

香蕉细菌性软腐病菌生物被膜形成特性

黄宁¹ 张景欣² 蒲小明² 沈会芳² 杨祁云² 王忠文¹ 林壁润^{1,2*}

(1. 广西大学 农学院, 南宁 530004;

2. 广东省农业科学院 植物保护研究所, 广州 510640)

摘要 为分析不同环境条件对香蕉细菌性软腐病菌(*Dickeya zae* MS1)生物被膜形成的影响,采用结晶紫染色法测试不同离体培养条件下香蕉细菌性软腐病菌生物被膜形成情况。结果表明:香蕉细菌性软腐病菌在牛肉膏蛋白胨培养基(YPB)中形成能力最强;添加1%蛋白胨之后,生物被膜形成的生物量最大,随着浓度添加到4%,生物量降低;在提供大量营养的培养体系(198 μL YPB+2 μL 菌液)中,细菌形成的生物被膜显著高于其他培养体系;培养24 h时,细菌生物被膜量最大,之后随着培养时间延长而减少;指数生长期细菌生物被膜形成能力优于平台期细菌;在初始菌密度 $10^2 \sim 10^8$ CFU/mL范围内,不同密度对24 h生物被膜形成量无显著差异;32 °C时,细菌生物被膜量显著高于其余温度试验组;pH 6~8时,细菌生物被膜量显著高于其他pH试验组。因此,香蕉细菌性软腐病菌能形成稳固而清晰的生物被膜,其生物被膜的形成能力与环境条件密切相关。

关键词 软腐病; 香蕉细菌性软腐病菌; 生物被膜; 环境因子

中图分类号 S436.341.1+3

文章编号 1007-4333(2019)05-0082-08

文献标志码 A

Biofilm formation characteristics of *Dickeya zae* MS1

HUANG Ning¹, ZHANG Jingxin², PU Xiaoming², SHEN Huifang²,

YANG Qiyun², WANG Zhongwen¹, LIN Birun^{1,2*}

(1. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530004, China;

2. Institute of Plant Protection, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract In order to analyze the effects of different environmental conditions on the biofilm formation of *Dickeya zae* MS1, crystal violet assay was used to evaluate the biofilm formation. The results showed that: The ability of *D. zae* MS1 to form biofilm was strongest in yeast extract peptone broth (YPB); The biofilm biomass reached peak after supplied with 1% peptone and then decreased with 1% - 4% peptone addition; The A_{600} of the *D. zae* MS1 biofilm was significantly higher in large amount of nutrient culture system (198 μL YPB + 2 μL of suspension) than that of other culture system. A_{600} of *D. zae* MS1 biofilm was highest in 24 h, and then decreased with incubation time. The ability of exponential bacteria cells on biofilm formation was stronger than plateau bacteria cells. Within $10^2 - 10^8$ CFU/mL, the initial bacterial concentration of *D. zae* MS1 exhibited no significantly effect on biofilm formation. The A_{600} values of *D. zae* MS1 biofilm increased with the incubation temperatures of 17 - 32 °C and peaked in 32 °C. The remarkably higher A_{600} values of *D. zae* MS1 biofilm was pH 6 - 8. In conclusion, *D. zae* MS1 was able to form stable biofilm under different environmental conditions.

Keywords soft rot disease; *Dickeya zae*; biofilm; environmental factors

收稿日期: 2018-09-08

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2015A030312002); 广东省科技计划项目(2016B020202003); 广州市科技创新项目(2014J4500034)

第一作者: 黄宁, 博士研究生, E-mail: ninghuanggx@163.com

通讯作者: 林壁润, 研究员, 主要从事土传病害研究, E-mail: linbr@126.com

生物被膜是微生物(细菌、藻类、原生动物或真菌)聚集附着于生物或非生物介质表面,分泌胞外物质(多糖、蛋白质、核酸、脂类及离子如 Ca^{2+})将微生物细胞嵌入其中,形成一个高度水合的、结构复杂的微生物群落^[1-3]。生物被膜是细菌重要生存方式,具有极强的抗逆性^[4]。生物被膜不仅可以通过污染医疗植入物^[1,5]、食品加工和饮用水配送过程^[6-7]、产生抗药性^[8]、造成生物污染和生物腐蚀^[9-10]威胁人类健康,而且还是植物重要致病因子,在植物致病菌的定植和病害循环过程中具有毒性作用。植物病原菌水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)、苛养木杆菌(*Xylella fastidiosa*)、梨火疫病菌(*Erwinia amylovora*)形成的生物被膜在其病原物侵染过程中有重要致病作用。水稻白叶枯病菌鞭毛相关基因 *rbfC_{xoo}* 突变菌株生物被膜形成能力增强,对水稻的致病性显著增强^[11]。苛养木杆菌和梨火疫病菌在寄主木质部导管中可形成浓密的生物被膜,阻塞植物导管,寄主植物失水和养分运输受阻而表现症状^[12-13]。

Dickeya 属细菌(原名 *E. chrysanthemi*)是引起植物发生严重软腐症状的病原细菌,本研究团队在国内也首次报道了由 *Dickeya* 属细菌引起的细菌性软腐病菌,分离的致病菌株 MS1 后经鉴定为 *Dickeya zeae*^[14-15]。国内外已经有大量文献报道 *Dickeya* 属细菌生物学性状的研究工作,但极少有对该属细菌生物被膜的形成及其形成机理的研究。目前已有报道 *Dickeya* 属细菌具有生物被膜形成能力,其生物被膜形成与Ⅲ型分泌系统、PhoP-PhoQ 双组分系统、纤维素合成操纵子、类核相关蛋白 Fis 紧密相关^[16-18]。然而,尚未见关于该属细菌生物被膜形成规律、培养条件影响等研究报道。本研究拟以香蕉细菌性软腐病菌 *Dickeya zeae* MS1 为研究对象,采用结晶紫快速检测法测试不同离体培养条件对香蕉细菌性软腐病菌生物被膜形成的影响,以期了解不同环境条件下香蕉细菌性软腐病菌生物被膜的形成规律,为控制香蕉细菌性软腐病菌生物被膜形成,防止香蕉细菌软腐病害的发生及蔓延传播提供依据。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株及材料

香蕉细菌性软腐病菌菌株(*D. zeae* MS1)由本实验室分离自患病香蕉植株, -80 °C 保存。菌株使用牛肉膏蛋白胨培养液(牛肉浸膏 3 g/L、葡萄糖

10 g/L、酵母浸膏 0.5 g/L、蛋白胨 10 g/L、水 1 000 mL、pH 7.0±0.2)在 32 °C 培养。其他用于试验的培养基如下:LB 培养液(胰蛋白胨 10 g/L、酵母提取粉 5 g/L、氯化钠 10 g/L、水 1 000 mL、pH 7.0±0.2)、马铃薯葡萄糖培养液(马铃薯 200 g/L、葡萄糖 20 g/L、水 1 000 mL、pH 7.0±0.2)、肉汤培养液(牛肉 500 g/L、蛋白胨 10 g/L、氯化钠 5 g/L、水 1 000 mL、pH 7.0±0.2)。

1.2 试验方法

1.2.1 香蕉细菌性软腐病菌生物被膜形成及检测

活化香蕉细菌性软腐病菌,挑取新鲜培养的单菌落接种于牛肉膏蛋白胨培养液(YPB),振荡培养(150 r/min, 32 °C)至指数生长期。无菌条件下,取 200 μL 指数生长期菌液加入 96 孔聚苯乙烯微量板,以无菌的培养液 200 μL 作空白对照,各组设 5 个平行试验。32 °C 静止培养 24 h,轻拍菌液,用 0.1 mol/L 无菌的磷酸缓冲液(PBS)冲洗 3 次去除浮游细菌,后用 0.1% 结晶紫染色 15 min,自来水洗至溶液澄清。晾干后每孔加入 200 μL 的 33% 冰醋酸,待结晶紫充分溶解后用酶标仪测定 A_{600} 值^[19]。重复 3 次。

1.2.2 不同培养基对香蕉细菌性软腐病菌生物被膜形成能力测定

取 10 mL 指数生长期菌液,离心(3 500 r/min, 10 min)收集菌体,分别加入 10 mL 新鲜的牛肉膏蛋白胨培养液(YPB)、LB 培养液(LB)、马铃薯葡萄糖培养液(PDB)以及营养肉汤培养液(NB),配制成菌密度为 10^8 CFU/mL 的菌液;分别取 200 μL 菌悬液加入 96 孔聚苯乙烯微量板,32 °C 静止培养 24 h,按照 1.2.1 的方法测试生物被膜形成。

1.2.3 不同浓度蛋白胨对香蕉细菌性软腐病菌生物被膜形成能力测定

取 10 mL 指数生长期菌液,离心(3 500 r/min, 10 min)收集菌体,分别加入 10 mL 不同浓度的牛肉膏蛋白胨培养液(0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、4.0%)配制成菌密度为 10^8 CFU/mL 的菌液;分别取 200 μL 菌液加入 96 孔聚苯乙烯微量板,32 °C 静止培养 24 h,按照 1.2.1 的方法测试生物被膜形成。

1.2.4 不同配比培养体系对香蕉细菌性软腐病菌生物被膜形成能力测定

按照表 1 分别向 96 孔聚苯乙烯微量板加入不同体积的无菌水、YPB、以及密度为 10^8 CFU/mL

的指数生长期菌液,后置于 32 ℃ 静止培养 24 h,按照 1.2.1 的方法测试生物被膜形成。

表 1 不同配比的培养体系

Table 1 Different proportions of culture system

编号 Code	无菌水 Sterile water	YPB 培养液 YPB broth	软腐病菌 悬液 Bacterial suspension	μL
				总体积 Total volume
1	0	200	0	200
2	0	198	2	200
3	20	178	2	200
4	40	158	2	200
5	60	138	2	200
6	80	118	2	200
7	100	98	2	200
8	150	48	2	200
9	175	23	2	200
10	188	10	2	200
11	194	4	2	200
12	197	1	2	200
13	198	0	2	200

1.2.5 不同培养时间对香蕉细菌性软腐病菌生物被膜形成能力测定

取 200 μL 指数生长期菌液加入 96 孔聚苯乙烯微量板,32 ℃ 下静止培养 6、12、24、36、48、60、72、96 和 144 h,按照 1.2.1 的方法测试生物被膜形成。

1.2.6 不同生长期细菌对香蕉细菌性软腐病菌生物被膜形成能力测定

分别取 10 mL 指数生长期和平台期菌液,离心 (3 500 r/min, 10 min) 收集菌体,加入新鲜 YPB 10 mL,配制成菌密度为 10^8 CFU/mL 的菌悬液;然后取 200 μL 以上不同生长期菌悬液加入 96 孔聚苯乙烯微量板,32 ℃ 静止培养 6、12、24、36 和 48 h,按照 1.2.1 的方法测试生物被膜形成。

1.2.7 不同初始菌密度对香蕉细菌性软腐病菌生物被膜形成能力测定

取 10 mL 指数生长期菌液,离心 (3 500 r/min, 10 min) 收集菌体,加入新鲜 YPB 10 mL,配制成菌浓度为 10^8 CFU/mL 的菌悬液,10 倍稀释法得到

10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 CFU/mL 密度的菌悬液;然后取 200 μL 上述不同密度的菌悬液加入 96 孔聚苯乙烯微量板,32 ℃ 静止培养,于 2、4、6、8、10、12、14 和 24 h 收集样品,按照 1.2.1 的方法测试生物被膜形成。

1.2.8 不同培养温度对香蕉细菌性软腐病菌生物被膜形成能力测定

取 200 μL 指数生长期菌悬液加入 96 孔聚苯乙烯微量板,分别在 17、22、27、32、37 和 42 ℃ 静止培养,于 2、4、6、8、10、12、14 和 24 h 收集样品,按 1.2.1 的方法测试生物被膜形成。

1.2.9 不同初始 pH 对香蕉细菌性软腐病菌生物被膜形成能力测定

使用 pH 分别为 5、6、7、8 和 9 的新鲜 YPB 配制终密度为 10^8 CFU/mL 的菌悬液;取 200 μL 上述不同 pH 的菌悬液加入 96 孔聚苯乙烯微量板,32 ℃ 静止培养,于 2、4、6、8、10、12、14 和 24 h 收集样品,按 1.2.1 的方法测试生物被膜形成。

1.3 数据处理

每一处理设 5 组平行试验,3 次重复,结果以平均数±标准差表示,利用 Excel、DPS 软件 (版本 7.05) 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同培养基条件下香蕉细菌性软腐病菌成膜情况

检测牛肉膏蛋白胨培养液 (YPB)、LB 培液 (LB)、马铃薯葡萄糖培养液 (PDB) 以及营养肉汤培养液 (NB) 对香蕉细菌性软腐病菌生物被膜形成能力的影响,结果表明:香蕉细菌性软腐病菌生物被膜在 YPB、LB 中的形成能力优于 PDB 及 NB (图 1(a))。香蕉细菌性软腐病菌在 YPB 中生长 24~48 h 后生物被膜会从乳白色变成灰色,而在 48 h 后灰色又消失,该特征有利于鉴别该菌生物被膜。因此,选择 YPB 进行后续试验。

2.2 不同蛋白胨浓度条件下香蕉细菌性软腐病菌成膜情况

检测 YPB 培养下不同蛋白胨浓度对香蕉细菌性软腐病菌生物被膜形成能力的影响,结果表明:0~1% 蛋白胨添加浓度,香蕉细菌性软腐病菌生物被膜形成能力逐渐增强,并在 1% 浓度生物量达到最大值;随着浓度增大至 4%,该菌生物被膜的形成能力下降 (图 1(b))。

2.3 不同配比的培养体系中香蕉细菌性软腐病菌成膜情况

使用菌悬液和 YPB 不同体积配比的培养体系培养香蕉细菌性软腐病菌生物被膜,结果表明:香蕉

细菌性软腐病菌在处理组合 2(198 μ L YPB+2 μ L 菌悬液)中生物被膜形成能力最强;随着 YPB 添加体积减少,香蕉细菌性软腐病菌生物被膜形成能力减弱(图 1(c))。

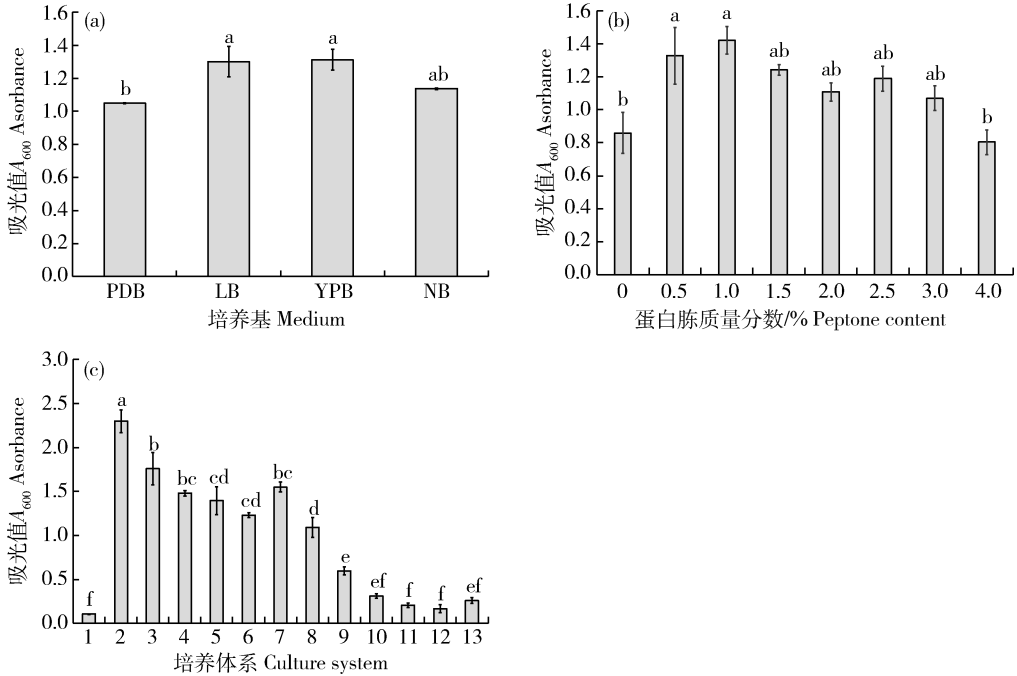


图 1 不同培养基(a)、蛋白胨浓度(b)、培养体系(c)对香蕉细菌性软腐病菌成膜情况影响
Fig. 1 Effects of different media (a), peptone concentrations (b) and culture systems (c) on the formation of *Dickeya zeae* MS1

2.4 不同培养时间香蕉细菌性软腐病菌成膜情况

检测不同培养时间后香蕉细菌性软腐病菌生物被膜形成情况,结果表明:不同培养时间(0~216 h)生物被膜的形成长度差异显著($P < 0.05$)。0~24 h时,香蕉细菌性软腐病菌生物被膜的形成长度随时间的延长不断增加,并在 24 h 达到峰值形成动态平

衡,平衡时间持续到 48 h;随后生物被膜脱落, A_{600} 开始下降($P < 0.05$)(图 2(a))。

2.5 不同生长期菌液对香蕉细菌性软腐病菌成膜情况影响

检测香蕉细菌性软腐病菌不同生长期菌液生物被膜形成情况,结果表明:不同生长期细菌均能形成

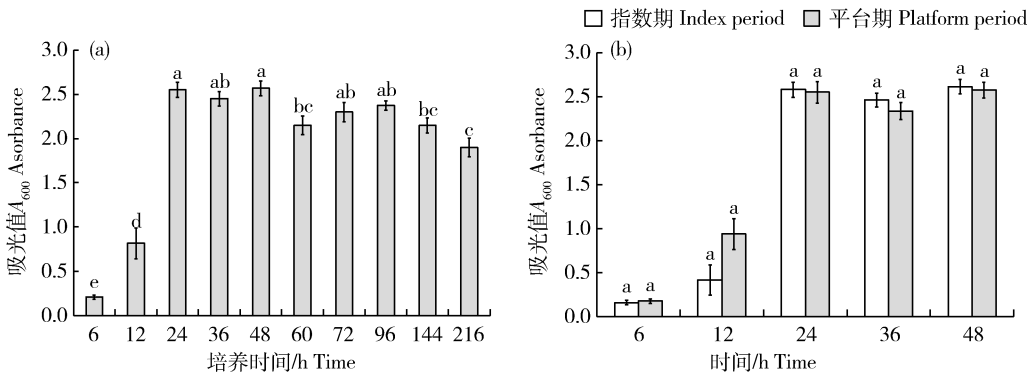


图 2 不同培养时间(a)、生长期(b)对香蕉细菌性软腐病菌成膜情况影响
Fig. 2 Effects of different inoculation times (a) and development periods (b) on the formation of *Dickeya zeae* MS1

明显的生物被膜,但在 24、36 和 48 h 处,指数生长期细菌的生物被膜形成量高于平台期细菌的生物被膜形成量(图 2(b))。

2.6 不同初始菌密度条件下香蕉细菌性软腐病菌成膜情况

检测不同初始菌密度的香蕉细菌性软腐病菌的生物被膜形成情况,结果表明:不同的初始菌密度表现不同的生物被膜细菌迟滞期(图 3(a))。初始接菌密度为 10^8 CFU/mL 迟滞期为 4 h、初始接菌密

度为 10^7 CFU/mL 迟滞期为 6 h、初始接菌密度为 10^6 CFU/mL 迟滞期为 8 h、初始接菌密度为 10^5 CFU/mL 迟滞期为 10 h、初始接菌密度为 10^4 CFU/mL 迟滞期为 12 h、初始接菌密度为 10^3 CFU/mL 迟滞期为 14 h。但是经过 24 h 培养,各初始密度组形成的生物被膜量无差异显著($P < 0.05$)(图 3(a)和 3(b))。此外,初始接菌密度为 10^8 CFU/mL 时,迟滞期为 0~4 h,对数期为 4~12 h,平台期 12~24 h(图 3(a))。

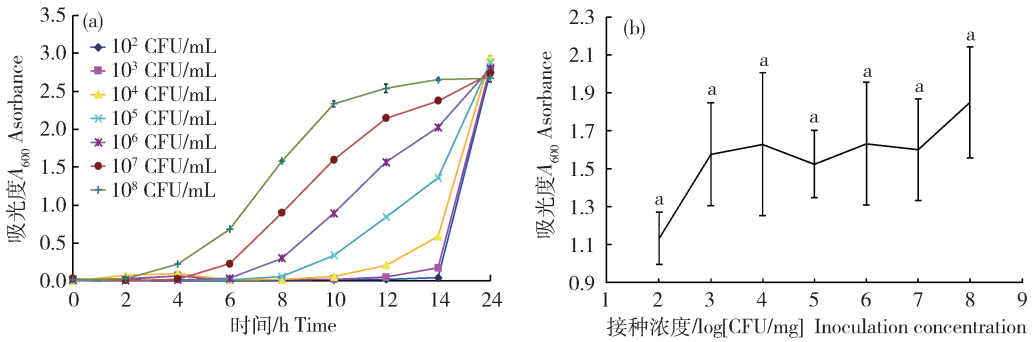


图 3 不同初始菌密度条件下香蕉细菌性软腐病菌经过 0~24 h(a)、24 h(b)培养后生物被膜形成情况

Fig. 3 Effects of inoculation concentration on *Dickeya zeae* MS1 biofilm formation after incubation at 0–24 h (a) and 24 h (b)

2.7 不同温度条件下香蕉细菌性软腐病菌成膜情况

检测不同温度条件下香蕉细菌性软腐病菌生物被膜形成情况,结果表明:不同温度对香蕉细菌性软腐病菌生物被膜的生成有明显影响(图 4(a)和 4(b))。温度可影响生物被膜细菌的迟滞期,37 °C 条件下,该菌的迟滞期最短,其次为 32 °C;温度过高(42 °C)或者过低(17 °C)均会延长生物被膜细菌的

迟滞期(图 4(a))。温度可影响生物被膜细菌的生长速度,0~14 h 内 27~37 °C 条件下生长的细菌可快速进入平台期;而 17 °C 条件下生长的细菌才刚进入指数生长期(图 4(a))。温度也可影响生物被膜形成的最大生物量,17~32 °C 范围内香蕉细菌性软腐病菌生物被膜的形成量随温度的升高而不断增加,在 32 °C 达到最高,高于 32 °C 生物被膜形成量则降低(图 4(b))。

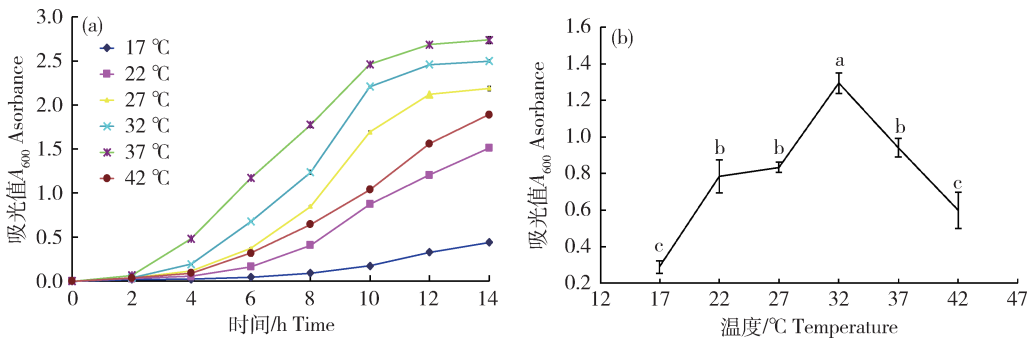
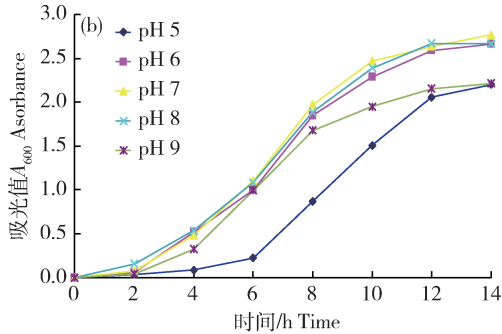


图 4 不同温度条件下香蕉细菌性软腐病菌经过 0~14 h(a)、24 h(b)培养后生物被膜形成情况

Fig. 4 Effects of different temperature on *Dickeya zeae* MS1 biofilm formation after incubation at 0–14 h (a) and 24 h (b)

2.8 不同初始 pH 条件下香蕉细菌性软腐病菌成膜情况

检测不同初始 pH 对香蕉细菌性软腐病菌生物被膜形成影响,结果表明:初始 pH 不影响生物被膜



细菌的迟滞期以及生长速率,但可影响其生物被膜形成的生物量。初始 pH 为 6~8 时,香蕉细菌性软腐病菌生物被膜形成量差异不显著,但形成量显著高于 pH 5 和 9 试验组 ($P < 0.05$) (图 5(a)和 5(b))。

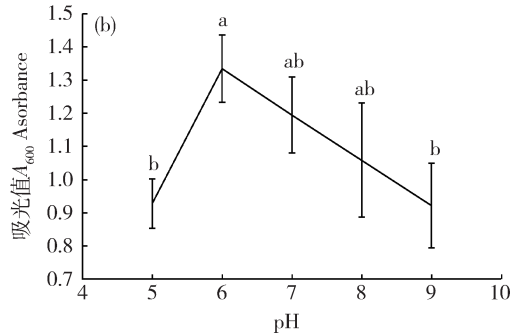


图 5 不同初始 pH 条件下香蕉细菌性软腐病菌经过 0~14 h (a)、24 h (b) 培养后生物被膜形成情况

Fig. 5 Effects of initial pH levels on *Dickeya zeae* MS1 biofilm formation after incubation at 0–14 h (a) and 24 h (b)

3 讨论与结论

细菌生物被膜的形成可以分为粘附、生长、成熟、播散 4 个阶段^[20]。本研究结果表明:静止培养条件下,香蕉细菌性软腐病菌生物被膜的形成可分为 4 个阶段:0~6 h 粘附期,6~24 h 生长繁殖期,24~48 h 成熟期,48 h 以后为播散期。细菌对载体表面的黏附、细菌菌体之间的聚集并非随机进行,而是具有一定的选择性和特异性^[21]。牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)能与多种口腔链球菌菌体的表面受体产生特异性识别,并定植于口腔链球菌形成的生物被膜中^[21]。带有负电荷、亲水表面的细菌,在具亲水表面载体上则能更迅速形成生物被膜^[22]。本研究中,香蕉细菌性软腐病菌生物被膜在形成初期,细菌首先附着在载体表面,但最初的附着是不牢固的,应是需要经过一系列复杂机制才可牢固地附着在载体表面^[20]。生物被膜附着的牢固程度主要取决于载体表面的粗糙度、疏水性,以及细胞表面聚合物(细胞粘附蛋白、菌毛、鞭毛、多糖)^[23]。此外,指数生长期的细菌比平台期的细菌具有更强的生物被膜形成能力,可能由于这 2 个时期的细菌在生长速率、代谢活性、黏附能力等方面存在的差异,影响了生物被膜形成能力^[24]。

细菌生物被膜的形成与培养基中营养物质的供给具有直接的联系。培养基中营养成分的有效性可影响细菌生物被膜形成的速率以及最大生物量。本

研究结果表明:香蕉细菌性软腐病菌生物被膜在 YPB 培养基、1%蛋白胨浓度、有大量营养的培养体系(198 μ L YPB+2 μ L 菌液)中形成能力强;而在 4%蛋白胨添加条件下,细菌生物被膜形成能力下降,说明丰富培养基中生物被膜形成的减少可能是有效营养成分的缺失。培养基在细菌分离、鉴定方面的作用有大量报道,如 Lee^[24]等报道,特殊的培养基 NGM 培养菊欧文氏菌(*E. chrysanthemi*)可使菌落产生蓝色素,该培养性状有利于将菊欧文氏菌从欧文氏菌属(*E. spp.*)菌落中分离出来。培养基影响细菌生物被膜的形成也有相关报道,如使用 4 种不同的培养基(LB、ABTG、MOPS、人体尿液)对 4 株大肠杆菌(F-18、83972、Nissle 1917、413/89-1)和 1 株克雷伯肺炎菌(i222-86)生物被膜的形成进行研究,发现这 5 株细菌分别在各自适宜的培养基中形成大量的生物被膜^[25];在对空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)研究也发现,相比于丰富的培养基(NB2、Brucella and Bolton broths),该菌在营养匮乏的培养基(MHB)中形成更大量的生物被膜^[26-27]。因此,培养基中营养成分对于细菌生物被膜的形成具有重要作用,选择适宜的培养基是培养细菌生物被膜的前提条件。

本研究表明,初始接菌密度($10^2 \sim 10^8$ CFU/mL)可影响生物被膜细菌迟滞期,但经过 24 h 后,初始接菌密度对香蕉细菌性软腐病菌生物被膜形成的影响不显著,其可能原因是:接菌密度高的处理生物被

膜细菌虽然可快速进入细菌指数生长期和平台期,但是生物被膜细胞局限于营养物质的供给水平,24 h 生物被膜已处于生物量最大值的动态平衡中;而接菌密度低的处理虽有 14 h 的迟滞期,经过 8 h 对数生长期的快速增长后,生物被膜可生成最大的生物量,因此各处理之间培养 24 h 后,生物被膜的生物量差异不显著。Azevedo 等^[28]研究发现接种浓度对幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)生物被膜的粘附影响不显著;说明由于初始接菌密度不影响菌体的粘附,且培养基中宽松的营养条件使菌体生长和胞外物质的分泌受到限制较少。因此,不同初始接菌密度之间形成的生物被膜无显著差异。

在一定温度范围内,细菌具有较好的生物被膜形成能力。本研究结果显示,在 22~37 °C 温度范围内,香蕉细菌性软腐病菌具有较好的生物被膜形成能力,且在 32 °C 条件下,生物被膜形成能力最强。柠檬酸杆菌(*Citrobacter werkmanii*)在 30 °C 条件下可形成大量生物被膜,而极端温度(37 °C)不利于该菌生物被膜的形成^[29]。空肠弯曲杆菌在 37~42 °C 温度范围内形成的生物被膜具有一定区别,但是差异不显著^[27]。22~30 °C 条件下,30 株沙门氏菌属(*Salmonella* spp.)具有较好的生物被膜形成能力;30 °C 条件下沙门氏菌经过 24 h 可形成成熟的生物被膜,而 22 °C 条件下细菌需经过 48 h 才形成成熟的生物被膜^[30]。因此,适宜的温度是生物被膜形成的必要条件。此外,本研究发现,低温(17 °C)可使生物被膜形成能力下降,已有研究表明低温能使细菌胞外多糖分泌量减少、胞外多糖活性降低,导致生物被膜的黏附能力下降,造成生物被膜形成能力减弱^[22,31]。

碱性溶液可抑制金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)生物被膜的生长,并将生物被膜限制在微菌落阶段,控制细菌的定殖^[32]。本试验发现偏碱性条件不利于香蕉细菌性软腐病菌生物被膜的形成,因此,偏中性环境对香蕉细菌性软腐病菌生物被膜的形成更具有优势。

本研究建立了稳定的香蕉细菌性软腐病菌生物被膜形成培养体系:YPB 培养液中添加 1% 蛋白胨、优化的培养体系(198 μ L YPB+2 μ L 菌液)、指数生长期菌液、菌密度 $10^2 \sim 10^8$ CFU/mL、32 °C、pH 7、培养 24 h 等,是香蕉细菌性软腐病菌形成的适宜条件;使用结晶紫染色法可快速、准确地对香蕉

细菌性软腐病菌生物被膜的形成进行测定。研究通过阐明不同环境因素对香蕉细菌性软腐病菌生物被膜形成的作用,有利于通过优化物理因素来减少软腐病害的发生。

参考文献 References

- [1] Hall-Stoodley L, Costerton J W, Stoodley P. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2(2): 95-108
- [2] O'Toole G, Kaplan H B, Kolter R. Biofilm formation as microbial development [J]. *Annual Review of Microbiology*, 2000, 54(1): 49-79
- [3] Branda S S, Vik Å, Friedman L, Kolter R. Biofilms: The matrix revisited [J]. *Trends in Microbiology*, 2005, 13(1): 20
- [4] Rinker K D, Kelly R M. Growth physiology of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*: Development of a sulfur-free defined medium, characterization of an exopolysaccharide, and evidence of biofilm formation [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(12): 4478-4485
- [5] An Y H, Friedman R J. Laboratory methods for studies of bacterial adhesion [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1997, 30(2): 141-152
- [6] Kumar C G, Anand S K. Significance of microbial biofilms in food industry: A review [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1998, 42(1-2): 9-27
- [7] Flemming H C, Percival S L, Walker J T. Contamination potential of biofilms in water distribution systems [J]. *Water Science and Technology Water Supply*, 2002, 2(1): 271-280
- [8] Lewis K. Riddle of biofilm resistance [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, 45(4): 999-1007
- [9] Flemming H C. Biofouling in water systems-cases, causes and countermeasures [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 59(6): 629-640
- [10] Jayaraman A, Earthman J C, Wood T K. Corrosion inhibition by aerobic biofilms on SAE 1018 steel [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1997, 47(1): 62-68
- [11] 傅本重, 吴茂森, 陈华民, 何晨阳. 水稻白叶枯病菌在离体培养条件下生物膜形成的检测 [J]. *植物保护*, 2010, 36(1): 47-50
Fu B Z, Wu M S, Chen H M, He C Y. Detection of biofilm formation of *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* in vitro under static culture conditions [J]. *Plant Protection*, 2010, 36(1): 47-50 (in Chinese)
- [12] Guilhabert M R, Kirkpatrick B C. Identification of *Xylella fastidiosa* antivirulence genes: Hemagglutinin adhesins contribute a biofilm maturation to *X. fastidiosa* and colonization and attenuate virulence [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2005, 18(8): 856
- [13] Koczan J M, McGrath M J, Zhao Y, Sundin G W. Contribution

- of *Erwinia amylovora* exopolysaccharides amylovoran and levan to biofilm formation: Implications in pathogenicity[J]. *Phytopathology*, 2009, 99(11): 1237-1244
- [14] Lin B R, Shen H F, Pu X M, Tian X S, Zhao W J, Zhu S F, Dong M M. First report of a soft rot of banana in mainland China caused by a *Dickeya* sp (*Pectobacterium chrysanthemi*) [J]. *Plant Disease*, 2010, 94(5): 640
- [15] Zhang J X, Lin B R, Shen H F, Pu X M. Genome sequence of the banana pathogen *Dickeya zea* strain MS1, which caused bacterial soft rot [J]. *Genome Announcements*, 2013, 1(3): e00317-13
- [16] Jahn C E, Selimi D A, Barak J D, Charkowski A O. The *Dickeya dadantii* biofilm matrix consists of cellulose nanofibres, and is an emergent property dependent upon the type III secretion system and the cellulose synthesis operon [J]. *Microbiology*, 2011, 157(10): 2733-2744
- [17] Haque M M, Tsuyumu S. Role of PhoP-PhoQ two-component system in biofilm formation of the phytopathogen *Dickeya dadantii* strain 3937 [J]. *The Agriculturists*, 2010, 6(1): 108
- [18] Prigent-Combaret C, Zghidi-Abouzeid O, Effantin G, Lejeune P, Reverchon S, Nasser W. The nucleoid-associated protein Fis directly modulates the synthesis of cellulose, an essential component of pellicle-biofilms in the phytopathogenic bacterium *Dickeya dadantii* [J]. *Molecular Microbiology*, 2012, 86(1): 172-186
- [19] de Campos P A, Royer S, Batistão D W, Araújo B F, Queiroz L L, de Brito C S, Gontijo-Filho P P, Ribas R M. Multidrug resistance related to biofilm formation in *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* clinical strains from different pulsotypes [J]. *Current Microbiology*, 2016, 72(5): 617-627
- [20] Denkhaus E, Meisen S, Telgheder U, Wingender J. Chemical and physical methods for characterisation of biofilms [J]. *Microchimica Acta*, 2007, 158(1-2): 1-27
- [21] Daep C A, Lamont R J, Demuth D R. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with oral streptococci requires a motif that resembles the eukaryotic nuclear receptor box protein-protein interaction domain [J]. *Infection and Immunity*, 2008, 76(7): 3273
- [22] Chavant P, Martinie B, Meylheuc T, Bellon-Fontaine M N, Hebraud M. *Listeria monocytogenes* LO₂₈: Surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(2): 728-737
- [23] Quiryren M, Bollen C M L. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man [J]. *Journal of Clinical Periodontology*, 2005, 22(1): 1-14
- [24] Lee Y A, Yu C P. A differential medium for the isolation and rapid identification of a plant soft rot pathogen, *Erwinia chrysanthemi* [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, 64(2): 200-206
- [25] Hancock V, Witsø I L, Klemm P. Biofilm formation as a function of adhesin, growth medium, substratum and strain type [J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2011, 301(7): 570-576
- [26] Reeser R J, Medler R T, Billington S J, Jost B H, Joens L A. Characterization of *Campylobacter jejuni* biofilms under defined growth conditions [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(6): 1908-1913
- [27] Teh A H T, Lee S M, Dykes G A. The Influence of prior modes of growth, temperature, medium, and substrate surface on biofilm formation by antibiotic-resistant *Campylobacter jejuni* [J]. *Current Microbiology*, 2016, 73(6): 859-866
- [28] Azevedo N F, Pinto A R, Reis N M, Vieira M J, Keevil C W. Shear stress, temperature, and inoculation concentration influence the adhesion of water-stressed *Helicobacter pylori* to stainless steel 304 and polypropylene [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(4): 2936-2941
- [29] Zhou G, Li L J, Shi Q S, Ouyang Y S, Chen Y B, Hu W F. Effects of nutritional and environmental conditions on planktonic growth and biofilm formation of *Citrobacter werkmanii* BF-6 [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, 23(12): 1673-1682
- [30] Stepanović S, Ćirković I, Mijač V, Švabić-Vlahović M. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp [J]. *Food Microbiology*, 2003, 20(3): 339-343
- [31] Dewanti R, Wong A C. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O₁₅₇: H₇ [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1995, 26(2): 147
- [32] Nostro A, Cellini L, di Giulio M, D'Arrigo M, Marino A, Blanco A R, Favaloro A, Cutroneo G, Bisignano G. Effect of alkaline pH on *Staphylococcal* biofilm formation [J]. *Apmis*, 2012, 120(9): 733-742