

细菌生物膜在农产品病害生物防治中的作用及其增强方式

周文文 聂麟杰 解婉悦 叶婉琼

(浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 浙江 杭州 310058)

摘要:生物膜是生长在物质表面的具有一定黏附性的微生物群落,其中的微生物被包裹在一些自产的多糖、蛋白质、脂质和细胞外DNA组成的胞外聚合物基质中。生物膜难以去除且抗性较强,其对医疗卫生、食品以及海洋工业等方面都存在一定的危害。然而,由芽孢杆菌等细菌形成的生物膜可广泛应用于农业、食品、医药、环境等领域,且可以通过干扰群体感应以及改善培养的环境条件来促进生物膜的生长。作者概述了生物膜形成的过程,重点介绍了细菌生物膜在农产品采前采后的生物防治中的应用,阐述了目前用于促进细菌生物膜形成的方法,为进一步在农业及食品领域开发生物膜的有益功能提供借鉴。

关键词:生物膜;生物防治;芽孢杆菌;生物膜增强

Biocontrol Effect of Bacteria Biofilm on Agricultural Products and Its Enhancement Approach

ZHOU Wenwen NIE Linjie XIE Wanyue YE Wanqiong

(College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: Biofilms are sessile microbial communities growing on surfaces, which are encased in some self-produced polysaccharides, proteins, lipids, and extracellular DNA. Biofilms were often supposed to be potentially destructive to the environment and detrimental to medical, food, and marine industries due to their tough structures and difficult to remove from surface. However, the biofilms formed by bacteria such as *Bacillus* can be widely used in agriculture, food, medicine, environment and other fields, and can promote biofilm formation by interfering with quorum sensing and improving the environmental conditions of culture. The author summarizes the process of biofilm formation, focuses on the application of biofilms in the pre-harvest and post-harvest biological control of agricultural products, and explains some strategies currently used to promote the formation of biofilms, which aims to provide reference for further development and application of biofilms in the fields of agriculture and food.

Keywords: biofilm; biological control; *Bacillus*; biofilm enhancement

细菌生物被膜的概念由 Costerton 等^[1]首次提出,此后人们逐渐开始对生物膜进行系统的研究。据统计,地球上 40%~80% 的细菌可以形成生物膜^[2]。生物膜作为一种微生物多细胞群落,可以由

单一种类的微生物或不同种类的微生物形成,如细菌、原生动物、古细菌、丝状真菌和酵母等^[3-5]。由于生物膜难以去除且耐药性较强,对医疗卫生、食品以及海洋环境等方面都存在一定的危害,因

基金项目:浙江省自然科学基金项目(LY20C200005)。

通信作者:周文文(1982—),女,博士,副教授,主要从事微生物代谢调控与发酵工程、食品微生物与生物技术、应用微生物学研究。E-mail: vivianzhou11@zju.edu.cn

收稿日期:2022-02-22 **改回日期:**2022-03-20

此目前的研究重点是如何预防和控制它的形成。然而,生物膜还在植物保护、果实采后防治、废水处理等方面发挥着有益的作用,可以通过调节黏附表面、干扰群体感应以及改善培养环境条件来促进生物膜的形成和发展。作者综述了细菌生物膜在农产品生物防治中的作用以及应用前景,为生物膜有益功能的基础研究及实际应用提供参考。

1 生物膜的形成

生物膜中的微生物被由多糖、蛋白质、脂质和细胞外 DNA 等组成的胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)包裹,这些基质形成了一个内聚的三维聚合物网络,可以为生物被膜提供一定的机械稳定性,同时促进了菌体与物体表面的黏附^[6],其中微生物在干物质总质量中占比较少,而胞外物质质量分数达到 50%~90%^[7]。

细菌由浮游或分散状态转变为生物膜的过程受细胞、基质和周围介质之间的相互作用影响。细菌和非生物表面之间的黏附通常是由非特异性相互作用(如疏水性)介导,而对生物组织的黏附是通过特定分子(如黏附素)对接机制实现的,整体可以分为 5 个阶段^[8],见图 1。

第一阶段为可逆黏附阶段。浮游微生物游动到靠近接触面的地方,在分子间力、疏水相互作用的帮助下附着在表面上,该阶段的黏附是可逆的,细胞表面的疏水性、鞭毛以及胞外多糖或蛋白质的存在都可以使菌体摆脱接触面^[9];第二阶段为不

可逆黏附阶段。细胞外聚合物促进了细胞和表面之间的黏附,细胞表面结构鞭毛也发挥着重要的作用^[7]。如果在第二阶段结束时没有额外的物理或化学干预,黏附将变得不可逆转,只有通过强物理或化学手段才能将其去除;第三阶段为微菌落形成阶段。随着微生物的附着,逐渐形成微菌落,这些菌落直径为数十或数百微米,微菌落之间分布着错综的通道网,可运送酶、养料和代谢废料等物质,最终嵌入在水合聚合物基质中。细菌细胞产生大量 EPS,这些表面的胞外多糖层对于生物膜的建立和维持具有重要意义^[10];第四阶段为生物膜成熟阶段。在此阶段,随着细胞复制和 EPS 积累,生物膜中的细胞相互黏合,细菌细胞合成并释放信号分子以感知彼此的存在,不断促进微菌落的形成和生物膜的成熟;第五阶段为脱落阶段。在某一时刻,生物膜达到临界质量,处于动态平衡,此时最内层的细胞会静止或死亡,而外层细菌细胞脱离生物膜并恢复到独立的浮游生活方式。这些生物可以随流体到达其他表面继续开始新的生物膜循环^[11],这对于菌体的繁殖意义重大。

2 细菌生物膜的有益应用

微生物从自由生存的生物体转化为固着生物膜细胞后,具有了感知周围环境和快速摄取营养物质的优势,生物膜也为细胞提供保护屏障,使其免受物理、化学或生物侵害和不断变化的环境条件的影响,从而提高了微生物的存活率^[12],但这会导致一些微生物对常规抗生素、消毒剂和

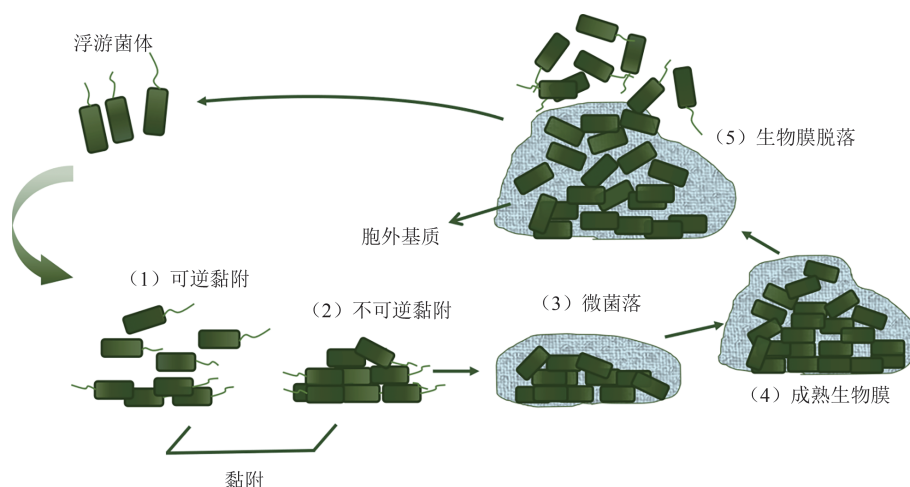


图 1 生物膜形成的 5 个阶段

Fig. 1 The five stages of biofilm development

宿主免疫系统具有更高的抗性。因此,最初认为生物膜对环境具有潜在的破坏性并对人类健康有害^[13-15]。随着时间的推移,人们发现了生物膜的优点,见表 1。生物膜可以用于食品发酵、植物保护、生物修复、废水处理、防腐蚀、燃料电池等方面,涉及到食品、农业、医疗、环境等多个领域^[16-21]。根据已有的报道,包括芽孢杆菌属^[22]、乳酸菌属^[23]、肠

球菌属^[24]、假单胞菌属^[25]、醋酸杆菌属^[26]以及部分真菌^[27]等在内的菌株均可以产生有益功能的生物膜。生物膜在自然界普遍存在,与人类的生活和生产密切相关,除了控制其有害的一面,开发生物膜的有益功能也将是一种新的研究思路,可能会促进相关生物新技术的产生和应用。

表 1 生物膜的有益功能
Table 1 Beneficial functions of biofilms

应用领域	生物膜功能
生物防治	合成分泌抗菌物质,通过群集运动大量定殖,防止病原体入侵,促进植物利用营养物质,可被制成生物防治剂商品化使用
环境污染修复	提高细胞对环境压力、病原体及有害化学物质的耐受性,控制细胞产生胞外酶代谢污染物,参与烃类降解、农药降解、重金属生物修复、水污染生物修复、抗生素生物修复等
电子传递	细胞附着在电极上形成电活性生物膜,可增强电子传递效率,进行绿色能源生产、有机品电合成、电源供应、传感器应用等
发酵食品工业	启动发酵过程,提高发酵速度,促进发酵食品产生特征风味,形成特别的质地与色泽,延长食品货架期
抑制金属腐蚀	可通过消耗氧气、产生抑菌物质或表面活性剂直接抑制腐蚀,也可通过微生物的新陈代谢活动在材料表面形成一层防护层,间接抑制腐蚀
人体肠道菌群	存在于胃肠道的黏膜表面或腔内,与宿主健康或疾病相关,为菌群提供稳定环境,参与食物和药物代谢

2.1 生物膜在农产品采前保护中的应用

植物生物膜在绿色生态农业特别是作物生产、保护和改良方面表现出了巨大的潜力^[20],有益的生物膜可以用作生物肥料和生物防治剂。生物防治是一种环保、经济和可持续防治植物病害的

策略,覆盖在植物叶片和根部的生物膜可以防止病原体入侵,并有助于植物利用土壤里的营养物质,对植物的生长意义重大,见表 2。从这个意义上说,生物膜为绿色可持续的粮食和农业发展提供了新的方式。

表 2 细菌生物膜在农产品采前保护中的作用

Table 2 Function of bacterial biofilms in preharvest protection of agricultural products

生物膜形成细菌	对于植物的有益效果
解淀粉芽孢杆菌	促进植物生长、防治植物溃疡病、增强植物耐旱性、减少植物对重金属的吸收 ^[28-30]
枯草芽孢杆菌	增强植物对病原体的防御能力、促进菌株的根际定殖 ^[31-33]
荧光假单胞菌	抑制病原菌生长、生物防治、促进植物生长 ^[34-35]
绿针假单胞菌	促进菌株的根际定殖,利于菌株发挥促生和生防作用 ^[36]
地衣芽孢杆菌	生物防治、促进植物生长 ^[34, 37]
吡咯伯克霍尔德氏菌	提升生物防治效果,增强植物环境抗逆性 ^[38]
短小芽孢杆菌	防治番茄枯萎病、促进植物生长、增强耐盐性 ^[39-41]
多黏类芽孢杆菌	抑制番茄青枯病、促进植物生长 ^[42-43]
日本慢生根瘤菌	增强固氮酶活性,促进固氮,提高植株对病原体的抗性 ^[44]
苜蓿中华根瘤菌	有助于根际定殖 ^[45]
恶臭假单胞菌	促进小麦生长,降低土壤污染 ^[46]

根际促生细菌 (plant growth promoting rhizobacteria, PGPR) 是一群定殖于植物根部,与植物生长发育密切相关的细菌,细菌在根部或根部周围活跃生长,促进植物营养成分的利用,也抑制土壤中植物病原体^[47]。PGPR 在商业上用于植物

病害的生物防治、生物施肥、植物刺激或植物修复。大多数市售的 PGPR 产品都含有芽孢杆菌菌株,芽孢杆菌广泛存在于自然环境中,是最常见的内生细菌,在植物根系大量定殖。其具有内生孢子能力,抗逆性强,生长稳定且繁殖速度快,可以合成

并分泌抗菌物质,已经被广泛应用于生物防治、植物促生等方面^[48-49]。生物防治机制主要包括生防菌产生抑菌物质或裂解酶、与病原菌竞争营养和空间、信号干扰以及诱导系统抗性。目前已有大量关于芽孢杆菌分泌的抗菌化合物的研究报道,而有效定殖作为决定生防菌活性和效率的重要因素也值得深入研究^[50]。

枯草芽孢杆菌已成为探究与生物膜发展成熟有关的分子机制的生物模型^[51]。事实上,许多芽孢杆菌都能形成高度结构化的漂浮在液体培养基表面或延展在琼脂平板上的坚固薄膜,它们利用群集运动形成生物膜并定殖在植物根部,与植物形成共生关系。大量的研究发现,芽孢杆菌的生物膜形成能力与生防菌的防治效果呈正相关。Wang等^[29]构建了生物膜强化突变体,发现生物膜的形成对解淀粉芽孢杆菌54在保护番茄抵抗干旱胁迫方面有着积极的作用。接种强化生物膜突变体的植物中菌株定殖明显增多,且能够更好抵抗干旱胁迫^[29]。多黏类芽孢杆菌HY96-2中存在生物膜正向调节基因*luxS*,将*luxS*过表达后,生防菌株对番茄青枯病的防治效率明显提高^[43]。当生物膜生长减弱时,生物防治效果也随之降低。如生物膜缺陷突变株短小芽孢杆菌HR10产生的胞外多糖和蛋白质含量显著降低,体外的群集能力也有所下降,体内定殖试验也发现菌株的定殖能力较弱,生物防治功效也有所降低^[41]。此外,Zhou等^[52]研究发现,当枯草芽孢杆菌Bs916*fliZ*缺失突变菌株的群集运动能力和生物膜形成能力降低时,其对水稻纹枯病的田间防治能力也有所减弱。

2.2 生物膜在农产品采后保护中的应用

有关根际生物膜成熟的研究给生物膜在果实采后生防上的应用带来了新的思路,生物膜在伤口处的定殖可以使果实贮存期的腐烂率有所下降。Wang等^[35]发现荧光假单胞菌ZX培养约24 h后形成成熟的生物膜,能够有效防治锦橙伤口处的绿霉病。Hao等^[53]发现低剂量的茶皂素可以促进解淀粉芽孢杆菌HF-01在柑橘果实伤口表面的生长,增强菌株生物膜的形成,也因此提高HF01对柑橘采后的生防效率。Yu等^[54]研究了光对解淀粉芽孢杆菌JBC36生物膜形成的影响,发现经光诱导后JBC36运动性和生物膜的增强会影响菌株在柑橘果实表面的定殖和存活,从而有助于提高

防治效果。巨大芽孢杆菌MHT6产生的生物膜同样可以用于保护猕猴桃免受植物病原细菌的侵害^[55]。

在一些农产品发酵过程中生物膜的形成可以改善产品的生化质量、味道、风味和质地特性。发酵剂在果皮或果皮接触表面上的定殖可以防止致病菌或腐败菌的生长。在发酵过程中,不同种类的微生物在发酵过程中发挥着重要作用,决定了最终产品的质量和风味。在橄榄发酵的过程中存在大量的乳酸杆菌,它们在橄榄表皮上定殖并占据了主导地位,切片观察发现橄榄表皮上有大量乳酸杆菌和酵母聚集形成的生物膜,生物膜的形成使发酵菌株包埋在胞外多糖基质中,即使在发酵环境中对低pH、高盐浓度和酚类化合物也能够长期存活^[56-57]。

3 增强生物膜的方式

如何控制生物膜的有害作用一直以来备受研究者的关注^[58-59],与此同时,研究者对于如何增强具有有益功能的生物膜也进行了一系列的探索。这主要是从控制群体感应信号、外源添加根系分泌物和金属离子以及优化细菌生物膜培养基质等方面进行调节。

3.1 外源添加AI-2信号分子

群体感应信号是建立在细菌之间的一种通讯机制^[60],细菌可以产生、释放和识别这种细胞外信号分子,这种分子被称为自诱导剂(autoinducer, AI)。信号分子的浓度与菌群的密度呈正相关,当达到阈值时,信号分子就会被多种受体感知,进而激活或抑制特定靶基因的表达,调节细菌的生长代谢,如生物膜产生、细胞外酶分泌、质粒转移以及抗生素的合成^[61]等。Autoinducer-2(AI-2)存在于革兰氏阴性和阳性细菌中,参与种内与种间的信息交流。研究发现通过外源添加群体感应信号分子AI-2可以增强解淀粉芽孢杆菌SQR9的生物膜形成,并促进其运动性和在玉米根际中的定殖^[62]。Ding等^[63]发现添加了核桃寡肽后,植物乳杆菌Z7可能刺激群体感应系统来调节生物膜的生长,使生物膜形成增强,从而增加了细菌对不利环境的抵抗力。Liu等^[64]研究了过表达*luxS*基因对于类植物乳杆菌的影响,*luxS*编码参与AI-2生成的酶,最终导致AI-2的产生。结果显示过表达

*luxS*可以促进类植物乳杆菌 L-ZS9 生成 AI-2 信号分子,增强该菌株生物膜的形成能力。外源补充 AI-2 同样可以促进双歧杆菌 NCC2705 生物被膜的形成^[65]。

3.2 外源添加金属离子

重金属对于细胞的生长、细胞活力和生物膜的形成存在一定的毒性^[66-67],而有些金属离子对生物膜可以起到积极的作用,涉及多种细胞生理过程,包括生物膜结构的形成与维持、EPS 的分泌和细菌运动。

3.2.1 钙离子 由于 EPS 含有带负电荷的官能团,二价离子有可能与 EPS 结合,从而改变其整体结构和功能^[68]。培养基中的钙离子可通过抑制生物膜基质中的静电排斥力或通过形成钙离子桥来增强枯草芽孢杆菌的生物膜。在培养过程中去除钙离子对生物膜基质基因的表达没有影响,但使生物膜的结构弱化,推测 Ca^{2+} 能够增强生物膜基质结构的稳定性^[68-69]。

3.2.2 铁离子 胞外 DNA (eDNA) 是一种随处可见的生物膜基质聚合物,促进大多数受试细菌物种的附着和生物膜形成,其自身的电荷性质使其可以螯合二价金属阳离子^[70]。研究表明,铁离子对细菌生物膜的形成至关重要。亚铁离子(Fe^{2+})和三价铁离子(Fe^{3+})通过刺激 eDNA 和细胞外多糖的产生,促进了空肠弯曲杆菌的生物膜形成^[71]。Lin 等^[72]向含有铁螯合剂的培养基中添加亚铁离子恢复了金黄色葡萄球菌 SA113 形成生物膜的能力,说明铁可正向调节金黄色葡萄球菌的生物膜形成。Qin 等^[73]提出了三价铁离子在枯草芽孢杆菌中促进生物膜形成的 2 种方式,一种方式为大量铁离子作为电子受体参与生物膜基质中的细胞外电子转移(EET)过程;另一种方式为小部分铁被内化,在促进氧化呼吸过程中细胞内电子转移(IET)所必需的多种含铁酶的产生方面发挥关键作用。EET 和 IET 都可以帮助芽孢杆菌建立强大的膜电位,参与生物膜形成过程中相关基因的表达。

3.2.3 锰离子 包括枯草芽孢杆菌在内的一些细菌需要 Fe^{2+} 和 Mn^{2+} 共同存在才能正常生长和发挥生理功能, Mn^{2+} 在细菌中最重要的作用是参与抗氧化应激反应,且对枯草芽孢杆菌的生物膜发育非常重要^[74-75]。 Mn^{2+} 可以增强生物膜的密度、促进

生物膜形成并加速生物膜成熟。陈凯等^[76]发现 Mn^{2+} 的存在使生物膜受到刺激分泌出了更多的紧密黏附型 EPS, EPS 含有的蛋白质和多糖可以保护微生物免受伤害。Mhatre 等发现 Mn^{2+} 在芽孢杆菌属中许多细菌的孢子萌发过程中起到关键作用,且在无 Mn^{2+} 的情况下,枯草芽孢杆菌中参与生物膜形成的基因有所下调^[75]。甘油与 Mn^{2+} 共同作用可在普通 LB 培养基中刺激枯草芽孢杆菌 NCIB 3610 中结构化菌落生物膜的形成,且这种促进作用在其他芽孢杆菌属物种中是保守的^[77]。

3.3 外源添加根际分泌的小分子有机酸

根系分泌物的主要成分为碳水化合物、糖类、氨基酸、有机酸等,这些可作为微生物的营养物质,且会在根际产生营养梯度,从而引导细菌向植物根部移动。这些物质也可以作为信号分子,吸引微生物到根部促使根部生物膜的形成,在连接植物和微生物方面发挥着至关重要的作用^[78]。小分子有机酸,如 L-苹果酸、富马酸、草酸与柠檬酸,是根际细菌活动重要因素。已有许多研究报道了外源添加根系分泌的有机酸对于菌株生物膜的形成和根系定殖的影响。可以利用根系分泌物作为生物防治剂进行繁殖和增殖,促进生物膜的形成。

体外添加玉米根系分泌物可以增强解淀粉芽孢杆菌 SQR9 生物膜的形成,其中的葡萄糖通过促进细菌的生长增强生物膜,富马酸通过诱导与基质生产有关的 *epsD* 和 *tapA* 基因表达来刺激生物膜形成,而柠檬酸同时使用这两种机制^[79]。Yuan 等^[80]发现苹果酸刺激了解淀粉芽孢杆菌 NJN-6 的趋化性,富马酸诱导了生物膜形成,与生物膜形成相关的基因也被刺激表达。Chen 等^[81]发现一定浓度的 L-苹果酸能够直接或间接被 KinD 识别,以依赖于 KinD CACHE 域的方式刺激枯草芽孢杆菌生物膜的形成。Jin 等^[82]报道了根系分泌的苹果酸和葡萄糖促进贝莱斯芽孢杆菌 S3-1 的趋化反应和蜂群运动,也使得其在玉米根表面定殖的数量增加。蒙氏假单胞菌和假单胞菌 K6 两种菌的生物膜形成在添加 10 $\mu\text{mol/L}$ 苹果酸后都达到了峰值^[78]。生物膜还有助于降解土壤中的污染,添加 80 $\mu\text{mol/L}$ 的 L-苹果酸显著刺激磺酰脲类除草剂高效降解菌 *Hansschlegelia zhihuaiae* S113 生物膜的形成,培养 48 h 后生物量增加了 12.6%,且生物膜对土壤中苯磺隆的降解和玉米生长表现出更有利的影响^[83]。

3.4 优化培养基质

菌株培养过程中基质成分对于生物膜的形成也有较大影响。Fu等^[38]在TSB培养基中加入甘油和MgSO₄后刺激了吡咯伯克霍尔德氏菌JK-SH007生物膜产生,且提高了JK-SH007在低营养环境中的存活率以及对病原体的拮抗能力。与对照组相比,在培养基中补充柠檬酸钠增加了生物膜的生物量,使微生物群落结构中变形菌的相对丰度和优势增加^[5]。类芽胞杆菌CCB36在含有壳聚糖纳米颗粒(CNPs)的固体培养基上生长时,生物膜的形成能力增强,CNPs还增强了CCB36菌株的生物防治特性,为马铃薯提供了更好的保护^[84]。荣格达利梭菌在含有200 mmol/L氯化钠(NaCl)的培养基中培养3 d后,附着在表面上的生物量体积比对照组高20倍,且NaCl促进了菌株在玻璃、石墨和玻璃碳上形成生物膜^[85],低浓度NaCl同样促进了蜡样芽孢杆菌生物膜的生长^[86]。Sarti等^[87]探究了不同碳源下枯草芽孢杆菌斯氏亚种的生物膜形成能力,发现在葡萄糖马铃薯培养基中生成生物膜的生物量最高,且对降解过程的抵抗力最强,在室温7 d后显示出降解迹象。

有研究报道了优化后的培养基配制方法。马悦等^[88]发现在37℃、pH为7.0时,添加3.0~6.0 g/dL的葡萄糖、3.0 g/dL的蔗糖和1.0 g/dL的MgCl₂或0.01 g/dL的CaCl₂的培养基对蜡状芽孢杆菌生物膜形成的促进效果最为明显。潘晓鸿等^[89]优化了枯草芽孢杆菌生物膜的生长条件,确定了温度为25℃时,在含有12 g/L的葡萄糖、10 mmol/L的Mg²⁺、1 mmol/L的Ca²⁺,初始pH 8.0(灭菌前)的LB培养基中培养枯草芽孢杆菌,可以形成最优的生物膜,与空白对照(纯LB培养基)相比生物膜干质量提高了40%。冯静静等^[90]发现一定质量浓度的NaCl和葡萄糖可促进生物膜的形成,37℃下菌株在pH 7.0、含有50 g/L葡萄糖及50 g/L的NaCl的TSB培养基中培养72 h可以形成最佳生物膜。

4 展望

生物膜是一把双刃剑,在农业、食品工业以及医疗卫生等领域的危害研究今后仍将继续深入,但随着人们对生物膜认识的提高,围绕生物膜在植物保护、生物修复、食品发酵、废水处理、控制腐蚀等方面的研究也将越来越多。研究者认为农产

品采前采后的生物膜处理可能是一种安全、有效、生态友好的新型生物防治策略。生物膜的活性主要与其群体感应机制有关,该机制通过信号分子提供细胞与细胞之间的相互作用,但他们的功能尚不完全清楚。作者综述了生物膜在农产品采前采后的重要应用,并总结了已有的增强生物膜的相关方式。随着下一代生物技术在生物膜研究中的应用,生物膜群落中涉及的生物体调控机制、遗传及生态作用将逐渐被挖掘,也会促进不同工业领域的发展,未来可在以下方面开展生物膜的研究:

(1)基于生物膜的有益功能进行新商业产品的开发,如微生物生物膜制剂,高效利用具有高产生物膜的有益菌。

(2)通过分子生物学、生物信息学等手段深入研究生物膜形成和扩散的调控机制,挖掘有关生物膜调节基因的深入信息,探究生物膜-自身细胞、生物膜-宿主相互关联的生物信息。

(3)探究多物种共培养条件下菌群空间结构及生物膜活性的变化,发挥生物膜的协同作用。

随着生物技术的不断发展,有关生物膜有益功能的开发与利用将会越来越多,其在农产品病害的生物防治中将发挥更大的作用。

参考文献

- [1] COSTERTON J W, GEESEY G G, CHENG K J. How bacteria stick[J]. Scientific American, 1978, 238(1): 86-95.
- [2] FLEMMING H C, WUERTZ S. Bacteria and archaea on earth and their abundance in biofilms[J]. Nature Reviews Microbiology, 2019, 17(4): 247-260.
- [3] LEONHARD M, ZATORSKA B, MOSER D, et al. Evaluation of combined growth media for *in vitro* cultivation of oropharyngeal biofilms on prosthetic silicone[J]. Journal of Materials Science-Materials in Medicine, 2018, 29(4): 45.
- [4] REN D W, MADSEN J S, SØRENSEN S J, et al. High prevalence of biofilm synergy among bacterial soil isolates in cocultures indicates bacterial interspecific cooperation[J]. The ISME Journal, 2015, 9(1): 81-89.
- [5] YAO Y, PU Y, NGAN W Y, et al. Effects of sodium citrate on the structure and microbial community composition of an early-stage multispecies biofilm model[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 16585.
- [6] FLEMMING H C, WINGENDER J. The biofilm matrix[J]. Nature Reviews Microbiology, 2010, 8(9): 623-633.
- [7] DONLAN R M. Biofilms: microbial life on surfaces[J].

- Emerging Infectious Diseases, 2002, 8(9):881-890.
- [8] JR D W M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2002, 15(2): 155-166.
- [9] HE S Y, JIA M Y, XIANG Y P, et al. Biofilm on microplastics in aqueous environment: physicochemical properties and environmental implications[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 424(B): 127286.
- [10] SAÏDI F, JOLIVET N Y, LEMON D J, et al. Bacterial glycocalyx integrity drives multicellular swarm biofilm dynamism[J]. Molecular Microbiology, 2021, 116(4): 1151-1172.
- [11] RENNER L D, WEIBEL D B. Physicochemical regulation of biofilm formation[J]. MRS Bulletin, 2011, 36(5): 347-355.
- [12] BHARDWAJ D K, TANEJA N K, D P, et al. Phenotypic and genotypic characterization of biofilm forming, antimicrobial resistant, pathogenic *Escherichia coli* isolated from Indian dairy and meat products[J]. International Journal of Food Microbiology, 2021, 336:108899.
- [13] CAPPITELLI F, POLO A, VILLA F. Biofilm formation in food processing environments is still poorly understood and controlled[J]. Food Engineering Reviews, 2014, 6(1): 29-42.
- [14] FU H H, CHEN F F, LIU W H, et al. Adding nutrients to the biocontrol strain JK-SH007 promotes biofilm formation and improves resistance to stress[J]. AMB Express, 2020, 10(1):32.
- [15] VESTBY L K, GRØNSETH T, SIMM R, et al. Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease[J]. Antibiotics, 2020, 9(2):59.
- [16] CHIOLERIO A, ADAMATZKY A. *Acetobacter* biofilm: electronic characterization and reactive transduction of pressure[J]. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2021, 7(4):1651-1662.
- [17] DANG H Y, LOVELL C R. Microbial surface colonization and biofilm development in marine environments[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2016, 80(1): 91-138.
- [18] KANCHAN A, SIMRANJIT K, RANJAN K, et al. Microbial biofilm inoculants benefit growth and yield of chrysanthemum varieties under protected cultivation through enhanced nutrient availability[J]. Plant Biosystems, 2019, 153(2):306-316.
- [19] SUNLL, ZHANGY, GUO XJ, et al. Characterization and transcriptomic basis of biofilm formation by *Lactobacillus plantarum* J26 isolated from traditional fermented dairy products[J]. LWT—Food Science and Technology, 2020, 125:109333.
- [20] MALIK A, ERGINKAYA Z, ERTEN H. Health and safety aspects of food processing technologies[M]. Cham: Springer, 2019:445-469.
- [21] XING Y H, LUO X S, LIU S, et al. A novel eco-friendly recycling of food waste for preparing biofilm-attached biochar to remove Cd and Pb in wastewater[J]. Journal of Cleaner Production, 2021, 311: 127514.
- [22] ARNAOUTELI S, BAMFORD N C, STANLEY-WALL N R, et al. *Bacillus subtilis* biofilm formation and social interactions[J]. Nature Reviews Microbiology, 2021, 19(9): 600-614.
- [23] LIQ, GÄNZLE M G. Host-adapted lactobacilli in food fermentations: impact of metabolic traits of host adapted lactobacilli on food quality and human health[J]. Current Opinion in Food Science, 2020, 31:71-80.
- [24] CONWELL M, DOOLEY J S G, NAUGHTON P J. A novel biofilm model system to visualise conjugal transfer of vancomycin resistance by environmental enterococci[J]. Microorganisms, 2021, 9(4):789.
- [25] MANN E E, WOZNIAC D J. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2012, 36(4):893-916.
- [26] GULLO M, CHINA S L, FALCONE P M, et al. Biotechnological production of cellulose by acetic acid bacteria: current state and perspectives[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(16): 6885-6898.
- [27] ROUDBARY M, VAHEDI-SHAHANDASHTI R, SANTOS A L S D, et al. Biofilm formation in clinically relevant filamentous fungi: a therapeutic challenge[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2022, 48(2):197-221.
- [28] GAUTAM S, CHAUHAN A, SHARMA R, et al. Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of bacterial canker of tomato incited by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*[J]. Microbial Pathogenesis, 2019, 130: 196-203.
- [29] WANG D C, JIANG C H, ZHANG L N, et al. Biofilms positively contribute to *Bacillus amyloliquefaciens* 54-induced drought tolerance in tomato plants[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(24):6271.
- [30] XIONG Z H, ZHENG J W, SUN H R, et al. Biofilm-overproducing *Bacillus amyloliquefaciens* P29ΔsinR decreases Pb availability and uptake in lettuce in Pb-polluted soil[J]. Journal of Environmental Management, 2022, 302(A):114016.
- [31] TOWNSLEY L, YANNARELL S M, HUYNH T N, et al. Cyclic di-AMP acts as an extracellular signal that impacts

- Bacillus subtilis* biofilm formation and plant attachment[J]. mBio, 2018, 9(2): e00341-e00318.
- [32] WANG T, WANG X C, HAN M H, et al. Enhanced spoVF operon increases host attachment and biocontrol ability of *Bacillus subtilis* for the management of *Ceratocystis fimbriata* in sweet potato[J]. Biological Control, 2021, 161: 104651.
- [33] YANG W, YAN H X, ZHANG J, et al. Inhibition of biofilm formation by Cd²⁺ on *Bacillus subtilis* 1JN2 depressed its biocontrol efficiency against *Ralstonia* wilt on tomato[J]. Microbiological Research, 2018, 215: 1-6.
- [34] ANSARI F A, AHMAD I. Fluorescent *Pseudomonas*-FAP2 and *Bacillus licheniformis* interact positively in biofilm mode enhancing plant growth and photosynthetic attributes[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 4547.
- [35] WANG Z R, MEI X F, DU M Y, et al. Potential modes of action of *Pseudomonas fluorescens* ZX during biocontrol of blue mold decay on postharvest citrus[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(2): 744-754.
- [36] 宗媛娜, 彭华松, 张雪洪. *suhB* 基因对绿针假单胞菌 HT66 生防能力的影响[J]. 微生物学通报, 2021, 48(1): 35-45.
- ZONG Y N, PENG H S, ZHANG X H. Effect of *suhB* gene on biocontrol ability of *Pseudomonas chlororaphis* HT66[J]. Microbiology China, 2021, 48(1): 35-45. (in Chinese)
- [37] YASMEEN T, AHMAD A, ARIF M S, et al. Biofilm forming rhizobacteria enhance growth and salt tolerance in sunflower plants by stimulating antioxidant enzymes activity[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2020, 156: 242-256.
- [38] FU H H, CHEN F F, LIU W H, et al. Adding nutrients to the biocontrol strain JK-SH007 promotes biofilm formation and improves resistance to stress[J]. AMB Express, 2020, 10(1): 32.
- [39] AHMAD A F, AHMAD I, PICHTEL J. Growth stimulation and alleviation of salinity stress to wheat by the biofilm forming *Bacillus pumilus* strain FAB10[J]. Applied Soil Ecology, 2019, 143: 45-54.
- [40] HEIDARZADEH N, BAGHAEE-RAVARI S. Application of *Bacillus pumilus* as a potential biocontrol agent of *Fusarium* wilt of tomato[J]. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 2015, 48(13/14/15/16): 841-849.
- [41] ZHU M L, WU X Q, WANG Y H, et al. Role of biofilm formation by *Bacillus pumilus* HR10 in biocontrol against pine seedling damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*[J]. Forests, 2020, 11(6): 652.
- [42] ABDALLAH Y, YANG M, ZHANG M, et al. Plant growth promotion and suppression of bacterial leaf blight in rice by *Paenibacillus polymyxa* Sx3[J]. Letters in Applied Microbiology, 2019, 68(5): 423-429.
- [43] YI J C, ZHANG D J, CHENG Y J, et al. The impact of *Paenibacillus polymyxa* HY96-2 luxS on biofilm formation and control of tomato bacterial wilt[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(23/24): 9643-9657.
- [44] SENEVIRATNE G, JAYASINGHEARACHCHI H S. A rhizobial biofilm with nitrogenase activity alters nutrient availability in a soil[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2005, 37(10): 1975-1978.
- [45] AMAYA-GÓMEZ C V, HIRSCH A M, SOTO M J. Biofilm formation assessment in *Sinorhizobium meliloti* reveals interlinked control with surface motility[J]. BMC Microbiology, 2015, 15: 58.
- [46] MISHRA S, NAUTIYAL C S. Reducing the allelopathic effect of *Parthenium hysterophorus* L. on wheat (*Triticum aestivum* L.) by *Pseudomonas putida*[J]. Plant Growth Regulation, 2012, 66(2): 155-165.
- [47] SANTOYO G, URTIS-FLORES C A, LOEZA-LARA P D, et al. Rhizosphere colonization determinants by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR)[J]. Biology, 2021, 10(6): 475.
- [48] CHEN K, TIAN Z H, HE H, et al. *Bacillus* species as potential biocontrol agents against citrus diseases[J]. Biological Control, 2020, 151: 104419.
- [49] SONI R, KEHARIA H. Phytostimulation and biocontrol potential of Gram-positive endospore-forming Bacilli[J]. Planta, 2021, 254(3): 49.
- [50] MENDIS H C, THOMAS V P, SCHWIENTEK P, et al. Strain-specific quantification of root colonization by plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus firmus* I-1582 and *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 in non-sterile soil and field conditions[J]. PLoS ONE, 2018, 13(2): e0193119.
- [51] VLAMAKIS H, CHAI Y R, BEAUREGARD P, et al. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way[J]. Nature Reviews Microbiology, 2013, 11(3): 157-168.
- [52] ZHOU H, YANG H, YAO K, et al. FliZ regulated the biofilm formation of *Bacillus subtilis* Bs916 and its biocontrol efficacy on rice sheath blight[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2020, 53(1): 55-64.
- [53] HAO W N, LI H, HU M Y, et al. Integrated control of citrus green and blue mold and sour rot by *Bacillus amyloliquefaciens* in combination with tea saponin[J]. Postharvest Biology and Technology, 2011, 59(3): 316-323.
- [54] YU S M, LEE Y H. Effect of light quality on *Bacillus amyloliquefaciens* JBC36 and its biocontrol efficacy[J].

- Biological Control, 2013, 64(3):203-210.
- [55] FU R M, YU F, WANG Y Y, et al. Study on biofilm in kiwi fruit biocontrol[J]. Journal of Animal and Plant Sciences, 2015, 25(3):226-231.
- [56] ARROYO-LÓPEZ F N, BAUTISTA-GALLEGO J, DOMÍNGUEZ-MANZANO J, et al. Formation of lactic acid bacteria-yeasts communities on the olive surface during Spanish-style 'Manzanilla' fermentations[J]. Food Microbiology, 2012, 32(2):295-301.
- [57] LEÓN-ROMERO Á, DOMÍNGUEZ-MANZANO J, GARRIDO-FERNÁNDEZ A, et al. Formation of *in vitro* mixed-species biofilms by *Lactobacillus pentosus* and yeasts isolated from spanish-style green table olive fermentations[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(2):689-695.
- [58] GOMES I B, LEMOS M, FERNANDES S, et al. The effects of chemical and mechanical stresses on *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* single-and dual-species biofilm removal[J]. Microorganisms, 2021, 9(6): 1174.
- [59] JIMÉNEZ-PICHARDO R, HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ I, REGALADO-GONZÁLEZ C, et al. Innovative control of biofilms on stainless steel surfaces using electrolyzed water in the dairy industry[J]. Foods, 2021, 10(1):103.
- [60] GARG N, MANCHANDA G, KUMAR A. Bacterial quorum sensing: circuits and applications[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2014, 105(2):289-305.
- [61] WILLIAMS P. Quorum sensing, communication and cross-Kingdom signalling in the bacterial world[J]. Microbiology, 2007, 153(12):3923-3938.
- [62] XIONG Q, LIU D, ZHANG H H, et al. Quorum sensing signal autoinducer-2 promotes root colonization of *Bacillus velezensis* SQR9 by affecting biofilm formation and motility[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(16):7177-7185.
- [63] DING T, LI Y. Beneficial effect and mechanism of walnut oligopeptide on *Lactobacillus plantarum* Z7[J]. Food Science & Nutrition, 2021, 9(2):672-681.
- [64] LIU L, WU R Y, ZHANG J L, et al. Overexpression of *luxS* promotes stress resistance and biofilm formation of *Lactobacillus paraplantarum* L-ZS9 by regulating the expression of multiple genes[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9:2628.
- [65] SUN Z K, HE X, BRANCACCIO V F, et al. Bifidobacteria exhibit *luxS*-dependent autoinducer 2 activity and biofilm formation[J]. PLoS One, 2014, 9(2):e88260.
- [66] HARRISON J J, CERI H, STREMICKE C A, et al. Biofilm susceptibility to metal toxicity[J]. Environmental Microbiology, 2004, 6(12):1220-1227.
- [67] SYED A, ZEYAD M T, SHAHID M, et al. Heavy metals induced modulations in growth, physiology, cellular viability, and biofilm formation of an identified bacterial isolate[J]. ACS Omega, 2021, 6(38):25076-25088.
- [68] STEIGER E L, MUELLI J R, BRAISSANT O, et al. Effect of divalent ions on cariogenic biofilm formation[J]. BMC Microbiology, 2020, 20(1):287.
- [69] NISHIKAWA M, KOBAYASHI K. Calcium prevents biofilm dispersion in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 2021, 203(14):e0011421.
- [70] LEWENZA S, JOHNSON L, CHARRON-MAZENOD L, et al. Extracellular DNA controls expression of *Pseudomonas aeruginosa* genes involved in nutrient utilization, metal homeostasis, acid pH tolerance and virulence[J]. Journal of Medical Microbiology, 2020, 69(6):895-905.
- [71] OH E, ANDREWS K J, JEON B. Enhanced biofilm formation by ferrous and ferric iron through oxidative stress in *Campylobacter jejuni*[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9:1204.
- [72] LIN M H, SHU J C, HUANG H Y, et al. Involvement of iron in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*[J]. PLoS One, 2012, 7(3):e34388.
- [73] QIN Y X, HE Y H, SHE Q X, et al. Heterogeneity in respiratory electron transfer and adaptive iron utilization in a bacterial biofilm[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 3702.
- [74] BOSMA E F, RAU M H, VAN GIJTENBEEK L A, et al. Regulation and distinct physiological roles of manganese in bacteria[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2021, 45(6):28.
- [75] MHATRE E, TROSZOK A, GALLEGOS-MONTERROSA R, et al. The impact of manganese on biofilm development of *Bacillus subtilis*[J]. Microbiology, 2016, 162(8): 1468-1478.
- [76] 陈凯, 胡学伟, 赖信可. Mn^{2+} 促进载体挂膜的机理研究[J]. 环境科学学报, 2016, 36(7):2415-2421.
- CHEN K, HU X W, LAI X K. The promotion mechanism of Mn^{2+} for biofilm formation on carrier[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2016, 36(7):2415-2421. (in Chinese)
- [77] SHEMESH M, CHAI Y R. A combination of glycerol and manganese promotes biofilm formation in *Bacillus subtilis* via histidine kinase KinD signaling[J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(12):2747-2754.
- [78] PANICHIKKAL J, KRISHNANKUTTY R E. Rhizobacterial biofilm and plant growth promoting trait enhancement by organic acids and sugars[J]. Biofouling, 2020, 36(8):990-999.
- [79] ZHANG N, YANG D Q, WANG D D, 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.
- [80] YUAN J, ZHANG N, HUANG Q W, et al. Organic acids from root exudates of banana help root colonization of PGPR strain *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6[J]. Scientific Reports, 2015, 5:13438.
- [81] CHEN Y, CAO S G, CHAI Y R, et al. A *Bacillus subtilis* sensor kinase involved in triggering biofilm formation on the roots of tomato plants[J]. Molecular Microbiology, 2012, 85(3):418-430.
- [82] JIN Y Q, ZHU H F, LUO S, et al. Role of maize root exudates in promotion of colonization of *Bacillus velezensis* strain S3-1 in rhizosphere soil and root tissue[J]. Current Microbiology, 2019, 76(7):855-862.
- [83] ZHANG H, QIAN Y Y, FAN D D, et al. Biofilm formed by *Hanschlegelia zhihuaiae* S113 on root surface mitigates the toxicity of bensulfuron-methyl residues to maize[J]. Environmental Pollution, 2022, 292(A): 118366.
- [84] PANICHIKKAL J, JOSE A, SREEKUMARAN S, et al. Biofilm and biocontrol modulation of *Paenibacillus* sp. CCB36 by supplementation with zinc oxide nanoparticles and chitosan nanoparticles[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2022, 194(4):1606-1620.
- [85] PHILIPS J, RABAEY K, LOVLEY D R, et al. Biofilm formation by *Clostridium ljungdahlii* is induced by sodium chloride stress: experimental evaluation and transcriptome analysis[J]. PLoS One, 2017, 12(1):e0170406.
- [86] 夏俊芳, 刘霞, 李晓燕, 等. 胁迫因素对玻璃表面蜡样芽孢杆菌菌膜形成的影响分析[J]. 食品工业科技, 2017, 38(7): 105-110.
- XIA J F, LIU X, LI X Y, et al. Effects of stress factors on the formation of *Bacillus cereus* biofilm on glass surfaces [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(7):105-110. (in Chinese)
- [87] SARTI G, MIGUEZ A E J C, CURÁ A J. Optimización de Las condiciones de cultivo para el desarrollo de una biopelícula bacteriana y su aplicación como biofertilizante en *Solanum lycopersicum* L. var. Rio grande. [J]. Revista de Protección Vegetal, 2019, 34(2):e01.
- [88] 马悦, 吴谦, 吴希阳, 等. 培养条件及接触材料对大米中蜡样芽孢杆菌生物被膜形成的影响[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(12):64-69.
- MA Y, WU Q, WU X Y, et al. Effects of culture condition and contact surface on formation of *Bacillus cereus* biofilm from rice[J]. Food and Fermentation Industries, 2015, 41(12): 64-69. (in Chinese)
- [89] 潘晓鸿, 洪纤纤, 方云, 等. 枯草芽孢杆菌生物膜生长条件的优化[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2020, 49(6):752-758.
- PAN X H, HONG X X, FANG Y, et al. Optimization of growth conditions for biofilm of *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2020, 49(6): 752-758. (in Chinese)
- [90] 冯静静, 杨自名, 吴静, 等. 培养条件及表面活性剂的添加对纳豆芽孢杆菌生物膜形成的影响[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(3):90-96.
- FENG J J, YANG Z M, WU J, et al. The effects of culture conditions and surfactants on the biofilm formation of *Bacillus subtilis* natto[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(3):90-96. (in Chinese)

(责任编辑:李春丽)