



研究报告

菲降解菌 *Pseudomonas* sp. JM2-gfp 细胞特性对生物膜形成能力的影响及其在植物根表的定殖

高晓蓉* 朱丽晖 周玉嫚

大连理工大学生物工程学院 辽宁 大连 116024

摘要:【背景】多环芳烃是农田土壤中的主要有机污染物,可通过作物根系进入食物链威胁人类健康。采用高效降解菌在植物根际形成生物膜是一种经济可行的生态阻控策略,而细菌细胞特性是影响其表面粘附并进行初始成膜的关键。【目的】探究菲高效降解菌 *Pseudomonas* sp. JM2-gfp 的细胞特性对自聚集成膜过程的影响,观察其在小麦根表定殖成膜情况,为在土壤-根际系统中构建阻控屏障提供理论依据。【方法】采用培养皿培养、结晶紫染色、接触角测量(Contact Angle Measurement, CAM)及定量方法测定 JM2-gfp 菌株细胞特性,采用植物液体培养法形成生物膜,采用激光共聚焦显微镜(Confocal Laser Scanning Microscope, CLSM)、扫描电子显微镜(Scanning Electron Microscope, SEM)观察和分析生物膜的结构特征。【结果】菌株 *Pseudomonas* sp. JM2-gfp 生有鞭毛结构及疏水性细胞壁,并具备较强的运动能力、初始粘附率和自聚集能力。JM2-gfp 菌株具有良好的成膜及降解能力,48 h 菲降解效率是浮游态菌株的 2.5 倍。成膜过程呈现明显的周期性变化,2 d 时生物膜量达最大值。2 d 内生物膜厚度约为 32.8 μm ,生物膜上分泌多种胞外基质物质(Extracellular Polymeric Substances, EPS),其中碳水化合物和蛋白质含量分别为 74.68 $\mu\text{g/mL}$ 和 211.9 $\mu\text{g/mL}$ 。小麦根系与菌株共培养 4 d 后, JM2-gfp 菌株可在根表形成稳定的生物膜,并进一步定殖到根和茎、叶组织内部。【结论】菲胁迫下, *Pseudomonas* sp. JM2-gfp 降解菌易于在载体表面附着聚集成生物膜,降解能力也随之增强,其在植物根表定殖成膜的结果为阻控土壤有机污染物进入作物体内提供了一种新的技术策略。

关键词: 菲降解菌, 细胞特性, 生物膜, 根表, 定殖

Effect of characteristics of phenanthrene-degrading bacteria *Pseudomonas* sp. JM2-gfp on biofilm formation and its colonization on plant root surface

GAO Xiaorong* ZHU Lihui ZHOU Yuman

School of Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116024, China

Abstract: [Background] Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) accumulated in agricultural soils are threatening human health and ecosystem via food chain. The strategy to impede PAHs entrance by biofilm

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (21876017)

*Corresponding author: Tel: 86-411-84706316; E-mail: biogaorx@dlut.edu.cn

Received: 02-02-2021; Accepted: 09-04-2021; Published online: 18-05-2021

基金项目: 国家自然科学基金(21876017)

*通信作者: Tel: 0411-84706316; E-mail: biogaorx@dlut.edu.cn

收稿日期: 2021-02-02; 接受日期: 2021-04-09; 网络首发日期: 2021-05-18

formation of degrading bacteria on the root surface is economically feasible. Bacteria cell properties are the key factors determining its adhesion and initial formation of the biofilm. **[Objective]** Our study aims to investigate the biofilm formation process and identify the features of a phenanthrene degrading bacterium *Pseudomonas* sp. JM2-gfp influencing on the cell adhesion and the biofilm formation, to observe its colonization on the wheat root surface, and finally to provide references for building a control barrier in the soil-rhizosphere system. **[Methods]** Methods of petri dish culture observation, crystal violet stain, and contact angle assay were used to determine the cell characteristics of JM2-gfp. Hydroponic culture of plant was used to generate the biofilm formation. The structural features of the biofilm were observed and analyzed by a confocal laser scanning microscope (CLSM) and scanning electron microscope (SEM). **[Results]** The strain *Pseudomonas* sp. JM2-gfp has a flagella structure and hydrophobic cell wall, as well as strong motility, initial adhesion, self-aggregation ability. It showed good biofilm-forming abilities and phenanthrene-degrading performance. Compared with planktonic bacteria, our biofilms can degrade phenanthrene within 48 hours by 2.5 times. The film formation process presented obvious periodic changes, and the amount of the biofilm reached the maximum at the second day. The thickness of the biofilm within 2 days was about 32.8 μm , and a variety of extracellular polymeric substances (EPS) were secreted on the biofilm, containing carbohydrate at the concentration of 74.68 $\mu\text{g/mL}$ and protein 211.9 $\mu\text{g/mL}$, respectively. After 4 days of co-cultivation of wheat roots and JM2-gfp, a stable biofilm was formed by JM2-gfp on the root surface, and further colonized the roots, stems and leaf tissues. **[Conclusion]** The phenanthrene degrading bacterium *Pseudomonas* sp. JM2-gfp can form stable biofilms and enhance its degradation abilities. The formation of biofilm on the root surface provides an alternative approach in future applications to prevent organic pollutants entering into the crops.

Keywords: phenanthrene-degrading bacteria, cell characteristics, biofilm, root surface, colonization

多环芳烃(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs)是一类环境中普遍存在的持久性有机污染物,具有致癌、致畸、致突变特性,近年来已发展成为我国农田土壤的主要有机污染物^[1]。诸多证据表明,土壤中的PAHs可通过作物根系进入食物链逐级放大并最终威胁人类健康^[2]。相较于物理和化学修复方法所存在的成本高、容易造成二次污染等问题,低成本、环境友好且降解彻底的微生物修复被认为是去除土壤PAHs的有效手段^[3]。然而,实验室筛选出的许多优良降解菌株由于面临土壤环境中的各种生物及非生物胁迫,导致难以生存并发挥作用^[4]。生物膜结构是自然条件下大多数细菌在物体表面的存在形式,这种群体优势每年都会导致医药和工业等领域出现数十亿美元的设备损坏、产品污染、医疗感染等问题^[5-7],然而生物膜在作物保护、工业废水处理等领域实现有机污染物的降解和迁移阻控中发挥了重要作用^[8]。例如,很多细菌会在植物根表自然成膜,以提高其在根际土壤中的生物量和存活时间^[9],目前已在生物修复中逐渐应

用^[10]。然而,PAHs降解菌在作物根际的成膜特性和降解能力稳定性尚不明确,对其成膜机制的深入研究具有非常重要的意义。

生物膜的发育是一个连续的过程,细菌的自身特性、物体表面特性及环境条件是生物膜形成的决定因素^[11]。生物膜形成的关键步骤是细菌在物体表面的初始粘附,而细菌的表面疏水性以及鞭毛、纤毛等附属结构都会影响其在材料表面的附着^[12]。据报道,鞭毛介导的泳动和群集运动对于生物膜发育的各个阶段都是必不可少的,如附着、形成微菌落和分散等^[13-14],而细胞表面疏水性的增加促进了细菌对物体表面的初始附着。有研究表明,暴露于短波灭菌紫外线(Ultraviolet C, UVC)亚致死剂量下,铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)增加了细胞疏水性及生物膜形成能力^[15]。白色念珠菌(*Candida albicans*)形成生物膜期间,细胞表面疏水性基因的表达量增加,表明其表面疏水性与生物膜的形成显著相关^[16]。细胞表面疏水性通常与细菌粘附性相关,菌株类型、培养基成分、培养时间

以及外界的环境条件(pH、温度、流体剪切力)也会影响细胞的附着及成膜行为^[17-19]。

目前对于生物活性界面成膜的研究主要集中在人体器官表面(包括牙齿),但是对于根表面成膜的研究较少。本论文以实验室分离鉴定的高效非降解菌 *Pseudomonas* sp. JM2-gfp 为研究对象^[20],探究该菌株的运动特征、初始粘附能力、细菌自动聚集能力、细胞壁疏水性等细胞特性,明确其成膜能力、成膜过程及组成特征,阐明细菌细胞学特性对生物膜形成能力的影响,进而又在小麦根表探究其成膜能力,以期为在实际污染农田中开展降解菌生物膜的阻控应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 菌株和植物材料

降解菌 *Pseudomonas* sp. JM2-gfp 为本实验室从有机污染工业区土壤中以菲为唯一碳源筛选驯化、基因构建保存的高效降解菌株;降解菌 *Pseudomonas* sp. JPYR-1 为同一污染地筛选驯化、保存的茚高效降解菌株; *Paeruginosa* sp. PAL 由大连理工大学徐永平教授课题组提供。

小麦种子(丰强 7),由吉林省农业科学研究院提供。

1.2 主要试剂和仪器

酵母膏、蛋白胨、20% PBS 缓冲溶液、1%结晶紫染色液、葡聚糖、Brandford,北京索莱宝科技有限公司;苯酚、戊二醛,天津市大茂化学试剂厂;菲,天津希恩思生化科技有限公司;甲醇(色谱纯)、正己烷,北京百灵威科技有限公司。

透射电子显微镜,Hitachi 公司;高效液相色谱仪,Agilent 公司;场发射扫描电镜,日本株式会社公司;接触角测量仪,KRüSS 公司;傅里叶红外光谱仪,Thermo 公司;激光共聚焦显微镜,Olympus 公司。

1.3 细胞运动特征测定

(1) 形态特征的观察

2.5%戊二醛溶液固定 JM2-gfp 菌体 1 h, PBS

缓冲液漂洗 3-5 次、重悬。取 8 μ L 菌液滴至铜网上,静置,干燥,用无菌水多次洗涤铜网后,滴加 0.5% 磷钨酸,滤纸吸干,置于透射电子显微镜下观察。

(2) 群集性和泳动性测定

JM2-gfp 菌株在含有 1.5%琼脂的 LB 固体培养基上进行划线培养。分别配制含有 0.3%琼脂和 0.7%琼脂的 LB 固体培养基,用于测定细胞的泳动性和群集性。无菌牙签挑取单菌落接种在平板中心,干燥 30 min 后,置于 30 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 12 h^[21]。

1.4 细胞初始粘附能力测定

将 JM2-gfp 菌株接种到 LB 液体培养基中,30 $^{\circ}$ C、170 r/min 培养 12-16 h(下同)。菌液用 PBS 缓冲液稀释至 OD_{600} 为 0.1,取 2 mL 加入聚苯乙烯培养皿中,30 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。用 PBS 缓冲液洗去未附着的菌体,粘附细胞用 1%结晶紫染液染色,在光学显微镜下定量统计,结果以粘附细胞占细胞总数的百分比表示。

1.5 细胞自聚集能力测定

取 50 mL 培养的 JM2-gfp 菌液,5 000 r/min 离心 10 min,弃上清,PBS 缓冲液重悬菌体。向玻璃管(10 mm \times 70 mm)中加入 3 mL 菌悬液,室温条件下静置 24 h。将 200 μ L 菌悬液加到 96 孔板中,测量 OD_{600} 。自动聚集百分比($A\%$)按照 Mangwani 等^[22]的方法计算。

1.6 细胞壁疏水性测定

(1) 微生物黏着碳烃化合物法(Microbial Adhesion to Hydrocarbons, MATH)

将 4 mL 菌悬液($OD_{600}=1.0$)转移到酸处理后的玻璃试管($d=10$ mm)中,加入 1.5 mL 二甲苯溶液作为有机相,涡旋混匀后,静置。待分层后测定下层水相的 A_f 值(波长为 600 nm),对照组 A_i 不加有机相,样品设置 3 个重复。细胞表面疏水率($\%$)= $(A_i-A_f)\times 100/A_i$ 。疏水性评定^[23]: 67%-100%为高疏水性; 33%-67%为中度疏水; 0-33%为亲水。

(2) 接触角测量法(Contact Angle Measurement, CAM)

JM2-gfp 菌液 5 000 r/min 离心 10 min,用 PBS

缓冲液重悬菌体至 OD_{600} 为 1.0, 随后用孔径为 $0.45\ \mu\text{m}$ 的硝酸纤维素膜过滤。将滤膜置于 LB 固体培养基上, 滤纸吸干后, 用接触角测量仪进行测定^[24]。

1.7 成膜能力测定

将 JM2-gfp 菌液用 LB 培养基以 1:100 比例稀释, 取 200 μL 菌液加入 96 孔培养板中, $30\ ^\circ\text{C}$ 培养 1–4 d, 用 PBS 缓冲液轻轻洗去浮游细菌, 待自然风干后再用 0.1% 结晶紫染液 (100 μL) 染色 30 min。PBS 缓冲液冲洗去掉浮色, 风干后加入 200 μL 95% 乙醇, 待结晶紫完全溶解后, 测定 595 nm 吸光值 (A_s), 以 LB 培养基为对照 (A_c)。细菌形成生物膜能力评定^[25]: $A_s \leq A_c$ 为无生物膜生产者; $A_c < A_s \leq (2 \times A_c)$ 为低生物膜生产者; $(2 \times A_c) < A_s \leq (4 \times A_c)$ 为中等生物膜生产者; $(4 \times A_c) < A_s$ 为强生物膜生产者。

1.8 生物膜形态观察

(1) 激光共聚焦显微镜 (Confocal Laser Scanning Microscope, CLSM) 观察

JM2-gfp 菌株在 LB 培养基中培养过夜, 用 LB 培养基以 1:100 的比例稀释, 取 3 mL 在聚苯乙烯培养皿中 $30\ ^\circ\text{C}$ 培养 2 d。PBS 缓冲液洗去浮游细菌后, 在 2.5% 戊二醛溶液中至少固定 4 h, 用于 CLSM 观察。

(2) 扫描电子显微镜 (Scanning Electron Microscope, SEM) 观察

将 $1\ \text{cm} \times 1\ \text{cm}$ 载玻片置于 JM2-gfp 菌液中静置 48 h 培养生物膜。用 PBS 缓冲液洗涤载玻片, 2.5% 戊二醛溶液固定 4 h 以上, 逐步在浓度为 30%、50%、70%、90%、95% 的乙醇溶液中脱水, 每次脱水时间为 20 min, 最后用 100% 酒精脱水 2 次。对载玻片喷金处理后用于 SEM 观察^[26]。

1.9 细胞外基质 (Extracellular Polymeric Substances, EPS) 含量及生物膜降解能力测定

JM2-gfp 菌液与 LB 培养基 1:100 比例混合后, 加入装有灭菌玻璃珠 ($2\ \text{mm} \times 2\ \text{mm}$) 的烧瓶中。 $30\ ^\circ\text{C}$ 静置孵育 48 h。PBS 轻洗、温和涡旋将生物

膜从玻璃珠分离。

(1) EPS 含量

取 5 mL 生物膜样品于 $4\ ^\circ\text{C}$ 、 $6\ 500 \times g$ 离心 10 min, 上清液与双倍体积的 90% 预冷乙醇混合, $4\ ^\circ\text{C}$ 静置 18 h。 $4\ ^\circ\text{C}$ 、 $10\ 050 \times g$ 离心 10 min, 收集沉淀, $60\ ^\circ\text{C}$ 干燥备用^[27]。干燥物与 KBr 粉末以 1:100 比例混匀, 傅立叶变换红外 (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) 光谱仪测量官能团组成。Bradford 和苯酚硫酸法估算 EPS 总蛋白和碳水化合物含量^[27]。

(2) 生物膜降解能力测定

5 mL 生物膜样品加入同体积无机盐培养基 (含 50 mg/L 菲), $30\ ^\circ\text{C}$ 黑暗孵育 7 d, 添加等体积正己烷萃取有机相, 高效液相色谱法 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 测定残留的菲。浮游细菌浓度调节至与生物膜内细菌浓度相当为对照^[28]。

HPLC 检测条件: 色谱柱: C18, $4.6\ \text{mm} \times 250\ \text{mm} \times 5\ \mu\text{m}$; 柱温: $25\ ^\circ\text{C}$; 进样量: 10 μL ; 检测时间: 10 min; 流动相: 甲醇: 水 (85:15, 体积比); 流速: 1 mL/min。

1.10 小麦根表菲降解菌生物膜的构建

(1) 小麦幼苗培养

萌发的小麦种子移栽到 1/2 Hoagland 营养液中, 每个烧杯种植 16 株小麦, 置于光照培养箱中培养 15 d (16 h 光照/8 h 黑暗, $25 \pm 3\ ^\circ\text{C}$)。每天补充营养液, 轮流交换烧杯位置。

(2) 生物膜构建及形态观察

将小麦幼苗转移到含有 JM2-gfp 菌悬液 (OD_{600} 为 1.5) 的 1/2 Hoagland 营养液中, 根部完全浸泡, 1–7 d 每天随机选取小麦根部, 用 pH 7.0 的 10 mmol/L PBS 清洗后, 浸泡在 4% 的多聚甲醛溶液中 $4\ ^\circ\text{C}$ 固定^[29], 制成临时玻片。利用激光共聚焦显微镜, 分别在 40、600 倍镜下观察成膜情况 (激发波长 488 nm, 发射波长 515–535 nm)。未浸菌悬

液培养的小麦幼苗根部作为对照。

(3) 小麦体内菲降解菌菌量的统计

无菌水冲洗去除小麦根表上的浮游细菌，滤纸吸干、称重，再将其放置于含有 5 mL 无菌水的离心管中，充分涡旋振荡，获得根表面生物膜的菌悬液。无菌水清洗根与茎、叶表面，滤纸吸干、称重，再转移至超净工作台中表面消毒后，研磨制备成菌悬液。适当稀释菌悬液，取 100 μ L 涂布于含有抗生素的 LB 固体培养基上(Amp: 100 mg/L; Kan: 50 mg/L)，30 $^{\circ}$ C 倒置培养 1–3 d，对目标菌落数进行计数。

1.11 数据处理与分析

实验结果以平均值 \pm 标准偏差的形式表示，使用 SPSS19.0、Origin9.0、Image J 软件对不同培养条件下的生物膜形成量和浮游态细菌量进行数据处理和分析。以 $P<0.05$ 作为具有显著性差异的标准。

2 结果与讨论

2.1 细胞运动学特征对菲降解菌 JM2-gfp 成膜能力的影响

细菌通常借助极性鞭毛或菌毛自由游动到合适的表面并在其上移动，主要依赖群集、泳动、抽搐、滑行和滑动等一系列行为机制^[13-14]。JM2-gfp 菌株的电镜观察结果表明，菌体细胞生长有周生鞭毛，具备运动特性(图1A)。一般认为，鞭毛旋转可驱动单细胞菌体在液体中通过趋化性进行快速定向的泳动，以及多个细菌在表面快速进行群集运动。分别在含有 0.3%半固体琼脂培养基和 0.7%半固体琼脂培养基上，JM2-gfp 菌株显示出较强的游泳运动能力(图1B)和明显的群集行为(图1C)，泳动直径大于 3 cm，群集运动直径大于 1 cm (图1D)。在生物膜发育过程中，游泳运动和群集运动发挥重要作用^[13-14]。假单胞菌、芽孢杆菌、弧菌、大肠杆

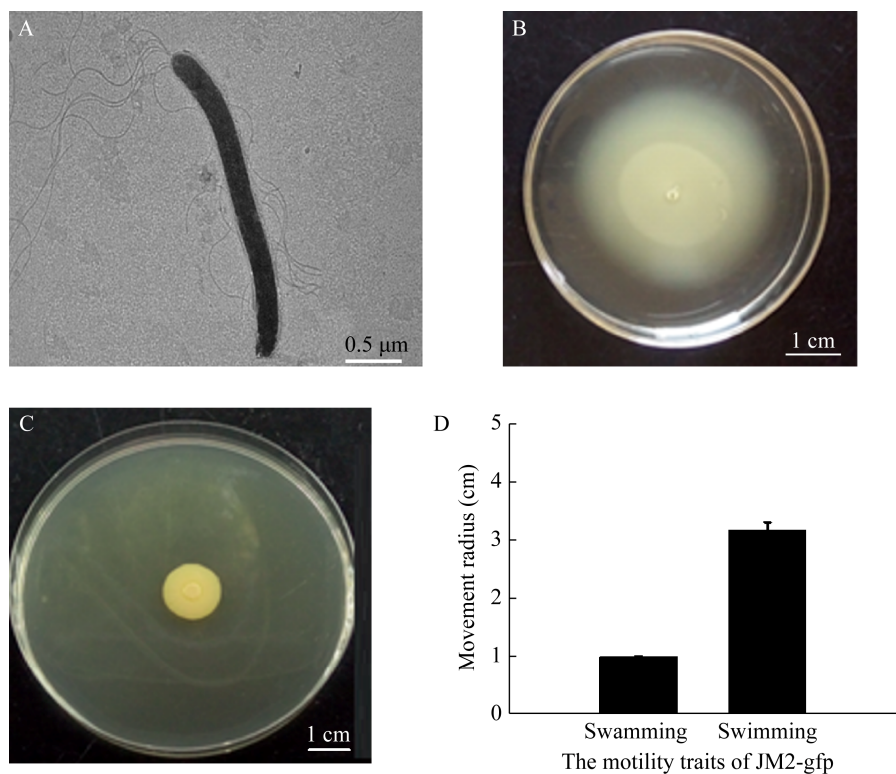


图 1 JM2-gfp 降解菌的运动学特征

Figure 1 Movement characteristics of JM2-gfp degrading bacteria

注：A：鞭毛结构；B：游泳运动；C：群集运动；D：运动半径

Note: A: Bacterial flagella; B: Swimming movement; C: Cluster movement; D: Movement radius

菌、沙门氏菌和变形杆菌等细菌的成膜与其自身的运动学特征有关^[21]。

2.2 细胞表面特性对菲降解菌 JM2-gfp 成膜能力的影响

利用结晶紫染色和菌落计数法对 JM2-gfp 菌株的细胞初始粘附能力进行了测定。图 2A 中的箭头明确指出了培养基表面上生长的生物膜, 菌落计数结果显示该菌株的初始粘附率为 $2.63\% \pm 0.22\%$ 。

JM2-gfp 菌株具有自聚集能力, 图 2B 中的结果表明, 生长 4 h 时, JM2-gfp 菌株细胞聚集量约为 68%, 8 h 以后聚集量增加到 75%, 高于文献中报道的成膜能力较强的铜绿假单胞菌 N6P6 和假产碱假单胞菌 NP103 自动聚集的能力, 它们分别为 18%–38% 和 19%–43%^[22]。值得注意的是, 具有强自聚集行为的根际促生细菌(根瘤菌突变株 *A. brasilense*)也表现了与生物膜形成能力的相关性, 主要表现在生物膜的初始形成阶段, 这说明自聚集能力有利于细菌建立一个无柄的微生物群落^[30]。

细胞表面疏水性是影响细菌在各种材料表面粘附的主要因素, 主要是其中的疏水基团去除相互作用表面之间的水膜, 从而使粘附能够发生作用^[31]。因此, 细胞表面疏水性也是生物膜初始建立过程中微菌落形成的关键因素。已有研究表明, 可降解疏水性化合物的细菌通常具有高疏水性^[32]。本研究使用 CAM 法和 MATH 法分别测定了铜绿假单胞菌 PAL、菲降解菌 JM2-gfp 和茚降解菌 JPYR-1 的细胞表面疏水性。CAM 法测量的 3 种细菌接触角分别为 48.4° 、 89.7° 和 92.8° , 表明 2 株降解菌细胞的表面疏水性明显高于铜绿假单胞菌 PAL^[24](图 2C)。MATH 法进一步证明 2 株多环芳烃降解菌为疏水性强的细菌, 铜绿假单胞菌 PAL 的疏水性与报道的 N6P6 细菌表面疏水性 35.33% 相似, 属于弱疏水性菌(图 2D)^[22]。此外, 细菌的生长环境、培养时间及菌体形态等因素发生改变也会改变细胞表面的疏水特性, 从而影响细菌在其他表面的附着和成膜^[33]。

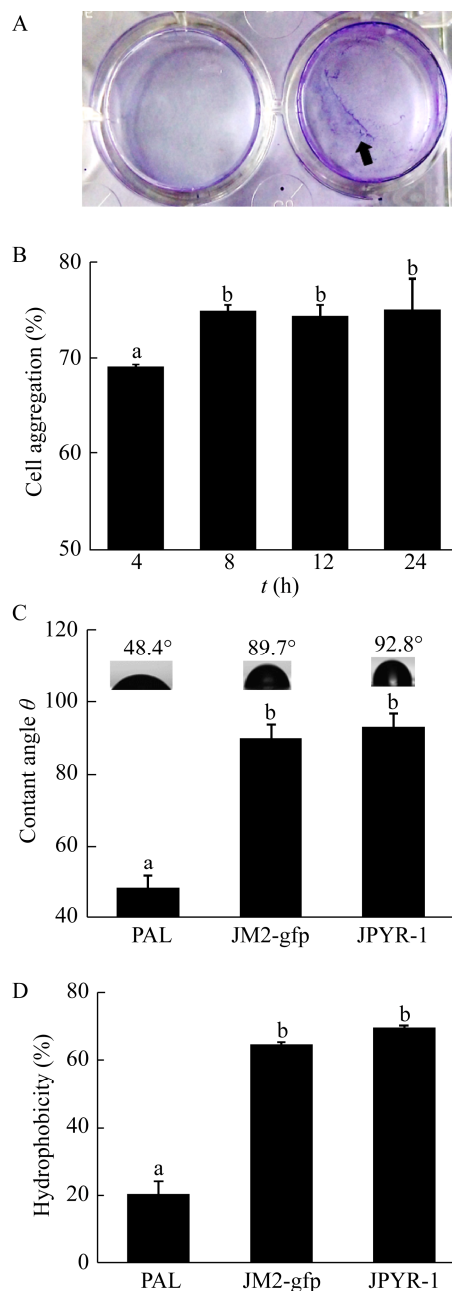


图 2 JM2-gfp 菌株细胞表面化学特性测定结果

Figure 2 Cell surface chemistry of JM2-gfp

注: A: JM2-gfp 菌株在聚苯乙烯材料表面初始粘附; B: 自聚集能力; C: 水接触角法测定细菌细胞壁疏水性; D: MATH 法测定细菌细胞壁疏水性。不同字母(a、b)表示样本间差异显著($P < 0.05$)

Note: A: The initial adhesion on polystyrene; B: Automatic aggregation ability; C: Determination of bacterial cell hydrophobicity by water contact angle method; D: Determination of bacterial cell wall hydrophobicity by MATH method. Different letters indicate significant differences between samples ($P < 0.05$)

2.3 菲降解菌 JM2-gfp 的成膜能力

利用结晶紫染色法对菲降解菌 JM2-gfp、铜绿假单胞菌 PAL 和苾降解菌 JPYR-1 的成膜能力进行测定(图 3)。实验结果表明, 3 种细菌生长 2 d 后均达到生物膜的成熟期。铜绿假单胞菌 PAL 通常被用作生物膜研究的模式细菌, 其染色后测得 OD_{595} 为 0.565 ± 0.048 , 大于评定标准值 $0.328^{[25]}$, 是强生物膜生产者^[34]。菲降解菌 JM2-gfp 染色后的 OD_{595} 为 $0.382 \pm 0.035 > 0.328$, 同样属于强生物膜生产者, 苾降解菌 JPYR-1 属于中等生物膜生产者, OD_{595} 为 0.279 ± 0.038 , 介于 0.246 和 0.328 之间。阴性对照(LB 培养基)的 OD_{595} 为 0.082。

2.4 JM2-gfp 菌株生物膜的结构解析

对 JM2-gfp 菌株在聚苯乙烯表面上形成生物膜的过程进行观察。荧光强度显示菌株自身生物膜的形成量和细菌密度在第 2 天均达到最大值(图 4A–4C)。膜的厚度也在第 2 天达到最大值 $32.8 \pm 3.80 \mu\text{m}$, 与之前结晶紫染色的结果一致。第 1 天和第 3 天的细菌密度和膜厚度均小于第 2 天, 厚度分别为 $9.8 \pm 0.24 \mu\text{m}$ 和 $7.4 \pm 0.96 \mu\text{m}$ (图 4D–4F)。值得注意的是, 细菌 JM2-gfp 在成膜过程中形态发生了变化, 成膜第 1 天的菌体呈长杆状, 之后体积变小, 多呈圆球形。有研究表明 *Paenibacillus lautus* NE3B01 在形成生物膜时呈现

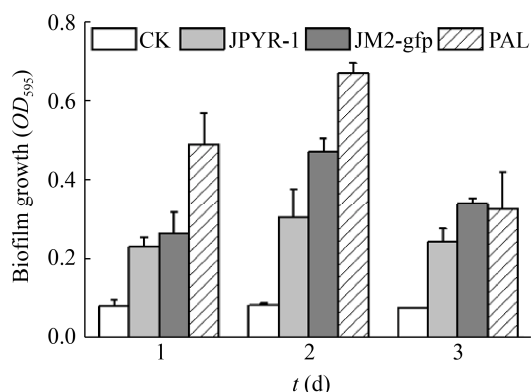


图 3 JM2-gfp 降解菌的成膜过程

Figure 3 JM2-gfp degrading bacterial biofilm formation

注: CK 表示无菌 LB

Note: CK means sterile LB

球形和杆状 2 种形态, 这是细胞通过表型异质性的适应, 有助于优化细胞与其附着的表面之间的相互作用^[35]。

扫描电镜表征了 JM2-gfp 菌株生物膜形成过程, 与 CLSM 观察的结果相似(图 4G–4I)。菌株 JM2-gfp 培养 2 d 后可形成成熟的生物膜, 细菌彼此间紧密粘附, 并且被致密的网状结构所包被, 可能是由细菌分泌物所构成的胞外基质物质。EPS 对生物膜的功能特性具有决定作用, 例如增强生物膜的机械稳定性、保水性、提高细菌抗环境胁迫、促进生物膜对化合物的吸附以及营养物质的吸收利用等^[36]。

2.5 生物膜对菲的降解

为了验证生物膜的降解能力优于浮游细菌, 测定了 0–84 h 内生物膜对菲的降解效果(图 5)。其中, 生物膜生长 48 h 后可降解约 52.8% 的菲, 是浮游细菌降解能力的 2.5 倍左右。Mangwani 等也报道了相似的研究结果, 浮游生长的 *Stenotrophomonas*

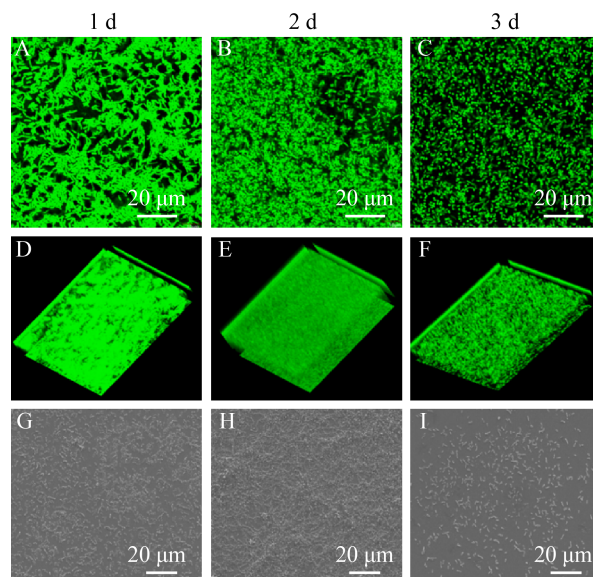


图 4 JM2-gfp 菌株生物膜形成过程

Figure 4 The formation process of JM2-gfp biofilm

注: A–F: CLSM 表征 JM2-gfp 菌株生物膜形成过程; G–I:

SEM 表征 JM2-gfp 菌株生物膜形成过程

Note: A–F: Characterization of JM2-gfp biofilm formation by CLSM; G–I: Characterization of JM2-gfp biofilm formation by SEM

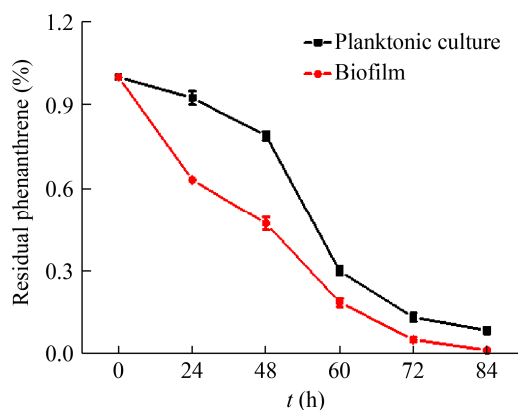


图5 生物膜降解菲

Figure 5 Biofilm degradation of phenanthrene

acidaminiphila NCW-702 培养 7 d 后对菲的降解率仅为 $38.7\% \pm 2.5\%$, 形成生物膜后的降解率高达 $71.1\% \pm 3.1\%$ ^[28]。因为 48 h 是 JM2-gfp 菌株生物膜成熟的极大值, 所以 48 h 后生物膜和浮游细菌降解速率的差距逐渐减少。相对于浮游细菌, 生物膜的高效降解能力可能源于其优越的生长模式。一方面, EPS 作为物理屏障不仅有利于细菌附着, 而且避免了细菌和菲的直接接触, 降低菲对细菌的毒性损害并提高生长速率; 另一方面, 生物膜在空间上扩大了细菌与疏水性碳底物之间的界面面积, 提高了菲的生物可及性, 从而有利于降解菌对菲的利用转化。

2.6 JM2-gfp 菌株生物膜细胞外基质组成

生物膜形成过程中, 细菌生长会逐渐向胞外分泌多种物质。利用 Bradford 和还原糖计量方法, 测得 JM2-gfp 菌株生物膜的胞外基质蛋白含量为 $211.9 \mu\text{g/mL}$, 碳水化合物总量为 $74.68 \mu\text{g/mL}$ 。

FTIR 分析了 EPS 表面功能基团的光谱组成 (图 6)。谱图上对应于 $-\text{COC}-$ 、 PO_4^- 、 $-\text{NH}_2$ 和 $-\text{CH}_2-$ 官能团的特定峰值, 说明 EPS 中含有多糖、核酸、蛋白质和脂质^[37]。其中, $1\,372\text{--}1\,041 \text{ cm}^{-1}$ 之间为糖醛酸的目标峰, $3\,500\text{--}2\,921 \text{ cm}^{-1}$ 之间的峰值表明 EPS 中存在脂质, 碳水化合物由 $1\,750 \text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,625 \text{ cm}^{-1}$ 之间的 $-\text{COC}-$ 拉伸显示, 在 $1\,643\text{--}1\,372 \text{ cm}^{-1}$ 处出现了酰胺特征峰, 表明 EPS

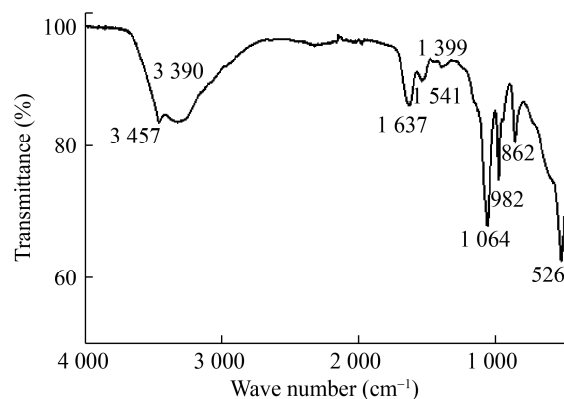


图6 细胞外基质组成

Figure 6 The composition of the extracellular polymeric substances

组成成分中含有蛋白质, 而且在 878 cm^{-1} 处的峰值说明 EPS 中还含有核酸。

2.7 菲降解菌 JM2-gfp 在小麦根表和体内的成膜定殖

采用蘸根法, 将小麦根部浸泡在 JM2-gfp 菌悬液中 (OD_{600} 为 1.5), 每隔 1 d 随机取样, 连续 7 d, 分别在 40 倍和 600 倍物镜下观察了小麦根表形成生物膜的情况 (图 7)。结果表明, 蘸根处理 4 d 后, 在小麦根部可观察到由 JM2-gfp 降解菌构成的成熟稳定的生物膜, 主要形成过程如下: (1) 游离状态的 JM2-gfp 菌体在小麦根表附着; (2) 细菌利用根表分泌出的营养物质开始生长直至形成微菌落; (3) 随着浮游菌体继续附着和更多微菌落形成, 根表不断被菌体铺满, 生物膜逐渐成形; (4) 在根表形成成熟稳定的生物膜。这种成膜方式与高等生物中细菌生物膜的形成过程相似, 都经历菌体的初始粘附、出现微菌落、生物膜成熟稳定及最后细菌从生物膜中脱离与再粘附重生等过程^[38]。

利用平板计数法对小麦根表生物膜形成过程中 JM2-gfp 菌数量的变化情况进行统计。结果表明 (图 8), 小麦根表上的菲降解菌 JM2-gfp 数量在 1–7 d 内逐渐增加并趋于稳定。其中, 生物膜在第 4 天基本达到稳定状态; 5–7 d 时, 根表降解菌数量虽略有增加但并不显著; 第 7 天时, 根表

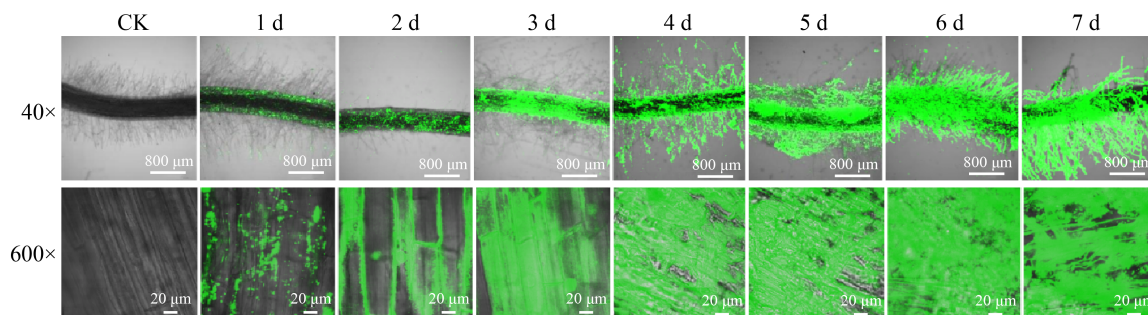


图 7 菲降解菌 JM2-gfp 在小麦根表的定殖成膜过程

Figure 7 Biofilm formed by phenanthrene-degrading bacteria JM2-gfp on the surface of wheat roots

注: 40 倍镜下观察, 标尺为 800 μm; 600 倍镜下观察, 标尺为 20 μm

Note: Observed at 40×, scale bar=800 μm; Observed at 600×, scale bar=20 μm

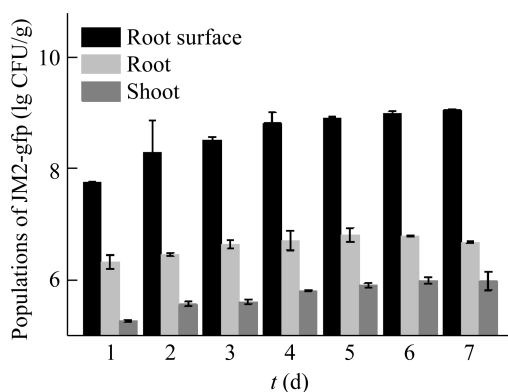


图 8 菲降解菌 JM2-gfp 在小麦地下部和地上部上的分布

Figure 8 Distribution of phenanthrene-degrading bacteria JM2-gfp on the root surface and in the root and the shoot of wheat plant as determined by plate counting

JM2-gfp 菌株数量达到 9.05 lg CFU/g 鲜重。结果进一步证明, 蘸根处理 4 d 时菲降解菌 JM2-gfp 即可在小麦根表形成成熟生物膜这一结论。

3 结论

通过对菲降解菌细胞特征以及生物膜形成过程、膜结构和功能等进行表征, 得到的结论如下:

(1) 运动学特性、较高初始粘附率、强自聚集能力和细胞壁疏水性增强了菲降解菌 *Pseudomonas* sp. JM2-gfp 形成生物膜的能力。

(2) 菲降解菌 *Pseudomonas* sp. JM2-gfp 成膜后, 表面含有多糖、核酸、蛋白质和脂质等多种胞

外基质, 对菲的降解效率是浮游细菌的 2.5 倍。

(3) 菲降解菌 *Pseudomonas* sp. JM2-gfp 能够在植物根表定殖形成生物膜, 为阻控有机污染物向作物体内迁移提供了一种新的安全有效的技术手段。

REFERENCES

- [1] Sun JT, Pan LL, Tsang DCW, Zhan Y, Zhu LZ, Li XD. Organic contamination and remediation in the agricultural soils of China: a critical review[J]. Science of the Total Environment, 2018, 615: 724-740
- [2] Bansal V, Kim KH. Review of PAH contamination in food products and their health hazards[J]. Environment International, 2015, 84: 26-38
- [3] Dutta K, Shityakov S, Khalifa I, Mal A, Moulik SP, Panda AK, Ghosh C. Effects of secondary carbon supplement on biofilm-mediated biodegradation of naphthalene by mutated naphthalene 1,2-dioxygenase encoded by *Pseudomonas putida* strain KD9[J]. Journal of Hazardous Materials, 2018, 357: 187-197
- [4] Ghosal D, Ghosh S, Dutta TK, Ahn Y. Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1369
- [5] Flemming HC, Wuertz S. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms[J]. Nature Reviews Microbiology, 2019, 17(4): 247-260
- [6] Joseph R, Naugolny A, Feldman M, Herzog IM, Fridman M, Cohen Y. Cationic pillararenes potently inhibit biofilm formation without affecting bacterial growth and viability[J]. Journal of the American Chemical Society, 2016, 138(3): 754-757
- [7] Valentini M, Gonzalez D, Mavridou DA, Filloux A. Lifestyle transitions and adaptive pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Current Opinion in

- Microbiology, 2018, 41: 15-20
- [8] Leyva-Diaz JC, Martin-Pascual J, Poyatos JM. Moving bed biofilm reactor to treat wastewater[J]. International Journal of Environmental Science and Technology, 2017, 14(4): 881-910
 - [9] Kotoky R, Das S, Singha LP, Pandey P, Singha KM. Biodegradation of Benzo(a)pyrene by biofilm forming and plant growth promoting *Acinetobacter* sp. strain PDB4[J]. Environmental Technology & Innovation, 2017, 8: 256-268
 - [10] Ansari FA, Ahmad I. Fluorescent *Pseudomonas* -FAP2 and *Bacillus licheniformis* interact positively in biofilm mode enhancing plant growth and photosynthetic attributes[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 4547
 - [11] Jing HY, Sahle-Demessie E, Sorial GA. Inhibition of biofilm growth on polymer-MWCNTs composites and metal surfaces[J]. Science of the Total Environment, 2018, 633: 167-178
 - [12] Wang Y, Samaranayake LP, Dykes GA. Plant components affect bacterial biofilms development by altering their cell surface physicochemical properties: a predictability study using *Actinomyces naeslundii*[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2021, 97(1): fiae217
 - [13] Perez Ipiña E, Otte S, Pontier-Bres R, Czerucka D, Peruani F. Bacteria display optimal transport near surfaces[J]. Nature Physics, 2019, 15(6): 610-615
 - [14] Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jørgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants[J]. Molecular Microbiology, 2003, 48(6): 1511-1524
 - [15] Ghorbal SKB, Chourabi K, Maalej L, Ammar AB, Ouzari HI, Hassen A, Jaafoura H, Chatti A. *Pseudomonas aeruginosa* swarmer cells adaptation toward UVc radiations[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 556
 - [16] Bujdaková H, Didiášová M, Drahovská H, Černáková L. Role of cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* biofilm[J]. Central European Journal of Biology, 2013, 8(3): 259-262
 - [17] Sorongon ML, Bloodgood RA, Burchard RP. Hydrophobicity, adhesion, and surface-exposed proteins of gliding bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(11): 3193-3199
 - [18] Rios-Castillo AG, Thompson KD, Adams A, Mateo MM, Rodríguez-Jerez J. Biofilm formation of *Flavobacterium psychrophilum* on various substrates[J]. Aquaculture Research, 2018, 49: 3830-3837
 - [19] Toyofuku M, Inaba T, Kiyokawa T, Obana N, Yawata Y, Nomura N. Environmental factors that shape biofilm formation[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2016, 80(1): 7-12
 - [20] Zhou YM, Gao XR. Characterization of biofilm formed by phenanthrene-degrading bacteria on rice root surfaces for reduction of PAH contamination in rice[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2019, 16(11): E2002
 - [21] Kearns DB, Losick R. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*[J]. Molecular Microbiology, 2003, 49(3): 581-590
 - [22] Mangwani N, Kumari S, Das S. Effect of synthetic N-acylhomoserine lactones on cell-cell interactions in marine *Pseudomonas* and biofilm mediated degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. Chemical Engineering Journal, 2016: 172-186
 - [23] Rossi C, Chaves-López C, Serio A, Anniballi F, Valbonetti L, Paparella A. Effect of *Origanum vulgare* essential oil on biofilm formation and motility capacity of *Pseudomonas fluorescens* strains isolated from discoloured Mozzarella cheese[J]. Journal of Applied Microbiology, 2018, 124(5): 1220-1231
 - [24] Katz H, Farber R, Chaniel G, Ankar Y, Cohen H, Cahan R. Rhamnolipid-enhanced *Pseudomonas putida* biofilm formation on hydrophilic surfaces with toluene as the bacterium's sole carbon source[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2018, 127: 87-94
 - [25] Lajhar SA, Brownlie J, Barlow R. Characterization of biofilm-forming capacity and resistance to sanitizers of a range of *E. coli* O26 pathotypes from clinical cases and cattle in Australia[J]. BMC Microbiology, 2018, 18(1): 1-15
 - [26] Premnath N, Mohanrasu K, Guru Raj Rao R, Dinesh GH, Siva Prakash G, Pugazhendhi A, Jeyakanthan J, Govarthanan M, Kumar P, Arun A. Effect of C/N substrates for enhanced extracellular polymeric substances (EPS) production and Poly Cyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) degradation[J]. Environmental Pollution, 2021, 275: 116035
 - [27] Felz S, Vermeulen P, Van Loosdrecht MCM, Lin YM. Chemical characterization methods for the analysis of structural extracellular polymeric substances (EPS)[J]. Water Research, 2019, 157: 201-208
 - [28] Mangwani N, Shukla SK, Kumari S, Rao TS, Das S. Characterization of *Stenotrophomonas acidaminiphila* NCW-702 biofilm for implication in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. Journal of Applied Microbiology, 2014, 117(4): 1012-1024
 - [29] Bossù M, Selan L, Artini M, Relucenti M, Familiari G, Papa R, Vrenna G, Spigaglia P, Barbanti F, Salucci A, et al. Characterization of *Scardovia wiggsiae* biofilm by original scanning electron microscopy protocol[J]. Microorganisms, 2020, 8(6): 807
 - [30] Shelud'ko AV, Filip'echeva YA, Shumilova EM, Khlebtsov BN, Burov AM, Petrova LP, Katsy EI. Changes in biofilm formation in the nonflagellated flhB1 mutant of *Azospirillum brasilense* Sp245[J]. Microbiology, 2015, 84(2): 144-151

- [31] Van Oss CJ. Hydrophobicity and hydrophilicity of biosurfaces[J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 1997, 2(5): 503-512
- [32] Poimenidou SV, Chrysadaku M, Tzakoniati A, Bikouli VC, Nychas GJ, Skandamis PN. Variability of *Listeria monocytogenes* strains in biofilm formation on stainless steel and polystyrene materials and resistance to peracetic acid and quaternary ammonium compounds[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 237: 164-171
- [33] Zhu ML, Wang YH, Dai Y, Wu XQ, Ye JR. Effects of different culture conditions on the biofilm formation of *Bacillus pumilus* HR10[J]. Current Microbiology, 2020, 77(8): 1405-1411
- [34] Karami P, Khaledi A, Mashoof RY, Yaghoobi MH, Karami M, Dastan D, Alikhani MY. The correlation between biofilm formation capability and antibiotic resistance pattern in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Gene Reports, 2020, 18: 100561
- [35] Mangwani N, Kumari S, Shukla SK, Rao TS, Das S. Phenotypic switching in biofilm-forming marine bacterium *Paenibacillus lautus* NE3B01[J]. Current Microbiology, 2014, 68(5): 648-656
- [36] Mangwani N, Kumari S, Das S. Bacterial biofilms and quorum sensing: fidelity in bioremediation technology[J]. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 2016, 32(1/2): 43-73
- [37] Beech IB, Gubner R, Zinkevich V, Hanjantsit L, Avci R. Characterisation of conditioning layers formed by exopolymeric substances of *Pseudomonas* NCIMB 2021 on surfaces of AISI 316 stainless steel[J]. Biofouling, 2000, 16(2/3/4): 93-104
- [38] Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(10): 2675-2679