

几种不同基质对阿萨希毛孢子菌形成生物膜影响的初步观察

任晓萍^{1,2} 樊昕¹ 杨蓉娅¹ 夏志宽¹ 李海涛¹

(1 北京军区总医院全军皮肤病诊治中心, 北京 100125; 2 运城市中心医院, 山西 044000)

【摘要】 目的 观察不同基质对阿萨希毛孢子菌生物膜形成能力的影响。方法 在聚芳脂、聚苯乙烯、聚氯乙烯上构建阿萨希毛孢子菌生物膜, 在生物膜形成过程中采用 XTT 法对其活性进行定量分析, 倒置显微镜和扫描电镜下观察不同基质上阿萨希毛孢子菌生物膜形态特征。结果 3种基质上均能形成阿萨希毛孢子菌生物膜, 且形成广泛的生物膜。比较成熟期不同基质上形成生物膜的活性有差别 ($F=14.743, P<0.01$), 活性由高到低为聚芳脂 = 聚氯乙烯 > 聚苯乙烯。倒置显微镜和扫描电镜下观察发现聚芳脂、聚氯乙烯形成的生物膜可见孢子、菌丝、假菌丝结构, 聚苯乙烯上形成以孢子为主要结构的微生物群落。结论 阿萨希毛孢子菌可在聚芳脂、聚苯乙烯、聚氯乙烯上形成生物膜, 但形成生物膜的能力不同。聚芳脂、聚氯乙烯比聚苯乙烯更易于真菌的黏附; 且以菌丝、假菌丝为主要结构的微生物群落活力比单纯孢子的活力强。

【关键词】 阿萨希毛孢子菌; 生物膜; 黏附基质

【中图分类号】 R 379.9 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-3827(2010)04-0201-05

Biofilm formation of *Trichosporon asahii* on different support materials

REN Xiaoping^{1,2}, FAN Xin¹, YANG Rongya¹, XIA Zhikuan¹, LI Haitao¹

(1 The General Hospital of Beijing Military Command, Beijing 100125; 2 Yuncheng Central Hospital, Yuncheng 044000)

【Abstract】 Objective To study biofilm formation of *T. asahii* (*T. asahii* BF) on different matrix *in vitro*. **Methods** The biofilm of *T. asahii* was formed on PAT, polystyrene and PVC. The activity of biofilm was measured and quantitatively analyzed by XTT. Morphological characteristics of *T. asahii* was observed under inverted microscope and scanning electron microscope. **Results** Biofilm was formed extensively on PAT, polystyrene and PVC. The vitality of biofilm formed on different materials differed from strong to weak as followed: PAT = PVC > polystyrene ($F=14.743, P<0.01$). Yeast cells, pseudohyphae and hyphae were found on PAT and PVC, but only yeast cells were observed on polystyrene. **Conclusions** *T. asahii* could form biofilms on different support materials, but differs in ability. It's more easier to adhere on PAT and PVC than on polystyrene, and the vitality of pseudohyphae and hyphae is stronger than that of yeast cells.

【Key words】 *Trichosporon asahii*; biofilm; support material

[Chin J Mycol 2010; 5(4): 201-205]

阿萨希毛孢子菌 (*T. asahii*) 在自然界中广泛存在, 是毛孢子菌属中最重要的临床致病菌, 可导致播散性毛孢子菌病及夏季超敏性肺炎。调查发现, 毛孢子菌已成为仅次于隐球菌和酿酒酵母的第三位常见的非白念珠菌酵母^[1,2]。与浮游状态相比, 阿萨希毛孢子菌生物膜细胞对抗真菌药物的耐药性明显增加^[3,4]。生物膜被定义为微生物聚集

在一起, 由其自身产生的细胞外基质包裹的菌细胞群体, 不仅可在自然界产生, 也可在宿主体内产生, 是微生物的一种独特的生存方式^[5]。生物膜导致耐药性增加的机制目前尚不完全清楚。研究发现很多因素可以影响真菌生物膜的形成, 如物理性质: 基质, 碳源, 唾液的存在, 氧气的存在, 表面限定, 酸碱环境; 环境因素: 热, 冷, 紫外线; 真菌的种类^[5]。成熟真菌生物膜的结构主要受附着层表面材料的影响^[6]。本实验以聚芳脂、聚苯乙烯、聚氯乙烯为生物膜黏附基质观察不同基质对阿萨希毛

基金项目: 国家自然科学基金 (30700038)。

作者简介: 任晓萍, 女 (汉族), 硕士, 住院医师。E-mail: 2007renxiaoping@sina.com

通讯作者: 杨蓉娅, E-mail: yangrya@sina.com

孢子菌生物膜形成的影响,为临床医用材料的选择提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株 阿萨希毛孢子菌株 1株,来源于本院皮肤科临床分离株 (BZP07002),并经 AP20AUX 生化鉴定及 DNA 序列分析验证 (AS2 2174)^[7]。

主要试剂及材料 XTT 试剂: ApplChem 公司, PMS: Sigma 公司, 扫描电镜: HITACHI S-520 由北京市神经外科研究所提供。

1.2 方法

生物膜体外构建^[3] 将-80℃保存的阿萨希毛孢子菌菌种复苏,在沙氏培养基中转种培养 2次,转入酵母蛋白胨葡萄糖肉汤 (YPD)中过夜振荡培养,离心、收集后,重悬于 RPM I-1640 中,稀释成 10⁶ CFU / mL 菌悬液。在培养板中预先放入无菌的聚芳脂、聚苯乙烯、聚氯乙烯 (长宽各为 1.0 cm),每种材料共 9个,分 3个孔放入。将 2.0 mL 该菌悬液加入到 24孔培养板中,28℃培养 72 h。2 h 时 PBS 缓冲液冲洗 2次,重新加入 2.0 mL RPM I-1640 培养液。之后每隔 24 h 更换一次培养液。设不加有阿萨希毛孢子菌的空白对照组。

生物膜形成的定量分析^[3] 通过 XTT 还原比色测定法进行定量分析。测定依据通过代谢活性细胞使黄色的四唑盐 XTT 分裂成橘黄色的甲臞染料。RPM I-1640 培养液中加入 XTT 和电子耦合剂 PMS 使终浓度为 12.5 μmol/L。在预先洗涤培养 0.5 h、1 h、2 h、4 h、8 h、24 h、48 h、72 h 的生物膜孔 63个 (每组 3孔,每孔 3个,共 7组)和空白对照孔中放入 1.5 mL 的 XTT-PMS 溶液,28℃避光培养 2 h。离心上清液平分在 96孔板中,微量滴定板 492 nm 下读数。

倒置显微镜观察 将培养 2 h、4 h、8 h、24 h、48 h、72 h 的含生物膜的聚芳脂、聚苯乙烯、聚氯乙烯用灭菌的 PBS 缓冲液冲洗 2次,放置在载玻片上倒置显微镜下观察。

扫描电镜观察 选培养 48 h 的含生物膜的聚芳脂、聚苯乙烯材料常规扫描电镜制片并观察其形态。

1.3 统计学方法

用 SPSS 13.0 统计软件分析。采用单因素方差分析 (F) 和 LSD-t 检验进行多个样本均数的两两比较。取 α = 0.01 为检验水准, P < 0.01 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 菌株在体外生物膜的形成及定量测定

表 1 显示 3 种材料在 1 h、2 h、4 h、8 h、24 h、48 h、72 h 各时间点上形成生物膜的活力,随时间延长,生物膜的活力逐渐增强。对成熟期 48 h 的生物膜活性采用方差分析表明不同材料上形成阿萨希毛孢子菌生物膜的活性有差别 (F = 14.743, P < 0.01, 见表 2), 采用 LSD-t 检验进行多个样本均数的两两比较,聚芳脂与聚氯乙烯的活性差别无统计学意义 (P > 0.01), 其余材料两两比较差别均有统计学意义 (P < 0.001)。说明不同材料上形成生物膜的活性有差别,活性由高到低为聚芳脂材料 = 聚氯乙烯材料 > 聚苯乙烯材料。

2.2 倒置显微镜下形态

实验发现材料聚芳脂、聚苯乙烯、聚氯乙烯在 2 h 时均有微生物黏附,随时间延长,生物膜形成逐渐增多,经历黏附期,形成期和成熟期。且其形成的生物膜广泛,覆盖整个材料。观察发现聚芳脂、聚氯乙烯形成的生物膜可见孢子、菌丝、假菌丝结构,聚苯乙烯上形成以孢子为主要结构的微生物群落 (见图 1~3)。

表 1 阿萨希毛孢子菌在 3 种材料上形成生物膜的定量 XTT 值测定 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Analysis of the activity of *T. asahii* biofilm by XTT on 3 kind of support materials ($\bar{x} \pm s$)

材料	不同时间点的 XTT 值 ($\bar{x} \pm s$)						
	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h	48 h	72 h
聚芳脂	0.059 ± 0.017	0.148 ± 0.023	0.017 ± 0.011	0.108 ± 0.019	0.393 ± 0.034	1.424 ± 0.120	1.293 ± 0.074
聚苯乙烯	0.042 ± 0.032	0.098 ± 0.021	0.051 ± 0.014	0.130 ± 0.038	0.290 ± 0.011	1.240 ± 0.007	1.310 ± 0.042
聚氯乙烯	0.051 ± 0.012	0.110 ± 0.004	0.042 ± 0.028	0.097 ± 0.015	0.340 ± 0.024	1.580 ± 0.010	1.240 ± 0.020

表 2 不同材料上 48 h 阿萨希毛孢子菌生物膜活性方差分析结果

Tab 2 Analysis of the activity of *T. asahii* biofilm on 3 kind of support materials

变异来源	SS	v	MS	F	P
组间	.388	2	.194	14.743	.000
组内	.315	24	.013		
总	.703	26			

2.3 扫描电镜下形态

观察在聚芳脂、聚苯乙烯材料表面培养 48 h 的阿萨希毛孢子菌生物膜在扫描电镜下的结构, 放大倍数分别为 $\times 2\ 000$, $\times 5\ 000$ 。聚芳脂扫描电镜下可见生物膜为多层结构, 包括所有真菌形态 (关节孢子、假菌丝、菌丝), 形成一个复杂的三维立体架构。镜下可见串珠状孢子, 关节孢子, 部分孢子上可看到绒毛状结构 (见图 4)。聚苯乙烯表面生物

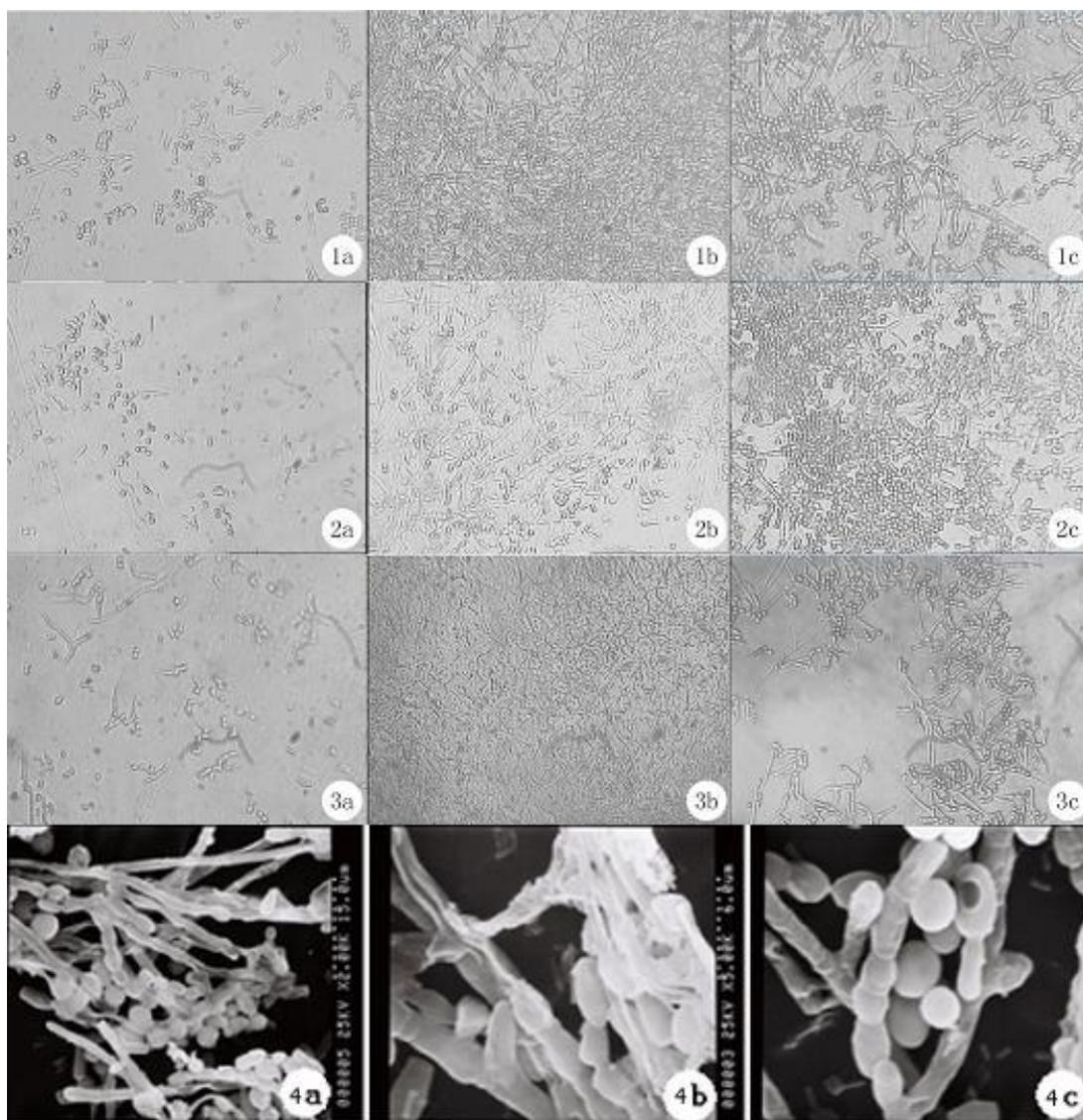


图 1~3 分别示聚芳脂、聚苯乙烯、聚氯乙烯 3 种材料上倒置显微镜下 *T. asahii* 生物膜的形态 (a 2 h b 48 h c 72 h $\times 200$)。2 h 时为散在的芽生孢子结构; 48 h 时孢子、菌丝、假菌丝结构相互缠绕聚集, 并被胞外多糖基质包裹。1c 3c 可见孢子、菌丝、假菌丝结构; 2c 镜下主要为孢子结构。3 种材料镜下形成的生物膜均很广泛 图 4 聚芳脂上 48 h 时扫描电镜下阿萨希毛孢子菌生物膜形态, 可见菌丝、关节孢子、串珠状孢子, 部分孢子上可看到绒毛状结构 (a $\times 2\ 000$ b c $\times 5\ 000$)

Fig 1-3 Morphological characteristics of *T. asahii* observed under inverted microscope on 3 different support materials PAT, polystyrene and PVC (a 2 h b 48 h c 72 h $\times 200$). After 2 hours adherent budding yeast cells stuck to the materials in a random manner. During the maturation phase (48 to 72 h), the complexity of the biofilm increased from a monolayer into a multilayered structure involving all fungal morphology (yeast cells, hyphae and pseudohyphae). 1c 3c yeast cells, hyphae and pseudohyphae; 2c yeast cells. Widespread biofilm was observed on 3 kind of material. Fig 4 Morphological characteristics of *T. asahii* biofilm under scanning electron microscope on PAT: hyphae, arthrospore, bead-like spore, villiform structure (a $\times 2\ 000$ b c $\times 5\ 000$)

膜在扫描电镜下观察为一个一个的形态不规则的孢子。未见菌丝和假菌丝 (见图 5)。

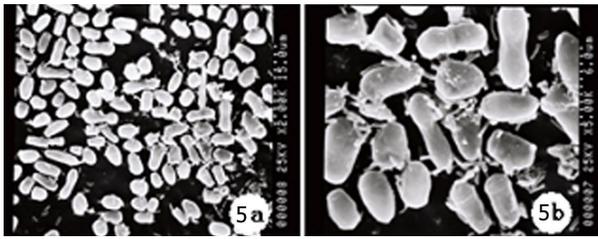


图 5 聚苯乙烯上 48 h 时扫描电镜下阿萨希毛孢子菌生物膜形态, 只见孢子结构 (a × 2 000, b × 5 000)

Fig 5 Morphological characteristics of *T. asahii* biofilm under scanning electron microscope on polystyrene spore only (a × 2 000, b × 5 000)

3 讨 论

播散性毛孢子菌病呈世界性分布, 是一种慢性、顽固、难治的系统性真菌病, 其发病呈逐年上升的趋势^[8], *T. asahii*是引起该病的重要致病菌。在对 *T. asahii*所致播散性毛孢子菌病的临床研究发现, 尽管使用抗真菌药物, 但感染仍持续存在。2006年 Giovanni^[3]等发现与浮游状态的菌株相比, *T. asahii*生物膜细胞对两性霉素 B 卡泊芬净、伏立康唑和氟康唑的最低抑菌浓度 (MICs) 明显增加, 国内李继红^[4]等也发现固着相即生物膜细胞的 MIC 比浮游相成倍提高。近年来各种医用材料 (各种支架、导管、瓣膜、起搏器、人工关节等材料) 的使用率很高, 而微生物易于黏附于其表面且可形成生物膜, 导致耐药性增加而感染灶不易清除^[9]。Giovanni^[8]首先在体外聚苯乙烯材料表面成功构建 *T. asahii*生物膜, 证明 *T. asahii*生物膜的存在。研究表明^[10], 微生物的致病力与其在聚合材料表面形成生物膜的能力呈正相关。

本实验以医学上常用的各种导管材料聚芳脂、聚苯乙烯、聚氯乙烯为黏附基质, 观察不同支撑材料对阿萨希毛孢子菌形成生物膜的影响。研究发现塑料材料 (聚芳脂、聚苯乙烯、聚氯乙烯) 上生物膜形成经历真菌表面黏附、微菌落形成和生物膜成熟的典型步骤, 且 3 种材料的生物膜黏附时间、聚集及形成复杂三维立体结构的时间接近, 且形成的生物膜结构均为广泛性的; 采用 XTT 比色法观察生物膜活性时发现生物膜中阿萨希毛孢子菌的活性随培养时间延长而增加, 当生长趋于成熟时, 代

谢的活性相对稳定, 但仍保持在一个高水平, 这表明即使是在成熟的生物膜中, 细胞的数量也有增加, 处于一态平衡中, 这与荧光显微镜下观察结果一致^[11]: 在初始阶段, 有散在的阿萨希毛孢子菌黏附在支撑材料上, 其中有少量的死菌, 随时间延长, 阿萨希毛孢子菌逐渐聚集成团块, 活菌和死菌的量都增加。研究表明, 基质的生理化学特点可影响真菌的黏附从而影响生物膜的形成。不同导管材料上形成的真菌生物膜量亦不同。本实验发现在聚芳脂、聚苯乙烯、聚氯乙烯上均能形成生物膜, 倒置显微镜下观察发现聚芳脂、聚氯乙烯形成的生物膜可见孢子、菌丝、假菌丝结构, 聚苯乙烯上形成以孢子为主要结构的微生物群落。扫描电镜下更清楚的发现微生物群落组成的差异。分析 XTT 比色测定的定量结果可推测菌丝、假菌丝的活力比孢子的活力强。

本实验表明不同材料上形成阿萨希毛孢子菌生物膜的能力不同, 聚芳脂、聚氯乙烯比聚苯乙烯更易于真菌的黏附; 且证实了以菌丝、假菌丝为主要结构的微生物群落活力比单纯孢子的活力强。针对医学材料上形成生物膜导致抗真菌药耐药性增加, 研究人员提出了许多干预措施: Chandra^[12]发现 6% 的聚氧化乙烯修饰的聚醚氨基甲酸乙酯比同类未修饰的材料以及其他种类的材料形成白色念珠菌生物膜的能力降低。国内马荣华^[13]等发现纳米银水凝胶涂膜可有效减少气管导管表面铜绿假单胞菌的黏附数量, 延缓导管表面细菌生物膜形成, 其作用强弱随培养时间及单位面积中的纳米银剂量的变化而变化。提示对常用的医学生物材料的改良和特殊处理在防治微生物生物膜感染上具有很好的前景。本实验不足之处是未对阿萨希毛孢子菌生物膜进行药敏试验。

参 考 文 献

- [1] Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, et al Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: 10.5-year analysis of susceptibilities of noncandida yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing [J]. J Clin Microbiol 2009; 47 (1): 117-123.
- [2] 郭丽娜, 徐英春, 窦洪涛, 等. 临床相关毛孢子菌的研究现状 [J]. 中国真菌学杂志, 2010, 5(1): 53-56
- [3] Giovanni D, Arianna P, Carla P, et al Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development architecture and antifungal resistance [J]. Antimicrob Agents

- Chemother 2006 50(10): 3269-3276
- [4] 李继红, 杨敬芳, 范士英. 阿萨希毛孢子菌生物膜构建及水杨酸干预策略研究 [J]. 中国真菌学杂志, 2008 3(4): 183-185
- [5] 任晓萍, 杨蓉娅, 樊昕, 等. 真菌生物膜影响因素的研究进展 [J]. 中国真菌学杂志, 2009 4(3): 197-200.
- [6] Mukherjee PK, Zhou G, Mohamed S et al *Candida albicans* biofilm: isolation and composition of extracellular matrix [A]. C In abstracts of the seventh ASM conference on *Candida* and *Candidiasis* Austin, 2004
- [7] 杨蓉娅, 李天伟, 赵建花, 等. 国内首例播散性毛孢子菌病病原菌阿萨希丝孢酵母菌的 DNA 序列分析 [J]. 中华医学杂志, 2001 81(8): 472-475.
- [8] Sugita T, Nishikawa A. Molecular taxonomy and identification of pathogenic fungi based on DNA sequence analysis [J]. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi 2004, 45(2): 55-58.
- [9] Mathur T, Singhal S, Khan S, et al Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods [J]. Indian J Med Microbiol 2006 24(1): 5
- [10] Tokinatsu I, Karashima R, Yamagata E, et al Pathogenesis of *Trichosporon asahii* and strategies for infectious control of disseminated trichosporonosis [J]. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi 2003, 44(3): 181-186.
- [11] 任晓萍, 杨蓉娅, 樊昕, 等. 阿萨希毛孢子菌生物膜超微结构观察和耐药机制研究 [J]. 中华皮肤科杂志, 2010 43(8): 538-541.
- [12] Chandra J, Patel J, Li J et al Modification of surface properties of biomaterials influences the ability of *Candida albicans* to form biofilms [J]. Appl Environ Microbiol 2005 71(12): 8795-8801
- [13] 马荣华, 左泽兰, 刘卫娟. 纳米银水凝胶涂膜干预气管导管表面铜绿假单胞菌黏附及生物膜形成的实验研究 [J]. 中国微生态学杂志, 2009, 21(3): 217-222
- [收稿日期] 2010-03-02
[本文编辑] 卫凤莲

(上接第 200页)

参考文献

- [1] Shao PL, Huang LM, Hsieh PR. Invasive fungal infection laboratory diagnosis and antifungal treatment [J]. Microbiol Immunol Infect 2006, 39(3): 178-188
- [2] Hsiao HH, Tsai HJ, Liu YC, et al Invasive fungal infections in patients with acute leukemia [J]. Kaohsiung J Med Sci 2006, 22(5): 217-222
- [3] Guillot J, Gueho E, Lesourd M, et al Identification of *Malassezia* species: a practical approach [J]. J Mycol Med, 1996 6(2): 103-110.
- [4] Pfaller MA, Diekema DJ. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* [J]. J Clin Microbiol 2004 42(10): 4419-4431
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts Third Informational Supplement CLSI document M27-S3 3rd ed [M]. Wayne PA: Clinical Laboratory Standards Institute 2008
- [收稿日期] 2010-02-05
[本文编辑] 施慧