

人类健康相关的微生物膜感染,往往给治疗带来极大的困难。此外,微生物膜还可造成如水处理系统和食品加工设备等的污损、微生物膜腐蚀一直是水处理、食品加工、海洋工程长期致力解决的问题。总之,对微生物膜的研究是十分重要的,是微生物领域研究工作的热点之一。本文结合微生物膜研究的最新进展,介绍了几种研究微生物膜的发生装置以及检测技术,并概述了几种潜在的控制和去除微生物膜的方法,展望了该领域的研究前景。

## 1 微生物膜发生装置

严格控制条件的体外微生物膜实验始于20世纪80年代中期<sup>[1-2]</sup>,随后几种微生物膜发生装置相继问世(表1)。借助于这些体外实验,人们在发现存在于自然界中的微生物膜的密度感应(Quorum Sensing, QS)现象的基础之上进一步研究了密度感应的作用<sup>[3-4]</sup>。

在表1介绍的这几种发生装置中,罗宾斯装置(Robbin's device)和流室法(flow cell),需要不断地向装置内加入新鲜的

表1 微生物膜发生装置及其优缺点对比

Table 1 Examples of biofilm-forming devices and their characteristics and limitations

微生物膜发生装置	主要优点	主要缺点	参考文献
改进的罗宾斯装置(modified Robbin's device)	流体力学条件较好,可连续培养	低通量	[7]-[8]
两阶段恒化器(two-stage chemostat)	避免了连续培养出现的泄露问题,是研究病原菌微生物膜形成过程的最佳选择	低通量	[9]
流室法(flow cell)	反应器表面平坦,可直接用于显微镜观察	低通量	[10]
灌注式微生物膜发酵器(perfused biofilm fermentor)	可对微生物膜生长速度进行控制	低通量	[11]-[12]
恒定厚度微生物膜发酵器(constant depth film fermentors)	常用于口腔医学的研究	低通量	[13]-[14]
微孔板(microtitre plate)	高通量,可直接用于显微镜观察	直接用于显微镜观察时,程序复杂,通量降低;自动定量检测时重复再现性差	[15]-[16]
卡尔加里装置(calgary device)	高通量,可直接用于显微镜观察并定量	需要在微孔板上外加一个平板	[17]
BioFilm ring test	高通量,操作程序简单,比微孔板法重复再现性好	没有实现自动化检测	[18]

营养液。微孔板法(microtitre plate)则不同,只需要一次性加入营养液,经过夜培养,营养物质消耗殆尽,微生物膜便可形成。微孔板法最大的特点是在短时间内产生大量的微生物膜,是一种高通量方法,对微生物膜基因突变的研究尤为重要。例如, Kulasekara 等<sup>[5]</sup>利用微孔板法构建了与微生物膜附着能力相关的转座子随机突变文库。微孔板法还可以用来对微生物膜的突变株进行纯化或者对显型进行检测。所以,微孔板法可将微生物膜的基因型与其功能联系起来。

新近发展起来的发生装置不但可以实时在线监测微生物膜的形成过程,而且可以对微生物的数量或胞外多聚物(Extracellular Polymeric Substances, EPS)进行定量<sup>[6]</sup>。虽然这些体外实验检测了环境因素、生理生化条件或基因突变等对微生物膜形成过程的影响,但是仍然无法直接对比这些参数的重要性以及相互之间的关系,其主要原因是大多数微生物膜发生装置无法在不同运行条件下,短时间内产生大量的实验数据;另一个重要原因是很难同时控制影响微生物膜形成的所有参数,特别是在复杂的混合菌群微生物膜中。

## 2 微生物膜结构研究技术

目前,研究微生物膜结构的最好方法是应用显微镜技

术,例如共聚焦激光扫描显微镜(Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM)、落射荧光显微镜(Epifluorescence Microscope, EFM)等<sup>[19-20]</sup>(表2)。

在微生物膜研究中存在一个很大的障碍,就是很难获得不脱水样品的清晰的显微照片,而共聚焦激光扫描显微镜则恰好克服了这一个困难,可在单细胞水平上对微生物膜进行四维( $x, y, z, t$ )的原位检测。共聚焦激光扫描显微镜是一种高技术荧光显微镜,可以对仅为 $0.3\mu\text{m}$ 厚度的区域进行聚焦,而把这 $0.3\mu\text{m}$ 以外的光全部用针孔遮挡起来,这就大大降低了背景噪音的干扰。共聚焦激光扫描显微镜以激光作为光源,可以提供高强度、高穿透力的激发光能量。这种显微镜不但可以获得二维平面图像,还可以获得三维立体图像。

荧光显微镜的显影荧光染料很多,但是迄今为止常用于微生物膜研究的主要有以下几种(表3)。DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)、CTC(5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride)、SYTO 9/碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)等荧光染料分别用来检测微生物膜的细胞总数、具有呼吸活性的细胞数量和活/死细胞相对数量等参数。而BOBO-3和凝集素-荧光素则可以揭示胞外多聚物的性质。

除了这些外加荧光染料外,还可以利用被荧光蛋白基因

表 2 用于微生物膜研究的显微镜类型、原理和用途

Table 2 Microscopes used for biofilm studies, their principles and applications

显微镜类型	原理和用途	参考文献
扫描电子显微镜 (Scanning Electron Microscope, SEM)	分辨率较高;但是要预先对微生物膜进行脱水处理,使得整个框架收缩,因而很难得到微生物膜原有的三维结构信息	[21]
环境扫描电子显微镜 (Environmental Scanning Electron Microscope, ESEM)	低真空(接近大气压)扫描电子显微镜,可用于不脱水样品的检测	[22]
原子力显微镜 (Atomic Force Microscopy, AFM)	用弹性微悬臂来检测样品表面特征,可用于不脱水的、活的生物样品的检测。只能观察到微生物膜的外在轮廓,而对其内部结构无能为力。多用于微生物膜表面附着力的检测	[23]
红外线显微镜 (Infrared Microscopy)	因为所用光源波长为 2800~10000nm, 所以分辨率仅为几十微米,无法对细菌单细胞进行检测	[24]
拉曼显微镜 (Raman Microscopy)	以可见光或近红外光激光作为光源,可对细菌单细胞进行检测	[25]
落射荧光显微镜 (Epifluorescence Microscope, EFM)	以紫外线为光源,用以照射被检物体,使之发出荧光,然后在显微镜下观察物体的形状及其所在位置	[26]
共聚焦激光扫描显微镜 (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM)	可获得原有的、不脱水状态下的三维结构;可同时应用多个探针,并能同时记录多方面的图像数字信息	[27]
荧光相关光谱 (Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS)	利用测定微区内 (<10 <sup>-15</sup> L) 荧光强度随时间的涨落进行分析检测,具有极高的灵敏度,是一种重要的单分子检测技术,可与共聚焦激光扫描显微镜集成用于微生物膜的研究	[28]

表 3 用于微生物膜研究的荧光染色方法、原理和用途

Table 3 Fluorescence staining methods used for biofilm studies, their principles and applications

荧光染色方法	原理	用途	参考文献
DAPI 染色	DNA 荧光染料,发蓝色荧光,可以标记所有细菌	用于检测微生物膜的结构及在物体表面的附着面积	[32]
SYTO 9/PI 染色	二者均是 DNA 荧光染料,当混合使用时,细胞膜完整的细菌被 SYTO 9 标记,发绿色荧光;细胞膜破损的细菌被 PI 标记,发红色荧光	用于检测活/死细菌的相对数量	[33]
CTC 染色	可以被细菌细胞通过电子传递链还原,在细胞内形成红色荧光沉淀物质 CTC(CTC-Formazan)	用于检测具有呼吸活性的细胞。还可以与 DAPI 进行双染色,检测具有呼吸活性的细菌占细菌总数百分比	[34]
BOBO-3 染色	DNA 荧光染料,发红色荧光,与 PI 类似不能透过微生物膜,但比 PI 灵敏度高	用于检测胞外多聚物中的 DNA (extracellular DNA, eDNA)	[27]
凝集素-荧光素染色	凝集素是一种能与糖结合的蛋白质,一种凝集素具有对某一种特异性糖基专一性结合的能力	用于检测胞外多聚物中多糖的种类和数量	[32]

修饰的菌种来制作微生物膜,如绿色荧光蛋白 (Green Fluorescent Protein, GFP), 由于绿色荧光蛋白的荧光是生物细胞的自主功能,荧光的产生不需要任何外源反应底物,可以直接用于荧光显微镜的观察。荧光蛋白有很多变种,最近有人用 3 种不同颜色的荧光蛋白标记的不同菌种制成混合菌群微生物膜,研究不同菌种之间的相互关系<sup>[29]</sup>。

与分光光度计不同,显微镜不但可以提供这些参数的定量结果,还可以提供微生物膜的空间结构图像。如果微生物膜由混合菌群组成,还可以结合荧光原位杂交技术检测每个微生物种群的相对数量和位置<sup>[30-31]</sup>。

### 3 微生物膜化学物质检测方法

#### 3.1 微型传感器

在结构异质性被发现前,有人预测微生物膜内存在一些“通道”<sup>[35]</sup>。因为在好氧微生物膜中,物质的有效运输取决于微生物膜的结构。通过共聚焦激光扫描显微镜观察,证明这些“通道”确实是存在的。接下来可以用微型传感器来直接检测微生物膜中不同区域底物的浓度。例如,溶解氧 (Dissolved Oxygen, DO) 微电极可以用来检测好氧微生物膜中氧气的分布状况。De Beer 等<sup>[36]</sup>的研究结果显示这些“通道”可以将氧气输送到微生物膜内部,但是因为扩散速度和外层微生物的利

用导致在微菌落中心区的溶解氧浓度非常低。这种直接对微生物膜进行检测的方法可以解释为什么自然界存在一些混合菌群组成的微生物膜,其表层为好氧微生物,而里层则为兼性或者厌氧微生物。

### 3.2 胞外多聚物的检测

微生物膜的胞外多聚物包括 DNA、蛋白质、多糖、脂质等物质,它们相互牢固地凝集在一起构成微生物膜的支架,对微生物膜最初的黏附、发展过程中物质的运输、对抗逆境等起到重要作用。这些多聚物可以用相关的荧光染料染色,然后进行荧光显微镜观察,也可以提取后进行定量测定。常用的提取方法有离心法、EDTA 提取法、蒸汽提取法、甲醛提取法等。其中蒸汽提取法比较适合于蛋白质,甲醛提取法则比较适合于多糖<sup>[37]</sup>。胞外多聚物提取方法的优劣主要取决于是否将尽量多的胞外物质提取出来,同时尽量少地破坏细胞。

### 3.3 密度感应信号分子的检测

密度感应即当微生物的数量达到一定的密度时才能发生的感应现象。微生物在繁殖过程中向周围环境分泌特定的信号分子,这种信号分子被称为自诱导物(Autoinducer, AI)。当微生物达到某一密度时,它们的信号分子的浓度就会超过一个阈值水平,此时的微生物会通过细胞之间的信息交流来感知、整合和处理环境的综合信息,改变和协调它们之间的行为,共同表现出它们的某些特性,从而表现出单个细胞无法达到的某些生理功能和调节机制。研究微生物膜的密度感应系统对理解微生物膜的形成过程、表观特征等具有重要意义。根据细菌群体交流的化学信号分子(即自诱导物)的种类,大体可以分为 3 大类。通常,革兰氏阴性菌以酰化高丝氨酸内酯(Acylhomoserine Lactone, AHL)作为自诱导物,而革兰氏阳性菌则使用修饰的寡肽作为沟通用语,第三类是兼具了上述两种密度感应系统的部分特征,是一种杂合型“多语言”的群体感应。

通常情况下,信号分子的浓度是很低的,无法用普通的方法进行检测。信号分子的检测包括提取-分离、纯化-鉴定等步骤。分离纯化通常使用高效液相色谱(High-Pressure Liquid Chromatography, HPLC)或者薄层色谱(Thin-Layer Chromatography, TLC)等方法。信号分子的结构则可以用质谱(Mass Spectrometry, MS)、核磁共振谱(Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR)或红外光谱(Infrared Spectroscopy, IR)等进行分析<sup>[38]</sup>。信号分子基因被敲除的突变株不能产生信号分子,只有人为地外加信号分子才能够表现出野生型菌株所具有的表型,所以还可以用突变菌株对信号分子的性质进行分析。

## 4 潜在的控制和去除微生物膜方法

应用于水处理系统的抗污损方法既要对付游微生物有效,还要对微生物膜起作用。常用的方法有通入氯气、二氧化氯、氯胺或者臭氧,还有碘、溴、高锰酸钾、双氧水,还可以用紫外线照射、离子辐射、高 pH、高温等方法。这些方法都或多

或少的会对环境造成影响,甚至危害人类健康,所以开发新的控制和去除微生物膜的方法越来越受到各界的重视。

### 4.1 自然抗污损物质

生活在海洋里的大多数生物都具有防止其他生物附着其上的能力<sup>[39]</sup>。其原理是这些生物可以合成并分泌一类代谢产物,这类代谢产物可以防止其他生物的附着。很多海洋藻类<sup>[40]</sup>、海绵<sup>[41]</sup>、一种蓝贻贝<sup>[42]</sup>都具有抗污损的能力。因此,近些年一些研究致力于从这些生物中提取这类代谢产物,并评价其抗污损的能力。与人工合成的抗生素相比,这类物质是自然产生的,不会导致环境污染问题。研究还表明用这类物质制成的油漆具有很好的抗污损效果<sup>[43]</sup>。常见的自然抗污损物质有辣椒素、zosteric 酸、单宁酸、单宁酸铜等。迄今为止,在这一领域实验室开展的研究工作还非常有限,大多数自然抗污损物质的成分还不得而知,所以这类物质的广泛应用还有待时日。

### 4.2 酶法驱散

有些方法可以将微生物从所附着的表面驱散下来,如一些酶的作用。这些酶有的可以直接作用于微生物的黏附素,有的可以水解胞外多糖。早在 1995 年, Brisou 等的研究结果表明,将水解酶作用于微生物膜 2~4h 就可将细菌从其所附着的表面上驱散下来<sup>[44]</sup>。Leroy 等用市售的 4 种蛋白酶、7 种糖苷酶和一种脂肪酶来检验这些水解酶对一种海洋细菌附着过程的影响,结果发现枯草杆菌蛋白酶不但可以有效阻止细菌的粘附,还可将已经附着的细菌驱散下来<sup>[45]</sup>。一项最新的研究则将这种方法应用于实际,研究者将 7 种多糖酶和蛋白酶作用于从食品生产设备中分离出来的 16 种细菌,结果一种丝氨酸蛋白酶和一种  $\alpha$ -淀粉酶具有很好的驱散细菌的作用<sup>[46]</sup>。但是,因为微生物的多样性和微生物胞外多聚物的复杂性,使得这些酶短期内难以成为抗生素的替代品。

### 4.3 一氧化氮

一氧化氮是一种易溶于水的气体。早在 2004 年, Schmidt 等发现对于欧洲亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas europaea*),一氧化氮既是控制其生长的信号分子,同时还具有影响其微生物膜形成的作用。当一氧化氮浓度高于 30mg/L 时可以诱导这种细菌生物膜的形成;但若浓度低于 5mg/L 则恰好相反<sup>[47]</sup>。2006 年, Barraud 等在研究中用硝普钠(Sodium Nitroprusside, SNP)作为一氧化氮的供体,当硝普钠处于低浓度、亚致死量(25~500nmol/L)时就可导致铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)生物膜的解散。因为细菌形成生物膜后对抗生素的抗性要比浮游状态高至少 1000 倍。所以,研究发现当把已形成的铜绿假单胞菌生物膜用 500nmol/L 浓度的 SNP 溶液处理以后,再加托普霉素、双氧水、SDS 等杀菌剂几乎可将这种细菌杀灭殆尽<sup>[48]</sup>。关于一氧化氮驱散微生物膜的作用机理还不清楚,不过它已成为一种潜在的环境友好型方法。

## 5 展望

组学(omics)的概念由来已久,如基因组学(genomics)、蛋

白质组学(proteomics)等,基因组学的兴起源于高通量基因分析技术的发展。Azevedo等<sup>[49]</sup>提出是否可以将组学概念引进到微生物膜领域,建立微生物膜组学(biofomics)。这可能会引发微生物膜在线数据库的建立,就像基因组学中的GenBank、蛋白质组学中的PDB(Protein Data Bank)等一样,供全世界分享和交流的一个平台。这个数据库的建立需要全世界的研究机构提供有关微生物膜的各种信息。当然,这需要大力发展高通量的微生物膜发生装置,建立微生物膜组学的标准方法和标准参数。这可能是未来几十年微生物膜领域的主要发展方向,将会对医学、工业和环境微生物的发展发挥巨大的推动作用<sup>[49]</sup>。

### 参考文献 (References)

- [1] Bakke R, Trulear M G, Robinson J A, *et al.* Activity of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms—steady state [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1984, 12: 1418–1424.
- [2] Nickel J C, Wright J B, Ruseska I, *et al.* Antibiotic-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* colonizing a urinary catheter *in vitro* [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1985, 4: 213–218.
- [3] McLean R J C, Whiteley M, Stickler D J, *et al.* Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, 154: 259–263.
- [4] Hardie K R, Heurlier K. Establishing bacterial communities by "word of mouth": LuxS and autoinducer 2 in biofilm development[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6: 635–643.
- [5] Kulasekara H D, Ventre L, Kulasekara B R, *et al.* A novel two-component system controls the expression of *Pseudomonas aeruginosa* fimbrial cup genes[J]. *Mol Microbiol*, 2005, 55: 368–380.
- [6] Peeters E, Nelis H J, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates [J]. *J Microbiol Methods*, 2008, 72: 157–165.
- [7] Evans R C, Holmes C J. Effect of vancomycin hydrochloride on *Staphylococcus epidermidis* biofilm associated with silicone elastomer[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1987, 31: 889–894.
- [8] Kharazmi A, Giwercman B, Hoiby N. Robbin's device in biofilm research [J]. *Biofilms*, 1999, 310: 207–215.
- [9] Keevil C W. Continuous culture methods to study pathogens in biofilms [J]. *Methods Enzymol*, 2001, 334: 104–122.
- [10] Braganca S M, Azevedo N F, Simoes L C, *et al.* Use of fluorescent *in situ* hybridisation for the visualisation of *Helicobacter pylori* in real drinking water biofilms[J]. *Water Sci Tech*, 2007, 55: 387–393.
- [11] Gilbert P, Allison D G, Evans D J, *et al.* Growth rate control of adherent bacterial populations[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55: 1308–1311.
- [12] Baillie G S, Douglas L J. Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42: 1900–1905.
- [13] Kinniment S L, Wimpenny J W T, Adams D, *et al.* The effect of chlorhexidine on defined, mixed culture oral biofilms grown in a novel model system[J]. *J Appl Bacterio*, 1996, 181: 120–125.
- [14] McBain A J, Bartolo R G, Catrenich C E, *et al.* Effects of triclosan-containing rinse on the dynamics and antimicrobial susceptibility of *in vitro* plaque ecosystems [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47: 3531–3538.
- [15] Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of *Staphylococcal* biofilm formation[J]. *J Microbiol Methods*, 2000, 40: 175–179.
- [16] Azevedo N F, Pacheco A P, Keevil C W, *et al.* Adhesion of water stressed *Helicobacter pylori* to abiotic surfaces [J]. *J Appl Microbiol*, 2006, 101: 718–724.
- [17] Harrison J J, Turner R J, Ceri H. High-throughput metal susceptibility testing of microbial biofilms[J]. *BMC Microbio*, 2005, 15: 53.
- [18] Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R, *et al.* A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria [J]. *J Microbiol Methods*, 2007, 68: 605–612.
- [19] Keevil C W. Rapid detection of biofilms and adherent pathogens using scanning confocal laser microscopy and episcopic differential interference contrast microscopy[J]. *Water Sci Tech*, 2003, 47: 105–116.
- [20] Merod R T, Warren J E, McCaslin H, *et al.* Toward automated analysis of biofilm architecture: Bias caused by extraneous confocal laser scanning microscopy images [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73: 4922–4930.
- [21] Rajeb A B, Kallali H, Aissa N B, *et al.* Soil microbial growth and biofilm expansion assessment under wastewater infiltration percolation treatment process: Column experiments [J]. *Desalination*, 2009, 246: 514–525.
- [22] Jacqueline P E, Buckman J O, Bowen D, *et al.* An environmental-scanning-electron microscope investigation into the effect of biofilm on the wettability of quartz[J]. *SPE Journal*, 2010, 15(1): 223–227.
- [23] Kuznetsov Y, Malkin A, McPherson A. Atomic force microscopy studies of living cells: Visualization of motility, division, aggregation, transformation and apoptosis[J]. *J Struct Biol*, 1997, 120: 180–191.
- [24] Suci P A, Siedlecki K J, Palmer R J. Combined light microscopy and attenuated total reflection fourier transform infrared spectroscopy for integration of biofilm structure, distribution, and chemistry at solid-liquid interfaces[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(11): 4600–4603.
- [25] Ivleva N P, Wagner M, Horn H, *et al.* Towards a nondestructive chemical characterization of biofilm matrix by Raman microscopy[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 393: 197–206.
- [26] Larsen P, Olesen B H, Nielsen P H, *et al.* Quantification of lipids and protein in thin biofilms by fluorescence staining[J]. *Biofouling*, 2008, 24(4): 241–250.
- [27] 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): 5513.
- [28] Massol-Deya A, Whallon J, Hickey R, *et al.* Channel structures in aerobic biofilms of fixed-film reactors treating contaminated groundwater [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61: 769–777.
- [29] Werner E, Roe F, Bugnicourt A, *et al.* Stratified growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 6188–6196.
- [30] Silverman A P, Kool E T. Oligonucleotide probes for RNA-targeted fluorescence *in situ* hybridization[J]. *Adv Clin Chem*, 2007, 43: 79–115.
- [31] Cerqueira L, Azevedo N F, Almeida C, *et al.* DNA mimics for the rapid identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization (FISH)[J]. *Int J Mol Sci*, 2008, 9: 1944–1960.
- [32] Nosyk O, Haseborg E, Metzger U, *et al.* A standardized pre-treatment method of biofilm flocs for fluorescence microscopic characterization[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2008, 75: 449–456.
- [33] Zhu M, Takenaka S, Sato M, *et al.* Influence of starvation and biofilm formation on acid resistance of *Streptococcus* mutants[J]. *Oral Microbiol Immunol*, 2001, 16: 24–27.

- [34] Leroy C, Delbarre C, Ghillebaert F, *et al.* Effects of commercial enzymes on the adhesion of a marine biofilm-forming bacterium [J]. *Biofouling*, 2008, 24(1):11-22.
- [35] Siegrist H, Gujer W. Mass transfer mechanisms in a heterotrophic biofilm[J]. *Water Res*, 1985, 19(11): 1369-1378.
- [36] DeBeer D, Stoodley P, Roe F L, *et al.* Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport [J]. *Biotech Bioeng*, 1994, 43: 1131-1138.
- [37] Zhang X, Bishop P L, Kinkle B K. Comparison of extraction methods for quantifying extracellular polymers in biofilms [J]. *Wat Sci Tech*, 1999, 39(7): 211-218.
- [38] Graciela B M, Eulogio J B. Detection, purification and characterisation of quorum-sensing signal molecules in plant-associated bacteria [J]. *Journal of Biotechnology*, 2001, 91: 197-209.
- [39] Fusetani N. Biofouling and antifouling [J]. *Natural Product Reports*, 2004, 21: 94-104.
- [40] Hellio C, Berge J P, Beaupoil C, *et al.* Screening of marine algal extracts for anti-settlement activities against microalgae and macroalgae [J]. *Biofouling*, 2002, 18(3): 205-215.
- [41] Yang L H, Lee O O, Jin T, *et al.* Antifouling properties of 10 $\beta$ -formamidokalihinol-A and kalihinol A isolated from the marine sponge *Acanthella cavernosa*[J]. *Biofouling*, 2006, 22(12): 23-32.
- [42] Bers A V, D'Souza F, Klijnstra J W. Chemical defence in mussels: Antifouling effect of crude extracts of the periostracum of the blue mussel *Mytilus edulis*[J]. *Biofouling*, 2006, 22(4): 251-259.
- [43] Burgess J G, Boyd K G, Armstrong E, *et al.* The development of a marine natural product-based antifouling paint [J]. *Biofouling*, 2003, 19 (1): 197-205.
- [44] Brisou J F. Biofilms—methods for enzymatic release of microorganisms [M]. New York: CRC Press, 1995.
- [45] Leroy C, Delbarre C, Ghillebaert F, *et al.* Effects of commercial enzymes on the adhesion of a marine biofilm-forming bacterium [J]. *Biofouling*, 2008, 24(1): 11-22.
- [46] Lequette Y, Boels G, Clarisse M, *et al.* Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry [J]. *Biofouling*, 2010, 26(4): 421-431.
- [47] Schmidt I, Steenbakkens P J M, Op Den Camp H G M, *et al.* Physiologic and proteomic evidence for a role of nitric oxide in biofilm formation by *Nitrosomonas europaea* and other ammonia oxidizers [J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(9): 2781-2788.
- [48] Barraud N, Hassett D J, Hwang S H, *et al.* Involvement of Nitric Oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(21): 7344-7353.
- [49] Azevedo N F, Lopes S P, Keevil C W, *et al.* Time to "go large" on biofilm research: Advantages of an omics approach [J]. *Biotechnol Lett*, 2009, 31: 477-485.

(责任编辑 王芷)

## 加入全国学会注册个人会员登记号

中国科协所属的全国学会有192个，如中国数学会、中国光学学会等，您加入自己所属学科的全国学会了吗？您拥有个人会员登记号了吗？

如果您已经加入某一全国学会，请赶快注册个人会员登记号，它将使您：

→ 通过个人会员管理系统方便地浏览学会概况，登记个人参加学术活动、发表专著等信息，发表意见和建议，查看学会相关信息。

→ 您参加所加入的全国学会举办的学术活动，可获得注册费等方面的减免优惠。

→ 您在《科技导报》发表学术论文，交纳版面费时将获得优惠，还可以8折优惠价订阅《科技导报》。

