

细菌菌膜的成分、调控及其与植物的关系

李昱龙 陆一鸣 韩正敏 樊奔*

(南方现代林业协同创新中心 南京林业大学林学院 江苏 南京 210037)

摘要: 菌膜是细菌群落发展的一种高度组织化的群体状态。在菌膜形成过程中, 细菌胞外物质 EPS (Exopolysaccharides)、eDNA (Extracellular DNA)、胞外蛋白等都参与菌膜的形成, 它们为菌膜提供机械稳定性, 帮助细菌粘附到物体表面, 促进菌膜中不同细菌间物质的循环及基因的水平转移。菌膜形成涉及到群体感应、C-di-GMP (Cyclic diguanylate monophosphate)和 sRNA 等一系列调控机制。土壤环境中栖息着大量的微生物, 许多土壤微生物定殖于植物根际, 从而与植物发生着密切的相互作用; 菌膜的形成是细菌稳定定殖于植物根际的关键因素, 有助于植物促生菌或致病菌在根际更好的生存。本文就菌膜的成分、调控及其与植物的关系等三个方面的内容进行综述。

关键词: 菌膜, sRNA, 植物病害, 植物促生菌

Bacterial biofilm: composition, regulation and association with plant

LI Yu-Long LU Yi-Ming HAN Zheng-Min FAN Ben*

(Collaborative Innovation Center of Sustainable Forestry in Southern China, College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu 210037, China)

Abstract: Biofilm is a highly structured bacterial community state. Bacterial extracellular matrix substances such as EPS, eDNA, and extracellular proteins are involved in the formation of biofilm. These matrix substances enhance biofilm mechanical stability, promote bacterial adhesion to solid surface, facilitate nutrient circulation and gene transfer, and provide other advantages to the bacterial survival. Biofilm formation is related to quorum sensing, C-di-GMP and sRNA. In soil environment habitat plenty of bacteria, many of which colonize plant roots and thus interact with host plants intensively. Biofilm is known to play an important role in plant colonization by soil bacteria including both phytopathogenic and plant beneficial ones. In this paper the biofilm studies are reviewed with a focus on biofilm composition, regulation and, especially its association with plant roots.

Keywords: Biofilm, sRNA, Plant diseases, Plant growth promoting bacterium

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31100081); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20151514); Priority Academic Program Development (PAPD) of Jiangsu Higher Education Institutions

*Corresponding author: Tel: 86-25-85427301; E-mail: fanben2000@gmail.com

Received: October 10, 2016; **Accepted:** December 27, 2016; **Published online** (www.cnki.net): February 08, 2017

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(No. 31100081); 江苏省自然科学基金项目(No. BK20151514); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

*通讯作者: Tel: 86-25-85427301; E-mail: fanben2000@gmail.com

收稿日期: 2016-10-10; 接受日期: 2016-12-27; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-02-08

1 菌膜概述

菌膜(Biofilm)是细菌粘附在物体表面生长时形成致密而复杂的群落结构。它由细菌及自身所产生的胞外基质构成。当生存环境发生改变时,细菌群落通过分泌不同的组分来改变菌膜的结构和胞外基质的营养成分,这种基质的变化能够帮助细菌更好地储藏营养物质和水分,抵御外界的不良环境^[1](图 1)。菌膜广泛存在于人类世界中,能够对生产和生活产生巨大影响。在医学上,65%–80%的人类细菌感染都与菌膜有关^[2]。在食品工业生产中,菌膜能够造成食品污染^[3]。在农业上,细菌通过形成菌膜对一部分作物起到促生作用,对另一些则产生病害^[4-5]。因此,菌膜的作用、功能及对寄主产生

的影响一直都是科学研究的热点问题。本文将重点讨论菌膜的形成、分子机理及与植物寄主的关系。

2 菌膜的成分、形成和功能

菌膜的主要成分为胞外多糖、糖蛋白、菌毛、鞭毛和胞外 DNA (Extracellular DNA ,eDNA)^[6](图 1)。不同的种之间或同种的不同菌株之间,甚至同一菌株的不同生长时期或不同生长环境,菌膜的成分都会不同。菌膜具有一定的渗透性,使得菌膜内的细菌能够进行更有效的物质交换,还能为细菌提供物理、化学屏障以阻挡所处环境中的抗生素、免疫防御物质和其他有害化合物,保护菌膜内的细菌免受环境中应激因子的危害,如紫外线、pH 改变、干燥和渗透胁迫等。

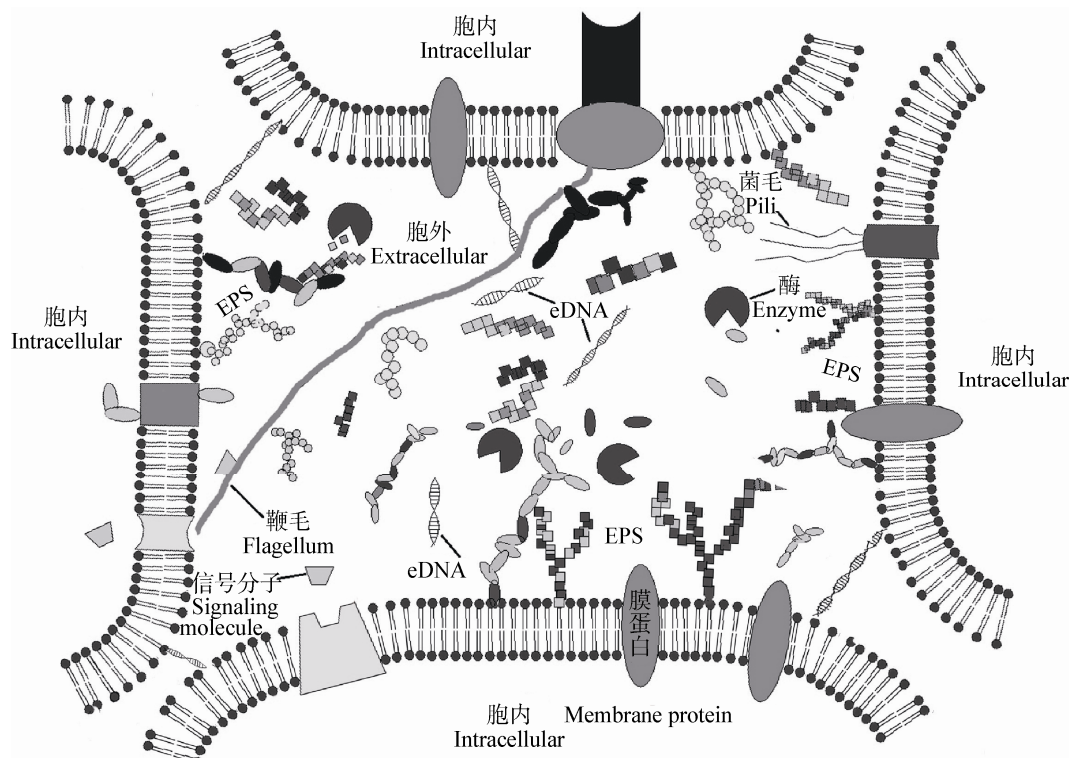


图 1 菌膜胞外基质结构示意图

Figure 1 A schematic diagram for the structure of extracellular matrix of biofilm

注:菌膜的主要成分为胞外多糖、糖蛋白、菌毛、鞭毛及 eDNA。菌膜内的细菌排列紧密并能够进行物质的交换。eDNA 既是营养物质又是细胞间连接的桥梁。胞外酶能够根据环境变化来改变胞外物质的结构和成分。鞭毛和菌毛在形成菌膜过程中帮助细菌聚集。

Note: The matrix components of biofilm include extracellular polysaccharides, glycosidoprotein, pili, flagellum and eDNA. The bacterial cells are bundled together in biofilm so that materials and information are dynamically exchanged inside biofilm. eDNA serve as bacterial nutrient but also bridge the connection of the cells. The extracellular enzymes vary in respect of components and structure responding to environmental clues. Fimbriae and flagella can facilitate the assembly of bacterial cells in the formation of biofilm.

细菌形成菌膜受液相条件、营养浓度、运动性、细胞通讯、胞外多糖和蛋白的影响。菌膜形成的过程从胞外基质相关应激环境信号基因的表达开始。此后,细菌就能够随机吸附到物体表面。这一过程主要与膜蛋白、菌毛、eDNA 和 EPS (Exopolysaccharides)有关。细菌形成小菌落后会逐渐产生群体感应信号来促进菌膜的成熟。在菌膜形成初期,细胞为杆状并带有鞭毛的运动型细胞。而后,这些细胞分化为能够产生胞外基质的非运动性细胞。这种转变阻止了细胞的分散,使菌膜结构更加稳定。菌膜成熟的后期,细胞开始分泌 D-氨基酸和多胺等小分子物质,使得细胞能够突破外基质扩散到外环境中去,在条件适合的时候再形成新的菌膜,从而完成一个循环的发展过程(图 2)^[7]。

2.1 EPS

EPS 是菌膜的主要成分之一。菌膜中的 EPS 分子之间相互作用决定了胞外基质的机械性质^[6]。细菌能够分泌促进细菌积聚的胞外聚合物。胞外聚合物的主要成分是 EPSs,它是由杂多糖组成不同的线性或者分枝状分子。EPSs 具有分子胶的功能,能够发起和维持细胞之间的联系,维持菌膜结构稳定^[8]。每种 EPS 的成分和功能都不相同。例如,根际共生

菌中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)分泌的半乳糖聚糖(EPS II)分为两种主要结构:低聚糖和高聚糖。不能产生 EPS II 的突变株通常也不能积聚。只分泌高聚糖的 *mucR* 突变株具有较弱的聚集表型。在不产 EPS II 菌株和 *mucR* 菌株加入 EPS II 后表型即恢复正常,说明菌膜中的胞外多糖组分在自聚集中发挥重要作用^[8]。不同的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)都能够分泌两种明显的生物聚合物——多糖 EPS 和多聚 δ 谷氨酸盐(PGA),这两种物质都参与了菌膜形成,但是根据菌株和实验条件的不同,两种物质所起的作用不同^[9]。

菌膜中不同 EPS 的种类和含量是动态变化的。胞外基质中的多糖物质经常由于细菌的生长条件、培养基种类及底物类型的不同而发生较大变化^[10]。例如革兰阴性菌铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*),它通过产生藻酸盐、PEL、PSL 等胞外多糖构成菌膜。根据细菌所处的不同条件或状态,其胞外多糖在胞外基质的变化过程中所起的作用和重要性不断发生变化,并且影响细菌的定殖状态^[11]。EPS 的另一主要功能是帮助菌膜同外界进行物质和能量的交换。EPS 能够吸附周围环境中的营养、气体和其他离子等物质^[12]。另外,菌膜中的细

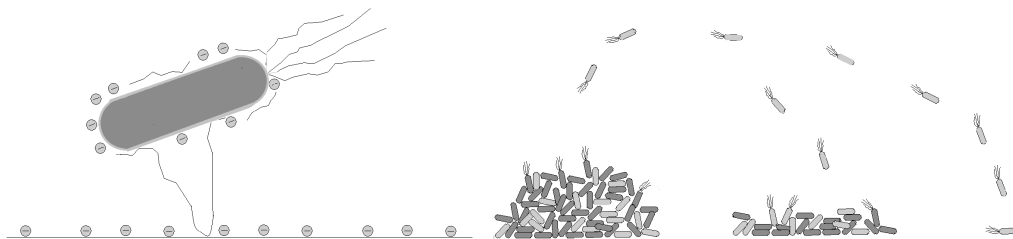


图 2 菌膜形成过程

Figure 2 A model of the development of biofilm formation involved by eDNA

注:细胞表面和平面都带负电荷的情况下,细胞难以接触物体表面。eDNA 能够形成约为 300 nm 的环状结构,弱化物体之间的静电斥力。同时还能与物体表面细微的凹凸(通常是纳米级)作用,拉近细胞与物体表面的距离。细菌在胞外多糖和 eDNA 参与下拉近自身与物体距离,粘附到物体表面(左);成功粘附到物体表面的细菌会不断积聚或复制形成一定的群落规模,菌膜成熟后逐渐分散,使细菌能够定殖到其物体表面,从而完成一个循环的过程(右)。

Note: The both negatively charged bacterial cells and solid surface will not favor their adhesion until the involvement of eDNA. eDNA surround the cells in a space of approximately 300 nm and hence attenuate the static pulsion from both sides. Meanwhile, eDNA from cells can interact with the nanoscale particles on solid surface and lower the distance between them by attraction. Adhesion of bacterial cells on solid surface with the involvement of polysaccharides and eDNA (left). Post adhesion on solid surface the bacteria will aggregate gradually and propagate till forming a clony community (right). Some bacteria can break the restriction of matured biofilm and disperse to colonize a new location on solid surface. Thus the biofilm expands outward.

胞表面通常都具有 EPS 结合位点,包括阴离子和阳离子交换器。这些结合位点利用 EPS 将细胞与细胞以及细胞与菌膜绑定在一起。他们能把周围环境的营养和毒害物质吸附、富集到菌膜中并加以利用,这种特性能够使细菌在营养贫乏的环境中生存^[13]。

2.2 eDNA

eDNA 通常散布在菌膜中的各个角落,是菌膜中保持菌与菌之间联络及菌膜稳定的关键物质。在成熟的菌膜中,细菌亚群能够产生大量 eDNA,但未成熟的菌膜对 DNase 更加敏感,说明 eDNA 在假单胞菌的菌膜的形成、发展和成熟中都发挥一定的作用^[14]。

在假单胞菌(*Pseudomonas* spp.)中,eDNA 的释放是群体感应(Quorum sensing, QS)依赖及 QS 非依赖机制介导的。QS 非依赖机制介导释放少量 eDNA, QS 依赖型机制介导细胞大量裂解,增大 eDNA 的产生^[15-16]。酰化丝氨酸内酯(AHLs)和假单胞菌的喹诺酮(PQS)等群体感应分子调控产生细胞裂解因子。前噬菌体和吩嗪衍生物诱导细胞裂解并触发 eDNA 释放。铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*) PQS 和 AHL 缺陷型突变株表现出原噬菌体诱导降低,细胞裂解和 eDNA 释放减少;PQS 相关基因过表达则直接导致菌膜中 eDNA 含量升高^[16]。另外还有一些革兰氏阳性菌,如金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)等都是通过细胞裂解的方式产生 eDNA。枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)则通过不依赖裂解的方式释放 eDNA。枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) QS 基因 *oppA*、*oppF*、*comXP* 缺陷型突变株以及 DNA 代谢相关基因 *mfd* 和 *topA* 缺陷型突变株 eDNA 明显减少,而且不能形成完整的菌膜^[17]。

在蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、希瓦氏菌(*Shewanella* sp.)、硝化螺菌属(*Nitrospira* sp.)、金色葡萄球菌(*Staphylococcus* sp.)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)等许多细菌中,eDNA 都参与菌膜

的形成^[18-21]。金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)在菌膜形成早期产生的 eDNA 与细菌粘附在物体表面有关,去除 eDNA 或阻碍 eDNA 产生都会降低细菌的粘附能力^[22]。单个细菌细胞粘附到物体表面通常包含两个阶段:第一阶段,细菌细胞与物体表面接触并产生粘附物质使自身更牢固地锚定于物体表面。在吸附过程中,物体更小的表面积更有利于接触到物体表面。有研究表明菌体表面的 eDNA 能够形成伸出表面约 400 nm 的环状结构,可作为吸附到物体表面的桥梁。第二阶段,产生由 eDNA 介导电子基团相互作用的区域,这种通过 eDNA 介导的电子相互作用使细胞更容易粘附于物体表面(图 2)^[23]。

eDNA 对菌膜完整性也起着稳定作用。如利用 DNase 处理新形成的菌膜会造成菌膜的快速解体,利用蛋白酶或多糖酶处理菌膜或者用 DNase 处理成熟的菌膜则效果不明显^[14,24]。原因可能是菌膜成熟后 eDNA 的作用被其他物质所取代,或是成熟菌膜中 eDNA 与其它生物分子相互作用,从而保护 eDNA 免遭 DNase 降解。还有一些研究证明加入外源 DNA 也能够促进细菌聚集和形成菌膜。细菌基因的水平转移是细菌进化的重要途径。菌膜中的 eDNA 为细菌间的自然转化提供了 DNA 基础,同时也是可移动遗传元件和噬菌体诱导基因转移的途径,这种 eDNA 的水平转移在土壤中的革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌中都被发现^[25-26]。

2.3 其他成分

细菌胞外结构如鞭毛、菌毛和纤毛通过与 EPS 成分相互作用,也具有稳定菌膜结构的作用。铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)的 IV 鞭毛能够结合 eDNA,在菌膜中形成有利于菌膜稳定的交联结构^[27]。但是,成熟菌膜中的细菌通常不具有运动性,鞭毛的作用发生于细菌形成菌膜过程中,可能只在形成菌膜的初期发挥作用。通过基因敲除降低细菌游动性或增强游动性时发现这两种突变株在特定的生长时期对菌膜的形成都有促进作用,说明游动性在菌膜形成时是由两种模式共同调控的(图 2)^[28-29]。

菌膜中也有许多胞外蛋白质。这些蛋白质一部

分是水解酶,它们能够将大分子物质,如纤维素、几丁质和脂类化合物等水解成为易于细菌利用的有机物,促进菌膜内养分的循环(图 1)。类胶原蛋白(Collagen like proteins, CLP)是菌膜形成的重要因素,解淀粉芽孢杆菌中的 *clpA*、*clpB*、*clpC*、*clpD* 等 CLP 基因缺失突变株不仅表现出较低的菌膜形成能力,而且难以在拟南芥根部定殖^[30]。也有一些致病性细菌分泌的酶则是重要的致病因子^[31],如细菌表面的 Bap 蛋白(Bacterial alkaline phosphatase, BAP)和 Bap 类似蛋白,它们具有串联重复结构域,此结构域与菌膜形成和侵染有关^[32]。胞外蛋白 TasA 是枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)菌膜的必要蛋白,对 *tasA* 缺失突变株和胞外多糖合成基因缺失突变株的研究显示,细胞外蛋白 TasA 和胞外多糖能够组装形成具有功能性的基质^[33]。具有一定功能的胞外蛋白还有变形链球菌(*Streptococcus mutans*)的葡聚糖蛋白^[34]、大肠杆菌(*E. coli*)中的纤维素^[35]、铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)中的 LecA 和 LecB^[36]、巴西固氮螺菌(*Azospirillum brasilense*)的凝集素^[37]、假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.)中的淀粉体^[38]等。EPS、eDNA 和胞外蛋白等组分也有相互作用的机制。铜绿假单胞菌菌膜中阳离子胞外多糖 Pel 能与 eDNA 相互交联,维持胞外基质的结构完整^[39]。大肠杆菌菌膜中 DNA B II 型结合蛋白能够保持 eDNA 二级结构的稳定性等^[39]。上述菌膜的各种成分相互协调形成了完整的结构体系。

3 菌膜形成的分子调控机制

3.1 群体感应(Quorum sensing)

群体感应在许多菌膜形成中发挥关键作用。群体感应系统中,细菌在一定浓度时向胞外分泌自诱导物,当体外自诱导物达到一定的浓度时就能激活群体感应系统。LuxI/LuxR 系统在许多革兰氏阴性菌的群体感应系统。在该系统中 LuxI 型蛋白能合成酰基化高丝氨酸内酯(AHL)自诱导物,之后 AHL 激活基因表达调节 LuxR 型转录激活物合成。铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)拥有两个 AHL 群集感应系统——Las 和 RhI。不同的群集感应系统都有其自身的 AHL 合酶

LasI 和 RhII 及其自身的转录调控因子 LasR 和 RhIR。AHL 信号物质分别由 N-(3-oxododecanoyl)-HSL 和 N-butyryl-HSL 组成^[40]。这两套双组分系统会根据菌株和实验条件的不同在菌膜形成过程中发挥不同的作用。在铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*) PAO1 菌株中,双组分系统 Las 和 RhI 通过控制 eDNA 释放对菌膜结构的形成起到重要作用。然而在铜绿假单胞菌菌株 PA14 中,仅 Las 系统对于菌膜的形成较为重要,该系统通过控制 PEL 胞外多糖的产生调控菌膜形成^[16]。

革兰氏阳性细菌通常使用更加复杂的群体感应系统。它以修饰过的寡聚肽作为自诱导物,然后进入双组分信号转录路径。与 AHL 不同,菌膜上的相关受体能够直接识别该寡聚肽。然后受体的识别过程又进一步通过磷酸化作用激活感应调控蛋白,最终激活靶标基因的表达^[41]。在金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)中,其自诱导物来自 *agrD* 基因产生的小分子肽 AIP。该小分子肽被加工并成为含有硫代内酯环的环形肽。AIP 通过 AgrC 分泌,同时被其感应,这一过程进一步激活了转录调控因子 AgrA。AgrA 可以正调控编码胞外蛋白酶合成的多个基因,从而引起菌膜的分解^[42]。金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)中,双组分系统负调控菌膜的形成。该菌膜的形成包括几个连续的阶段,如初始的细胞聚集,细胞间的粘附、成熟和最终解体^[43]。粘附到物体表面是该菌从浮游细胞过渡到菌膜的初始步骤。只有群集感应系统 *agr* 基因被抑制时这个步骤才能完成。一旦细菌粘附到某个表面,细菌就开始聚集并产生胞外多糖 PNAG 或 PIA,形成复杂的结构。正常情况下,细胞一般都会从成熟的菌膜上脱离并继续扩散,但是当 *agr* 基因缺失时,细菌的菌膜将较野生菌变得更厚,并丧失从成熟的菌膜上分离的能力。

3.2 C-di-GMP

C-di-GMP 是细菌中重要的次级信使之一,它参与多种细菌群体行为的基因调控,包括致病性、细胞周期和分化、EPS 合成、菌体聚集和菌膜的形成等^[44]。在细胞内,这种分子由两种酶共同调控:

具有 GGDEF 结构域的二鸟苷酸环化酶(DGCS, 合成 C-di-GMP)和有 EAL 或 HD-GYP 结构域的磷酸二酯酶(PDE, 降解 C-di-GMP)。DGCS 和 PDE 的共同作用使细胞内的 C-di-GMP 达到动态平衡, 以增加或降低 C-di-GMP 的浓度来调控细菌群体行为^[45]。C-di-GMP 信号能够在多种细菌中调节菌膜的形成。根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)中, 提高胞内 C-di-GMP 浓度能够激活单极多糖粘附素的合成, 促进菌膜的形成^[46]。达旦提狄克氏菌(*Dickeya dadantii*) PDE 基因 *epcB* 和 *epcC* 缺失型突变株的菌膜形成速度和大小明显增加, 也说明 C-di-GMP 对菌膜形成具有正向调控作用^[47]。

3.3 sRNA

调节小 RNA (Small RNA, sRNA)是一类长度为 5–500 nt 非编码 RNA, 它通过不完全配对调节目标 mRNA 的转录。大部分与 mRNA 结合的 sRNA 都由 *tran* 基因编码, 它们与目标 mRNA 的 5'-UTR (5'-非编码区)或 ORF (开放式阅读框)结合, 阻塞 mRNA 上的 SD 序列, 干扰 mRNA 与核糖体结合或促进 RNaseE 降解目标 mRNA^[48]。sRNA 的正向调控主要是抑制 mRNA 形成二级结构, 这能够重排 5'-UTR 结构并促进核糖体的结合。大部分的 sRNA 都需要 RNA 结合蛋白 Hfq 因子, 它能够影响 sRNA 与 mRNA 互动时的效率和稳定性^[49-50]。与转录激活蛋白相比, sRNA 能够更有效地进行转录后调控。因此 sRNA 能够使细菌对环境变化有更快的反应^[51]。

近几年的研究表明, 一些 sRNA 对细菌形成菌膜有一定影响。霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)中 sRNA VqmR 位于 *VqmA* 基因上游, VqmR 至少控制 8 个 mRNA, 其中包括 *rtx* 致病基因和菌膜合成相关基因 *vspT*。在霍乱弧菌(*V. cholerae*)中过表达 sRNA VqmR 则强烈抑制该菌形成菌膜^[52]。梨火疫病菌(*Erwinia amylovory*)中 sRNA ArcZ 能够正向调节 III 型分泌系统、胞外多糖的合成以及细菌运动性, 从而进一步影响细菌粘性及菌膜的形成^[53]。RsmA (CsrA)是 RNA 结合调控蛋白, 能够结合到目标 mRNA 上以稳定或阻碍 mRNA 的翻译^[54]。RNA 结

合蛋白 CsrA 通过激活 FlhDC 表达并下调菌膜形成相关基因 *pga* 的表达。大肠杆菌进入稳定期后会产生 sRNA CsrB/CsrC, 它们的主要作用是抑制 CsrA 蛋白的产生。CsrB/CsrC 可能还促进鞭毛形成及 PGA 的形成, 这些都与菌膜形成有直接联系^[54-55]。

4 菌膜与植物

微生物可分为致病菌和促生菌两类, 它们能够在植物不同组织中定殖, 包括种子、维管组织、根、茎、叶等。对于某些细菌, 形成菌膜是它们实现定殖的关键策略^[56-57]。形成菌膜能够为细菌带来多种生存优势, 如提高细菌环境耐受性、增强拮抗能力以及防止被原生动植物吞食等。高密度细菌群体具有多种单个细菌无法有效完成的功能。例如, 菌膜与单个菌体相比, 能够分泌更多的代谢物或胞外酶。另外, 细菌定殖于植物寄主上时, 只有达到一定的群体规模才可能达到促生或致病效果。

4.1 植物致病菌与菌膜

植物病原菌如铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)、青枯病菌(*P. solanacearum*)和软腐果胶杆菌(*Pectobacterium carotovorum*)等能够在植物表面或组织里形成菌膜, 使植物产生溃疡、腐烂和萎蔫等病害。有证据表明细菌在植株上形成规则的菌膜, 不仅能够帮助病原菌获取营养物质, 还能够帮助细菌抵抗宿主中各种应激环境, 获得生存优势并发挥其致病性^[58]。对致病菌来说, 粘附到宿主表面之后, 病原菌需要不断地积聚增强侵染毒力以更好地保护自身免受寄主免疫反应的杀灭。铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)在侵染植物木质部组织时, 首先粘附到木质部内壁, 而后聚集并形成成熟的菌膜堵塞木质部导管^[59], 最终造成植物整体萎蔫死亡。

一些研究表明菌膜的形成与寄主植物免疫反应或植物信号有关, 细菌利用植物免疫反应因子和信号分子触发菌膜形成的相关基因表达。软腐果胶杆菌能够在土豆的木质部形成菌膜类似结构^[60]。拟南芥(*A. thaliana*)突变株在根部产生高浓度的水杨酸能够触发系统防御反应, 表现出降低铜绿假单胞

菌(*P. aeruginosa*) PA14 定殖和形成菌膜的能力^[61]。Mori 等在研究青枯病菌(*P. solanacearum*)侵染西红柿(*Lycopersicon esculentum* Mill)时发现该菌在西红柿表皮细胞上形成的伞状菌膜是该菌发挥其毒力的关键群体行为^[5]。这些说明细菌形成菌膜对于防范植物免疫反应起到重要作用。

4.2 植物促生菌与菌膜

细菌形成菌膜也可对植物产生促生作用。促生菌可分泌多种代谢产物帮助植物抵抗其他致病微生物和线虫病害,从而促进植物生长。多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)具有广泛的寄主,它在拟南芥根尖形成的菌膜能够诱导提高拟南芥抗旱能力,合成多种抗菌物质帮助宿主抵抗病原微生物^[62]。恶臭假单胞菌(*P. putida*)同时具有植物促生和生物修复的潜力,它能够利用植物根际分泌物及自身趋化性快速在植物根部形成菌膜,促进植物利用土壤中的不溶养分、螯合金属并抑制其他假单胞菌属致病菌的生长^[63]。

植物与某些促生菌共生时存在相互促进的关系。玉米根系分泌物能够刺激并促进解淀粉芽孢杆菌 SQR9 *tapA-sipW-tasA* 操纵子的表达,帮助 SQR9 菌株定殖和形成菌膜^[64]。解淀粉芽孢杆菌 FZB42 中的 *degU*、*nfrA* 和 *RBAM_017141* 基因突变株都能影响细菌的群游现象和菌膜的形成,而且有明确的证据显示 *nfrA* 和 *RBAM_017141* 参与植物的互作^[65]。解淀粉芽孢杆菌 FZB42 菌株与玉米根部互作时,游动性基因(*flm*、*hag*、*flip* 和 *flgM*)和趋化性基因(*cheC*、*cheD*)等都有一定的变化,说明玉米根部分泌的物质能够吸引该菌。*luxS* 参与群体信号自诱导物合成,*ymcA* 和菌膜形成有直接关系。这些基因表达的变化,说明玉米根部诱导物能够促进该菌形成菌膜^[66-67]。枯草芽孢杆菌在定殖于拟南芥(*A. thaliana*)时会产生脂肽类抗菌物质,此类物质不仅是该菌形成菌膜的必要条件,而且还对一般微生物病害产生较强的抑制作用。在拟南芥与枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)互作过程中,拟南芥会分泌一些小分子物质。如细菌性斑点病侵染拟南芥时,拟南芥会

在根部分泌苹果酸来增强枯草芽孢杆菌形成菌膜的能力^[7],以此抵抗细菌病害的进一步扩张。

5 结语

细菌形成菌膜能够使其获得免遭原生动捕食、增强抗逆性、抗菌素耐受性和增加养分的循环利用等生存优势。利用上述特点,菌膜能够同时为植物促生菌和病原菌提供更大的生存和发展空间。现在已经证实细菌细胞表面的 EPS、eDNA、信号因子和酶等物质使细菌在植物组织表面聚集和形成菌膜的过程中发挥重要作用。EPS 分子是由多种生物多糖组成,这就赋予了不同多糖的不同物理特性。现在未能清晰阐述的是:细菌如何调控不同种类的多糖组成,以获取营养物质、传递信号,各种组分是如何进行协同合作?细菌通过感应细胞外环境中的信号分子来激活这些机制和级联反应,虽然有一部分信号因子已被进行了功能验证,但在菌膜形成时所涉及的多种分子调控机制和级联反应仍未完全了解。另外,植物与细菌互作时植物如何产生信号分子刺激细菌形成菌膜,从而进一步导致促生或致病的机制也尚属未知。现在对菌膜的研究主要针对单一细菌进行研究,仅有少数文献阐述了不同微生物协作形成的菌膜群落^[68],这也是将来一个重要的研究方向。

参 考 文 献

- [1] Gjermansen M, Nilsson M, Yang L, et al. Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms: genetic elements and molecular mechanisms[J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 75(4): 815-826
- [2] Paredes J, Alonso-Arce M, Schmidt C, et al. Smart central venous port for early detection of bacterial biofilm related infections[J]. *Biomedical Microdevices*, 2014, 16(3): 365-374
- [3] van Houdt R, Michiels CW. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109(4): 1117-1131
- [4] Rinaudi LV, Giordano W. An integrated view of biofilm formation in rhizobia[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2010, 304(1): 1-11
- [5] Mori Y, Inoue K, Ikeda K, et al. The vascular plant-pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum* produces biofilms required for its virulence on the surfaces of tomato cells adjacent to intercellular spaces[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2016, 17(6): 890-902
- [6] Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(9): 623-633
- [7] Vlamakis H, Chai Y, Beaugard P, et al. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11(3): 157-168

- [8] Sorroche FG, Rinaudi LV, Zorreguieta A, et al. EPS II-dependent autoaggregation of *Sinorhizobium meliloti* planktonic cells[J]. Current Microbiology, 2010, 61(5): 465-470
- [9] Beauregard PB, Chai Y, Vlamakis H, et al. *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(17): E1621-E1630
- [10] Neu TR, Lawrence JR. Innovative techniques, sensors, and approaches for imaging biofilms at different scales[J]. Trends in Microbiology, 2015, 23(4): 233-242
- [11] Fan B, Borriss R, Bleiss W, et al. Gram-positive rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 colonizes three types of plants in different patterns[J]. The Journal of Microbiology, 2012, 50(1): 38-44
- [12] Billings N, Birjiniuk A, Samad TS, et al. Material properties of biofilms—a review of methods for understanding permeability and mechanics[J]. Reports on Progress in Physics, 2015, 78(3): 036601
- [13] Battin TJ, Besemer K, Bengtsson MM, et al. The ecology and biogeochemistry of stream biofilms[J]. Nature Reviews Microbiology, 2016, 14(4): 251-263
- [14] Seper A, Fengler VHI, Roier S, et al. Extracellular nucleases and extracellular DNA play important roles in *Vibrio cholerae* biofilm formation[J]. Molecular Microbiology, 2011, 82(4): 1015-1037
- [15] Ramos I, Dietrich LEP, Price-Whelan A, et al. Phenazines affect biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* in similar ways at various scales[J]. Research in Microbiology, 2010, 161(3): 187-191
- [16] Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, et al. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms[J]. Molecular Microbiology, 2006, 59(4): 1114-1128
- [17] Zafra O, Lamprecht-Grandío M, de Figueras CG, et al. Extracellular DNA release by undomesticated *Bacillus subtilis* is regulated by early competence[J]. PLoS One, 2012, 7(11): e48716
- [18] Gödeke J, Paul K, Lassak J, et al. Phage-induced lysis enhances biofilm formation in *Shewanella oneidensis* MR-1[J]. The ISME Journal, 2011, 5(4): 613-626
- [19] Dominiak DM, Nielsen JL, Nielsen PH. Extracellular DNA is abundant and important for microcolony strength in mixed microbial biofilms[J]. Environmental Microbiology, 2011, 13(3): 710-721
- [20] Vilain S, Pretorius JM, Theron J, et al. DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(9): 2861-2868
- [21] Harmsen M, Lappann M, Knöchel S, et al. Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(7): 2271-2279
- [22] Mann EE, Rice KC, Boles BR, et al. Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation[J]. PLoS One, 2009, 4(6): e5822
- [23] Das T, Krom BP, van der Mei HC, et al. DNA-mediated bacterial aggregation is dictated by acid-base interactions[J]. Soft Matter, 2011, 7(6): 2927-2935
- [24] Yang L, Barken KB, Skindersoe ME, et al. Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microbiology, 2007, 153(5): 1318-1328
- [25] Thomas CM, Nielsen KM. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria[J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3(9): 711-721
- [26] Vlassov VV, Laktionov PP, Rykova EY. Extracellular nucleic acids[J]. Bioessays, 2007, 29(7): 654-667
- [27] van Schaik EJ, Giltner CL, Audette GF, et al. DNA binding: a novel function of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(4): 1455-1464
- [28] Guttenplan SB, Blair KM, Kearns DB. The EpsE flagellar clutch is bifunctional and synergizes with EPS biosynthesis to *Promote bacillus subtilis* biofilm formation[J]. PLoS Genetics, 2009, 6(12): 267-276
- [29] Bahlawane C, McIntosh M, Krol E, et al. *Sinorhizobium meliloti* regulator MucR couples exopolysaccharide synthesis and motility[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2008, 21(11): 1498-1509
- [30] Zhao X, Wang Y, Shang QH, et al. Collagen-like proteins (ClpA, ClpB, ClpC, and ClpD) are required for biofilm formation and adhesion to plant roots by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42[J]. PLoS One, 2015, 10(2): 1-16
- [31] Tamir-Ariel D, Rosenberg T, Navon N, et al. A secreted lipolytic enzyme from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is expressed in planta and contributes to its virulence[J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(6): 556-567
- [32] Lasa I, Penadés JR. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation[J]. Research in Microbiology, 2006, 157(2): 99-107
- [33] Romero D, Vlamakis H, Losick R, et al. An accessory protein required for anchoring and assembly of amyloid fibres in *B. subtilis* biofilms[J]. Molecular Microbiology, 2011, 80(5): 1155-1168
- [34] Lynch DJ, Fountain TL, Mazurkiewicz JE, et al. Glucan-binding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture[J]. FEMS Microbiology Letters, 2007, 268(2): 158-165
- [35] Serra DO, Richter AM, Hengge R. Cellulose as an architectural element in spatially structured *Escherichia coli* biofilms[J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(24): 5540-5554
- [36] Diggle SP, Stacey RE, Dodd C, et al. The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(6): 1095-1104
- [37] Mora P, Rosconi F, Fraguas LF, et al. *Azospirillum brasilense* Sp7 produces an outer-membrane lectin that specifically binds to surface-exposed extracellular polysaccharide produced by the bacterium[J]. Archives of Microbiology, 2008, 189(5): 519-524
- [38] Dueholm MS, Søndergaard MT, Nilsson M, et al. Expression of Fap amyloids in *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, and *P. putida* results in aggregation and increased biofilm formation[J]. Microbiology Open, 2013, 2(3): 365-382
- [39] Jennings LK, Storek KM, Ledvina HE, et al. Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(36): 11353-11358
- [40] de Kievit TR. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. Environmental Microbiology, 2009, 11(2): 279-288
- [41] Novick RP, Geisinger E. Quorum sensing in staphylococci[J]. Annual Review of Genetics, 2008, 42(1): 541-564
- [42] O'Gara JP. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2007, 270(2): 179-188
- [43] Le KY, Otto M. Quorum-sensing regulation in staphylococci—an overview[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 1174
- [44] Ryan RP. Cyclic di-GMP signalling and the regulation of bacterial virulence[J]. Microbiology, 2013, 159(7): 1286-1297
- [45] Boyd CD, O'Toole GA. Second messenger regulation of biofilm formation: breakthroughs in understanding c-di-GMP effector systems[J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2012, 28(1): 439-462
- [46] Xu J, Kim J, Koestler BJ, et al. Genetic analysis of *Agrobacterium tumefaciens* unipolar polysaccharide production reveals complex integrated control of the motile-to-sessile switch[J]. Molecular Microbiology, 2013, 89(5): 929-948
- [47] Yi X, Yamazaki A, Biddle E, et al. Genetic analysis of two phosphodiesterases reveals cyclic diguanylate regulation of virulence factors in *Dickeya dadantii*[J]. Molecular Microbiology, 2010, 77(3): 787-800
- [48] Storz G, Vogel J, Wassarman KM. Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers[J]. Molecular Cell, 2011, 43(6):

- 880-891
- [49] Vogel J, Luisi BF. Hfq and its constellation of RNA[J]. Nature Reviews Microbiology, 2011, 9(8): 578-589
- [50] Fan B, Chen S, Li YL. Structure, function and mechanisms of bacterial protein Hfq[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science Edition), 2016, 40(5): 155-162 (in Chinese)
樊奔, 陈晟, 李昱龙. 细菌 Hfq 蛋白的结构、功能及作用机制[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2016, 40(5): 155-162
- [51] Harfouche L, Haichar FEZ, Achouak W. Small regulatory RNAs and the fine-tuning of plant-bacteria interactions[J]. New Phytologist, 2015, 206(1): 98-106
- [52] Papenfort K, Förstner KU, Cong JP, et al. Differential RNA-seq of *Vibrio cholerae* identifies the VqmR small RNA as a regulator of biofilm formation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(7): E766-E775
- [53] Zeng Q, Sundin GW. Genome-wide identification of Hfq-regulated small RNAs in the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* discovered small RNAs with virulence regulatory function[J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 414
- [54] Romeo T, Vakulskas CA, Babitzke P. Post-transcriptional regulation on a global scale: form and function of Csr/Rsm systems[J]. Environmental Microbiology, 2013, 15(2): 313-324
- [55] Jonas K, Edwards AN, Ahmad I, et al. Complex regulatory network encompassing the Csr, c-di-GMP and motility systems of *Salmonella typhimurium*[J]. Environmental Microbiology, 2010, 12(2): 524-540
- [56] Fan B, Chen XH, Budiharjo A, et al. Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, engineered to express green fluorescent protein[J]. Journal of Biotechnology, 2011, 151(4): 303-311
- [57] Dietel K, Beator B, Budiharjo A, et al. Bacterial traits involved in colonization of *Arabidopsis thaliana* roots by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42[J]. The Plant Pathology Journal, 2013, 29(1): 59-66
- [58] Zhang WP, Sun J, Ding W, et al. Extracellular matrix-associated proteins form an integral and dynamic system during *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2015, 5: 40
- [59] Koczan JM, Lenneman BR, McGrath MJ, et al. Cell surface attachment structures contribute to biofilm formation and xylem colonization by *Erwinia amylovora*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(19): 7031-7039
- [60] Kubheka GC, Coutinho TA, Moleleki N, et al. Colonization patterns of an mCherry-tagged *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* strain in potato plants[J]. Phytopathology, 2013, 103(12): 1268-1279
- [61] Prithiviraj B, Bais H, Weir T, et al. Down regulation of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* by salicylic acid attenuates its virulence on *Arabidopsis thaliana* and *Caenorhabditis elegans*[J]. Infection and Immunity, 2005, 73(9): 5319-5328
- [62] Wang LQ, Wang QY, Liao MD. The progress of biological properties and mechanisms of *Paenibacillus polymyxa*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29(11): 158-163 (in Chinese)
王刘庆, 王秋影, 廖美德. 多粘类芽孢杆菌生物特性及其机理研究进展[J]. 中国农学通报, 2013, 29(11): 158-163
- [63] Pizarro-Tobías P, Udaondo Z, Roca A, et al. Events in root colonization by *Pseudomonas putida*[A]/Ramos JL, Goldberg JB, Filloux A. *Pseudomonas*[M]. Netherlands: Springer, 2015: 251-286
- [64] Zhang N, Yang DQ, Wang DD, et al. Whole transcriptomic analysis of the plant-beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 during enhanced biofilm formation regulated by maize root exudates[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 685
- [65] Budiharjo A, Chowdhury SP, Dietel K, et al. Transposon mutagenesis of the plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* FZB42 revealed that the *nfrA* and *RBAM17410* genes are involved in plant-microbe-interactions[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e98267
- [66] Fan B, Carvalhais LC, Becker A, et al. Transcriptomic profiling of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in response to maize root exudates[J]. BMC Microbiology, 2012, 12(1): 116
- [67] Fan B, Li L, Chao YJ, et al. dRNA-Seq reveals genomewide TSSs and noncoding RNAs of plant beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42[J]. PLoS One, 2015, 10(11): e0142002
- [68] Lee KWK, Periasamy S, Mukherjee M, et al. Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community biofilm[J]. The ISME Journal, 2014, 8(4): 894-907