



## 细菌生物被膜基质的研究进展

刘静聪, 方金玉, 朱军莉\*

浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江省食品安全重点实验室, 浙江 杭州 310018

刘静聪, 方金玉, 朱军莉. 细菌生物被膜基质的研究进展. 微生物学报, 2022, 62(1): 47–56.

Liu Jingcong, Fang Jinyu, Zhu Junli. A brief review of biofilm matrix in structured microbial communities. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(1): 47–56.

**摘要:** 细菌生物被膜(biofilm)附着在生物或者非生物表面, 由细菌及其分泌的糖、蛋白质和核酸等多种基质组成的细菌群落, 是造成病原细菌持续性感染、毒力和耐药性的重要原因之一。细菌的生物被膜基质由复杂的胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)构成, 影响生物被膜的结构和功能。本文阐述细菌生物被膜 2 种类型 EPS 的主要结构及功能, 包括细胞表面基质蛋白和胞外成分, 重点分析 EPS 基质的物理特性和化学特性, 及其生物被膜在细菌毒力中发挥的作用, 探讨基于 EPS 的多靶点和联合控制生物被膜策略, 为深入揭示细菌结构性群落的生物被膜形成机制和控制技术提供理论支撑。

**关键词:** 生物被膜; 胞外聚合物(EPS); 病原菌; 控制

## A brief review of biofilm matrix in structured microbial communities

LIU Jingcong, FANG Jinyu, ZHU Junli\*

Food Safety Key Laboratory of Zhejiang Province, College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China

**Abstract:** Bacterial biofilm is a structured community of microbial cells attached to biological or non-biological surfaces, which is composed of bacteria cells and their extracellular polymeric

**基金项目:** 浙江省属高校基本科研业务费专项(XRK21001); 浙江工商大学研究生创新项目(20020080035)

Supported by the Fundamental Research Funds of Zhejiang Province (XRK21001) and by the Innovative Foundation of Postgraduate of Zhejiang Gongshang University (20020080035)

\*Corresponding author. Tel: +86-571-28008924; Fax: +86-571-28008925; E-mail: junlizhu0305@163.com

Received: 17 March 2021; Revised: 28 May 2021; Published online: 20 July 2021

substances (EPS), including exopolysaccharides, protein, nucleic acid. Biofilms become one of the important causes of persistent infection, virulence and antimicrobial tolerance of pathogenic microorganisms. The biofilm matrix, as complex extracellular polymers, affect the structure and functional properties of biofilms. This article describes the composition and functions of two major categories of EPS, including cell surface components and extracellular components from some pathogenic bacteria. The physical and chemical properties of EPS matrixs and their roles in the biofilm virulence were mainly focused. Control strategies of biofilm matrix via multitargeted sites are also discussed. The aim of this review will provide theoretical support to explore biofilm forming mechanism and combating technologies in bacterial structured community.

**Keywords:** biofilm; extracellular polymeric substances; pathogenic bacteria; control

病原微生物是威胁人类健康和食品安全的重要生物性因素,对公共健康造成负面影响。大部分致病菌在人体内环境和食品基质中并非以单个细菌及浮游状态存在,而是多以群体生物被膜(biofilm)形式生存。细菌的生物被膜是指细菌粘附于接触表面并嵌入自身产生的细胞外基质中的微生物群落<sup>[1]</sup>。胞外多聚物(extracellular polymeric substance, EPS)由胞外多糖、蛋白质、核酸、脂质和其他生物分子组成。EPS能固定生物被膜中的微生物群落,维持一系列高度复杂的动态变化,在生物被膜结构和功能方面均发挥重要作用,包括表面粘附、空间和化学异质性、生物被膜毒力构成,减弱抗菌剂的影响,及促进细胞间互作,从而增强生物被膜中细胞的代谢能力和耐药性<sup>[2]</sup>。细菌分泌的EPS促进菌体在生物和非生物表面附着,随后将细胞包裹聚集形成结构性群体。生物被膜中紧密排列的细胞在基质包裹的有限空间内互作,且EPS提供结构的机械稳定性及复杂的化学微环境<sup>[3]</sup>。此外,EPS还增强生物被膜菌对抗菌剂的耐受性<sup>[4]</sup>。目前,大多数研究集中在铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、变形链球菌

(*Streptococcus mutans*)和霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)等模式细菌的生物被膜,特别是单种生物被膜产生的EPS基质组成和功能<sup>[1,5]</sup>。鉴于此,本文阐述生物被膜EPS基质的组成成分和多种特性,分析模式细菌生物被膜和EPS相关的毒力内在关联,探讨靶向作用EPS基质的控制策略。

## 1 生物被膜 EPS 基质的组成

因微生物种属、局部剪应力、营养物质和底物利用及宿主环境不同,生物被膜EPS基质组成和结构有较大的差异<sup>[1]</sup>,且单种和多种细菌群落间EPS的分泌和空间组织结构也不同<sup>[2]</sup>。EPS组分影响生物被膜的结构和功能属性<sup>[4]</sup>,这些生物分子可分为两种类型:细胞表面的基质蛋白和分泌到胞外组分。细胞表面的基质蛋白,主要为细胞表面附属物,如鞭毛、IV型菌毛和功能性淀粉样蛋白等。细胞表面附属物通过影响细菌运动和固体表面附着,调节细菌黏附、机械稳定性和群体感应等功能。胞外组分包括分泌于菌体外的胞外多糖、蛋白质、胞外DNA(eDNA)和胞外RNA(eRNA),与基质支架和功能有关<sup>[1-2]</sup>。目前铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌等多种模式菌的EPS生物大分子已被鉴定和报道(表1)。

表 1 几种模式细菌生物被膜中胞外聚合物的组成和作用

Table 1 Composition and functions of extracellular polymeric substances (EPS) in biofilms from some model bacteria

EPS	Names	Location	Functions	Bacteria	
Polysaccharides	Psl	Extracellular/ cell-associated	Adhesion, scaffolding, stability, protection against immune response, cell-to-cell binding	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	Pel	Extracellular/ cell-associated	Adhesion, scaffolding, stability, cell-to-cell binding, protection against antibiotics		
	Alginate	Extracellular	Adhesion, scaffolding, water/nutrient retention, protection against harsh environments/immune response/antimicrobials, stability		
	EpsA-EpsO	Extracellular	Adhesion, scaffolding, stability	<i>Bacillus subtilis</i>	
	$\gamma$ -PGA (poly- $\gamma$ -glutamate)	Extracellular	Adhesion, scaffolding, sorption, nutrient		
	PIA or PNAG	Extracellular	Adhesion, cohesion, scaffolding, stability, protection against antibiotics	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	Glucans/fructans	Extracellular/ cell-associated	Adhesion, cohesion, scaffolding, stability, cell-to-cell binding, acidic microenvironment, protection against antimicrobials, nutrient	<i>Streptococcus mutans</i>	
	Vibrio polysaccharide (VPS)	Extracellular/ cell-associated	Adhesion, cohesion, scaffolding, stability	<i>Vibrio cholerae</i>	
	Proteins	Type IV pilins (T4P)	Cell-associated	Adhesion, scaffolding, twitching motility, mechanosensing	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
		Lectins (LecA/LecB)	Extracellular/ cell-associated	Adhesion, cell-to-cell binding, stability, cytotoxin	
Structural matrix protein (CdrA)		Extracellular/ cell-associated	Adhesion, scaffolding, stability, cell-to-cell binding, interaction with Psl		
Biofilm surface layer protein (BslA)		Extracellular	Surface hydrophobicity, protection	<i>Bacillus subtilis</i>	
TasA/TapA		Extracellular cell wall	Scaffolding, cell-to-cell binding		
Flagellum		Cell-associated	Adhesion, motility, mechanosensing		
Fibronectin-binding proteins		Extracellular/ cell-associated	Adhesion, cell-to-cell binding	<i>Staphylococcus aureus</i>	
Staphylococcal protein A		Extracellular/ cell-associated	Adhesion, cell-to-cell binding, immune evasion		
Surface protein G (SasG)		Extracellular/ cell-associated	Adhesion, cell-to-cell binding		
Biofilm associated protein (BAP)		Extracellular	Adhesion, cell-to-cell binding, scaffolding, stability		
Phenol-soluble modulins (PSMs)	Extracellular	Proinflammatory, lysing of host cells, biofilm spreading, scaffolding			
Glucosyltransferases (Gtf)/ fructosyltransferases	Extracellular/ cell-associated	EPS production	<i>Streptococcus mutans</i>		
Dextranase	Extracellular	EPS degradation/remodeling			
P1 (Antigen I/II)	Cell-associated	Adhesion, cell-to-cell binding			

(待续)

(续表 1)

	Glucan binding proteins (GbpA, GbpB, GbpC)	Extracellular/ cell-associated	Adhesion, cohesion, stability	
	Biofilm-associated protein (Bap1)	Extracellular/ cell-associated	Adhesion, scaffolding, hydrophobicity, stability, protection	<i>Vibrio cholerae</i>
	RbmA/RbmC	Extracellular/ cell-associated	RbmA: cell-to-cell binding RbmC: scaffolding, stability	
	MSHA pili	Cell-associated	Adhesion, motility, mechanosensing	
Nucleic acids	eDNA	Extracellular	Scaffolding, adhesion, cohesion, nutrient source, DNA damage repair, gene transfer, interaction with other matrix components	Wide distribution in bacteria
Lipids	Teichoic and lipoteichoic acids	Cell-associated	Adhesion, cohesion, protection, immune evasion	<i>Staphylococcus aureus</i>
Lipopolysaccharides	LPS (endotoxin)	Cell-associated	Adhesion, colonization and host invasion, activation of immune response	Wide distribution in G <sup>-</sup> bacteria

生物被膜 EPS 基质由多种功能性生物分子组成, 包括胞外多糖、蛋白质、eDNA 和脂质。其中, 铜绿假单胞菌胞外多糖 Pel、Psl、藻酸盐, 金黄色葡萄球菌多糖细胞间粘附素(PIA), 变形链球菌的葡聚糖/果聚糖, 霍乱弧菌多糖, 枯草芽孢杆菌 *epsA-epsO* 操纵子编码的胞外多糖, 对生物被膜三维空间结构的形成起主导作用。铜绿假单胞菌蛋白 IV 型菌毛素、凝集素(LecA、LecB)、结构基质蛋白 CdrA, 枯草芽孢杆菌蛋白生物被膜表层蛋白(BslA)、易位依赖抗菌孢子组分(TasA)、鞭毛, 金黄色葡萄球菌蛋白纤维连接蛋白结合蛋白(FnBPs)、葡萄球菌蛋白 A (SpA)、表面蛋白 G (SasG)、生物被膜相关蛋白(BAP), 变形链球菌蛋白葡萄糖基转移酶(Gtf)、果糖基转移酶(Ftf)、葡聚糖酶、P1 粘附素(AgI/II)、葡聚糖结合蛋白 Gbps、霍乱弧菌被膜相关蛋白(BAP1)、基质蛋白 RbmA/RbmC、MshA 菌毛, 是构成生物被膜骨架的重要成分。胞外多糖和胞外蛋白基质可作为生物被膜在动态环境的支架, 维持空间结构的稳定性, 并为微生物群落提供各种化学和物理信号, 从而促进生物被膜的形成、发育和成熟<sup>[3]</sup>。混合生物

被膜中某些微生物在种属的互动中会分泌更粘稠和更多的胞外基质, 导致共聚集, 促进形成致密、稳定的空间结构, 如希瓦氏菌等 4 种共培养海洋微生物<sup>[6]</sup>、金黄色葡萄球菌和荧光假单胞菌混合被膜<sup>[7]</sup>。

细菌除自身产生 EPS 外, 还能从宿主或周围环境获得的生物分子作为 EPS 基质。研究发现, 宿主蛋白和糖蛋白(如唾液蛋白)可作为微生物营养的来源, 也有利于基质支架的形成, 促进菌体的附着<sup>[2]</sup>。另外, 在生物矿化过程中形成的矿物质也能为生物被膜基质提供完整性结构, 作为支架保护细菌免受抗菌剂的伤害<sup>[8]</sup>。已发现革兰氏阳性细菌枯草芽孢杆菌和分枝杆菌的生物被膜诱导碳酸钙矿物的产生, 抵抗不利环境条件, 并提高微生物群落的整体适应性<sup>[9]</sup>。本课题组也发现氯化钙介导食品致腐细菌-荧光假单胞菌生物被膜的形成, 使其被膜结构更致密<sup>[10]</sup>。

## 2 生物被膜 EPS 基质的特性

### 2.1 EPS 的物理特性

细菌生物被膜的形成是一个动态过程,

EPS 基质在被膜发育、发展和成熟阶段有多种功能, 与菌体的粘附、支架、机械稳定性和保护作用密切相关。生物被膜形成的初期阶段, 细菌在宿主表面的初期粘附以粘附素-受体作用为主, 还有表面扫描和传感。霍乱弧菌可利用鞭毛等结构作为机械传感器<sup>[1,11]</sup>, 寻找合适的粘附位点。霍乱弧菌基质蛋白 BAP1 参与生物被膜菌与介质表面的粘附, RbmA 介导表面附着特性<sup>[11]</sup>。铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、霍乱弧菌等细菌从初期的细胞聚集转变为微菌落过程中, 都有 EPS 介导的粘附作用<sup>[4-5,12-13]</sup>。另外, EPS 还参与混合生物被膜的共粘附, 枯草芽孢杆菌分泌的 EPS 蛋白 TasA 可介导链球菌间聚集<sup>[14]</sup>。在混合群落细菌的初期粘附中 EPS 分泌菌比非 EPS 菌更具竞争优势<sup>[15]</sup>。

在生物被膜发育阶段 EPS 能促进细胞间识别/共粘附和微生物聚集<sup>[1]</sup>, 其中菌种间以机械传感或特定粘附素(蛋白)-受体(多糖)为主要的的作用方式。在共培养环境下具有生物被膜形成能力的细菌可以架桥非被膜生成菌, 出现共聚集作用, 从而提高共生混合菌种的被膜形成能力<sup>[16]</sup>。以 EPS 基质介导的生物被膜组装包括: (1) 被膜菌在粘附位点分泌的 EPS 构成最初胞外基质, 促进细菌定殖和细胞聚类; (2) 持续分泌的 EPS 形成内部包裹菌体核心结构的三维空间基质; (3) 该核心结构提供三维聚集体或微菌落的形成<sup>[3]</sup>。随着生物被膜的发育, EPS 原位产生形成复杂的 3D 基质支架, 内部包裹聚簇状分布的微生物细胞, 为高度分隔的生物被膜菌提供凝聚力和机械稳定性<sup>[5]</sup>。Erskine 等<sup>[14]</sup>报道枯草芽孢杆菌中淀粉样不溶性 EPS 结合被膜内部的菌体, 稳定空间网络和支架作用。变形链球菌的 P1 粘附素(AgI/II)<sup>[15]</sup>、芽孢杆菌形成的非酰化 TasA<sup>[17]</sup>、假单胞菌 Fap 纤维<sup>[18]</sup>、金黄色葡萄球菌 Bap 纤维<sup>[19]</sup>也能形成功能性淀粉样

蛋白(淀粉样纤维), 增强生物被膜的结构稳定性, 保护菌体。

随着生物被膜进入成熟阶段, 被膜基质中胞外多糖和 eDNA 良好的粘弹性使被膜菌在持续的流体剪切应力或高机械压力下难以脱离, 提高被膜菌对环境应激因素的适应性和保护性反应<sup>[20]</sup>。除机械阻力外, EPS 还可作为扩散限制屏障因子, 阻止各种抗菌剂和药物进入生物被膜的深层<sup>[21]</sup>, 从而增强生物被膜对抗菌药物的耐受性<sup>[1,5,15]</sup>。并且生物被膜基质中存在某些酶也能分解抗生素, 使其失活<sup>[22]</sup>。EPS 基质也为生物被膜菌抵抗机械清除、抗菌剂和宿主免疫力提供物理稳定性, 然而相关的机制有待深入研究。

## 2.2 EPS 的化学特性

EPS 基质不仅作为物理屏障阻止多种物质, 还影响多种分子在生物被膜中扩散, 从而使多种营养和化学成分在被膜空间结构中形成梯度分布, 如氧、pH、信号分子、无机离子、代谢物等。因此, 异质性的生物被膜微环境受到不同浓度化学成分的影响, 还与 EPS 和微生物代谢互作有关。研究发现, 不同氧气丰度的铜绿假单胞菌和大肠杆菌生物被膜中 EPS 相关基因表达和代谢有差异<sup>[23]</sup>。并且, 生物被膜空间结构中微环境的 pH 分布也不同<sup>[24]</sup>, 变形链球菌的生物被膜结构中某些微菌落中 EPS 基质能形成酸性梯度的微环境, 从而调节多种 pH 应答的 *atpB* 基因差异表达<sup>[25]</sup>。

另外, 生物被膜基质的另一化学功能是作为多种生物分子的营养储藏场所, 如发酵多糖<sup>[5,26]</sup>。最近研究表明, 由于霍乱弧菌生物被膜中渗透压差异, 微生物菌落出现生理性的膨胀, 从而最大程度地接触营养成分、吸收养分。同时, 生物被膜基质还可以作为外部消化系统, 与外源酶参与 EPS 的合成和分解及不同底物的

新陈代谢活动密切相关<sup>[2]</sup>。变形链球菌的葡聚糖酶和果聚糖酶分别降解生物被膜 EPS 组分中的可溶性葡聚糖和果聚糖,生成可发酵的多糖,在饥饿胁迫时被利用<sup>[2]</sup>。eDNA 作为一种碳源,能影响被膜解离,而带阴离子的 EPS 成分和 eDNA 可作为阳离子螯合剂,从而提高菌体抗菌性。当然,其他基质成分在被膜营养沉积和化学梯度形成中的作用仍需阐明。

生物被膜是一种异质性、EPS 包裹的环境,能够改变该局部基因表达、代谢活性及被膜内多种物种细胞间的信号传导<sup>[3-4]</sup>。最近研究表明,多种胞外和胞内信号分子参与调节被膜基质基因表达和代谢通路<sup>[27]</sup>。群体感应(quorum sensing, QS)是一种细胞密度依赖的细胞-细胞间信号机制,与生物被膜基质调控密切相关。铜绿假单胞菌至少存在 *las*、*rhl*、*pqs* 和 *iqs* 四种群体感应系统,信号分子与相应的受体结合,能激活与生物被膜发育、毒力因子和次生代谢相关的多种基因转录<sup>[27]</sup>。胞外多糖促进生物被膜内 QS 分子的吸收,而生物被膜基质可以激活或淬灭 QS 活性<sup>[28]</sup>。而环二鸟苷酸(c-di-GMP)是一种普遍存在于细菌胞内的核苷酸类小分子,参与调控假单胞菌生物被膜形成等多种生理功能。铜绿假单胞菌中有 c-di-GMP 代谢相关的多个 GGDEG 和 EAL 结构域蛋白,参与生物被膜主要组分-胞外多糖前提物质糖原的表达,还与被膜形成的菌毛、粘附素表达和胞外多糖合成的调控有关<sup>[27]</sup>。

### 3 生物被膜 EPS 基质对病原菌毒力的影响

EPS 基质的物理和化学特性对生物被膜形成和毒力表达发挥重要作用。被膜基质中群体微生物行为和功能,被认为构成了生物被膜毒

力。某些基质成分可以通过影响黏附-共聚集、致病微环境、机械和药物抗性<sup>[3]</sup>等因素,作为潜在的毒力因子<sup>[1-2,4]</sup>,引起人和动物发生疾病。葡萄球菌 EPS 中的 eDNA 和聚 *N*-乙酰氨基葡萄糖表面多糖(PNAG)可参与宿主定殖和抗菌素耐药等多种毒力<sup>[29]</sup>。

细菌生长和致病过程中往往分泌蛋白酶和其他胞外酶,如脂肪酶、酯酶、脱氧核糖核酸酶、核糖核酸酶和纤溶酶等。研究显示,细菌被膜 EPS 的葡聚糖促进菌体粘附-聚集、物种间相互作用和生物被膜积累,也有助于形成保护性和高度酸性的微环境<sup>[2,30]</sup>。已报道变异链球菌中葡萄糖基转移酶(*Smu\_833*)可调控葡聚糖和 eDNA 两种生物被膜基质成分,而 *Smu\_833* 基因的缺失株葡聚糖含量下降, eDNA 成分增加,在大鼠龋齿模型中体内毒力下降<sup>[30]</sup>。

宿主体内的病原体 EPS 组分对细胞间互作也起重要作用<sup>[13]</sup>,尤其肠道细菌被膜基质。肠道生物被膜的 EPS 有淀粉样 Curli 蛋白、eDNA、O 抗原、纤维素和 BapA 表面蛋白等<sup>[31]</sup>,与自身免疫性疾病、帕金森病有关。肠道被膜 EPS 组分为病原体相关分子模式(PAMPs),能激活促炎性先天免疫受体,如 Toll 样受体(TLR2、TLR9)、LPS 受体 CD14 和炎性小体 NLRP3。大肠杆菌和沙门氏菌等肠杆菌产生的 Curli 是一种典型的功能淀粉样纤维,也是生物被膜形成中细胞外基质重要的组分,且能与基质直接结合,在菌体细胞间形成稳定的三维结构束。大肠杆菌 Curli 不仅保护菌体,而且通过阻断补体 1q (complement component 1q, C1q)增强其毒力<sup>[14,32]</sup>。其他功能性淀粉样蛋白或纤维在细菌生物被膜菌的毒力中也起作用,如铜绿假单胞菌的 Bap 纤维、芽孢杆菌的 TasA 纤维和金黄色葡萄球菌的 Bap 纤维<sup>[17-19]</sup>。

## 4 抗 EPS 基质的生物被膜控制策略

多功能 EPS 基质在生物被膜形成初期的菌体定殖、被膜发育和成熟、及其毒力基因表达的整个生物被膜发育周期都必不可少。由于基质复杂的物理、化学和生物学特性,常规的抗菌方法并不适用于生物被膜菌感染的控制,而需要多靶点或联合治疗。Karygianni 等<sup>[3]</sup>提出以基质为靶点,清除不同物种普遍存在的 EPS 成分,可能成为细菌感染中抗混合生物被膜作用的潜在思路。目前,生物被膜基质的控制可以通过抑制 EPS 形成和降解成熟生物被膜 EPS 两条途径实现(图 1)。

### 4.1 抑制 EPS 分泌和发育

生物被膜 EPS 的产生受多种胞外/胞内信号网络和非信号机制的调节,阻断这些通路能

有效控制生物被膜的形成<sup>[4,33]</sup>。QS、c-di-GMP 和环腺苷二磷酸(c-di-AMP)调控多种 EPS 产生的外酶、多糖和粘附素,抑制 QS 和核苷酸通路可影响多种 EPS 形成的代谢过程<sup>[34-35]</sup>。细胞内高水平的 c-di-GMP 会诱导胞外多糖基质分子 Psl 和 Pel 高表达,促进细菌粘附聚集和生物被膜形成<sup>[35]</sup>。多种植物精油能影响假单胞菌等细菌的信号交流,从而影响生物被膜的粘附和稳定<sup>[7]</sup>。脱氧核糖核酸酶(DNase)能切割单链和双链 DNA、降解 DNA,有效地破坏生物被膜的稳定性<sup>[34]</sup>。另外,粘附素生成抑制剂或粘附素结合分子可通过阻断 EPS 介导的粘附,靶向影响 EPS 与宿主的互动,阻止细菌生物被膜的形成(图 1 左)。然而,许多细菌与宿主表面结合时表现多受体-配体相互作用,因此抑制细菌定殖需要同时阻断多个粘附位点<sup>[13]</sup>。

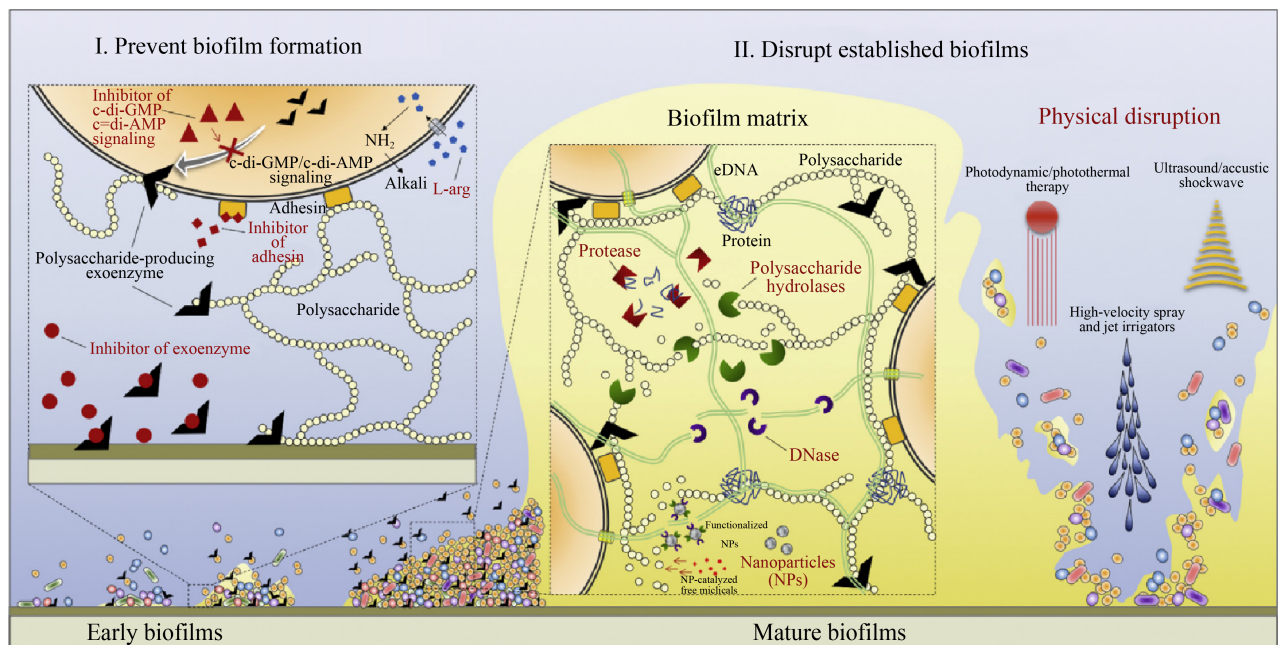


图 1 细菌生物被膜基质的控制策略<sup>[3]</sup>

Figure 1 Control strategies targeting the biofilm matrix<sup>[3]</sup>. Control strategies can be designed to prevent the biofilm formation either by inhibiting EPS production or blocking adhesion-mediated adherence (left). When biofilms are already established, strategies that can degrade EPS macromolecules may dismantle the scaffolding/protective matrix to weaken the biofilm structure and potentiate antimicrobial killing (middle). In addition, EPS networks can also be destroyed by physical-mechanical methods (right).

## 4.2 破坏结构性 EPS

微生物一旦分泌大量生物被膜基质, 形成保护性的微环境, 抑制 EPS 合成或阻止粘附相互作用的策略就不可行<sup>[36]</sup>。成熟生物被膜中形成的 EPS 可使用酶或其他抑菌剂降解, 破坏基质的物理完整性, 促进生物被膜的破坏和清除<sup>[19]</sup> (图 1 中)。Baker 等<sup>[37-38]</sup>使用糖苷水解酶 PslG 靶向分解 EPS 中的胞外多糖, 在体外破坏铜绿假单胞菌的成熟生物被膜。EPS 降解酶可作为常规抗菌剂的辅助剂, 增强药物渗透性和微生物杀灭活性<sup>[34]</sup>。研究表明, 葡聚糖基水解酶、糖苷水解酶和脱氧核糖核酸酶联合使用可以增强抗生素或抗菌肽对体外成熟生物被膜的杀伤力, 提高抗菌药物的转运能力<sup>[39]</sup>。此外, 机械、能量和光破坏等物理清除也是干预 EPS 的方法<sup>[36]</sup>, 如光动力和光热治疗、超声波和激光冲击波技术、及高速喷射和洗刷 (图 1 右)。光动力疗法中使用特定波长的光源来照射无毒的光敏剂, 如四吡咯、合成染料或天然化合物, 以产生活性单态氧, 破坏生物被膜杀灭微生物<sup>[40]</sup>。

## 4.3 新技术和新材料的应用

新技术和生物/纳米材料为控制 EPS 介导的生物被膜和毒力提供了新方向。第一类是缓释的有机药物纳米载体, 其具有生物相容性, 能渗透到生物被膜内部, 进入致病菌微环境后受触发以递送药物或多功能化合物(从催化纳米颗粒到适配体, 树状聚合物和生物活性肽), 以破坏 EPS 和内部菌体的活性或代谢<sup>[3]</sup>。抗菌肽和适配体还具有特定的生物被膜靶向特性, 可用于提高纳米颗粒(杂化纳米颗粒)的特异性和有效性<sup>[22]</sup>。第二类作为生物被膜靶向剂或纳米涂层的无机金属纳米粒子, 如银、铜、氧化铁和金。最近研究表明, 氧化铁( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )有类似过氧化物酶活性, 以剂量和 pH 依赖方式催化过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )产生羟基自由基, 降解生物被

膜基质, 从而快速杀灭内部的被膜菌<sup>[41]</sup>。此外, 利用益生菌或噬菌体治疗 EPS 也被认为是潜在的抗生物被膜技术。Lu 等<sup>[42]</sup>设计 T7 噬菌体表达 EPS 降解酶, 在感染大肠杆菌中比不表达酶的噬菌体抗生物被膜活性显著增强。

由于生物被膜生物学特性的复杂性, 如果微生物被膜菌和 EPS 基质的控制策略可以同时干扰被膜形成及破坏已产生的生物被膜, 则是一种更为有效和精准的方法。上述这些方法单独或联合使用, 都可以抑制生物被膜的形成, 破坏生物被膜的完整性。

## 5 总结和展望

细菌分泌的多种 EPS 基质对维持生物被膜结构的稳定性和支架发挥重要作用, 还参与生物被膜组装、群体行为和毒性的功能特性, 如信号传导、遗传交换、微环境形成、机械稳定性和抗生素耐受性等。微生物种类和代谢活性、营养物质的可利用性、宿主环境和生长阶段都影响 EPS 成分和结构的可变性, 为开发以 EPS 为靶点的药物和技术增加难度。尽管部分研究已揭示了某些模式微生物的生物被膜体系中 EPS 基质组成和功能, 然而复杂的信号分子与生物被膜形成和毒力因子表达的潜在机制仍需阐明, 多菌种的混合生物被膜中不同微生物如何共同调节发育和成熟的生物被膜中 EPS 组分的机制有待于进一步研究。

## 参考文献

- [1] Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(9): 563–575.
- [2] Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H. Oral biofilms: pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments. *Trends in Microbiology*, 2018, 26(3): 229–242.



- [3] Karygianni L, Ren Z, Koo H, Thurnheer T. Biofilm matrixome: extracellular components in structured microbial communities. *Trends in Microbiology*, 2020, 28(8): 668–681.
- [4] Dragoš A, Kovács ÁT. The peculiar functions of the bacterial extracellular matrix. *Trends in Microbiology*, 2017, 25(4): 257–266.
- [5] Hogley L, Harkins C, MacPhee CE, Stanley-Wall NR. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiology Reviews*, 2015, 39(5): 649–669.
- [6] Guillonneau R, Baraquet C, Bazire A, Molmeret M. Multispecies biofilm development of marine bacteria implies complex relationships through competition and synergy and modification of matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1960.
- [7] Wang YY, Hong XL, Liu JC, Zhu JL, Chen JR. Interactions between fish isolates *Pseudomonas fluorescens* and *Staphylococcus aureus* in dual-species biofilms and sensitivity to carvacrol. *Food Microbiology*, 2020, 91: 103506.
- [8] Dade-Robertson M, Keren-Paz A, Zhang M, Kolodkin-Gal I. Architects of nature: growing buildings with bacterial biofilms. *Microbial Biotechnology*, 2017, 10(5): 1157–1163.
- [9] Oppenheimer-Shaanan Y, Sibony-Nevo O, Bloom-Ackermann Z, Suissa R, Steinberg N, Kartvelishvily E, Brumfeld V, Kolodkin-Gal I. Spatio-temporal assembly of functional mineral scaffolds within microbial biofilms. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 2016, 2: 15031.
- [10] 樊洁敏, 唐蓉, 王雅莹, 朱军莉, 陆海霞. 氯化钙对食品致腐荧光假单胞菌生物被膜形成的影响. *食品科学*, 2019, 40(14): 160–165.  
Fan JM, Tang R, Wang YY, Zhu JL, Lu HX. Calcium chloride affected biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* as food spoilage bacteria. *Food Science*, 2019, 40(14): 160–165. (in Chinese)
- [11] Yan J, Nadell CD, Stone HA, Wingreen NS, Bassler BL. Extracellular-matrix-mediated osmotic pressure drives *Vibrio cholerae* biofilm expansion and cheater exclusion. *Nature Communications*, 2017, 8: 327.
- [12] Wang C, Hou JP, Van Der Mei HC, Busscher HJ, Ren YJ. Emergent properties in *Streptococcus mutans* biofilms are controlled through adhesion force sensing by initial colonizers. *mBio*, 2019, 10(5): e01908-19.
- [13] Hotterbeekx A, Kumar-Singh S, Goossens H, Malhotra-Kumar S. *In vivo* and *in vitro* interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus* spp.. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 106.
- [14] Erskine E, MacPhee CE, Stanley-Wall NR. Functional amyloid and other protein fibers in the biofilm matrix. *Journal of Molecular Biology*, 2018, 430(20): 3642–3656.
- [15] Sullan RMA, Li JK, Crowley PJ, Brady LJ, Dufrière YF. Binding forces of *Streptococcus mutans* P1 adhesin. *ACS Nano*, 2015, 9(2): 1448–1460.
- [16] Sanchez-Vizueté P, Orgaz B, Aymerich S, Le Coq D, Briandet R. Pathogens protection against the action of disinfectants in multispecies biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 705.
- [17] Romero D, Aguilar C, Losick R, Kolter R. Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(5): 2230–2234.
- [18] Dueholm MS, Petersen SV, Sønderkær M, Larsen P, Christiansen G, Hein KL, Enghild JJ, Nielsen JL, Nielsen KL, Nielsen PH, Otzen DE. Functional amyloid in *Pseudomonas*. *Molecular Microbiology*, 2010, 77(4): 1009–1020.
- [19] Taglialegna A, Navarro S, Ventura S, Garnett JA, Matthews S, Penades JR, Lasa I, Valle J. *Staphylococcal* bap proteins build amyloid scaffold biofilm matrices in response to environmental signals. *PLoS Pathogens*, 2016, 12(6): e1005711.
- [20] Hou JP, Veeregowda DH, Van De Belt-Gritter B, Busscher HJ, Van Der Mei HC. Extracellular polymeric matrix production and relaxation under fluid shear and mechanical pressure in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(1): e01516–e01517.
- [21] Reichhardt C, Parsek MR. Confocal laser scanning microscopy for analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture and matrix localization. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 677.
- [22] Arnaouteli S, Ferreira AS, Schor M, Morris RJ, Bromley KM, Jo J, Cortez KL, Sukhodub T, Prescott AR, Dietrich LEP, MacPhee CE, Stanley-Wall NR. Bifunctionality of a biofilm matrix protein controlled by redox state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(30): E6184–E6191.
- [23] Beebout CJ, Eberly AR, Werby SH, Reasoner SA, Brannon JR, De S, Fitzgerald MJ, Huggins MM, Clayton DB, Cegelski L, Hadjifrangiskou M. Respiratory heterogeneity shapes biofilm formation

- and host colonization in uropathogenic *Escherichia coli*. *mBio*, 2019, 10(2): e02400-18.
- [24] Schlafer S, Baelum V, Dige I. Improved pH-ratiometry for the three-dimensional mapping of pH microenvironments in biofilms under flow conditions. *Journal of Microbiological Methods*, 2018, 152: 194–200.
- [25] Hwang G, Liu Y, Kim D, Sun V, Aviles-Reyes A, Kajfasz JK, Lemos JA, Koo H. Simultaneous spatiotemporal mapping of *in situ* pH and bacterial activity within an intact 3D microcolony structure. *Scientific Reports*, 2016, 6: 32841.
- [26] Teschler JK, Zamorano-Sánchez D, Utada AS, Warner CJA, Wong GCL, Linington RG, Yildiz FH. Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(5): 255–268.
- [27] 王帅涛, 高倩倩, 成娟丽, 林金水. 铜绿假单胞菌生物被膜组成及其受体群体感应系统和 c-di-GMP 调控的研究进展. *微生物学报*, 2021: 1–21.  
Wang ST, Gao QQ, Cheng JL, Lin JS. Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by quorum sensing systems and c-di-GMP. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021: 1–21. (in Chinese)
- [28] Bai YX, Gangoiti J, Dijkstra BW, Dijkhuizen L, Pijning T. Crystal structure of 4,6- $\alpha$ -glucanotransferase supports diet-driven evolution of GH70 enzymes from  $\alpha$ -amylases in oral bacteria. *Structure*, 2017, 25(2): 231–242.
- [29] Bielen K, 's Jongers B, Boddaert J, Raju TK, Lammens C, Malhotra-Kumar S, Jorens PG, Goossens H, Kumar-Singh S. Biofilm-induced type 2 innate immunity in a cystic fibrosis model of *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 274.
- [30] Rainey K, Michalek SM, Wen ZT, Wu H. Glycosyltransferase-mediated biofilm matrix dynamics and virulence of *Streptococcus mutans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(5): e02247-18.
- [31] Tursi SA, Tükel Ç. Curli-containing enteric biofilms inside and out: matrix composition, immune recognition, and disease implications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2018, 82(4): e00028-18.
- [32] Biesecker SG, Nicastro LK, Wilson RP, Tükel Ç. The functional amyloid curli protects *Escherichia coli* against complement-mediated bactericidal activity. *Biomolecules*, 2018, 8(1): 5.
- [33] Okshevsky M, Regina VR, Meyer RL. Extracellular DNA as a target for biofilm control. *Current Opinion in Biotechnology*, 2015, 33: 73–80.
- [34] Tang R, Zhu J, Feng L, et al. Characterization of LuxI/LuxR and their regulation involved in biofilm formation and stress resistance in fish spoilers *Pseudomonas fluorescens*. *International of Journal of Food Microbiology*, 2019, 297(16): 60–71.
- [35] Pérez-Mendoza D, Sanjuán J. Exploiting the commons: cyclic diguanylate regulation of bacterial exopolysaccharide production. *Current Opinion in Microbiology*, 2016, 30: 36–43.
- [36] Koo H, Allan RN, Howlin RP, Stoodley P, Hall-Stoodley L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(12): 740–755.
- [37] Baker P, Whitfield GB, Hill PJ, Little DJ, Pestrak MJ, Robinson H, Wozniak DJ, Howell PL. Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* glycoside hydrolase PslG reveals that its levels are critical for Psl polysaccharide biosynthesis and biofilm formation. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(47): 28374–28387.
- [38] Da Silva DP, Matwichuk ML, Townsend DO, Reichhardt C, Lamba D, Wozniak DJ, Parsek MR. The *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB binds to the exopolysaccharide Psl and stabilizes the biofilm matrix. *Nature Communications*, 2019, 10: 2183.
- [39] Baelo A, Levato R, Julián E, Crespo A, Astola J, Gavalda J, Engel E, Mateos-Timoneda MA, Torrents E. Disassembling bacterial extracellular matrix with DNase-coated nanoparticles to enhance antibiotic delivery in biofilm infections. *Journal of Controlled Release*, 2015, 209: 150–158.
- [40] Warriar A, Mazumder N, Prabhu S, Satyamoorthy K, Murali TS. Photodynamic therapy to control microbial biofilms. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2021, 33: 102090.
- [41] Gao LZ, Liu Y, Kim D, Li Y, Hwang G, Naha PC, Cormode DP, Koo H. Nanocatalysts promote *Streptococcus mutans* biofilm matrix degradation and enhance bacterial killing to suppress dental caries *in vivo*. *Biomaterials*, 2016, 101: 272–284.
- [42] Lu TK, Collins JJ. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(27): 11197–11202.

(本文责编 张晓丽)