



水中构筑物表面生物膜形成物理化学过程*

申 锴¹⁾ 高 飞²⁾ 黄须强²⁾ 卢小鹏²⁾ 周慧敏²⁾ 李卫荣¹⁾ 铁 镒^{1)**}

(¹⁾ 大连交通大学, 连续挤压教育部工程研究中心, 大连 116028; ²⁾ 东北大学, 材料科学与工程学院, 沈阳 110819)

摘要 水中构筑物表面生物膜的形成会加速构筑物的腐蚀, 严重影响其使用效率和寿命; 成熟后的生物膜老化脱落或受水力剪切作用进入主体水中, 会造成水体二次污染, 对动植物生长和人类生活造成重大影响。生物膜的形成是由单个细菌黏附到表面开始的, 经过可逆黏附到不可逆黏附的过渡后, 细菌分泌的胞外聚合物 (extracellular polymeric substances, EPSs) 会加速表面微生物的形成, 再通过细菌间的群体感应 (quorum sensing, QS) 使细菌启动表型和基因型变化, 最终促使成熟生物膜的形成。本文综述了生物膜形成的不同阶段所涉及的物理化学过程 (薄膜形成阶段、细菌黏附阶段、胞外聚合物膜阶段、群体感应调节生物膜阶段和生物膜成熟与表征), 分析总结了本领域各方向的最新研究进展, 归纳并阐明了水中构筑物表面生物膜形成的机理和影响因素, 为生物膜防控、清除和利用等相关研究领域提供了理论依据。

关键词 水中构筑物, 生物膜, 细菌黏附, 物理化学过程, 胞外聚合物, 群体感应调节

中图分类号 Q935, Q936, Q937

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0632

水系统中的罐体、管道、过滤装置等构筑物, 长时间使用后微生物附着在设备表面或内壁, 容易形成生物膜, 生物膜会加速构筑物的腐蚀并可能造成水体二次污染, 进而影响到水系统生态平衡和人类的日常生活。水中有机和无机化合物吸附在构筑物表面形成薄膜, 为细菌、原生动物、真菌和放线菌、藻类等微生物的附着提供了条件, 其中单细胞细菌黏附在表面是形成生物膜的第一步, 也是最关键的一步。

在自然环境中, 细菌生长的主要模式是附着在表面形成生物膜^[1], 生物膜是一种结构化的群落, 由细菌和胞外多聚物共同组成^[2]。关于生物膜发育周期的探索起源于对铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 在表面附着行为的研究, 发现了生物膜发育过程是一个有序的、高度调节的过程^[3-4]。本文在现有研究的基础上, 将水中构筑物表面生物膜发育的关键时期分为5个阶段 (图1): 薄膜形成、细菌黏附、胞外聚合物

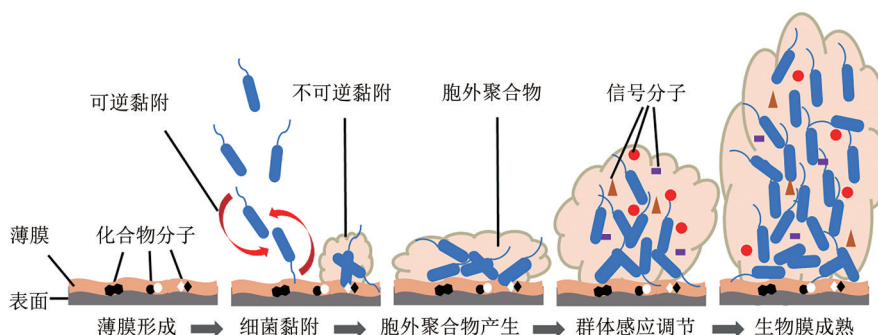


Fig. 1 Schematic diagram of the biofilm formation process^[5]

图1 生物膜形成过程示意图^[5]

* 国家重点研发计划重点专项 (2022YFE0126400), 国家自然科学基金 (52171235, 51974083, 52111540263) 和辽宁省教育厅基本科研项目 (LJKMZ20220856) 资助。

** 通讯联系人。

Tel: 0411-84105516, E-mail: tie-di@hotmail.com

收稿日期: 2022-12-31, 接受日期: 2023-03-21

(extracellular polymeric substances, EPSs) 产生、群体感应 (quorum sensing, QS) 调节、生物膜成熟, 每个发育阶段对应于蛋白质产生和基因表达的独特模式。本文将比较研究生物膜形成的不同阶段所涉及的物理化学过程的最新研究进展, 阐明水中构筑物表面生物膜的形成机理和影响因素, 为后续生物膜的控制和清除策略提供指导。

1 薄膜形成阶段

1.1 表面薄膜的形成

在 20 世纪 70 年代就有报道称溶解性和胶体性有机物在与自然水接触的表面吸附并形成薄膜, 这种薄膜的厚度为纳米级别^[6]。近年来的研究表明, 吸附在表面的化合物分子主要是水生生物代谢活动的产物, 包括如糖蛋白、脂类、核酸、离子、多糖、蛋白质等有机化合物、芳香族氨基酸、腐殖质物质和如糖醛酸、丙酮酸、硫酸盐、胞外多糖等可吸收的碳水化合物^[7]。由于化合物分子的来源、水域和季节等环境因素的不同, 薄膜的组成及其化学特征千差万别^[8]。

在水环境中, 化合物分子在表面沉降形成薄膜是生物膜形成的第一步^[9]。薄膜通过改变电荷、电位和表面张力来改变表面的理化性质, 这些表面属性的不规则变化导致局部黏附效率的变化, 进而影响细菌与表面的黏附^[10]。

1.2 薄膜对细菌黏附的影响

薄膜对细菌黏附的影响具有两面性。首先, 表面吸附的化合物薄膜可能支持黏合剂的形成, 从而增强细菌黏附力。Lorite 等^[10-11]通过研究苛养木杆菌 (*Xylella fastidiosa*) 对非生物表面的黏附性表明, 调节膜中存在的特定磷酸盐基团可以影响表面黏附过程和生物膜的发育, 不仅可以促进表面-细菌相互作用, 还可以作为细菌细胞信号通路的调节因子, 并进一步证明了调节膜是降低硅和玻璃表面亲水性和玻璃粗糙度的主要原因; Wolfe 等^[12]证明, 磷酸乙酰基的存在可以作为一个信号, 使生物膜形成中细菌可逆黏附与不可逆黏附之间进行有序切换。

相反的, 细菌群落中自然产生的非抗生素分子, 包括分泌信号分子或表面活跃的生物表面活性剂, 也可能干扰生物膜的形成, 调节微生物与界面的相互作用。Valle 等^[11]研究表明, 大肠杆菌分泌的 II 型荚膜由高分子质量和带负电荷的多糖聚合物组成, 可以通过削弱初始细菌-表面相互作用和减

少细菌-细菌的相互作用来干扰和抑制生物膜的形成。并证明了用 II 型荚膜多糖处理非生物表面会持久地影响表面的分子间作用力, 可以显著抑制并阻止革兰氏阳性 (Gram-positive) 和革兰氏阴性 (Gram-negative) 细菌形成生物膜。

此外, 有研究表明, 具有界面活性的两亲性分子——鼠李糖脂 (Rhamnolipids), 对细菌黏附和生物膜形成的影响取决于其分子浓度。鼠李糖脂是主要由铜绿假单胞菌产生的具有表面活性的细胞外次生代谢产物, 鼠李糖脂具有改变细胞与表面和细胞与细胞相互作用的能力, 鼠李糖脂的浓度不同, 结果可能不同^[13]。Raya 等^[14]表明, 低浓度鼠李糖脂通过导致细胞表面释放脂多糖从而增加细胞疏水性来影响细胞表面特性, 从而增加细胞最初附着在表面的亲和力。Davey 等^[15]认为鼠李糖脂可作为抗黏合剂和破坏剂, 如过量生产会抑制生物膜的发育, 以对抗由几种细菌和真菌形成的生物膜。

2 细菌黏附阶段

2.1 细菌黏附过程

细菌需要主动或被动接近物体表面才能开始附着, 有鞭毛的细菌可以利用基于鞭毛的运动, 对化学信号、光、温度、磁场和氧等环境线索作出反应, 主动向表面方向游去^[16], 而有些不运动的细菌通过液体流动、布朗运动、重力等被动运输靠近表面^[17-18]。相比之下, 主动运动是到达表面的最有效的方法。如图 2 所示, 当细菌向表面靠近时, 在范德华力、布朗运动和静电力等非特定力作用下首先发生可逆黏附^[19], 细菌通过感知与表面的接触及时调整蛋白质、聚合物刷层和胞外多糖等疏水成分的表达, 从而促进稳定的细菌-表面相互作用^[20], 一旦细菌足够接近表面 (<1 nm), 黏附素和细菌的鞭毛、菌毛等可以与固体表面相互作用, 并在黏附中起直接或间接的作用, 最终实现从可逆黏附到不可逆黏附的过渡。在发生不可逆黏附后, 来自基底表面的黏附力引起细菌细胞壁的纳米级变形, 直到细胞壁的刚性肽聚糖层的弹性和细胞质的胞内压力产生的反作用力达到平衡。细胞壁变形不仅增加了与基底表面的接触面积, 呈现出另一种物理化学键强化机制, 而且还伴随着膜表面张力的变化^[21]。

在细菌黏附过程中, 细菌-表面界面存在复杂的细胞外电子转移 (extracellular electron transfer, EET), 近年来, 人们对其转移机制和有效调控进

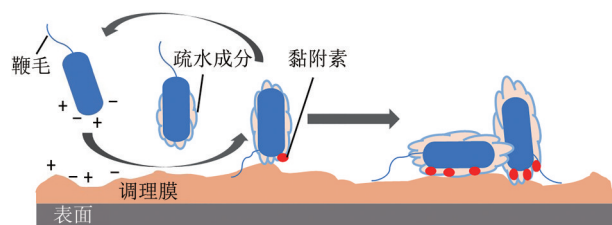


Fig. 2 Schematic diagram of single cell attachment process^[22]

图2 单细胞附着过程示意图^[22]

行了探索。Zhang等^[23]通过模拟电活性细菌在各种代谢条件下的黏附行为,建立了细菌黏附力与电场强度之间的非线性模型,证明了电活性细菌(electroactive bacteria, EAB)在代谢过程中可以通过EET与细胞外环境交换电子,为利用表面电位和电子流动方向及通量精确调节细菌黏附力提供了理论基础。Logan等^[24]探讨了细胞外电子传递的潜在原因主要包括细胞呼吸使用固体金属氧化物和可能作用于细胞与细胞间通信。Gong等^[25]指出电活性细菌可以进行双向的EET,与细胞外环境交换电子和能量。此外,一些学者致力于从细菌到表面的EET改进策略的研究:Apetrei等^[26]使用导电聚合物聚吡咯(polypyrrole, Ppy)修饰真菌细胞来改善真菌细胞膜和/或细胞壁的电荷转移;Wang等^[27]通过实验证明了用FeS₂纳米颗粒修饰的石墨烯阳极不仅有利于电极表面的细菌黏附和电化学活性地杆菌(*Geobacter*)的富集,而且还促进了高效的胞外电子转移。

2.2 细菌黏附的影响因素

细菌黏附会受到表面特征与周围环境的影响。首先,表面粗糙度或形貌的改变会极大地影响细菌的黏附和保留^[28],这是因为不同的表面结构为附着提供了不同的表面积,从而使细菌与表面产生不同的黏附力。在最近的研究中,在纳米尺度制备表面微结构已被证明是提高材料抗菌性能的有效策略。Dauben等^[29]通过控制纳米接触点密度,成功量化了金薄膜上的固定化金纳米颗粒(Au nanoparticles, AuNPs)与白色念珠菌(*Candida albicans*)之间的黏附力,得出AuNP结构表面被白色念珠菌附着所需的黏附力约为非结构表面的10倍。Spengler等^[30]将干净的硅片在氟酸、过氧化氢和水的混合物中分别刻蚀90 s、180 s、360 s,并对蚀刻硅表面进行单细胞力光谱测量,证明了金

黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)对纳米结构基底的黏附力随着表面结构尺寸的增大而减小。Doll等^[31]使用电子束光刻技术在硅表面制造了包括空白硅在内的4种表面微结构,并验证了金黄色葡萄球菌和放线菌聚集杆菌(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)在具有不同微结构的硅表面的附着力不同。表面疏水性也被认为是细菌黏附的决定因素,疏水相互作用可以促进蛋白质折叠和聚集、膜融合和细胞黏附^[32]。根据Van Oss等^[33]的研究可知,疏水相互作用通常是生物系统中所有长程非共价相互作用中最强的,两个非极性分子之间或一个非极性分子和一个极性分子之间的疏水引力被认为是围绕这些分子的水分子氢键释能的结果。Sheng等^[34]证明了金属表面疏水性的降低削弱了细菌黏附。

环境pH值在细菌初始附着过程中发挥着重要作用。研究表明,中性pH值有利于细菌生长和生物膜的形成,过度酸性或碱性的pH值可降低表面疏水性,减缓生物膜形成速度^[35]。Nguyen等^[36]进一步证明了生物膜生物量在pH为5.5~10的范围内波动较大,在pH值为7.5~8.0的范围时变得相对稳定。之后的Moraes等^[37]通过与酸性环境的对比,也得出形成生物膜的细菌更喜欢pH值在7.5~8.0的中性环境,中性环境中的菌株可以消耗更多的能量来促进生物膜基质的合成。此外,表面剪切应力随位置和流体流动而不断变化,也是影响细菌初始黏附的关键因素。剪切应力的增加促进了细菌黏附素表达^[38],黏附素进一步推动和巩固浮游细菌的表面黏附过程,加速后期微菌落结构的形成和稳定^[39]。

3 胞外聚合物膜阶段

3.1 胞外聚合物的组成

在生物膜形成的过程中,细菌通过一个独特的信息交流网来调节基质内黏附因子的相互联系,最终形成一个复杂的三维塔状生物膜结构。一旦细菌在表面成功定植,细菌开始繁殖并分泌各种细胞外物质包裹自己。研究表明,生物膜的胞外聚合物主要由胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)、胞外DNA(extracellular DNA, eDNA)、蛋白质、脂类等复杂的生物分子混合物组成^[40-41],它们有促进细胞互连、控制生物膜与表面的黏附、维持生物膜的机械稳定性等功能^[42]。

在生物膜的胞外聚合物中,EPS是生物膜中蛋

白质、脂类、核酸等其他物质的黏附支架，也是生物膜最关键的组成部分，它由细菌在胞内或胞外环境中合成并分泌到外部环境^[43]。EPS的组成和结构在不同的细菌群中也有很大的差异，比如铜绿假单胞菌EPS主要包括藻酸盐、Pel和Psl。Pel和Psl也是成熟生物膜EPS的主要成分，在表面附着初始阶段可以增加铜绿假单胞菌的黏附力^[44]。eDNA是由细菌主动凋亡或被动自噬的方式产生的^[45]，eDNA可以稳定生物膜基质，增强细菌之间的基因交换，甚至可能是促进细菌基因突变的关键因素^[46]。蛋白质在生物膜形成过程中可以介导细菌黏附和信号通信，如金黄色葡萄球菌的表面蛋白Bap可构建淀粉样蛋白支架，使细菌稳定积累^[47]。一些细菌分泌淀粉样卷曲蛋白，这种蛋白质可以与eDNA结合，在生物膜内形成坚固的纤维状聚合物^[48]。磷脂可与肽聚糖共价偶联形成墙磷壁酸(wall teichoic-acid, WTAs)，通过与纤维连接蛋白或细胞质膜结合使细菌对表面的黏附力增强^[5]。

3.2 胞外聚合物对生物膜形成的作用

液体环境中生物膜的形成与微表面特性有关，细菌表面EPSs中的部分官能团可促进细菌沉积并进一步黏附在表面。在之前的研究中发现，去除EPSs后表面的黏附细菌减少了，且在相似的表面电荷条件下，富含EPSs的菌株比缺乏EPSs的菌株

对细菌的黏附力更强。因此，EPSs对细菌-表面和细菌-细菌的黏附作用有助于生物膜的形成。为了证实这一结论，Harimawan等^[49]通过对枯草芽孢杆菌和铜绿假单胞菌产生的EPSs的黏附性质进行比较，表明了多糖在EPSs层中的存在增加了其黏附强度，并且认为蛋白质对黏附影响较小。EPS中的外聚糖Psl(ePsl)是一种关键的生物膜基质成分，可启动附着并保护生物膜内的细菌，维持生物膜结构稳定。Colvin等^[50]和Jennings等^[51]利用实验室常见的铜绿假单胞菌研究了Psl对生物膜发育的影响，表明Psl突变菌株会上调Pel多糖的表达，促进生物膜完整发育。Wu等^[52]研究了Psl蛋白PslA、PslD、PslG和PslE四种Psl蛋白之间的相互作用(图3)，PslD是一种转运体，PslG分布在细胞内膜和周质，对Psl的生物合成至关重要，PslE可以与PslA、PslD或PslG相互作用。此外，EPSs中的凝集素样序列(agglutinin-like sequence, Als)蛋白家族也是研究较多的一类调控细胞黏附作用的蛋白质分子，为了研究Als蛋白在多大程度上介导整个细胞的黏附，Alsteens等^[53]记录了表达Als5p黏附蛋白的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)细胞与不同疏水基质之间的多条力距曲线，证明了Als5p介导的黏附力随着时间的推移而增强，从而促进生物膜的形成。

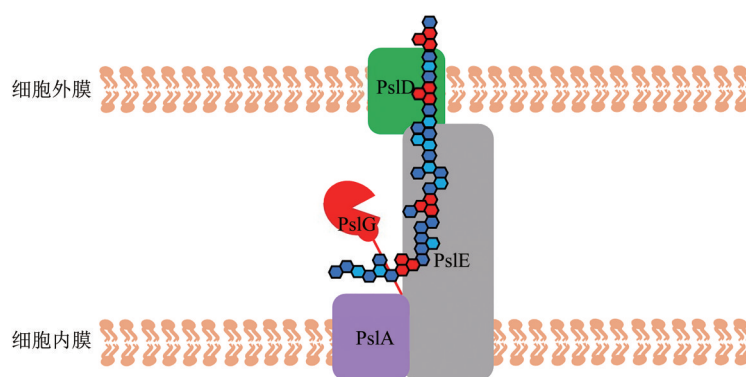


Fig. 3 Interaction mechanism of Psl proteins^[52]

图3 Psl蛋白相互作用机制^[52]

EPSs的产生会受到环境温度或额外碳源等因素的影响进而改变生物膜的形成过程。温度可以改变生物膜形成菌株的生理活性，可能会影响EPSs的产生和引起细菌表面电荷的变化已被Shen等^[54]证明，Maurya等^[55]在此基础上指出菌株形成生物膜的最佳温度在30~35℃范围内。额外的碳源反映

了积累在生物膜外层的葡萄糖、果糖、甘露糖等代谢副产物的产生，此类碳源可以启动碳分解产物抑制(carbon catabolite repression, CCR)引导细菌优先选择最合适的碳源，从而促进菌株的生长^[56]。Santos等^[57]证明了额外碳源可以促进微生物生长；Boyd等^[58]使用变形链球菌(*Streptococcus*

mutans) 在纯钛上培养形成生物膜, 通过在培养基中添加不同浓度的蔗糖改变生长条件, 结果表明: 当蔗糖浓度为 0~75 mmol/L 时, 生物膜-钛的黏附强度随蔗糖浓度的增加而增加, 当蔗糖浓度为大于 75 mmol/L 后, 生物膜-钛的黏附强度逐渐降低。此外, Zou 等^[59] 以表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 生物膜的生长为例, 确定了培养环境中各碳源的最佳浓度为 2.5 g/L, 碳源浓度在 0~2.5 g/L 范围内会促进生物膜的形成, 碳源浓度大于 2.5 g/L 后, 会抑制生物膜的形成。

4 群体感应调节生物膜阶段

4.1 群体感应调节机理

群体感应是细菌通过产生和释放化学分子来调

节自身基因的表达并使种群密度发生变化的过程^[60]。这一过程最早是由 Neelson 等^[61-62] 在 20 世纪 70 年代描述肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 和费氏弧菌 (*Vibrio fischeri*) 中的细菌相互作用时提出的。

生物膜的形成依赖于细菌群体感应的调节, 这是一种由交流系统介导的表型, 它依赖于信号分子——自动诱导剂 (automatic inducers, AIs) 的产生、释放和响应^[63]。AIs 的浓度与细菌数量成正比^[64], 当 AIs 的浓度达到一定的阈值水平时, 与同源受体结合触发下游基因的表达, 从而控制生物膜的形成、毒力因子的分泌、生物发光、产孢、抗生素的产生等过程^[65]。近年来研究最多的信号分子及其来源见表 1。

Table 1 Typical quorum sensing signal produced by microorganisms and their sources^[66]
表1 微生物产生的典型群体感应信号分子及其来源^[66]

信号分子	产生物种	代表性菌株	参考文献
N-酰基高丝氨酸内酯 (AHLs)	革兰氏阴性细菌	铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	[67]
寡肽 (AIP)	革兰氏阳性细菌	金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococci aureus</i>)	[68]
自诱导物2 (AI-2)	革兰氏阴性和阳性细菌	哈维弧菌 (<i>Vibrio harveyi</i>)	[69]
扩散信号因子 (DSF)	革兰氏阴性和阳性细菌	野生黄单胞菌 (<i>Xanthomonas campestris</i>)	[70]
金合欢醇 (Farnesol)	真菌	白色念珠菌 (<i>Candida albicans</i>)	[71]
酪醇 (Tyrosol)	真菌	白色念珠菌 (<i>Candida albicans</i>)	[72]
吲哚 (Indole)	革兰氏阴性和阳性细菌	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)	[73]

群体感应系统中起到关键作用的信号分子有 N-酰基高丝氨酸内酯 (N-Acyl-L-homoserine lactones, AHL)、自诱导物 II (autoinducer-2, AI-2)、寡肽 (autoinducing peptide, AIP)、扩散信号因子 (diffusible signaling factor, DSF), 它们的调节过程如图 4 所示。AHL 主要位于细胞外, 其合成是 LuxI 通过衍生内酯部分来调控的; 合成后的 AHL 分子进入细胞与 LuxR 受体结合, LuxR 激活后通过诱导胞外多糖、毒力因子和褐藻酸盐等目的基因的表达, 进一步调节生物膜的形成^[74] (图 4a)。AIP 小分子作为通讯信号从细胞中主动运出, 在达到阈值浓度时激活细菌表面由组氨酸激酶和响应调控子组成的双组分系统, 通过磷酸化级联信号转导, 激活目的基因的表达从而调节生物膜^[75] (图 4b)。AI-2 是由 *luxS* 基因编码合成并自发环化形成的一系列呋喃酮衍生物^[76], 合成后的 AI-2 可以被转运到细胞外, 并在浓度达到一定阈值时, 通过一系列的级联系统来调节群体感应基因的表达并影响菌株的生理行为, 包括生物被膜的形成和毒力基因的表达

等^[77-78] (图 4c)。DSF 是细菌用于种内和种间交流的一类重要信号分子。DSF 的合成受 *rpfF* 基因的调节^[79], 分子识别涉及传感器 RpfC 和响应调节器 RpfG 两部分调节系统^[80]。Rpf 蛋白最早发现于黄单胞菌 (*Xanthomonas spp*) 中, 且其同源蛋白质广泛地存在于黄单胞菌属中, 并控制着这些细菌毒力因子的合成、聚集行为和生物膜的形成^[81] (图 4d)。

4.2 群体感应中诱导剂的作用

细菌生物膜的形成和成熟生物膜的结构控制、营养物质的交换等过程均离不开群体感应系统中信号分子的协调^[82-84]。其中, AHL 可以通过上调外排泵基因 *adeFGH*, 增加 AHL 在生物膜中的转运, 从而激活群体感应系统, 分泌大量 EPS, 促进生物膜的形成^[85]。Passos 等^[86] 表明, 由 AHL 系统调节的 LecA 和 LecB 蛋白组成的凝集素是外膜的可溶性蛋白, 它们的黏附有助于胞外多糖在生物膜中的保留, 在菌落的最初黏附阶段形成细胞簇, LecB 还通过与 Psl 结合促进生物膜基质蛋白的形成。

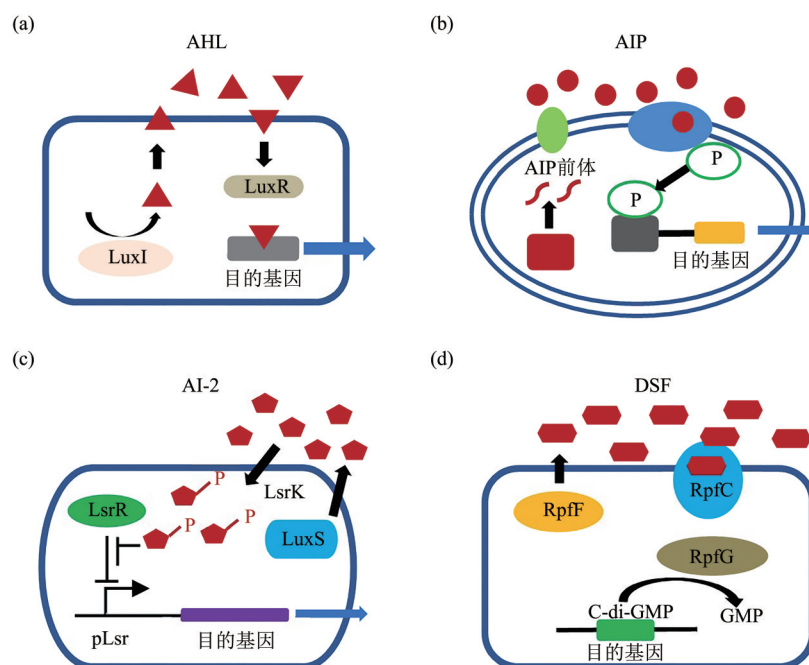


Fig. 4 The mechanism of the main quorum sensing signals^[66]

图4 主要群体感应信号的作用机制^[66]

(a) N-酰基高丝氨酸内酯 (AHL); (b) 寡肽 (AIP); (c) 自诱导物2 (AI-2); (d) 扩散信号因子 (DSF)。

Wang等^[87]发现,外源添加AI-2可以增加与变形链球菌的黏附生物膜相关的基因 $spaP$ 、 $fruA$ 、 $gtfB$ 、 $gtfC$ 和 $gtfD$ 等的转录,AI-2还在不同物种间共培养生物膜形成中扮演信使的角色。Laganenka等^[88]也证明了共培养的粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*) AI-2可以促进大肠杆菌生物膜的形成,这种共培养的生物膜对不利环境的抵抗力提高了17%。AIP传感涉及与细菌膜中的传感器激酶信号受体结合,然后使控制靶基因转录的细胞质反应调节器磷酸化。Nadell等^[89]研究发现,当细胞外AIP浓度达到阈值时,可与膜受体激酶AgrC结合,磷酸化反应调节剂AgrA同SarA相配合与P2启动子结合,促进下游 $agrBDCA$ 基因的表达,而后与相邻的P3启动子结合,调节生物膜的形成和毒力因子的表达。DSF复杂的调控网络及其所处环境的差异使其具有正、负调控的特点。DSF的合成途径也是一个正反馈调控过程。Han等^[90]研究表明,当细胞外DSF积累到一定浓度时,被受体蛋白RpfC感知,引起其构象变化,促进DSF合成酶RpfF的释放,从而形成更多的细胞外信号分子。Alcaraz等^[91]等研究表明,AmpR可以介导生物膜的形成和毒力因子的表达;在嗜麦芽链球菌中,AmpR主要通过抑制DSF合成负调控RpfF来抑制

群体感应,而AmpR突变体比野生型表现出更多的生物膜生成。

5 生物膜的成熟与表征方法

5.1 生物膜的成熟

水中构筑物表面在经历了薄膜形成、细菌黏附、胞外聚合物膜、群体感应4个阶段后形成了成熟稳定的生物膜。生物膜的形成是一个复杂的多因素过程,受遗传和环境因素的调控,生物膜的结构是由内在细菌调节和外部环境共同决定的^[92]。随着生物膜越发成熟,靠近基底的常驻细菌越来越多地与体液界面或营养来源进行物理分离,生物膜内经历着由细胞拥挤、化学梯度和营养竞争驱动的不断变化的微环境,这导致了生物膜内的分层和亚群体的产生^[93]。因此,生活在成熟生物膜结构中不同位置的细菌经历了养分资源、氧气、分泌物和细胞外信号分子的浓度梯度^[94],这也促使部分细菌开始与生物膜分离。

有研究表明,分离在形成成熟生物膜的形态特征和结构方面起着重要作用^[95]。细菌被动脱离生物膜有磨损、掠食、侵蚀和脱落4种机制^[96]。磨损是由于与散装液体中的颗粒碰撞而从生物膜中释

放细胞;而掠食是真核生物的掠食活动去除生物膜细胞的行为;侵蚀是指在流动系统中的流体剪切使生物膜发生的一小部分持续损失;剥落是指流体摩擦力使完整的生物膜碎片或整个生物膜被去除^[97]。

此外,扩散是细菌与生物膜的另一种分离方式,它的特征是一个主动的表型开关,它允许细菌离开生物膜。具体来说,扩散通过某些信号或线索的感知以及调节网络的传导,以实现促进细菌从生物膜群落释放的生理变化。扩散根据触发信号的来源可分为自然扩散和环境诱导扩散,自然扩散在感知到自合成信号分子时发生,而环境诱导扩散则由外部环境的因素和变化触发。自然扩散会导致细菌转移到新的地点进行定殖,所以通常被认为是生物膜发展的最后阶段^[98]。

5.2 生物膜形态表征

在构筑物表面形成成熟稳定的生物膜需要多种因素发挥作用,通过对成熟的生物膜进行表征有助于深入了解生物膜的形成过程及其影响因素,对后续生物膜的清除或利用也有指导意义。生物膜成熟稳定后,它的平均厚度、最大厚度、总生物量、表面生物体积比、粗糙度系数等基本形态参数是首先要表征的。He等^[99]用共聚焦激光扫描显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)观察样品7 d后生物膜形成情况,逐层采集CLSM图像,重建生物膜的空间结构并对它的基本参数进行了量化。Le Norcy等^[100]在培养基的连续流速下培养微藻生物膜,在120 h内定量测定微藻的生物体积,并测定其生长动力学。Cui等^[101]对生物膜的微观结构进行了表征,并分析了细菌的转录组。

此外,基于流体的动态测量系统在表征生物膜的形成研究中受到越来越多的关注。Guliy等^[102]等以假单胞菌为例,在微流体系统中基于交变电场引起的细胞极化率变化的实时记录,采用相衬显微镜和传统微生物镀膜法进行对照实验,描述了细胞从浮游生物到生物膜生长过程中传感器信号的变化,证实了生物膜的形成。Lemos等^[103]提出了一种基于动态流体的测量圆柱形表面生物膜厚度和量化生物膜去除应力的新方法。该装置是将测试筒浸入液体中进行试验操作,对生物膜厚度的测量精度为 $\pm 19\ \mu\text{m}$,与流体动力学计算模拟的结果吻合。

5.3 生物膜黏附力的表征

生物膜黏附力的表征一般是从单细胞黏附力的量化开始研究的。目前,许多技术已经应用于表征单细胞黏附过程和定量黏附力。其中,原子力显微

镜(atomic force microscope, AFM)将表征细胞之间的机械接触力下降到了单分子水平,并已被用于测量pN范围内的力。由于其在单个分子的拉伸/展开和测量分子键强度方面的强大作用而受到广泛且深入的研究。Boyd等^[104]使用AFM测量了细菌在抛光、未抛光和磨损3种经过不同处理的样品表面的黏附力在2~10 nN范围。Sahoo等^[105]制备了磷化铟(InP)纳米线阵列,利用场发射扫描电子显微镜(field emission scanning electron microscope, FESEM)观察了细胞在原始平坦的InP表面和空间有序的纳米线阵列的黏附情况,并且观察到了纳米线阵列与附着的细胞体直接接触时发生的变形,通过纳米线尖端位置在细胞附着时的位移,定量测量细胞黏附力可达45 nN。

在宏观水平上定量评估生物膜黏附性时常采用微流体控制装置,该类装置提供了精确控制剪切应力的方法来评估生物膜的黏附强度,常用的平台有改良Robbins装置、流动室、旋转生物膜装置、微板和微流体装置。Kozuka等^[106]利用所设计的微流控装置,借助微通道底壁上产生的1、2和3 Pa三个典型剪应力值,表征了金黄色葡萄球菌在不同表面的黏附强度。Al-Kafaween等^[107]使用96孔板和微板阅读器测量了铜绿假单胞菌和化脓性链球菌形成的生物膜,并根据黏附强度公式将生物膜分为非黏附、弱黏附、中度黏附和强黏附4类。Finlay等^[108]用玻璃和聚二甲基硅氧烷弹性体(PDMS)作为“模型”表面发展生物膜,在人造海水循环系统产生0~2.4 Pa的不同剪切应力,确定了生物膜的黏附性能。越来越多的研究表明,在微流控系统中引入传感技术,如微传感器或电化学探针,是在线生物膜检测和微环境分析的重要发展方向。

6 总结与展望

水中构筑物表面生物膜的形成是一个复杂的、动态变化的过程,包括薄膜形成阶段、细菌黏附阶段、胞外聚合物膜阶段、群体感应调节生物膜阶段、生物膜发育成熟阶段。本综述深入探讨了在生物膜成熟的过程中各阶段所发生的物理化学变化,以及各种变化对生物膜形成所产生的影响。

水中的化合物分子吸附在表面形成薄膜被证明是生物膜形成的第一步,而不同来源和环境中的化合物分子组成薄膜的化学特征也不尽相同,进而导致薄膜对细菌初始黏附的调控机制千差万别。薄膜形成后通过改变电荷、电位和表面张力来改变表面

的理化性质,当浮游细菌靠近表面时,会在范德华力、布朗运动和静电力等作用下在表面发生可逆黏附,随后,在表面化合物分子、EET、细菌鞭毛等共同作用下,细菌实现了从可逆黏附到不可逆黏附的转变。本文分析近年来细菌-表面黏附的相关研究发现,表面的粗糙度、形貌、疏水性和环境pH等因素在细菌黏附过程中发挥着重要作用。在细菌成功黏附到表面后,细菌开始分泌胞外多糖、eDNA、蛋白质和脂类等复杂的生物分子混合物,本文讨论了主要的胞外聚合物对细菌黏附和生物膜形成的影响,发现多数胞外聚合物可以促进细菌-细菌、细菌-表面相互作用,从而促进生物膜的形成,然而,有研究发现胞外聚合物产生及其对生物膜形成的影响具有不确定性,要根据具体的温度和碳源浓度范围来确定。胞外聚合物膜阶段后,表面开始出现三维网状膜结构,膜内的细菌通过产生信号分子来调节自身基因的表达和加强与细菌之间的交流,这种现象称为群体感应。本文通过综述近年来人们对中信号分子的研究,探讨了其在生物膜发育到成熟阶段的调节机制。生物膜在经过群体感应调节后发育为稳定的三维立体结构,此时的生物膜内环境极其复杂,细菌之间存在着资源、氧气、信号分子等物质竞争,导致部分细菌与生物膜分离。本文阐明了细菌从生物膜被动分离或主动分离的方式和分离机制,其中涉及到流体动力、分泌化合物等物理化学变化。在了解生物膜的成熟过程后,许多研究的重点放在了对生物膜的表征,包括形态的表征和黏附力的表征,相应的表征方法和技术手段也受到越来越多的关注,其中原子力显微镜和基于微流体的表征方法被更多的应用微观单细胞黏附力和宏观的生物膜黏附力的研究。

总之,本综述的讨论对研究生物膜防控和利用策略有一定指导意义,经过对近年来相关研究的分析,本文总结出尚需深入研究的几个关键科学问题:a. 细菌细胞与表面接触或感知周围环境物理-化学变化的确切机制;b. 细菌在不断变化的环境中与表面的黏附适应性;c. 在多样化环境中成长的物种与生活在同质环境中的物种黏附机制的差异。全面理解群体感应机制并明确群体感应出现的机理将是一个重要挑战,未来研究需要重点关注基因表达模式、细胞间相互作用、生理特性和信号分子的分子水平细节等关键问题。此外,细胞水平细菌行为表征新技术,以及生物膜微观精确观测新技术等微观测试技术的演进,将对研究水环境中生物膜的形

成过程和影响因素产生重要意义。

参 考 文 献

- [1] Costerton J W, Stewart P S, Greenberg E P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 1999, **284**(5418): 1318-1322
- [2] Flemming H C, Wingender J, Szewzyk U, *et al.* Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*, 2016, **14**(9): 563-575
- [3] Petrova O E, Sauer K J P P. A novel signaling network essential for regulating *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *PLoS Pathogens*, 2009, **5**(11): e1000668
- [4] O'toole G A, Kolter R J M M. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol*, 1998, **28**(3): 449-461
- [5] Ma R, Hu X, Zhang X, *et al.* Strategies to prevent, curb and eliminate biofilm formation based on the characteristics of various periods in one biofilm life cycle. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, **12**: 1003033
- [6] Taylor G T, Zheng D, Lee M, *et al.* Influence of surface properties on accumulation of conditioning films and marine bacteria on substrata exposed to oligotrophic waters. *Biofouling*, 1997, **11**(1): 31-57
- [7] Bhagwat G, O'connor W, Grainge I, *et al.* Understanding the fundamental basis for biofilm formation on plastic surfaces: role of conditioning films. *Front Microbiol*, 2021, **12**: 687118
- [8] Garg A, Jain A, Bhosle N B. Chemical characterization of a marine conditioning film. *Int Biodeter Biodegr*, 2009, **63**(1): 7-11
- [9] Van Der Aa B C, Dufrène Y F. *In situ* characterization of bacterial extracellular polymeric substances by AFM. *Colloid Surface B*, 2002, **23**(2): 173-182
- [10] Lorite G S, Rodrigues C M, De Souza A A, *et al.* The role of conditioning film formation and surface chemical changes on *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm evolution. *J Colloid Interface Sci*, 2011, **359**(1): 289-295
- [11] Valle J, Da Re S, Henry N, *et al.* Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(33): 12558-12563
- [12] Wolfe A J, Chang D E, Walker J D, *et al.* Evidence that acetyl phosphate functions as a global signal during biofilm development. *Mol Microbiol*, 2003, **48**(4): 977-988
- [13] Nickzad A, Deziel E. The involvement of rhamnolipids in microbial cell adhesion and biofilm development - an approach for control?. *Lett Appl Microbiol*, 2014, **58**(5): 447-453
- [14] Raya A, Sodagari M, Pinzon N M, *et al.* Effects of rhamnolipids and shear on initial attachment of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in glass flow chambers. *Environ Sci Pollut Res*, 2010, **17**(9): 1529-1538
- [15] Davey M E, Caiazza N C, O'toole G A. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*, 2003, **185**(3): 1027-1036

- [16] Schweinitzer T, Josenhans C. Bacterial energy taxis: a global strategy?. Arch Microbiol, 2010, **192**(7): 507-520.
- [17] Boks N P, Norde W, Van Der Mei H C, *et al.* Forces involved in bacterial adhesion to hydrophilic and hydrophobic surfaces. Microbiology, 2008, **154**(Pt 10): 3122-3133
- [18] Donlan R. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis, 2002, **8**(9): 881-881
- [19] Dixit D, Soppina V, Ghoroi C. A non-electric and affordable surface engineered particle (SEP) based point-of-use (POU) water disinfection system. Sci Rep, 2019, **9**(1): 18245
- [20] Palmqvist N, Foster T, Fitzgerald J R, *et al.* Fibronectin-binding proteins and fibrinogen-binding clumping factors play distinct roles in staphylococcal arthritis and systemic inflammation. J Infect Dis, 2005, **191**(5): 791-798
- [21] Carniello V, Peterson B W, Van Der Mei H C, *et al.* Physico-chemistry from initial bacterial adhesion to surface-programmed biofilm growth. Adv Colloid Interface Sci, 2018, **261**(20): 1-14
- [22] Shinde A, Illath K, Gupta P, *et al.* A review of single-cell adhesion force kinetics and applications. Cells, 2021, **10**(3): 577
- [23] Zhang S, Wang L, Wu L, *et al.* Deciphering single-bacterium adhesion behavior modulated by extracellular electron transfer. Nano Lett, 2021, **21**(12): 5105-5115
- [24] Logan B E. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. Nat Rev Microbiol, 2009, **7**(5): 375-381
- [25] Gong Z, Yu H, Zhang J, *et al.* Microbial electro-fermentation for synthesis of chemicals and biofuels driven by bi-directional extracellular electron transfer. Synth Syst Biotechnol, 2020, **5**(4): 304-313
- [26] Apetrei R M, Carac G, Ramanaviciene A, *et al.* Cell-assisted synthesis of conducting polymer - polypyrrole - for the improvement of electric charge transfer through fungal cell wall. Colloid Surface B, 2019, **175**(12): 671-679
- [27] Wang R, Yan M, Li H, *et al.* FeS(2) Nanoparticles decorated graphene as microbial-fuel-cell anode achieving high power density. Adv Mater, 2018, **30**(22): e1800618
- [28] Verran J, Boyd R D. The relationship between substratum surface roughness and microbiological and organic soiling: a review. Biofouling, 2001, **17**(1): 59-71
- [29] Dauben T J, Dewald C, Firkowska-Boden I, *et al.* Quantifying the relationship between surfaces' nano-contact point density and adhesion force of Candida albicans. Colloid Surface B, 2020, **194**(6): 111177
- [30] Spengler C, Nolle F, Mischo J, *et al.* Strength of bacterial adhesion on nanostructured surfaces quantified by substrate morphometry. Nanoscale, 2019, **11**(42): 19713-19722
- [31] Doll P W, Doll K, Winkel A, *et al.* Influence of the available surface area and cell elasticity on bacterial adhesion forces on highly ordered silicon nanopillars. ACS Omega, 2022, **7**(21): 17620-17631
- [32] Alsteens D, Dague E, Rouxhet P G, *et al.* Direct measurement of hydrophobic forces on cell surfaces using AFM. Langmuir, 2007, **23**(24): 11977-11979
- [33] Van Oss C J. Hydrophobicity and hydrophilicity of biosurfaces. Curr Opin Colloid Interface Sci, 1997, **2**(5): 503-512
- [34] Sheng X, Ting Y P, Pehkonen S O. The influence of ionic strength, nutrients and pH on bacterial adhesion to metals. J Colloid Interface Sci, 2008, **321**(2): 256-264
- [35] Vaezi S S, Poorazizi E, Tahmourespour A, *et al.* Application of artificial neural networks to describe the combined effect of pH, time, NaCl and ethanol concentrations on the biofilm formation of Staphylococcus aureus. Microb Pathog, 2020, **141**(4): 103986
- [36] Nguyen H D N, Yang Y S, Yuk H G. Biofilm formation of *Salmonella typhimurium* on stainless steel and acrylic surfaces as affected by temperature and pH level. Food Sci Technol, 2014, **55**(1): 383-388
- [37] Moraes J O, Cruz E A, Souza E G F, *et al.* Predicting adhesion and biofilm formation boundaries on stainless steel surfaces by five *Salmonella enterica* strains belonging to different serovars as a function of pH, temperature and NaCl concentration. Int J Food Microbiol, 2018, **281**(10): 90-100
- [38] Schaeffer C R, Hoang Tra-My N, Sudbeck C M, *et al.* Versatility of biofilm matrix molecules in staphylococcus epidermidis clinical isolates and importance of polysaccharide intercellular adhesin expression during high shear stress. mSphere, 2016, **1**(5): e00165-00116
- [39] Shi T, Hou X, Guo S, *et al.* Nanohole-boosted electron transport between nanomaterials and bacteria as a concept for nano-bio interactions. Nat Commun, 2021, **12**(1): 493
- [40] Sharma D, Misba L, Khan A U. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. Antimicrob Resist Infect Control, 2019, **8**(1): 76
- [41] Arnaouteli S, Bamford N C, Stanley-Wall N R, *et al.* *Bacillus subtilis* biofilm formation and social interactions. Nat Rev Microbiol, 2021, **19**(9): 600-614
- [42] Ma J, Wang K, Gong H, *et al.* Integrating floc, aggregate and carrier to reap high-quality anammox biofilm. Bioresource Technol, 2020, **309**(7): 123325
- [43] Nwodo U U, Green E, Okoh A I. Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. Int J Mol Sci, 2012, **13**(11): 14002-14015
- [44] Ma L, Wang J, Wang S, *et al.* Synthesis of multiple *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix exopolysaccharides is post-transcriptionally regulated. Environ Microbiol, 2012, **14**(8): 1995-2005
- [45] Valle J, Echeverez M, Lasa I. σ B Inhibits poly-N-acetylglucosamine exopolysaccharide synthesis and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 2019, **201**(11): e00098-00019
- [46] Lei W, Bruchmann J, Rüping J L, *et al.* Biofilm bridges forming structural networks on patterned lubricant-infused surfaces. Adv Sci, 2019, **6**(13): 1900519
- [47] Taglialegna A, Navarro S, Ventura S, *et al.* Staphylococcal Bap proteins build amyloid scaffold biofilm matrices in response to environmental signals. PLoS Pathog, 2016, **12**(6): e1005711

- [48] Yan Z, Yin M, Chen J, *et al.* Assembly and substrate recognition of curli biogenesis system. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 241
- [49] Harimawan A, Ting Y P. Investigation of extracellular polymeric substances (EPS) properties of *P. aeruginosa* and *B. subtilis* and their role in bacterial adhesion. *Colloid Surface B*, 2016, **146**(6): 459-467
- [50] Colvin K M, Irie Y, Tart C S, *et al.* The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environ Microbiol*, 2012, **14**(8): 1913-1928
- [51] Jennings L K, Dreifus J E, Reichhardt C, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* aggregates in cystic fibrosis sputum produce exopolysaccharides that likely impede current therapies. *Cell Rep*, 2021, **34**(8): 108782
- [52] Wu H, Wang D, Tang M, *et al.* The advance of assembly of exopolysaccharide Psl biosynthesis machinery in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiologyopen*, 2019, **8**(10): e857
- [53] Alsteens D, Beaussart A, Derclaye S, *et al.* Single-cell force spectroscopy of Als-mediated fungal adhesion. *Anal Methods*, 2013, **5**(15): 3657-3662
- [54] Shen J, Wang H, Zhu C, *et al.* Effect of biofilm on the survival of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk in high temperature and drying environment. *Food Res Int*, 2021, **149**(9): 110672
- [55] Maurya A, Kumar R, Singh A, *et al.* Investigation on biofilm formation activity of *Enterococcus faecium* under various physiological conditions and possible application in bioremediation of tannery effluent. *Bioresource Technol*, 2021, **339**(14): 125586
- [56] Li C, Chen X, Wen L, *et al.* An enhancement strategy for the biodegradation of high-concentration aliphatic nitriles: utilizing the glucose-mediated carbon catabolite repression mechanism. *Environ Pollut*, 2020, **265**(3): 114302
- [57] Santos J C D, Lopes D R G, Silva L C F, *et al.* Characterization of the biofilm structure and microbial diversity of sulfate-reducing bacteria from petroleum produced water supplemented by different carbon sources. *J Environ Manage*, 2022, **304**(23): 114189
- [58] Boyd J D, Korotkova N, Grady M E. Adhesion of biofilms on titanium measured by laser-induced spallation. *Exp Mech*, 2019, **59**(9): 1275-1284
- [59] Zou M, Liu D. Effects of carbon sources and temperature on the formation and structural characteristics of food-related *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Food Sci Hum Well*, 2020, **9**(4): 370-376
- [60] Mangwani N, Kumari S, Das S. Bacterial biofilms and quorum sensing: fidelity in bioremediation technology. *Biotechnol Genet Eng*, 2016, **32**(1-2): 43-73
- [61] Neilson K H, Platt T, Hastings J W. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol*, 1970, **104**(1): 313-322
- [62] Neilson K H, Hastings J W. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev*, 1979, **43**: 496-518
- [63] Rutherford S T, Bassler B L. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Csh Perspect Med*, 2012, **2**(11): a012427
- [64] Feng L, Wu Z, Yu X. Quorum sensing in water and wastewater treatment biofilms. *J Environ Biol*, 2013, **34**(2 suppl): 437
- [65] Waters C M, Bassler B L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005, **21**(1): 319-346
- [66] 程珂珂, 曾艳华, 蔡中华, 等. 微生物的交流信号. *生物化学与生物物理进展*, 2022, **49**(6): 960-974
- Cheng K K, Zeng Y H, Cai Z H, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2022, **49**(6): 960-974
- [67] Papenfort K, Bassler B L. Quorum sensing signal - response systems in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 2016, **14**(9): 576-588
- [68] Sturme M H, Kleerebezem M, Nakayama J, *et al.* Cell to cell communication by autoinducing peptides in gram-positive bacteria. *Anton Van Leeuwenhoek*, 2002, **81**(1): 233-243
- [69] Pereira C S, Thompson J A, Xavier K B. AI-2-mediated signalling in bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 2013, **37**(2): 156-181
- [70] Barber C, Tang J, Feng J, *et al.* A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Mol Microbiol*, 1997, **24**(3): 555-566
- [71] Hornby J M, Jensen E C, Lisec A D, *et al.* Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microb*, 2001, **67**(7): 2982-2992
- [72] Chen H, Fujita M, Feng Q, *et al.* Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(14): 5048-5052
- [73] Lee J H, Lee J. Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS Microbiol Rev*, 2010, **34**(4): 426-444
- [74] Yi L, Li J, Liu B, *et al.* Advances in research on signal molecules regulating biofilms. *World J Microbiol Biotechnol*, 2019, **35**(8): 130-130
- [75] Novick R P, Geisinger E. Quorum sensing in staphylococci. *Annu Rev Genet*, 2008, **42**: 541-564
- [76] Schauder S, Shokat K, Surette M G, *et al.* The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum - sensing signal molecule. *Mol Microbiol*, 2001, **41**(2): 463-476
- [77] Wang Y, Wang Y, Sun L, *et al.* The LuxS/AI-2 system of *Streptococcus suis*. *Appl Microbiol Biot*, 2018, **102**(17): 7231-7238
- [78] Federle M J. Autoinducer-2-based chemical communication in bacteria: complexities of interspecies signaling. *Contrib Microbiol*, 2009, **16**: 18-32
- [79] Gu Y, Tian J, Zhang Y, *et al.* Dissecting signal molecule AI-2 mediated biofilm formation and environmental tolerance in *Lactobacillus plantarum*. *JBiosci Bioeng*, 2021, **131**(2): 153-160
- [80] Slater H, Alvarez-Morales A, Barber C E, *et al.* A two-component system involving an HD - GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Mol Microbiol*, 2000, **38**(5): 986-1003

- [81] Chatterjee S, Wistrom C, Lindow S E. A cell-cell signaling sensor is required for virulence and insect transmission of *Xylella fastidiosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(7): 2670-2675
- [82] Püning C, Su Y, Lu X, *et al.* Molecular mechanisms of *Campylobacter* biofilm formation and quorum sensing. *Curr Top Microbiol*, 2021, **431**(1): 293-319
- [83] Li Y, Feng T, Wang Y, *et al.* The role of bacterial signaling networks in antibiotics response and resistance regulation. *Mar Life Sci Tech*, 2022, **4**(2): 163-178
- [84] Sun B, Luo H, Jiang H, *et al.* Inhibition of quorum sensing and biofilm formation of esculetin on *Aeromonas hydrophila*. *Front Microbiol*, 2021, **12**: 737626
- [85] Jiang Q, Chen J, Yang C, *et al.* Quorum sensing: a prospective therapeutic target for bacterial diseases. *Biomed Res Int*, 2019, **2019**: 2015978
- [86] Passos Da Silva D, Matwichuk M L, Townsend D O, *et al.* The *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB binds to the exopolysaccharide Psl and stabilizes the biofilm matrix. *Nat Commun*, 2019, **10**(1): 2183
- [87] Wang X, Li X, Ling J. *Streptococcus gordonii* LuxS/autoinducer-2 quorum-sensing system modulates the dual-species biofilm formation with *Streptococcus mutans*. *J Basic Microb*, 2017, **57**(7): 605-616
- [88] Laganenka L, Sourjik V. Autoinducer 2-dependent *Escherichia coli* biofilm formation is enhanced in a dual-species coculture. *Appl Environ Microb*, 2018, **84**(5): e02638-17
- [89] Nadell C D, Xavier J B, Foster K R. The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiol Rev*, 2009, **33**(1): 206-224
- [90] Han Y, Wang Y, Tombosa S, *et al.* Identification of a small molecule signaling factor that regulates the biosynthesis of the antifungal polycyclic tetramate macrolactam HSAF in *Lysobacter* enzymogenes. *Appl Microbiol Biot*, 2015, **99**(2): 801-811
- [91] Alcaraz E, Ghiglione B, Pineda M V, *et al.* AmpR is a dual regulator in *Stenotrophomonas maltophilia* with a positive role in β -lactam resistance and a negative role in virulence, biofilm and DSF production. *Res Microbiol*, 2022, **173**(3): 103917
- [92] Stoodley P, Sauer K, Davies D G, *et al.* Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol*, 2002, **56**(1): 187-209
- [93] Serra D O, Hengge R. Stress responses go three dimensional - the spatial order of physiological differentiation in bacterial macrocolony biofilms. *Environ Microbiol*, 2014, **16**(6): 1455-1471
- [94] Williamson K S, Richards L A, Perez-Osorio A C, *et al.* Heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms includes expression of ribosome hibernation factors in the antibiotic-tolerant subpopulation and hypoxia-induced stress response in the metabolically active population. *J Bacteriol*, 2012, **194**(8): 2062-2073
- [95] Picioreanu C, Van Loosdrecht M C M, Heijnen J J. Two-dimensional model of biofilm detachment caused by internal stress from liquid flow. *Biotechnol Bioeng*, 2000, **72**(2): 205-218
- [96] Petrova O E, Sauer K. Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion. *Curr Opin Microbiol*, 2016, **30**(1): 67-78
- [97] Stewart P S. A model of biofilm detachment. *Biotechnol Bioeng*, 1993, **41**(1): 111-117
- [98] Purevdorj-Gage B, Costerton W J, Stoodley P. Phenotypic differentiation and seeding dispersal in non-mucoid and mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbiology*, 2005, **151**(5): 1569-1576
- [99] He X, Liu Y, Bai X, *et al.* Alginate/albumin in incubation solution mediates the adhesion and biofilm formation of typical marine bacteria and algae. *Biochem Eng J*, 2018, **139**(11): 25-32
- [100] Le Norcy T, Faÿ F, Obando C Z, *et al.* A new method for evaluation of antifouling activity of molecules against microalgal biofilms using confocal laser scanning microscopy-microfluidic flow-cells. *Int Biodeter Biodegr*, 2019, **139**(2): 54-61
- [101] Cui X, Chen C, Liu Y, *et al.* Exogenous refractory protein enhances biofilm formation by altering the quorum sensing system: a potential hazard of soluble microbial proteins from WWTP effluent. *Sci Total Environ*, 2019, **667**(4): 384-389
- [102] Guliy O I, Evstigneeva S S, Bunin V D. Microfluidic bioanalytical system for biofilm formation indication. *Talanta*, 2022, **247**(9): 123541
- [103] Lemos M, Wang S, Ali A, *et al.* A fluid dynamic gauging device for measuring biofilm thickness on cylindrical surfaces. *Biochem Eng J*, 2016, **106**(2): 48-60
- [104] Boyd R D, Verran J, Jones M V, *et al.* Use of the atomic force microscope to determine the effect of substratum surface topography on bacterial adhesion. *Langmuir*, 2002, **18**(6): 2343-2346
- [105] Sahoo P K, Janissen R, Monteiro M P, *et al.* Nanowire arrays as cell force sensors to investigate adhesin-enhanced holdfast of single cell bacteria and biofilm stability. *Nano Lett*, 2016, **16**(7): 4656-4664
- [106] Kozuka Y, Lu Z, Masuda T, *et al.* Evaluation of bacterial adhesion strength on phospholipid copolymer films with antibacterial ability using microfluidic shear devices. *J Mater Chem B*, 2021, **9**(22): 4480-4487
- [107] Al-Kafaween M A, Mohd Hilmi A B, Jaffar N, *et al.* Determination of optimum incubation time for formation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus pyogenes* biofilms in microtiter plate. *Bull Natl Res Cent*, 2019, **43**(1): 1-5
- [108] Finlay J A, Schultz M P, Cone G, *et al.* A novel biofilm channel for evaluating the adhesion of diatoms to non-biocidal coatings. *Biofouling*, 2013, **29**(4): 401-411

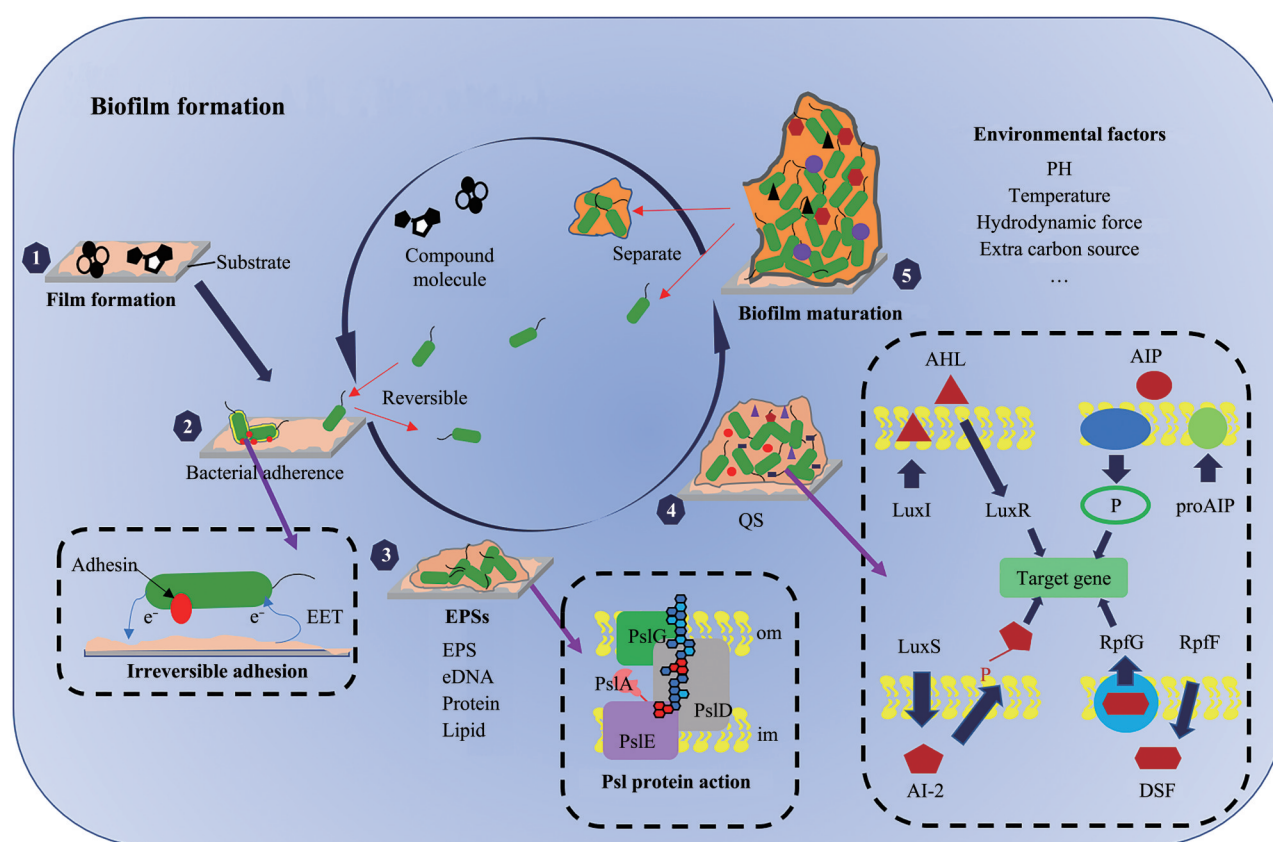
Physicochemical Processes of Biofilm Formation on The Surface of Structures in Water*

SHEN Kai¹⁾, GAO Fei²⁾, HUANG Xu-Qiang²⁾, LU Xiao-Peng²⁾, ZHOU Hui-Min²⁾,
LI Wei-Rong¹⁾, TIE Di^{1)**}

(¹⁾Engineering Research Center of Continuous Extrusion, Ministry of Education, Dalian Jiaotong University, Dalian 116028, China;

(²⁾College of Materials Science and Engineering, Northeastern University, Shenyang 110819, China)

Graphical abstract



Abstract Microorganisms can form biofilms, complex, heterogeneous, multicellular communities that adhere to surfaces. Biofilm formation on the surface of structures in water will accelerate structures' corrosion, seriously affect their service efficiency and life, and significantly impact the growth of animals, plants, and human life. Hence, clarifying the mechanism of biofilm formation contributes to developing new strategies to control biofilm

* This work was supported by grants from the National Key Research and Development Program (2022YFE0126400), The National Natural Science Foundation of China (52171235, 51974083, 52111540263), and Liaoning Education Department (LJKMZ20220856).

** Corresponding author.

Tel: 86-411-84105516, E-mail: tie-di@hotmail.com

Received: December 31, 2022 Accepted: March 21, 2023

formation on surface and then reduce infections, biofouling, and contaminations. Biofilm-targeting strategies include the regulation of established biofilms or the modulation of single-cell attachment. In most studies, physicochemical mechanism is frequently applied to explain the initial bacterial adhesion phenomena but rarely to explain other stages of biofilm formation. This review presents a five-step comprehensive description of the physicochemical process from film formation to biofilm maturation: (1) period of film formation; (2) period of bacterial adhesion; (3) period of extracellular-polymeric-substances (EPSs) membrane formation; (4) period of regulating biofilm by quorum sensing (QS); (5) period of biofilm maturation. We first clarify how the film formed by compound molecules affects the surface's physicochemical properties and initial adhesion, summarizing many factors that affect bacterial adhesion. We then review the types of EPSs and signal molecules secreted by bacteria after irreversible adhesion, as well as their role and QS mechanism in biofilm maturation. Finally, we discuss how bacteria or microcolonies separate from the mature biofilm by physicochemical action and summarize the morphology and adhesion characterization methods after the biofilm matures. This review redefines the role of physicochemical in the whole process of biofilm formation and provides a theoretical basis for the prevention, removal, and utilization of biofilm and other related research fields.

Key words underwater structure, biofilm, bacterial adhesion, physicochemical process, extracellular polymeric substances, quorum sensing

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0632