 BF 内的细菌死亡率均显著高于空白对照组($P<0.05$),但 2 种纳米银离子材料上 BF 的细菌死亡率无统计学差异($P>0.05$);银离子含量不同(0、0.05%、0.1%)的材料上的 BF 第 1、2、3 天细菌死亡率均分别显著高于第 0.5、5 天的细菌死亡率($P<0.05$),第 0.5、5 天 2 个作用时间点之间 BF 的细菌死亡率无统计学差异($P>0.05$)。见表 1。

表 1　不同作用时间下 3 种材料 BF 内的细菌死亡率比较

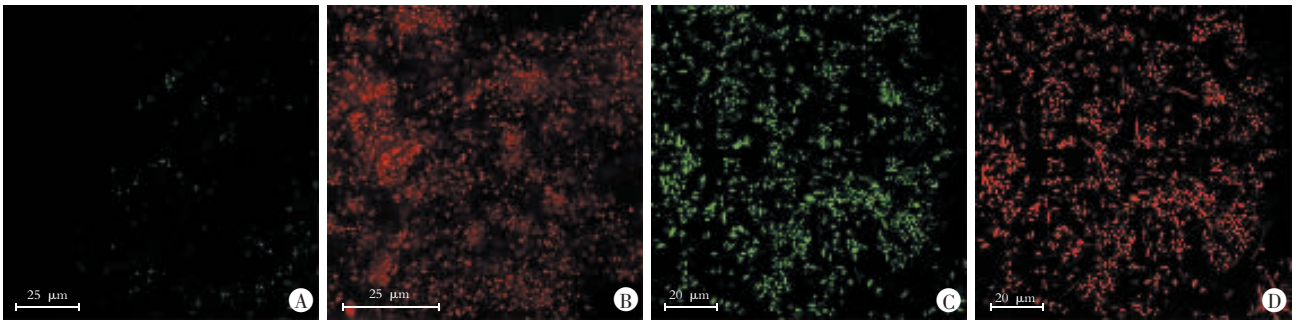
($n=25$, %, $\bar{x}\pm s$)

银离子含量	0.5 d	1 d	2 d	3 d	5 d
0(空白对照)	41.63 ± 4.20^{b}	49.55 ± 2.34	46.55 ± 2.34	46.41 ± 2.54	44.73 ± 5.67^{b}
0.05%	50.74 ± 2.12^{ab}	63.93 ± 6.97^{a}	79.69 ± 6.93^{a}	58.1 ± 7.06^{a}	47.89 ± 1.39^{ab}
0.1%	46.38 ± 2.19^{ab}	55.84 ± 3.89^{a}	88.53 ± 1.88^{a}	53.34 ± 4.89^{a}	49.22 ± 2.72^{ab}

a:$P<0.05$,与空白对照比较; b:$P<0.05$,分别与 1、2、3 d 比较

3　讨论

PAO1 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病菌,该菌极易形成 BF,是研究细菌生物被膜最好的模式菌株之一[4]。现在实验室体外研究 BF 的方法主要有平板培养法、透明膜法及连续培养法等。平板培养法为静态的培养方法,不能客观反应体内 BF 形成的微环境,而透明膜法和连续培养法虽然能较好的模拟体内 BF 发展所需营养物质、温度、时间等多种因素,但需要专门的连续培养装置,实验要求高,限制了其广泛应用。本实验模型利用恒温摇床能够提供恒温和摇动中能够让锥形瓶中菌液流动,摇床转动时,固定在菌液中的标本上会形成湍流,产生剪切力。Liu 等[5]研究发生剪切力是影响 BF 形成及其结构的一个主要因素。Takenaka 等[6]运用连续培养装置培养铜绿假单胞杆菌形成 BF,连续培养



A、B:第 2 天含 0.1% 纳米银离子的 EVA 塑料标本的同一扫描面上的绿色通道和红色通道的图像;C、D:第 5 天含 0.05% 纳米银离子的 EVA 塑料标本的同一扫描面上的绿色通道和红色通道的图像

图 3　激光共聚焦扫描电镜观察不同含量纳米银离子的 EVA 塑料上培养不同时间的 BF 内细菌存活情况

后行 CLSM 检测,观测到成流线状的 BF。本模型形成的,通过多糖染色、SEM、CLSM 检测到的 BF 和 Takenaka 等[6]运用连续培养装置形成的 BF 的形态、分布及空间、结构都相似。多糖染色、SEM、CLSM 的结果都证实了粘附载体上有 BF 的形成,证明了本实验采用的摇床法建立 PAO1 的 BF 体外模型是成功的。CLSM 是一种检测 BF 的重要方法,其能够在保证细菌 BF 结构完整的情况下,结合荧光标记技术,直接对一定厚度 BF 进行连续断层扫描,获取不同层面的精细图像,经三维重建后获得完整 BF 立体结构,实现了对 BF 内部结构客观准确的描述[7]。因而本研究采用 CLSM 检测方式来观察 BF 内的死菌和活菌的情况。

银离子具有广谱的杀菌功能,主要通过与细菌接触反应,干扰肽聚糖的合成,阻碍细胞壁的形成,也能破坏微生物电子传输系统、呼吸系统、物质传输系统,导致细菌死亡。当菌体失去活性后,银离子又会从菌体中游离出来,重复进行杀菌活动,因此其抗菌效果持久;另外银离子能激活水和空气中的氧,产生羟基自由基(·OH)及活性氧离子(O^-),活性氧离子(O^-)能在短时间内破坏细菌的增殖能力,致使细胞死亡[8]。随着现代科技的发展,产生了纳米级的银离子。纳米粒子是指粒子直径在 1 ~ 100 nm 的粒子,也称为超微粒子,具有独特的纳米晶体结构,有更大的接触面积,释放出更多强有力的银基团,相对于普通银离子对细菌有着更强的杀灭作用[9]。EVA 塑料中溢出的纳米银离子从 BF 的基底部进入 BF 内,会通过整合硫氢基、羧酸盐酯、酰胺、异吡唑、吲哚、氢氧基等电子基团而作用于 BF 内的细菌的酶和 DNA,干扰肽聚糖的合成,阻碍细胞壁的形成,增加其通透性,导致 BF 内的细菌死亡[10]。Roe 等[11]研究发现在导管上涂上厚度为 100 nm(相当于 0.1 ~ 0.3 $\mu g/cm^2$)含放射性同位素 110 m 的纳米硝酸银离子,10 d 内均有银离子的持续释放。体外实验发现纳米银离子有显著的杀菌活性,在 72 h 内能够防止大肠埃希菌、肠球菌、金黄色葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌、铜绿假单胞菌和白色念珠菌形成生物膜;体内实验结果显示涂在导管表面的纳米硝酸银离子涂层在 10 d 内约有 15% 的涂层被消耗了。本实验结果显示纳米银离子含量、作用时间对 BF 内的细菌死亡率均有明显影响,纳米银离子对 BF 内的活菌有明显的杀灭作用,这与 Roe 等[11]的体外实验的结论相似。本实验 2 种含纳米银离子的材料上都有 BF 形成,其 BF 的细菌死亡率先升高后降低,第 2 天达到高峰,在 0.5 d 和 5 d 时细菌死亡率无明显的统计学差异。表明含纳米银离子 EVA 塑料有 BF 形成,相对杀菌时效短,推测与 EVA 塑料中纳米银离子含量低,被持续消耗有关。要抑制 BF 的形成,延长杀菌时效,可以通过增加纳米银离子含量,有效控制纳米银离子的释放率来达到。实验含纳米银离子的 2 种材料 BF 的细菌死亡率无显著差异,提示这 2 种含纳米银离子材料对 BF 内的细菌杀灭效能相近,可能要增加更多不同含量纳米银离子组来对照。纳米银离子杀菌能力强,广谱,不易耐药,对哺乳动物的毒性低。本实验中摇床法模型提供的为相对高菌浓度的环境,在低菌微环境下,2 种含纳米银离子材料杀菌效能如何,值得进一步探讨。

参考文献:

[1] Cafiso V, Bertuccio T, Santagati M, *et al*. Presence of the ica operon in clinical isolates of Staphylococcus epidermidis and its role in biofilm production[J]. Clin Microbiol Infect, 2004, 10(12): 1081 - 1088.

[2] Branda S S, Vik S, Friedman L, *et al*. Biofilms: the matrix revisited [J]. Trends Microbiol, 2005, 13(1): 20 - 26.

[3] 陈波曼, 余加林, 刘官信, 等. 机械通气新生儿气管导管表面细菌生物被膜的扫描电镜观察及其与下呼吸道感染的关系[J]. 中华儿科杂志, 2007, 45(9): 655 - 660.

[4] Schleheck D, Barraud N, Klebensberger J, *et al*. Pseudomonas aeruginosa PAO1 Preferentially Grows as Aggregates in Liquid Batch Cultures and Disperses upon Starvation[J]. PLoS ONE, 2009: 4(5): e5513.

[5] Liu Y. Tay Metabolic response of biofilm to shear stress in fixed-film culture[J]. Journal of Applied Microbiology 2001, 90: 337 - 342.

[6] Takenaka S, Iwaku M, Hoshino E. Artificial Pseudomonas aeruginosa biofilms and confocal laser scanning microscopic analysis[J]. J Infect Chemother, 2001, 7(2): 87 - 93.

[7] 陈波曼, 余加林, 刘官信, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(5): 390 - 392.

[8] 杨 准, 杜 丽. 银系无机抗菌剂在口腔材料中的应用及研究进展[J]. 中华老年口腔医学杂志, 2007, 5(4): 233 - 235.

[9] 杨玉旺, 刘敬利. 纳米银研究和应用新进展[J]. 工业催化, 2003, 11(12): 7 - 12.

[10] Holt K B, Bard A J. Interaction of silver(I) ions with the respiratory chain of Escherichia coli: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag^+[J]. Biochemistry, 2005, 44(39): 13214 - 13223.

[11] Roe D, Karandikar B, Bonn-Savage N, *et al*. Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles[J]. J Antimicrob Chemother, 2008, 61(4): 869 - 876.

(编辑 王小寒)