

## 生物膜与慢性创面愈合的关系

崔荣涛 综述, 霍然 审校

(山东大学附属省立医院烧伤整形外科 山东 济南 250000)

**[摘要]** 本文主要探讨生物膜在慢性创面中的形成过程、耐药机制、基本结构和形态学等背景。详细讨论了慢性创面愈合过程中生物膜的特点, 以及生物膜对创面慢性愈合过程的影响。使用标准敏感性试验(最小抑菌浓度, 简称MICs)来确定慢性创面适宜的治疗方案或开发新的治疗方法所面临的困难, 并推荐了针对生物膜的可替代的检测方法。并描述了当前和未来潜在的用于治疗含有生物膜的慢性创面的治疗方案, 包括毒力减毒、益生菌疗法、免疫反应抑制和完全清创结合抗菌敷料的应用等。

**[关键词]** 密度感应; 抗生素耐药性; 胞外多糖; 炎症反应; 创面愈合; 最小抑菌浓度

**[中图分类号]** R318 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-6455 (2018) 02-0005-06

## The Relationship Between Biofilm and Chronic Wound Healing

CUI Rong-tao, HUO Ran

(Department of Burn and Plastic Surgery, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250000, Shandong, China)

**Abstract:** Background is provided on biofilms, including their formation, drug resistance mechanisms, general structure, and morphology within the context of chronic wounds. The features of biofilms in chronic are discussed in detail, and the effect of biofilm on the process of chronic wounds healing as well. Difficulties associated with the use of standard susceptibility tests (minimum inhibitory concentrations, MICs) to determine appropriate treatment regimens, or develop new treatments for use, chronic wounds are discussed, with alternate test methods specific to biofilms being recommended. Current and future therapies for treatments of biofilm-containing chronic wounds, including virulence attenuation, probiotic therapy, immune response suppression, and aggressive debridement combined with antimicrobial dressings are described.

**Key words:** quorum sensing; antibiotic tolerance; exopolymer; inflammation; wound healing; minimum inhibitory concentrations

慢性创面是指机体损伤且并发有抑制创面愈合的疾病时, 导致创面愈合困难, 其愈合过程大于8周, 一般将慢性创面划分为静脉性溃疡、动脉性溃疡、糖尿病性溃疡、创伤性溃疡、压力性溃疡5类常见类型, 其他还有由肿瘤和结缔组织疾病麻风等引起的创面。随着全球肥胖人数增加和人口老龄化的进展, 慢性创面人群不断增加, 导致医疗费用急剧上升, 认清慢性创面的愈合机制, 促进创面愈合是目前创面治疗研究的热点与难点。临床上形成慢性创面的病因复杂, 影响创面愈合的因素也是错综复杂的, 创面感染是其最主要的影响因素。有研究指出, 生物膜的形成是导致或加重慢性感染的主要原因, 自然界中99%的细菌是以生物膜的形式存在, 约65%的人类感染与生物膜有关, 更有学者认为超过80%的人类感染中有生物膜形成。因此, 了解生物膜的形成及对创面愈合的影响机制, 防止生物膜对创面愈

合的影响, 对于提高慢性创面的治愈率有着重要作用。

1978年美国Costerton JW基于对呼吸机导管污染的细菌群体所引发相关性肺炎的研究, 提出了Biofilm(细菌生物膜或微生物生物膜, 国内也有的译为生物膜)这一专用名词, 得到了国际学术界的认可<sup>[1]</sup>。Biofilm是微生物生长过程中附着于物体表面而形成的由微生物及其分泌的聚合物所组成的有三维结构的菌细胞群体<sup>[2]</sup>。大多数微生物, 如细菌、真菌、支原体等都可以形成生物膜, 微生物形成生物膜后, 其生物学特性可发生改变, 如营养代谢、生长率等, 其中主要表现为耐药性的改变。过去几十年的研究表明, 根据在贴壁生物中与生命相关的营养和保护性作用特性, 自然环境中所有已知微生物中有98%以上都是以群体的方式而存在的<sup>[3]</sup>。细菌附着在非生物或生物表面, 它们会产生复杂的含有多聚体的多糖、蛋白质、核酸、磷脂、

通信作者: 霍然, 山东大学附属省立医院烧伤整形外科, 主任医师, 医学博士, 教授, 山东大学博士研究生导师; 主要研究方向: 擅长婴幼儿血管瘤、血管畸形、淋巴管瘤治疗, 瘢痕、体表肿瘤、各种原因所致畸形和缺损的修复, 眼、耳、鼻及全颅面、乳房整形美容, 器官再造、各种烧伤和不愈合创面治疗; E-mail: huoran@medmail.com.cn

第一作者: 崔荣涛, 山东大学附属省立医院烧伤整形外科, 医师, 山东大学整形外科博士后; E-mail: sd cuirongtao@126.com

褐藻酸和腐质等胞外聚合物<sup>[4-5]</sup>，这有助于保持微生物间的连接，并使细菌细胞彼此交联，这是细菌在生长过程中为适应环境而形成的一种特殊的生存方式，也是与浮游细胞相对应的存在形式。

## 1 生物膜的形成过程

细菌形成生物被膜是一个动态的过程，主要可分为以下四个阶段<sup>[6]</sup>：

1.1 细菌可逆性粘附的定殖阶段：当浮游细菌与惰性物体表面或活性实体的表面接触后，浮游细菌会粘附到物体表面，启动在物体表面形成生物膜。在这个阶段，单个附着细胞仅由少量胞外聚合物包裹，还未进入生物膜的形成过程，很多菌体还可重新进入浮游状态，因此这时细菌的粘附是可逆的。

1.2 细菌不可逆性粘附的集聚阶段：细菌在经过初始定殖粘附后，一些特定基因的表达开始调整，与形成生物膜相关的基因被激活，细菌在生长繁殖的同时分泌大量胞外聚合物粘附细菌。在这个阶段，细菌对物体表面的粘附更为牢固，是不可逆的。

1.3 生物膜的成熟阶段：细菌与物体表面经过不可逆的粘附阶段后，生物膜的形成逐渐进入成熟期。成熟的生物膜形成高度有组织的结构，由类似蘑菇状或堆状的微菌落组成，在这些微菌落之间围绕着大量通道，可以运送养料、酶、代谢产物和排出废物等。因此，成熟的生物膜内部结构被比喻为原始的循环系统。

1.4 生物膜中细菌的脱落与再定殖阶段：成熟的生物膜通过蔓延、部分脱落或释放出浮游细菌等进行扩展，脱落或释放出来的细菌重新变为浮游菌，它们又可以在物体表面形成新的生物膜。

## 2 生物膜的密度感应

密度感应是细菌彼此之间传递信号的一种特殊机制。细菌能产生一种自体诱导物（Autoinducer, AI）的信号分子，并根据其浓度来调控外周环境中菌种内和菌种间的数量变化。随着细菌细胞密度的增加，AI信号分子浓度也随之增加，当AI积累到一定阈值时，可以启动菌体中相关基因表达或改变某些基因特性以适应外界生存环境，这一现象被称为密度感应（Quorum sensing, QS），是生物膜形成和生物膜特异性表达的关键过程<sup>[7]</sup>。

目前，研究最深入的是由革兰氏阴性菌产生的N-酰基高丝氨酸内酯（Acyl-homoserine lactones, AHLs）<sup>[8]</sup>，革兰氏阳性菌通常表现为产生小肽以及称为AI-2的一类分子，其结构在很大程度上是未知的<sup>[9-10]</sup>。这些AI都是在细菌细胞中以基础速率产生的小分子。这些AI中的大多数可在

细菌膜上自由扩散，在这种情况下，它们的细胞内浓度接近于周围环境中的浓度。随着局部区域（微菌落）内细菌数量的增加，AI的有效浓度升高。一旦AI的细胞内浓度达到临界水平，AI诱导基因表达改变，这将导致生物膜性质变化。

密度感应最常为研究的两种细菌种类为金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌，这两种细菌通常与慢性创面相关。与其他革兰氏阳性菌一样，金黄色葡萄球菌利用肽密度感应系统作为基于多肽的密度感应模型<sup>[11]</sup>。在此菌群中，密度感应是由agr基因编码的自体诱导肽（Autoinducing peptides, AIPs）介导的。同一基因也控制了一些毒性因子，其中包括生物膜的形成<sup>[12]</sup>。铜绿假单胞菌的密度感应机制也得到了广泛研究，结果显示慢性创面中许多毒性因子的定植处于密度感应途径的控制下，包括分泌的毒性因子（例如蛋白酶），细胞附着因子（例如脂多糖）和生物膜的形成<sup>[13]</sup>。密度感应在生物膜的发育早期就有影响，密度感应突变体不能形成结构正常的生物膜<sup>[14]</sup>。

有关密度感应参与体内生物膜生成过程的其他证据，包括铜绿假单胞菌定植的囊性纤维化患者中分离出的明显浓度的假单胞菌AIs<sup>[15]</sup>。然而，从囊性纤维化患者的痰中也分离出许多密度感应突变体。这表明感应密度必须有基于菌群总体的精确消耗，也就是说并不是菌群中所有成员都需要一个功能性的密度感应系统<sup>[16]</sup>。最近的研究结果表明，在更高的细胞密度下，密度感应控制下产生的细胞外因子更有效，并为群体提供益处<sup>[17]</sup>。同时表明密度感应分子可直接影响宿主细胞，改变宿主的细胞功能，包括抑制淋巴细胞增殖等活动<sup>[18]</sup>。

## 3 生物膜的抵抗力

生物膜对人类生活的许多方面都是非常有益的，包括预防大肠的移植抵抗<sup>[19]</sup>，有机化合物和环境污染物的降解<sup>[20]</sup>及全球养分循环<sup>[21]</sup>。然而，这些代谢整合的多细胞群体在工业和临床环境中在很大程度上被认为是会带来麻烦的，主要是因为生物膜非常难以被抗微生物剂和宿主的免疫应答消除。一般认为生物膜对抗菌治疗的敏感性要低于浮游细菌，可降低100~1000倍<sup>[22-23]</sup>。

经过众多体内和体外研究，结果表明外聚物可以保护慢性创面生物膜免受创面愈合炎症反应的影响，这一炎症反应是创面愈合的关键步骤。有学者建议使用外聚物来阻断补体的活化，抑制淋巴组织增生反应，并阻止吞噬细胞检测细菌细胞壁上的调理素。研究结果还显示，外聚合物限制了白细胞穿透生物膜的能力<sup>[24]</sup>，阻碍其通过生物膜的运动，减弱其脱粒和产生活性氧（Reactive oxygen species,

ROS)的能力,并预防细菌的吞噬<sup>[25]</sup>。将细菌生物膜暴露于亚抑制性抗生素浓度或错误的抗生素中,可能会诱发粘液表型,从而产生更厚的附加基质成分的生物膜<sup>[26]</sup>。

众所周知,生物膜相关感染难以根除,并且在过去的30年中一直是科学研究的主题。生物膜相关感染包括用于移植的医疗设备的细菌定植,如中心静脉导管、关节假体、导尿管、起搏器和机械心脏瓣膜、龋齿、肺囊性纤维化患者的肺部感染及慢性创面等<sup>[27-28]</sup>。研究表明,大多数人类感染(约60%~80%)是生物膜相关的<sup>[29]</sup>。生物膜相关的皮肤疾病包括烧伤、压疮、手术部位感染和糖尿病足溃疡等,美国每年发病率约为196万人,约有26万人死亡,且每年的直接成本约为180亿美元<sup>[30]</sup>。

经过数年研究,众学者提出了各种机制来解释生物膜对于积极治疗的耐受性。理论包括:生物膜联盟的生理异质性<sup>[31]</sup>;残留细胞的存在使得生物膜能够在治疗后重新生长<sup>[32]</sup>;生物膜相关细菌代谢率低,影响常用抗生素的作用机制,外排泵过度表达开放阅读框<sup>[33]</sup>;由外聚物引起的限制药物扩散,耐药基因的优势可以很容易地转移至生物膜内的其他生物<sup>[34]</sup>。没有一个单一机制可以充分解释这些细菌群体长期的慢性化程度,考虑可能涉及到这些机制的组合。

#### 4 生物膜的结构形态

最初,生物膜被认为是微生物无组织的聚集体。这一观点得到了来自不同环境的生物膜其结构相似的证据的支持。有证据表明,遗传和环境因素是形成生物膜结构和形态的原因。随着对氧化锌纳米线和蜂巢的探索,有明确的证据表明生物膜的结构比以前想象的更有组织性<sup>[35]</sup>。

最近一项研究也表明,枯草芽孢杆菌和耻垢分枝杆菌通过产生方解石矿物质来维持生物膜的结构。这一矿物质的产生是由二氧化碳水平的升高而引起的,由菌落内的固有碱性环境促进产生,并由细胞外基质成分引导。这些矿物支架可提供物理稳定性,抵抗环境污染(包括抗菌剂),提高生物膜的整体适应性(包括有毒二氧化碳的沉淀),可能在细菌多细胞交联中发挥重要作用<sup>[36]</sup>。

研究表明,铜绿假单胞菌对抗生素的敏感性随着粘度下降而增加。在高粘度[15%聚乙烯吡咯烷酮(Polyvinyl pyrrolidone, PVP)]的庆大霉素存在下生长的铜绿假单胞菌具有比在培养基中生长的细胞高6倍( $P=0.01$ )的最小抑菌浓度(Minimum inhibitory concentrations, MICS)。类似地,在高粘度(12.5% PVP)下,该生物体对哌拉西林的应答低于低粘度时的11倍( $P=0.0001$ )。当铜绿假单胞菌在高粘度下生长一段时间后,通过稀释(1:100)然后孵育3h来改变粘性,MICS值恢复到与在水中接近。此外,铜

绿假单胞菌和白色念珠菌两者的生长速率,特别是最终产生的细胞数也随着生长培养基粘度的增加而增加。铜绿假单胞菌和白色念珠菌分别产生3倍和10倍以上的细胞,粘度高于对照组。因此,这些生物体在高粘度环境中表现得像生物膜一样,并且随着粘度降低而像浮游生物一样,这表明降低的代谢活性与耐受性没有直接关系,并且生物膜表型可以在不与基质结合的情况下表达,这一研究可能对创面护理有深远影响。高度渗出性创面通常容易被感染并出现重度炎症。在中度至高度渗出性创面中,水的蒸发通过蛋白质浓度的增加从而导致残余流体的粘度增加。定植在这种较高粘度渗出物中的生物体可能能够表达降低的抗生素敏感性的生物膜特征,使其难以控制<sup>[37]</sup>。

#### 5 慢性创面中的生物膜

目前,经过大量动物实验及临床研究,在慢性创面中已经明确鉴别出了细菌生物膜。细菌生物膜存在于创面中的早期证据主要来源于动物实验造模中的慢性创面,随后在临床创面中得到了证实。慢性创面的细菌定植存在相当大的异质性,当致病细菌共生后就会成为主要的微生物群落<sup>[38-39]</sup>。

不同创面间细菌的类型和相对数量都存在明显不同。一项研究显示每个创面有多达17种不同细菌(包括需氧和厌氧菌)。有学者研究表明,每个创面的微生物有12~20种不同菌种是常见的,有60种不同类型的菌种也并不少见<sup>[3,33]</sup>。许多研究表明,完整皮肤的微生物种群越丰富,对感染传播的保护作用越大<sup>[40]</sup>。然而,将某些致病物种(特别是金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌)引入环境可以引起未受伤的皮肤共栖菌群被替代,从而导致向感染状态的转变。这表明慢性创面护理中益生菌疗法可能将微生物生态恢复到健康状态。有学者成功使用正常粪便移植治疗由艰难梭菌过度生长引起的严重的、反复发作的胃肠炎患者<sup>[41]</sup>。

生物膜深部的缺氧促进了厌氧菌在慢性创面中的增殖。因此,不仅要关注创面的细菌负荷量,而且要重点关注创面内存在的菌群及其相互作用,包括探索菌群间是否共存相互促进增殖或存在竞争机制<sup>[35,39]</sup>。有研究发现多重叠模式的共聚菌群,可表现出协同作用的能力,进而导致生物膜慢性创面感染,被称为“功能等价群体”<sup>[32]</sup>。

在生物膜深部,存在与一般的应激反应相关的生长速率降低的微生物,可以保护细菌免受pH变化、化学试剂浓度、渗透压以及免受活性细菌生长所需要的化学物质的影响。此外,生物膜包含许多浓度梯度,产生对抗生素和防腐剂有负面影响的微环境,而在某些情况下,促进特定微生物物种的生长。这些微环境可以包括有氧和厌氧微环境<sup>[42]</sup>。尽管一些作者认为大多数生物膜细胞可以被抗生素消灭,



但是在治疗后的慢性创面中会出现生物膜的快速再生。这表明在这些生物膜内存在存留细胞<sup>[43]</sup>。存留细胞估计占生物膜的0.1%~10%，也存在于浮游生物培养基中。它们是通过表型变化表现出抗生素耐受性的表型变体，例如代谢静止和/或关闭抗生素靶标<sup>[44]</sup>。

抗菌素有效性的缺乏可能与抗菌素渗入生物膜的减少或不完全有关。外聚物的净负电荷可以隔绝带正电荷的化合物和/或排斥带负电荷的化合物，防止与生物膜内的微生物接触。一些有机体也释放分泌抗生素分子。总体来说，这使得治疗慢性生物膜相关感染比治疗急性浮游感染更具挑战性<sup>[42]</sup>。

目前可用的许多治疗方法都是为了治疗急性感染而设计的，与慢性感染不同，它们很快就会出现并在很短的时间内失去效用。浮游细菌通常对抗菌素有应答反应，容易被健康的免疫系统消灭。相反，与急性创面相比，慢性创面通常具有顽固性和过度的炎症反应，并且不易受抗生素的影响<sup>[45]</sup>。

成熟的生物膜一般10h内就会在慢性创面中形成，并在创面开放时无限期地持续存在<sup>[46]</sup>。此外，临床研究发现，虽然慢性创面的清创手术可有效地从创面床中清除掉生物膜群落，生物膜在初步清创2d后又开始重新崛起，并在清创3d后成熟的生物膜中发现大量的细菌。这表明在清创后有一个时间窗，在这期间浮游细菌重新定殖创面，容易治疗并可高效杀死细菌，并防止生物膜群落的改变<sup>[47]</sup>。

在慢性创面中形成的生物膜不同于其他感染类型中观察到的生物膜。事实上，在许多慢性创面中，真正的生物膜的存在可能难以被证实。然而，通常可在创面环境内很明显的形成微菌落（即相对较少数量的非常接近的细胞）。鉴于某些种类的细菌，如铜绿假单胞菌在小菌落阶段显示出可提高AI水平的作用，并且一些AI具有直接影响人类细胞的能力，这些存在的微菌落可以促进创面的慢性化。例如，如果小菌落足够大以防止它们被吞噬细胞吞噬，吞噬作用可能引起一些吞噬细胞的脱粒化。这将导致过度的免疫炎性反应，可能将会改变创面中各种因素的平衡，例如抑制正常创面闭合的基质金属蛋白酶，当这种免疫反应被减弱时，创面可以迅速的正常愈合<sup>[48]</sup>。

## 6 展望

随着研究的不断进展，越来越多的细菌对抗生素具有遗传抵抗性。即使是细菌对抗生素不具有遗传抵抗性，其本身的生长模式也可耐受抗生素。细菌耐药性的问题和解决这一问题的新方法的探索已迫在眉睫<sup>[49]</sup>。即便如此，也很少有制药公司探索新的抗生素治疗药物，其中一部分原因是研制新药困难，且发现在不损害患者健康前提下可以

对患者施以足够高的药物浓度来抑制细菌生长。再加上短期抗生素治疗往往使研究新药这一领域在经济上没有吸引力<sup>[50]</sup>。因此，毒力衰减方法被众多研究者所青睐，涉及到治疗药物实际上不会杀死细菌，而是这些化合物会干扰细菌产生毒力因子的能力，例如在生长期间产生的因子作为促进对现有药物的对抗性的生物膜。这种方法是特别有吸引力的，其理论上是对细菌群落施加较少的选择性压力，从而减缓抗生素耐药机制的发展<sup>[51]</sup>。

最近在这一领域的研究重点是铜绿假单胞菌，并提供了大量的数据资料。在研究抑制密度感应的化合物的抗性发展的实验中，细菌可以通过促进高效外排泵来产生对这些分子的抗性。因此，维持细菌群体在一定可控水平下，同时阻止过度免疫反应可能是使宿主消除感染所必需的。目前，在慢性创面中，这样的治疗策略可能涉及使用一些抗菌敷料与完全清创术等技术相结合的方法<sup>[52]</sup>。

目前正在研究的一些潜在的抗生物膜治疗方法是基于生物膜最终作为存活细胞离开生物膜并被分散而解体的事实，尤其是当生物生存资源变得有限且细胞废物产物或其他毒素不断积累时。生物膜解体通常涉及破坏基质成分的诱导酶，从而释放生物膜相关细胞；因此，酶处理可能是生物膜根除的一种方法。与此同时，研制出的重组噬菌体可以攻击生物膜细胞并产生基质降解酶。此外，鉴于生物膜形成需要细胞信号传导，一些研究人员认为，干扰这些信号通路的小分子可能对生物膜根除有用。小分子也可以通过至少四种不同的机制自然触发和介导生物膜的解体，包括：信号和线索、细胞包膜修饰分子、抗基质分子、促进细胞死亡的分子。

应用这些潜在的抗生物膜方法有许多未知性，包括生物膜解体活化所需的信号分子可以是物种，甚至是应力依赖性的，而且一些密度感应途径可能仅在生物膜形成初始中起重要作用，因此密度感应对于早期建立的生物膜的解体并不理想。研究发现，许多小分子特别是抗基质分子在不同条件下具有双重作用，可引发生物膜的形成、成熟、维持，甚至导致生物膜的解体<sup>[53-57]</sup>。

## 7 总结

生物膜已经成为一个日益重要的研究课题，创面一旦形成了生物膜，细菌就具有极强的耐药性，生物膜导致的慢性创面感染可持续存在，比由浮游细菌引起的感染造成的损伤和炎症反应更为严重。在生物膜状态下极易导致难治性慢性感染，使创面迁延不愈，愈合率降低，愈合时间延长，增加患者痛苦及医疗费用。因此，使用适宜的抗菌剂来治疗这种生物膜感染导致的慢性创面感染是至关重要的。随着微生物学的发展，使人们进

一步认识了生物膜在创面中的形成过程和影响机制,对指导预防和诊疗起到极其重要的作用。当然,如今对于生物膜的研究还处于探索阶段,随着相关研究广泛而深入地开展,人们对生物膜引起的慢性反复性感染及其耐药机制也会有更加深入和全面透彻的认识。不同细菌在不同条件下形成的生物膜结构各异,而各种生物膜清除剂的作用方式也不尽相同,导致其适用范围不同。目前虽然对控制和清除生物膜有了一定的探索研究,并且对生物膜性质及生物膜细菌的生理和分子特征有了很好地了解,但对于如何抑制和减少生物膜的生成,根除已经生成的生物膜,促进创面愈合,获得最佳的生物膜清除手段还有待于不断深入探索。

#### [参考文献]

- [1]Costerton JW,Greese GG,Cheng KJ.How bacteria stick[J].Sci Am,1978,238(1):86-95.
- [2]Costerton JW,Cheng KJ,Geesey GG,et al.Bacterial biofilms in nature and disease[J].Annu Rev Microbiol,1987,41:435-464.
- [3]Cowan T.Biofilms and their management: From concept to clinical reality[J].J Wound Care,2011,20(5):220,222-226.
- [4]Branda SS,Vik S,Friedman L,et al.Biofilms: The matrix revisited[J].Trends Microbiol,2005,13(1):20-26.
- [5]Tsuneda S,Aikawa H,Hayashi H,et al.Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface[J].FEMS Microbiol Lett,2003,223(2):287-292.
- [6]Omar A,Wright JB,Schultz G,et al.Microbial Biofilms and Chronic Wounds[J]. Microorganisms,2017,5(1):9.
- [7]Donlan RM,Costerton JW.Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms[J].Clin Microbiol Rev,2002,15(2):167-193.
- [8]Diggle SP,Winzer K,Lazdunski A,et al.Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression[J].J Bacteriol,2002,184(10):2576-2586.
- [9]Antunes LC,Ferreira RB.Intercellular communication in bacteria[J].Crit Rev Microbiol,2009,35(2):69-80.
- [10]Kleerebezem M,Quadri LE,Kuipers OP,et al.Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria[J].Mol Microbiol,1997,24(5):895-904.
- [11]Novick RP,Geisinger E.Quorum sensing in staphylococci[J].Annu Rev Genet,2008,42:541-564.
- [12]Kong KF,Vuong C,Otto M.Staphylococcus quorum sensing in biofilm formation and infection[J].Int J Med Microbiol,2006,296(2-3):133-139.
- [13]Lyczak JB,Cannon CL,Pier GB.Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: Lessons from a versatile opportunist[J].Microbes Infect,2000,2(9):1051-1060.
- [14]Davies DG,Parsek MR,Pearson JP,et al.The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm[J].Science,1998,280(5361):295-298.
- [15]Erickson DL,Endersby R,Kirkham A,et al.*Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems may control virulence factor expression in the lungs of patients with cystic fibrosis[J].Infect Immun,2002,70(4):1783-1790.
- [16]Heurlier K,Denervaud V,Haas D.Impact of quorum sensing on fitness of *Pseudomonas aeruginosa*[J].Int J Med Microbiol,2006,296(2-3):93-102.
- [17]Darch SE,West SA,Winzer K,et al.Density-dependent fitness benefits in quorum-sensing bacterial populations[J].Proc Natl Acad Sci USA,2012,109(21):8259-8263.
- [18]Skindersoe ME,Zeuthen LH,Brix S,et al.*Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules interfere with dendritic cell-induced T-cell proliferation[J].FEMS Immunol Med Microbiol,2009,55(3):335-345.
- [19]Reid G.Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Lactic Acid Bacteria[R].Food and Agricultural Organization of the United Nations:New York, NY,USA,2001.Regulatory and clinical aspects of dairy probiotics.
- [20]White C,Sharman AK,Gadd GM.An integrated microbial process for the bioremediation of soil contaminated with toxic metals[J].Nat Biotechnol,1998,16(6):572-575.
- [21]Paul BJ,Duthie HC,Taylor WD.Nutrient cycling by biofilms in running waters of differing phosphorus status[J].J North Am Benthol Soc,1991,10(1):31-41.
- [22]Gilbert P,McBain AJ.Biofilms: Their impact on health and their recalcitrance toward biocides[J].Am J Infect Control,2001,29(4):252-255.
- [23]Thomas J,Linton S,Corum L,et al.The affect of pH and bacterial phenotypic state on antibiotic efficacy[J].Int Wound J,2012,9(4):428-435.
- [24]Thurlow LR,Hanke ML,Fritz T,et al.*Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation in vivo[J].J Immunol,2011,186(11):6585-6596.
- [25]Malic S,Hill KE,Playle R,et al.In vitro interactions of chronic wound bacteria in biofilms[J].J Wound Care,2011,20(12):569-577.
- [26]Weiser J,Henke HA,Hector N,et al.Sub-inhibitory tigecycline concentrations induce extracellular matrix binding protein Embp dependent *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and

- immune evasion[J]. *Int J Med Microbiol*, 2016, 306(6): 471-478.
- [27] Habash MB, Van der Mei HC, Busscher HJ, et al. The effect of water, ascorbic acid, and cranberry derived supplementation on human urine and uropathogen adhesion to silicone rubber[J]. *Can J Microbiol*, 1999, 45(8): 691-694.
- [28] Wolcott RD, Rhoads DD, Bennett ME, et al. Chronic wounds and the medical biofilm paradigm[J]. *J Wound Care*, 2010, 19(2): 45-53.
- [29] Oh KO, Kim KK. Prevention of Biofilm Infections[J]. *J Bacteriol Viro*, 2009, 39(4): 237-246.
- [30] Wolcott RD, Rhoads DD, Dowd SE. Biofilms and chronic wound inflammation[J]. *J Wound Care*, 2008, 17(8): 333-341.
- [31] McBain AJ, Allison DG, Gilbert P. Emerging strategies for the chemical treatment of microbial biofilms[J]. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 2000, 17(1): 267-279.
- [32] Lewis K. Persister cells and the riddle of biofilm survival[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2005, 70(2): 267-274.
- [33] Percival SL, Emanuel C, Cutting KF, et al. Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection[J]. *Int Wound J*, 2012, 9(1): 14-32.
- [34] Mah TF, Pitts B, Pellock B, et al. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance[J]. *Nature*, 2003, 426(6964): 306-310.
- [35] Schaudinn C, Stoodley P, Kainovic A, et al. Bacterial biofilms, other structures seen as mainstream concepts[J]. *Microbe*, 2007, 2(5): 231-237.
- [36] Oppenheimer-Shaanan Y, Sibony-Nevo O, Bloom-Ackermann Z, et al. Spatio-temporal assembly of functional mineral scaffolds within microbial biofilms[J]. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2016, 2: 15031.
- [37] Sauer K, Cullen MC, Rickard AH, et al. Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm[J]. *J Bacteriol*, 2004, 186(21): 7312-7326.
- [38] Brandenburg KS, Calderon DF, Kierski PR, et al. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on wound dressings[J]. *Wound Repair Regen*, 2015, 23(6): 842-854.
- [39] Thomson CH. Biofilms: Do they affect wound healing[J]? *Int Wound J*, 2011, 8(1): 63-67.
- [40] Krutmann J. Pre- and probiotics for human skin[J]. *Clin Plast Surg*, 2012, 39(1): 59-64.
- [41] Gough E, Shaikh H, Manges AR. Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent *Clostridium difficile* infection[J]. *Clin Infect Dis*, 2011, 53(10): 994-1002.
- [42] Percival SL, Hill KE, Malic S, et al. Antimicrobial tolerance and the significance of persister cells in recalcitrant chronic wound biofilms[J]. *Wound Repair Regen*, 2011, 19(1): 1-9.
- [43] Keren I, Kaldalu N, Spoering A, et al. Persister cells and tolerance to antimicrobials[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 230(1): 13-18.
- [44] Singh R, Ray P, Das A, et al. Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: An in vitro study[J]. *J Med Microbiol*, 2009, 58(8): 1067-1073.
- [45] Abraham WR. Controlling biofilms of gram-positive pathogenic bacteria[J]. *Curr Med Chem*, 2006, 13(3): 1509-1524.
- [46] Kim PJ, Steinberg JS. Wound care: Biofilm and its impact on the latest treatment modalities for ulcerations of the diabetic foot[J]. *Semin Vasc Surg*, 2012, 25(2): 70-74.
- [47] Wolcott RD, Rumbaugh KP, James G, et al. Biofilm maturity studies indicate sharp debridement opens a time-dependent therapeutic window[J]. *J Wound Care*, 2010, 19(8): 320-328.
- [48] Brackman G, De Meyer L, Nelis HJ, et al. Biofilm inhibitory and eradicating activity of wound care products against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms in an in vitro chronic wound model[J]. *J Appl Microbiol*, 2013, 114(6): 1833-1842.
- [49] Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, et al. Bad bugs, no drugs: No ESCAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America[J]. *Clin Infect Dis*, 2009, 48(1): 1-12.
- [50] Coates AR, Hu Y. Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections[J]. *Br J Pharmacol*, 2007, 152(8): 1147-1154.
- [51] Rasko DA, Sperandio V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease[J]. *Nature Rev Drug Discov*, 2010, 9(2): 117-128.
- [52] Maeda T, Garcia-Contreras R, Pu M, et al. Quorum quenching quandary: Resistance to antivirulence compounds[J]. *ISME J*, 2012, 6(3): 493-501.
- [53] Romero D, Kolter R. Will biofilm disassembly agents make it to market[J]? *Trends Microbiol*, 2011, 19(7): 304-306.
- [54] Oppenheimer-Shaanan Y, Steinberg N, Kolodkin-Gal I. Small molecules are natural triggers for the disassembly of biofilms[J]. *Trends Microbiol*, 2013, 21(11): 594-601.
- [55] Franci G, Falanga A, Galdiero S, et al. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents[Mol]. *Molecules*, 2015, 20(5): 8856-8874.
- [56] Kirmusaoglu S. Staphylococcal Biofilms: Pathogenicity, Mechanism and Regulation of Biofilm Formation by Quorum-Sensing System and Antibiotic Resistance Mechanisms of Biofilm-Embedded Microorganisms[J]. *Immun Microbiol*, 2016: 189-209.
- [57] Donlan RM. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage[J]. *Trends Microbiol*, 2009, 17(2): 66-72.