

研究报告



十二烷基苯磺酸钠对引发内置物感染表皮葡萄球菌生物被膜的作用

官妍¹ 吴嘉迪¹ 李杰¹ 许锦涛² 石晶金^{*3}¹ 安徽中医药大学中西医结合学院 安徽 合肥 230012² 江苏海洋大学药学院 江苏 连云港 222005³ 上海交通大学医学院附属国际和平妇幼保健院 上海 200030

摘要:【背景】随着医用内置物的广泛使用,由表皮葡萄球菌生物被膜导致的医院获得性感染不断增多,目前鲜见关于表面活性剂针对表皮葡萄球菌生物被膜作用的报道。【目的】通过研究阴离子型表面活性剂十二烷基苯磺酸钠(sodium dodecyl benzene sulfonate, SDBS)分别对 ATCC 35984 (产膜表皮葡萄球菌标准株)生物被膜的清除、生物被膜内细菌代谢和形成生物被膜的关键物质多糖胞间黏附素(polysaccharide intercellular adhesion, PIA)产生的影响,为临床使用 SDBS 防治由表皮葡萄球菌生物被膜引起的相关感染提供可靠的理论及实践依据。【方法】利用 XTT 减低法,评价 SDBS 对 ATCC 35984 已形成生物被膜的清除效率及对生物被膜内细菌代谢的影响;激光共聚焦显微镜观察 SDBS 对生物被膜作用的效果;采用刚果红培养基观察 SDBS 对 PIA 产生的影响。【结果】浓度为 256、128、64、32、16 mg/L 的 SDBS 在作用 6、12、24 h 时,对 ATCC 35984 的生物被膜均有显著的清除效率($P<0.01$);浓度为 32 mg/L 时对生物被膜内细菌的代谢有显著抑制作用($P<0.05$),并随作用浓度的增加而增强;激光共聚焦显微镜观察显示 256、128、64 mg/L 的 SDBS 对生物被膜的清除效率较为理想,SDBS 浓度为 64、32 mg/L 时对 PIA 的形成无明显抑制作用。【结论】SDBS 对表皮葡萄球菌生物被膜内细菌的代谢有显著抑制作用,对生物被膜形态结构有显著破坏作用。

关键词: 十二烷基苯磺酸钠, 表皮葡萄球菌, 生物被膜, 清除效率, 代谢, 多糖胞间黏附素

Foundation items: Key Project of Natural Science Research of Anhui Provincial Department of Education (KJ2019A0433); School-level subject of International Peace Maternal and Child Health Hospital affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (YN201806)

***Corresponding author:** Tel: 86-21-64070434; E-mail: shijingjin1115@sina.cn

Received: 06-08-2019; **Accepted:** 22-10-2019; **Published online:** 22-11-2019

基金项目: 安徽省教育厅自然科学研究重点项目(KJ2019A0433); 上海交通大学医学院附属国际和平妇幼保健院院级课题(YN201806)

***通信作者:** Tel: 021-64070434; E-mail: shijingjin1115@sina.cn

收稿日期: 2019-08-06; **接受日期:** 2019-10-22; **网络首发日期:** 2019-11-22

Effect of sodium dodecyl benzene sulfonate on biofilm of *Staphylococcus epidermidis* with infection of the implant

GUAN Yan¹ WU Jia-Di¹ LI Jie¹ XU Jin-Tao² SHI Jing-Jin^{*3}

1 College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui 230012, China

2 School of Pharmacy, Jiangsu Ocean University, Lianyungang, Jiangsu 222005, China

3 International Peace Maternal and Child Health Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China

Abstract: [Background] With the widespread use of medical implants, hospital-acquired infections caused by *Staphylococcus epidermidis* biofilm are increasing. For now, there are few reports about the effect of surfactant on the biofilm of *Staphylococcus epidermidis*. [Objective] To demonstrate the effect of anionic surfactant sodium dodecyl benzene sulfonate, including scavenging ATCC 35984 biofilm, bacterial metabolism and formation of polysaccharide intercellular adhesion (PIA). To provide reliable theory and practical evidence for SDBS, and prevent related infections caused by *Staphylococcus epidermidis* biofilm in clinic. [Methods] XTT reduction method was used to explore the effect of SDBS on the clearance of ATCC 35984 biofilm and bacterial metabolism in the biofilm. Laser scanning confocal microscope (LSCM) and Congo red medium was respectively used to observe the effect of SDBS on biofilm and PIA. [Results] SDBS on the concentration of 256 mg/L, 128 mg/L, 64 mg/L, 32 mg/L, 16 mg/L has significantly clearance on ATCC 35984 in the 6 h, 12 h, 24 h, respectively ($P<0.01$). It is significantly inhibition effect of SDBS with 32 mg/L on bacterial metabolism in the biofilm ($P<0.05$). 256 mg/L, 128 mg/L, 64 mg/L SDBS has satisfied clearance. 64 mg/L and 32 mg/L SDBS has no inhibition effect on PIA formation under the LSCM observation. [Conclusion] SDBS has significant inhibition effect on bacterial metabolism in the biofilm of *Staphylococcus epidermidis* and damage the morphological structure of biofilm.

Keywords: Sodium dodecyl benzene sulfonate, *Staphylococcus epidermidis*, Biofilm, Clearance, Metabolism, Polysaccharide intercellular adhesion

目前,越来越多的临床危重患者,依赖于各种医用材料(内置导管、假体、人工关节及人工心脏瓣膜等)的使用来维系生命与健康。随着植入性医用材料的大比例使用,由细菌生物被膜导致的感染性疾病逐渐显现出来。表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)作为人体皮肤与黏膜的重要共生菌之一,通常不致病,但可通过附着于植入体内的人工材料表面产生生物被膜而致病,是导致院内感染的重要病原菌。细菌生物被膜是细菌为了适应周围环境而形成的一种生存方式^[1],是细菌附着在有生命或无生命体表面,被自身分泌的胞外黏质物(extracellular polymeric substance, EPS)所包裹、具有高度组织化的多细胞群体结构^[2]。被生物被膜所包裹的细菌呈现出对抗生素、抗体、免疫细胞等杀菌物质的高度抗性^[3],常规的抗生素治疗并不能彻

底杀灭生物被膜内的细菌,这些存活的耐药菌在适宜条件下又可以游离出来,在机体其它部位定殖并形成新的感染灶,导致感染反复迁延,给临床治疗带来了很大的困难。

表面活性剂的清洁、杀菌作用早为人所熟知,其又是一种带电荷、有亲水和疏水双重功效、可以改变两相性质的物质,因而可在医用材料的界面处发生定向吸附,从而大幅提高抑菌效果,阻止细菌的粘附和成膜。由于细菌生物被膜显示负电性,就可能与带电荷的表面活性剂相互作用,影响 EPS 的结构和功能,从而导致生物被膜的瓦解。表面活性剂这些独特的性质使其成为潜在的抗细菌生物被膜的治疗制剂或者辅助治疗制剂,这对于抗生素不敏感生物被膜菌的防治有很重要的意义。

十二烷基苯磺酸钠(sodium dodecyl benzene

sulfonate, SDBS)是阴离子型表面活性剂,被广泛应用于家庭用洗涤剂 and 农药用乳化剂、分散剂等领域,其之所以能获得广泛应用主要因为其毒理学上的安全性^[4],但 SDBS 的抑菌效果远不如阳离子型表面活性剂,相关临床应用较少。前期我们已发现 SDBS 对产膜表皮葡萄球菌的初始粘附有明显的抑制作用^[5]。本研究通过 SDBS 分别对表皮葡萄球菌生物被膜的清除效率、生物被膜内细菌代谢和形成生物被膜的关键物质多糖胞间黏附素(polysaccharide intercellular adhesion, PIA)产生影响的研究,探究其对表皮葡萄球菌生物被膜的清除和破坏作用,拓展 SDBS 在医疗上更多的用途,为更好地控制由表皮葡萄球菌生物被膜所引起的内置物感染,提供新的思路和可行方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

ATCC 35984 (生物被膜表型和 PIA 表型均为阳性)由复旦大学上海医学院瞿涤教授惠赠; ATCC 12228 (生物被膜表型和 PIA 表型均为阴性)购自中国食品药品检定研究院。

1.1.2 培养基及主要试剂和仪器

刚果红培养基(g/L): 刚果红 0.8, 脑心浸液干粉 47.0, 蔗糖 36.0, 琼脂粉 20.0; 胰蛋白胍大豆琼脂培养基(TSA)、胰蛋白胍大豆肉汤培养基(TSB), 杭州微生物试剂有限公司; MH(B)培养基, 北京奥博星生物技术有限责任公司。

SDBS、琼脂粉, 国药集团化学试剂有限公司; 万古霉素标准品, 中国食品药品检定研究院; XTT, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 丙酮, 国药集团化学试剂有限公司; 甲萘醌, 上海笛柏生物科技有限公司; N-(2-羟乙基)哌嗪-N-(2-乙磺酸), 无锡市亚泰联合化工有限公司; GH 溶液: N-(2-羟乙基)哌嗪-N-(2-乙磺酸) 2.38 g 溶于 10 mL 水中, 再加入右旋葡萄糖 0.20 g 振荡溶解。

激光共聚焦电子显微镜, Olympus 公司; 酶

标仪, LabServ 公司; 96 孔微量培养板, Corning 公司。

1.2 方法

1.2.1 SDBS 对表皮葡萄球菌 MIC 的测定

利用 MH(B)培养基,通过连续稀释法^[6]使每个试管 2 mL 培养基中的 SDBS 被依次稀释为 512、256、128、64、32、16、8、4、2、1 mg/L, 再向试管中各加入 0.5 Mc (麦氏单位) ATCC 35984 菌液 200 μ L, 在 37 $^{\circ}$ C 恒温静置培养 24 h; 与阴性对照管(仅含有培养基,未加菌液)和阳性对照管(加菌的生长对照)对比,得出 SDBS 对 ATCC 35984 的 MIC。同样方法测定阳性对照药万古霉素对 ATCC 35984 的 MIC。

1.2.2 SDBS 对表皮葡萄球菌生物被膜清除效率的测定

参考文献[1,7]方法,向 96 孔板中加入 100 μ L 0.5 Mc 的 ATCC 35984,于 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后,取出 96 孔板,弃去菌液和培养基,用 PBS 缓冲液清洗 3 次,依次加入 SDBS (浓度为 4、2、1、1/2、1/4 MIC)、阳性对照药万古霉素(浓度为 4、2、1、1/2、1/4 MIC) (每个浓度均设 8 个复孔),于 37 $^{\circ}$ C 分别培养 6、12、24 h 后取出,用 PBS 清洗 3 次,加 XTT 溶液(用林格液溶解 XTT,用丙酮溶解维生素 K3,取微量维生素 K3 溶液加到 XTT 溶液中,并经孔径为 0.22 μ m 的滤膜过滤),37 $^{\circ}$ C 避光培养 2 h,测各孔 OD_{630} 值。另设空白对照孔(只加培养基)、阴性对照孔(未加入制剂的生物被膜生长对照)。

1.2.3 SDBS 对表皮葡萄球菌生物被膜内细菌代谢(酶活力)的影响

参考文献[8],将 37 $^{\circ}$ C、120 r/min 培养过夜的 ATCC 35984 菌液用 TSB 稀释至 0.5 Mc,取菌液接种入 96 孔板中,每孔 100 μ L; 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,弃去培养基及悬浮菌,用 PBS 清洗 3 次。用 TSB 对倍稀释 SDBS、万古霉素,分别加入 SDBS(浓度为 64、32、16、8、4、2、1、1/2 MIC),阳性对照药万古霉素(浓度为 64、32、16、8、4、2、1、

1/2 MIC) (每个浓度设 8 个复孔) 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 48 h。加入 XTT 溶液(林格液稀释为 0.5 g/L, 0.22 μm 孔径的滤膜过滤除菌, 临用前加 VK3) 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光培养 2 h, 测各孔 OD_{630} 值。另设空白对照孔(只加培养基)、阴性对照孔(未加入制剂的生物被膜生长对照)。

1.2.4 激光共聚焦显微镜观察 SDBS 对表皮葡萄球菌生物被膜的清除效率

吸取 500 μL 0.5 Mc 的 ATCC 35984 加入到激光共聚焦显微镜专用培养皿凹槽中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。弃去悬浮菌和培养基, 用 PBS 清洗一次, 吸取 SDBS (浓度为 4、2、1 MIC)、阳性对照药万古霉素(浓度为 4、2、1 MIC)各 500 μL 分别加入到各培养皿凹槽中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 分别培养 6、12、24 h。设置阴性对照。

各组样本培养到规定时间后, 弃去上层培养基, 用无菌 PBS 洗去未粘附的浮游菌。吸取 FUN1 染液(4 μL FUN1 染料加入 10 mL GH 溶液中)加入培养皿中, 每个培养皿各加入 1 mL。37 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色 30 min 后, 以激光共聚焦显微镜进行 3D 扫描(激发波长 532 nm, 发射波长 640 nm)。先用 100 倍低倍镜观察生物被膜完整程度, 然后设定 Z 轴, 选用 200 倍视野连续扫描 8 层并拍照; 每组平行测 3 次。

1.2.5 SDBS 对 PIA 形成的影响

参考文献[9]用 TSB 分别稀释 SDBS(浓度为 1、1/2 MIC)、阳性对照药万古霉素(浓度为 1、1/2 MIC) 1 mL 于试管中, 均加入经 37 $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 摇床增菌过夜的 ATCC 35984 (0.5 Mc) 50 μL (5%的接种量)。取 37 $^{\circ}\text{C}$ 分别培养 4、8、12、16、20、24 h 等时间段的菌液, 分别分区划线在刚果红培养基^[10]上, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后, 室温放置 24 h, 观察菌落颜色。另设阳性对照和阴性对照, 未经处理 ATCC 35984 和 ATCC 12228 菌液分区划线在刚果红培养基上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后, 室温放置 24 h, 观察菌落颜色。

1.2.6 数据处理

采用 SPSS Statistics 软件进行单因素方差分析, 两样本间进行 t 检验, 数据以平均值 \pm 标准差 ($\bar{X} \pm \text{SD}$)表示, $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 SDBS 对表皮葡萄球菌 MIC 的测定

由于 SDBS、万古霉素的终浓度呈递减趋势, 其对 ATCC 35984 的抑制作用也呈递减状态, 与阴性对照管和阳性对照管相比, 可得出 SDBS 对 ATCC 35984 的 MIC 为 64 mg/L; 万古霉素对 ATCC 35984 的 MIC 为 8 mg/L。

2.2 SDBS 对表皮葡萄球菌生物被膜清除的效率

与未加表面活性剂的阴性对照组相比, SDBS 的终浓度依次为 256、128、64、32、16 mg/L (4、2、1、1/2、1/4 MIC)时, 在 6、12、24 h 等时间段对 ATCC 35984 已形成的生物被膜均有清除作用, 12、24 h 等时间段对 ATCC 35984 的生物被膜清除效率极为显著($P < 0.001$), 清除率最高可达 86.77%。具体结果见图 1、表 1。

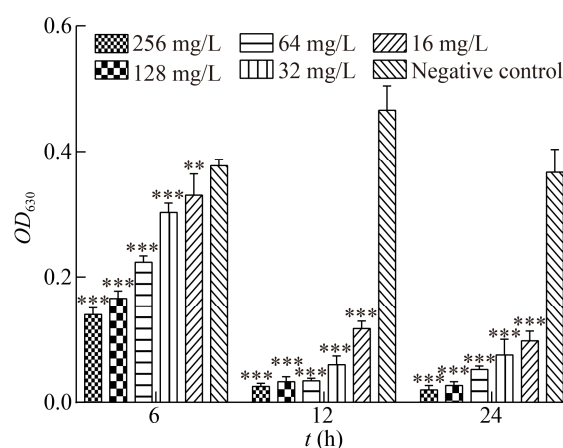


图 1 不同浓度的 SDBS 对表皮葡萄球菌生物被膜的清除作用 ($\bar{X} \pm \text{SD}$, $n=8$)

Figure 1 Scavenging effects of different concentrations of SDBS on the biofilm of *Staphylococcus epidermidis* ($\bar{X} \pm \text{SD}$, $n=8$)

注: 与阴性对照组相比, ***代表 $P < 0.001$, **代表 $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the negative control group, *** represents $P < 0.001$, ** represents $P < 0.01$.

表 1 不同浓度的 SDBS 对 ATCC 35984 的清除率
Table 1 Clearance of ATCC 35984 on different concentrations of SDBS (%)

Time (h)	Concentrations of SDBS (mg/L)				
	256	128	64	32	16
6	55.92	49.79	36.18	17.59	11.11
12	86.77	85.24	84.94	80.00	68.12
24	85.49	83.73	77.51	71.78	66.27

注:清除率=(对照组 OD_{630} -实验组 OD_{630})/对照组 $OD_{630} \times 100\%$.

Note: Clearance rate=(control group OD_{630} -experimental group OD_{630})/control group $OD_{630} \times 100\%$.

与阴性对照组相比,万古霉素的终浓度分别为 32、16 mg/L (4、2 MIC)在 6 h 对 ATCC 35984 已形成的生物被膜有较明显的清除作用($P<0.001$);其中浓度为 32 mg/L (4 MIC)万古霉素在 6、12、24 h 对 ATCC 35984 的生物被膜清除作用均很显著($P<0.001$),但清除率最高只达到 34.87%,8 mg/L (MIC)以下浓度的万古霉素在作用 12、24 h 时甚至促进了生物被膜菌的生长,具体机制尚不清楚。结果见图 2、表 2。

2.3 SDBS 对 ATCC 35984 生物被膜内细菌代谢(酶活力)的影响

与阴性对照孔相比,浓度为 4 096、2 048、1 024、512、256、128、64 mg/L (64、32、16、8、4、2、1 MIC)的 SDBS,对 ATCC 35984 生物被膜内细菌的代谢有极显著影响($P<0.001$);浓度为 32 mg/L (1/2 MIC)时,对 ATCC 35984 生物膜内细菌的代谢也有显著影响($P<0.05$),说明 SDBS 在亚抑菌浓度下即可影响生物被膜内细菌细胞的酶活力,显著抑制细胞代谢。结果见图 3。

与阴性对照孔相比,浓度为 512、256、128、64、32、16 mg/L (64、32、16、8、4、2 MIC)的万古霉素,对 ATCC 35984 生物被膜内细菌的代谢有极显著影响($P<0.001$);浓度为 8、4 mg/L (1、1/2 MIC)时,对 ATCC 35984 生物膜内细菌的代谢无明显影响($P>0.05$),说明万古霉素在 2 MIC 以上浓度时才显著抑制生物被膜内细菌的代谢,结果见图 4。

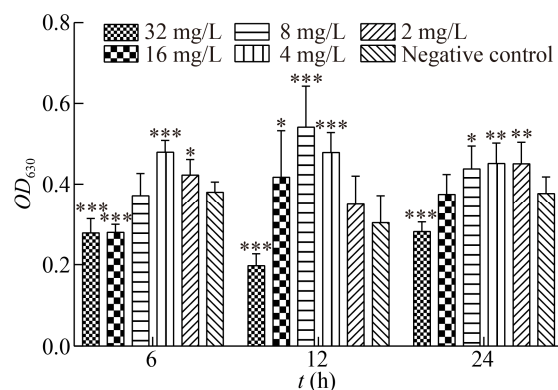


图 2 不同浓度万古霉素对表皮葡萄球菌生物被膜的清除作用($\bar{X} \pm SD$, $n=8$)

Figure 2 Scavenging effects of different concentrations of vancomycin on the biofilm of *Staphylococcus epidermidis* ($\bar{X} \pm SD$, $n=8$)

注:与阴性对照组相比,***代表 $P<0.001$, **代表 $P<0.01$, *代表 $P<0.05$.

Note: Compared with the negative control group, *** represents $P<0.001$, ** represents $P<0.01$, and * represents $P<0.05$.

表 2 不同浓度万古霉素对 ATCC 35984 的清除率
Table 2 Clearance of ATCC 35984 on different concentrations of vancomycin (%)

Time (h)	Concentrations of vancomycin (mg/L)				
	32	16	8	4	2
6	26.81	26.46	2.28	0.00	0.00
12	34.87	0.00	0.00	0.00	0.00
24	25.39	0.00	0.00	0.00	0.00

注:清除率=(对照组 OD_{630} -实验组 OD_{630})/对照组 $OD_{630} \times 100\%$.

Note: Clearance rate=(control group OD_{630} -experimental group OD_{630})/control group $OD_{630} \times 100\%$.

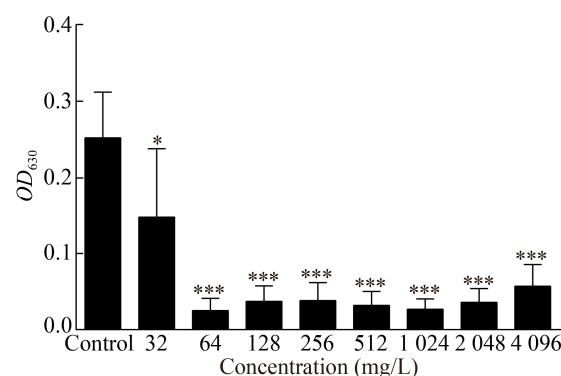


图 3 不同浓度 SDBS 对 ATCC 35984 生物被膜内细菌代谢的影响($\bar{X} \pm SD$, $n=8$)

Figure 3 Effects of different concentrations of SDBS on bacterial metabolism in ATCC 35984 biofilm ($\bar{X} \pm SD$, $n=8$)

注:与阴性对照组相比,***代表 $P<0.001$, *代表 $P<0.05$.

Note: Compared with the negative control group, *** represents $P<0.001$, * represents $P<0.05$.

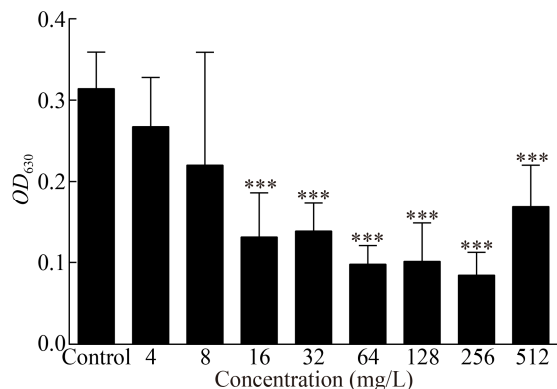


图4 不同浓度万古霉素对 ATCC 35984 生物被膜内细菌代谢的影响($\bar{X} \pm SD$, $n=8$)

Figure 4 Effects of different concentrations of vancomycin on bacterial metabolism in ATCC 35984 biofilm ($\bar{X} \pm SD$, $n=8$)

注: 与阴性对照组相比, ***代表 $P<0.001$.

Note: Compared with the negative control group, *** represents $P<0.001$.

2.4 激光共聚焦显微镜观察 SDBS 对表皮葡萄球菌生物被膜的清除效率

以激光共聚焦显微镜选用 200 倍视野连续扫描 8 层并拍照, 每组平行测 3 次, 所得结果见图 5、6。如图 5、6 所示, 当细菌生物被膜完整, 被膜内细菌正常存活时, 图片上荧光强烈; 而当生物被膜被破坏, 被膜内细菌死亡或受损时, 则图片所显示的荧光变弱或消失。通过观察发现, SDBS 对 ATCC 35984 形成的生物被膜的清除效果明显强于万古霉素。

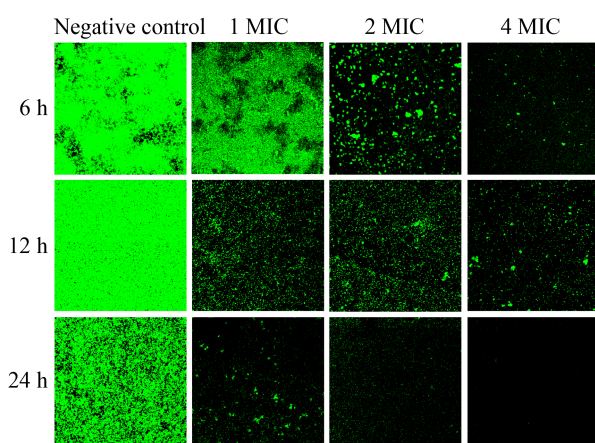


图5 激光共聚焦电子显微镜观察 SDBS 对 ATCC 35984 生物被膜的清除作用(200 \times)

Figure 5 Scavenging effects of SDBS on ATCC 35984 biofilm observed by laser confocal electron microscope (200 \times)

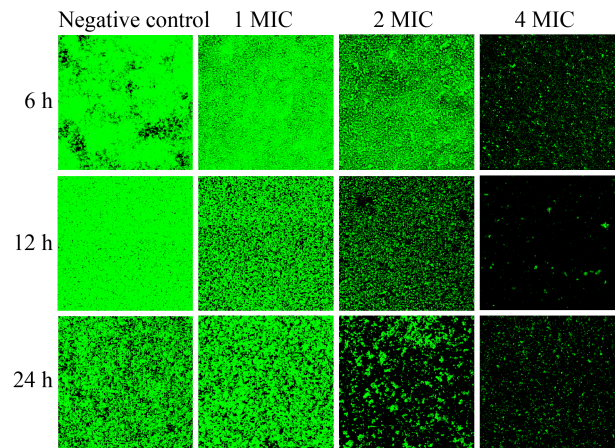


图6 激光共聚焦电子显微镜观察万古霉素对 ATCC 35984 生物被膜的清除作用(200 \times)

Figure 6 Scavenging effects of vancomycin on ATCC 35984 biofilm observed by laser confocal electron microscopy (200 \times)

2.5 SDBS 对 PIA 形成的影响

与阳性对照 ATCC 35984 产膜菌株和阴性对照 ATCC 12228 不产膜菌株相比(图 7), SDBS 浓度为 64、32 mg/L (1、1/2 MIC), 分别作用 4、8、12、16、20、24 h 时, ATCC 35984 在刚果红培养基上的菌落颜色均为黑色, 说明在 1 MIC 以下浓度的 SDBS 并不能显著影响 PIA 的形成, 结果见图 8。万古霉素浓度为 8、4 mg/L (1、1/2 MIC), 作用 4、8、12、16 h 时 ATCC 35984 在刚果红培养基上的菌落颜色均为黑色, 20、24 h 时菌落颜色为红色, 说明万古霉素在作用较长时间后可影响 PIA 的形成, 结果见图 9。

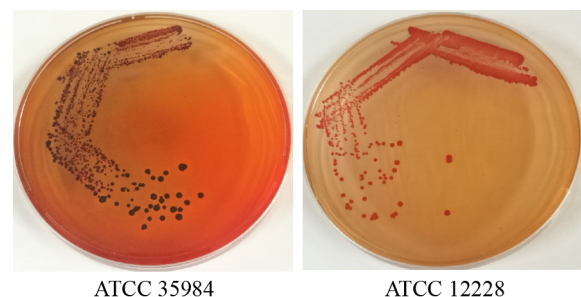


图7 PIA 阳性菌株与 PIA 阴性菌株在刚果红培养基上菌落颜色对照

Figure 7 Colony color comparison of PIA positive strains and PIA negative strains on Congo red medium

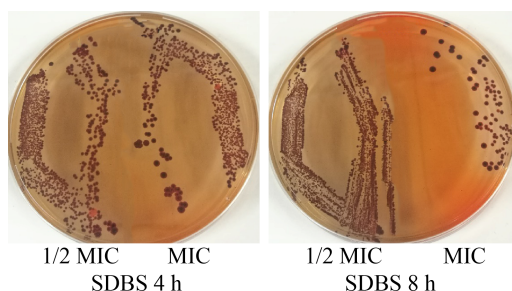


图8 SDBS作用后 ATCC 35984 在刚果红培养基上菌落颜色

Figure 8 Colony color of ATCC 35984 on Congo red medium after SDBS treatment

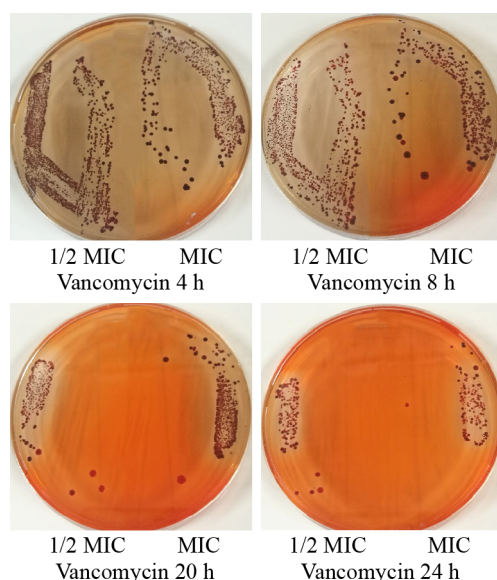


图9 万古霉素作用后 ATCC 35984 在刚果红培养基上菌落颜色

Figure 9 Colony color of ATCC 35984 on Congo red medium after vancomycin

3 讨论与结论

目前已知细菌通过粘附(adherence)、聚集(accumulation)、成熟(maturation)、脱落(detachment) 4个阶段形成生物被膜^[11], 初始粘附与相互聚集是生物被膜形成最重要的两个阶段, 其中 PIA 是细菌生物被膜形成聚集阶段所必需的物质^[12]。

临床治疗感染性疾病首选用药为抗生素, 抗生素虽有起效迅速、效果明显的优势, 但其易诱导产生耐药性和毒性大的缺点也不容忽视。因生

物被膜内的细菌比游离个体细菌的耐药性增加 1 000–1 500 倍, 单用任何一种抗生素均不能完全清除膜内细菌, 因此传统抗生素治疗内置物感染常常失败, 只有联合使用抗生物被膜和抗菌的药物才能有效杀灭细菌生物被膜内的细菌^[13]。以往也有利用中药及有效成分作用于细菌生物被膜的报道和研究, 但中药作用缓慢、抗菌力较弱, 对细菌生物被膜菌的作用效果不很理想。

阴离子表面活性剂具有生产工艺成熟、原料易得、适用范围广等诸多优点, 特别是毒理学上的安全特性使其广泛应用于日用化学品、农业、工业清洗、纺织印染等诸多领域。物竞化学品数据库有关 SDBS 安全说明, 在健康危害一栏显示: 本品基本无毒, 其浓溶液对皮肤有一定刺激作用。目前未见职业中毒报道^[4]。十二烷基苯磺酸及其钠盐是目前生产工艺最成熟、年产量最大的阴离子表面活性剂, 具有很强的脱脂能力, 且泡沫高、成本低、渗透力好。因此低毒价廉且具有一定抑菌能力的 SDBS 引起了我们的关注。

通过 XTT 减低法定量检测发现, 浓度为 256、128、64、32 mg/L (4、2、1、1/2 MIC) 的 SDBS, 在 6、12、24 h 对 ATCC 35984 清除作用极显著 ($P<0.001$), 并且作用时间越长效果越佳, 作用 12、24 h 时, 清除生物被膜效率均达 66% 以上, 激光共聚焦电子显微镜定性检测也呈现了相同的趋势, 其清除效果强于万古霉素。但我们也发现 XTT 减低法与激光共聚焦电子显微镜测得的结果并不完全一致, 可能与激光共聚焦显微镜观察点较少、生物被膜不够均一有关。

浓度为 64 mg/L (1 MIC) 以上的 SDBS 对 ATCC 35984 生物被膜内细菌的代谢有极显著影响 ($P<0.001$); 浓度为 32 mg/L (1/2 MIC) 时, 对 ATCC 35984 生物被膜内细菌的代谢也存在显著影响 ($P<0.05$), 表现出 SDBS 对生物被膜很好的渗透性和对细菌酶活力的抑制作用。与阳性对照药万古霉素相比, SDBS 抗生物被膜内细菌代谢的总体效果更加优良。

在刚果红培养基实验中, 浓度为 64、32 mg/L (1、1/2 MIC) 时, SDBS 对 ATCC 35984 PIA 的合成并无明显抑制作用, 提示 SDBS 对表皮葡萄球菌生物被膜形成的聚集阶段关键物质 PIA 的形成没有显著的影响, 推测 SDBS 可能是通过其他途径去影响或破坏表皮葡萄球菌的生物被膜。Izano 等^[14]研究了同为阴离子型表面活性剂的十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 对伴放线杆菌生物被膜的作用, 认为 SDS 能影响蛋白质的折叠结构, 因而可引起生物被膜基质中蛋白质变性, 导致细菌生物被膜分离, 这为我们进一步探究 SDBS 对表皮葡萄球菌生物被膜的作用提供了参考。

通过本研究, 结合前期对 SDBS 抗表皮葡萄球菌初始粘附影响的研究^[5], 我们发现 SDBS 在抗细菌初始粘附、抗膜内细菌代谢、清除生物被膜等方面效果突出。本研究证实了 SDBS 对引起医院内感染的表皮葡萄球菌生物被膜抑制及清除的作用, 希望能为临床防治由表皮葡萄球菌生物被膜引起的临床内置物感染提供理论及实践的参考。

REFERENCES

- [1] Krasteva PV, Fong JCN, Shikuma NJ, et al. *Vibrio cholerae* VpsT regulates matrix production and motility by directly sensing cyclic di-GMP[J]. *Science*, 2010, 327(5967): 866-868
- [2] Nobile CJ, Mitchell AP. Microbial biofilms: e pluribus unum[J]. *Current Biology*, 2007, 17(10): R349-R353
- [3] Bogdan M, Drenjancevic D, Harsanji drenjancevic I, et al. *In vitro* effect of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics on the biofilm formation ability of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates[J]. *Journal of Chemotherapy*, 2018, 30(1): 16-24
- [4] WUJING chemical database[DB/OL]. <http://www.basechem.org/>. 2019-06-22 (in Chinese)
物竞化学品数据库[DB/OL]. <http://www.basechem.org/>. 2019-06-22
- [5] Guan Y, Dong SZ, Shi JJ, et al. A preliminary study on the influence of SDBS on *Staphylococcus epidermidis* adhesion in the process of producing biofilm[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2016, 28(2): 133-137 (in Chinese)
官妍, 董仕政, 石晶金, 等. 十二烷基苯磺酸钠对产膜表皮葡萄球菌黏附作用影响初探[J]. *中国微生态学杂志*, 2016, 28(2): 133-137
- [6] Shen GX, Xu W. *Microbiology and Immunology*[M]. 8th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2016: 308-309 (in Chinese)
沈关心, 徐威. *微生物学与免疫学*[M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2016: 308-309.
- [7] Tong JP, Wang ZS, Wang Y, et al. Observation of *Staphylococcus* biofilm with silver staining method[J]. *Journal of Dalian Medical University*, 2009, 31(5): 613-615 (in Chinese)
佟金平, 王镇山, 王燕, 等. 银染法观察葡萄球菌生物被膜[J]. *大连医科大学学报*, 2009, 31(5): 613-615
- [8] Guan Y, Li C, Shi JJ, et al. Effect of combination of sub-MIC sodium houltuyfonate and erythromycin on biofilm of *Staphylococcus epidermidis*[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2013, 38(5): 731-735 (in Chinese)
官妍, 李春, 石晶金, 等. 亚抑菌浓度鱼腥草素钠及与红霉素联合对表皮葡萄球菌生物被膜的作用[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(5): 731-735
- [9] Wu XY, Chen JS, Ni KX. Influence of biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* on laboratory identification and drug resistance[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2008, 18(6): 1112-1114 (in Chinese)
吴晓艳, 陈劲松, 倪侃翔. 表皮葡萄球菌生物膜形成对实验室检测及耐药性的影响[J]. *中国卫生检验杂志*, 2008, 18(6): 1112-1114
- [10] Guan Y, Xu YH, Wang CZ, et al. Detection and drug resistance of biofilm-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* clinically isolated: a comparative analysis[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2010, 22(7): 626-627, 630 (in Chinese)
官妍, 徐元宏, 汪长中, 等. 临床分离的表皮葡萄球菌产膜株检出方法及耐药性比较[J]. *中国微生态学杂志*, 2010, 22(7): 626-627, 630
- [11] Li XH, Kim SK, Lee JH. Anti-biofilm effects of anthranilate on a broad range of bacteria[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 8604
- [12] Jeng WY, Ko TP, Liu CI, et al. Crystal structure of IcaR, a repressor of the TetR family implicated in biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(5): 1567-1577
- [13] Wallwork B, Coman W, Mackay-Sim A, et al. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of macrolide in the treatment of chronic rhinosinusitis[J]. *Laryngoscope*, 2006, 116(2): 189-193
- [14] Izano EA, Wang H, Ragunath C, et al. Detachment and killing of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilms by dispersin B and SDS[J]. *Journal of Dental Research*, 2007, 86(7): 618-622