

赵亚男,王晓东. 环境因素对哈密瓜细菌性果斑病病菌生物膜形成的影响[J]. 江苏农业科学,2017,45(12):73-76.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.12.019

环境因素对哈密瓜细菌性果斑病病菌生物膜形成的影响

赵亚男, 王晓东

(石河子大学绿洲农作物病害防控重点实验室, 新疆石河子 832000)

摘要:为研究哈密瓜细菌性果斑病病菌(*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, 简称 *Aac*) 在不同培养条件下形成生物膜的能力, 选用微孔板体外培养、结晶紫染色、分光光度测定法检测哈密瓜细菌性果斑病病菌在不同载体、培养基、培养温度、培养时间、葡萄糖浓度、初始 pH 值条件下生物膜的形成能力。结果发现, 在 11 种供试载体中, *Aac* 在聚苯乙烯表面易形成稳定、明显的生物膜; 在供试的 6 种培养基中, 牛肉膏蛋白胨培养基 (LB) 形成生物膜能力最强; 以 LB 为培养基、聚苯乙烯孔板为载体、初始 pH 值为 7、培养温度 28 ℃、培养 24 h、葡萄糖浓度为 30.0 mmol/L 时, *Aac* 形成生物膜能力最强。结果表明, 不同载体、培养基、培养温度、培养时间、葡萄糖浓度、初始培养 pH 值均对 *Aac* 生物膜形成能力有明显影响。研究结果能为有效阻止 *Aac* 生物膜形成、有效防治哈密瓜细菌性果斑病病菌提供理论依据。

关键词:哈密瓜细菌性果斑病病菌; 生物膜形成能力; 培养条件

中图分类号: S436.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)12-0073-04

瓜类细菌性果斑病由燕麦种西瓜亚种 (*Acidovora avenae* subsp. *citrulli*, 简称 *Aac*) 引起, 是一种严重的检疫性病害^[1]。它具有发病快、危害重、防治难等特点, 给哈密瓜的安全生产造成了严重威胁, 目前尚未发现免疫的哈密瓜品种^[2-3]。在生产中长期和大量使用铜制剂、抗生素会导致环境安全、病原菌耐药性问题的产生^[4]。在自然或人工条件下, 许多细菌主要以生物膜形式存在^[5]。植物生境相关细菌生物膜的形成不仅对植物健康造成严重影响, 同时也是植物-病原物互作中具有毒性作用的致病因子^[6]。铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 在紫花罗勒根部形成生物膜而引起病害, 使受感染植物 7 d 内死亡, 根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 在寄主根部形成生物膜, 有利于将其毒性质粒注入寄主体内引起根癌病^[7]。植物病原细菌柑橘溃疡病病菌生物膜在其定殖和病害循环中起重要作用^[8]。细菌生物膜 (biofilm, 简称 BF) 是由细菌群体感应 (quorum sensing, 简称 QS) 调控产生的生理效应 (如生物膜、分泌毒性因子、群集运动等) 之一, 是通过胞外基质 (蛋白质、多糖、脂肪等) 聚集附着于生物或非生物表面形成的具有复杂结构的群落^[9-10]。处在成熟生物膜中的细菌对抗生素的耐受性是浮游细菌的 100~1 000 倍, 细菌形成生物膜后, 可通过限制药物渗透使药物在生物膜内无法达到有效抑菌浓度或影响生物膜内 pH 值而影响药物的解离度等机制, 从而降低抗生素的抑菌效能, 明显增强细菌的耐药性^[11-13]。因此, 抑制或影响细菌生物膜的形成, 降低细菌

的耐药性, 减少细菌分泌毒性因子, 提升抗生素的抑菌效能, 将大大提高细菌病害防治效果, 同时也可缓解因滥用抗生素等农药引起的环境安全问题。本试验通过测定哈密瓜细菌性果斑病病菌在体外不同培养条件下形成生物膜的能力, 以期了解哈密瓜细菌性果斑病病菌生物膜形成的干扰因素, 为有效防治哈密瓜细菌性果斑病提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试培养基 细菌培养基为营养肉汤 (NB)、胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB)、牛肉膏蛋白胨培养基 (LB)、酵母浸出粉胨葡萄糖液体培养基 (YPD)、金氏培养液 (KB)、M210 培养基。

1.1.2 供试菌株 供试菌株瓜类细菌性果斑病病菌菌株 XJ05-1 (*Aac*) 由石河子大学植物保护系王晓东提供。*Aac* 接种于 KB 培养基中, 28 ℃ 恒温培养 36 h 后备用。

1.1.3 主要仪器及试剂 Multiskan 酶标仪 (FC)、FE20 pH 计、UV-1800 紫外可见分光光度计、DNP-9272 电热恒温培养箱、96 孔板、12 孔板、葡萄糖 (分析纯)。

1.2 方法

1.2.1 *Aac* 菌悬液的制备 挑取少量 *Aac* 划线于 KB 培养基上, 28 ℃ 培养 36 h 后, 用无菌水清洗培养物, 制备 3×10^8 CFU/mL ($D_{600\text{nm}} = 1.0$) *Aac* 菌悬液。

1.2.2 *Aac* 成膜的检测 对生物膜的测定参照文献 [14-15] 描述的方法并略有改动。将浓度为 3×10^8 CFU/mL ($D_{600\text{nm}} = 1.0$) 的 *Aac* 菌悬液 35 μ L 接种于装有 100 μ L 培养基的 96 孔板中, 每个测试样品 6 次重复。28 ℃ 静置培养 24 h 后用超纯水润洗孔板 3 次, 加入 200 μ L 0.4% 结晶紫染色 30 min, 去掉染液, 润洗直至流出液澄清, 最后用 200 μ L 纯乙醇溶解, 振荡, 测定 $D_{570\text{nm}}$ 。

收稿日期: 2016-12-12

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31460485)。

作者简介: 赵亚男 (1992—), 女, 河南商丘人, 硕士研究生, 主要从事植物病害生物防治研究。E-mail: 619020353@qq.com。

通信作者: 王晓东, 博士, 副教授, 主要从事植物病害生物防治研究。

E-mail: wxd_agr@shzu.edu.cn。

1.2.3 *Aac* 在不同培养条件下生物膜形成的测定 试验载体:取 700 μL 浓度为 3×10^8 CFU/mL 菌液加入含有 2 mL KB 培养液的 12 孔板中,分别将无菌处理后表面光滑的不锈钢片(网状不锈钢片)、表面粗糙的不锈钢片、玻璃片、聚苯乙烯片、铝片、铁片、铜片、木条、锡纸、乳胶片、陶瓷片斜插入 12 孔板中,28 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 24 h,测试生物膜形成能力。

培养基:向 96 孔聚苯乙烯微量孔板中分别加入 100 μL TSB、KB、YPD、M210、NB、LB 培养基,再加入 35 μL 浓度为 3×10^8 CFU/mL 菌液。28 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 24 h,测试生物膜形成能力。

培养时间:向装有 100 μL LB 培养基的 96 孔聚苯乙烯微量孔板中加入 35 μL 浓度为 3×10^8 CFU/mL 菌悬液。在 28 $^{\circ}\text{C}$ 条件下静置培养 6、8、10、12、24、36、48、60 h 后,测试生物膜的形成能力。培养温度:向装有 100 μL LB 培养基的 96 孔聚苯乙烯微量孔板中加入 35 μL 浓度为 3×10^8 CFU/mL 菌悬液。分别在 18、23、28、33 $^{\circ}\text{C}$ 条件下静置培养 24 h,测试生物膜的形成能力。

葡萄糖浓度:取 35 μL 浓度为 3×10^8 CFU/mL 菌液加入到含有 100 μL 不同浓度葡萄糖(0.0、5.6、7.0、11.1、16.7、

20.0、30.0 mmol/L)LB 培养基的 96 孔聚苯乙烯微量孔板中,28 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 24 h,测试生物膜的形成能力。

初始 pH 值:取 35 μL 浓度为 3×10^8 CFU/mL 菌液加入到含有 100 μL pH 值分别为 9、8、7、6、5、4、3、2 的 LB 培养基中,在 96 孔聚苯乙烯微量孔板中 28 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 24 h,测试生物膜的形成能力。

1.3 数据统计与分析

采用 SAS 8.0 软件中的方差分析程序(ANOVA)分析上述各试验处理间的差异显著性。比较各处理间的差异采用 Duncan's 新复极差法。

2 结果与分析

2.1 不同附着材质对 *Aac* 形成生物膜的影响

由图 1 可见,*Aac* 在表面光滑的不锈钢片(E)、表面粗糙的不锈钢片(G)、玻璃片(K)、聚苯乙烯片(C)、铝片(D)、铁片(A)、铜片(H)、锡纸(B)、陶瓷片(J)表面可以形成生物膜,在乳胶片(F)、木条(I)上无法形成生物膜,在聚苯乙烯片上形成的生物膜明显、厚、稳定。

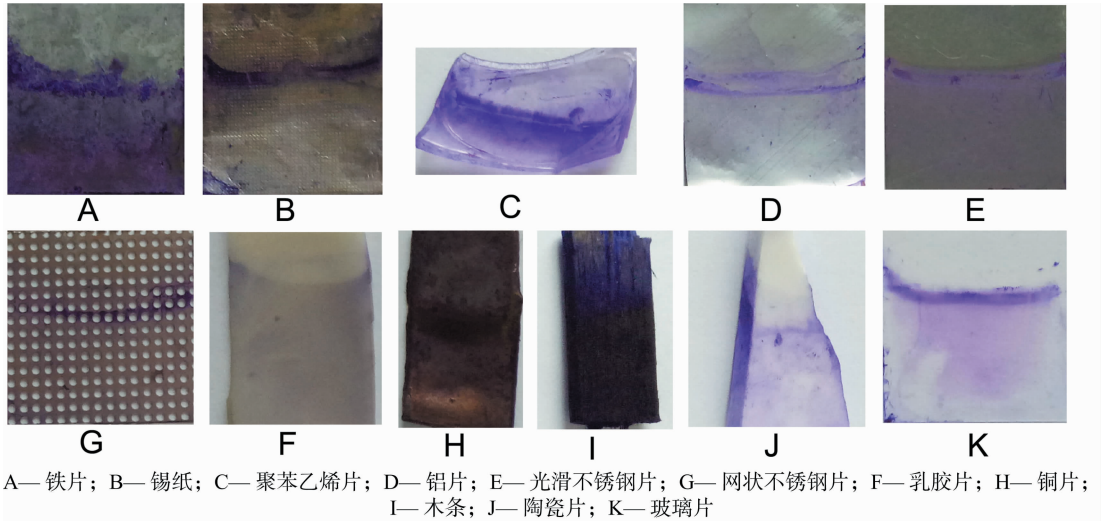


图1 不同载体对 *Aac* 生物膜形成的影响

2.2 培养基对 *Aac* 形成生物膜的影响

由图 2 可得,*Aac* 在 6 种培养基中均可形成生物膜,其中 *Aac* 在 LB 培养基中形成生物膜能力最强, $D_{570\text{ nm}}$ 最高,显著高于除 YPD 培养基外的其他试验组,在 NB 培养基中形成生物膜的能力最弱。

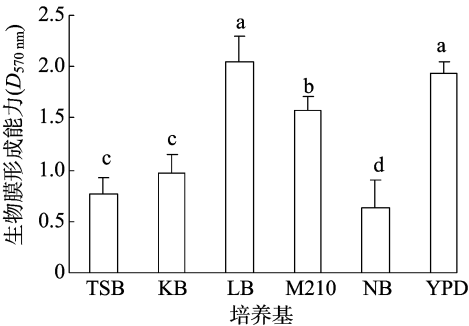


图2 培养基对 *Aac* 生物膜形成的影响

2.3 培养时间对 *Aac* 形成生物膜的影响

由图 3 可得,*Aac* 生物膜在形成初期, $D_{570\text{ nm}}$ 随着时间的延长逐渐提高,在 24 h 时 $D_{570\text{ nm}}$ 达到最高值,这时生物膜形成能力最强,而后随着培养时间的延长, $D_{570\text{ nm}}$ 逐渐下降,生物膜的形成能力逐渐减弱。

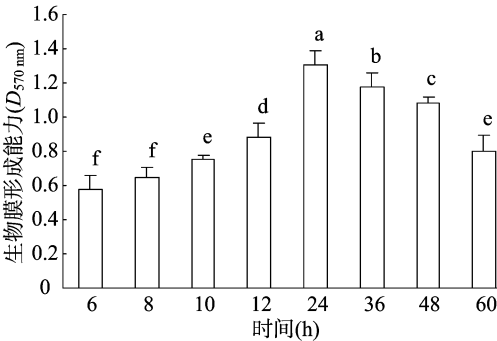


图3 培养时间对 *Aac* 生物膜形成的影响

2.4 培养温度对 *Aac* 生物膜形成的影响

由图 4 可得, *Aac* 在 18、23、28、33 ℃ 条件下均可形成生物膜, 形成生物膜能力随着温度的升高而增强, 在 28 ℃ 时, $D_{570\text{ nm}}$ 达到最大值, 随后温度升高, $D_{570\text{ nm}}$ 下降, 即生物膜形成能力减弱。

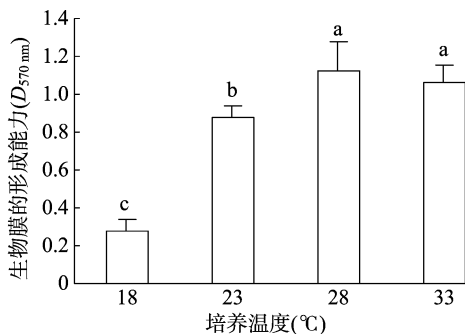


图4 培养温度对 *Aac* 生物膜形成的影响

2.5 初始 pH 值对 *Aac* 生物膜形成的影响

由图 5 可得, *Aac* 在初始 pH 值为 5、4、3、2 时几乎无法形成生物膜, $D_{570\text{ nm}}$ 接近 0; 当初始 pH 值为 7 时, 检测的 $D_{570\text{ nm}}$ 最高, 生物膜形成能力最强; 在初始 pH 值为 8~9 时, $D_{570\text{ nm}}$ 逐渐降低, 生物膜形成能力减弱。

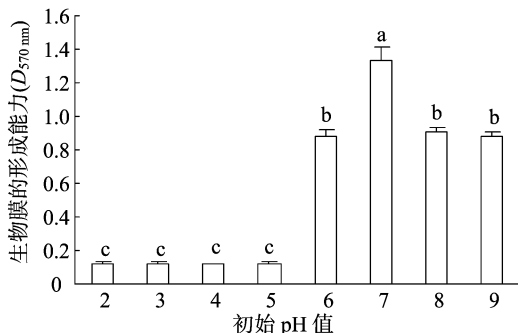


图5 初始 pH 值对 *Aac* 生物膜形成的影响

2.6 葡萄糖浓度对 *Aac* 形成生物膜的影响

由图 6 可得, *Aac* 在葡萄糖浓度为 0 时形成生物膜的能力最弱, 随着葡萄糖浓度的增加, 形成生物膜的能力逐渐增强, 在葡萄糖浓度为 30.0 mmol/L 时, $D_{570\text{ nm}}$ 最大, 形成生物膜能力最强。

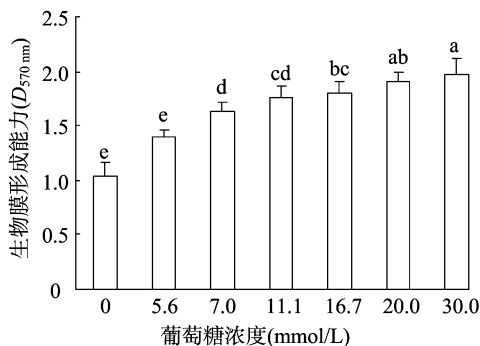


图6 葡萄糖浓度对 *Aac* 生物膜形成的影响

3 结论与讨论

本试验研究了环境因素对哈密瓜细菌性果斑病病菌生物

膜形成能力的影响发现, 成膜载体、培养基、时间、温度、葡萄糖浓度、初始 pH 值对其成膜能力均有影响。试验结果显示, 在 11 种供试载体中, *Aac* 在聚苯乙烯片上易形成明显、稳定的生物膜; 6 种供试培养基中, *Aac* 在 LB 培养基中形成生物膜的能力最强, $D_{570\text{ nm}} = 2.05$; 以 LB 为培养基、聚苯乙烯孔板为培养载体, 初始培养 pH 值为 7、葡萄糖浓度为 30.0 mmol/L、培养 24 h 时成膜能力达到最强, 所检测的 $D_{570\text{ nm}}$ 分别为 1.34、1.98、1.30。

不同温度下, *Aac* 形成生物膜的能力是不同的。18~28 ℃ 时, $D_{570\text{ nm}}$ 随温度升高逐渐提高, *Aac* 生物膜形成能力逐渐增强。彭晓云等在不同培养条件下对金黄色葡萄球菌生物膜生长影响试验中发现, 温度与生物膜呈依赖关系, 随着温度的升高, BF 表面积增大^[16]。但本研究发现, 当 *Aac* 培养温度达到 33 ℃ 时, $D_{570\text{ nm}}$ 减小, 反而抑制了成膜能力。温度过高, 可能使细胞组分(蛋白质、核酸等)产生不可逆的失活, 丧失细胞功能, 对生物膜的形成有一定的影响^[17]。

国外学者 Sutherland 发现, 只要存在能合成胞外多糖的微生物菌属, 就能形成成熟、稳定的生物膜^[18]。并且研究表明, 菌体黏附后生成的水不溶性多糖也有利于促进菌体间的聚集和维持生物膜的三维结构^[19]。本试验在检测不同葡萄糖浓度对哈密瓜细菌性果斑病菌生物膜形成的影响中发现, 在不含有葡萄糖的培养基中, *Aac* 形成生物膜的能力最低; 随着葡萄糖浓度的增加, *Aac* 形成生物膜的能力逐渐增强。葡萄糖浓度的增加促进了菌体间的相互黏附、聚集, 增强了成膜能力。同时, 杨虹等发现高浓度葡萄糖对鲍氏不动杆菌生物膜的形成能力、厚度有很强的促进作用^[20]。

在进行不同初始 pH 值对 *Aac* 生物膜形成的影响试验中发现, *Aac* 在初始 pH 值低于 6 的环境里静置培养, 成膜能力几乎丧失。初始 pH 值为 7 时, 形成生物膜的能力最强, 初始 pH 值为 8~9 时, *Aac* 具有成膜能力, 但逐渐减弱。刘文竹等研究发现, 溶藻弧菌在 pH 值低于 6 的环境里, 几乎无法形成生物膜, 成膜能力受到明显抑制^[21]。同时姜颖等研究也说明, 低 pH 值条件下, 培养的变形链球菌黏附力较弱, 影响生物膜的形成^[22]。细菌的群体感应是细菌通过分泌可溶性信号分子来检测群体密度并协调细菌生物功能的信息交流机制, 为功能性生物膜的形成提供了保证。革兰氏阴性菌的 QS 系统主要由信号分子 *N*-酰基高丝氨酸内酯(*N*-acyl-homoserine lactones, 简称 AHLs)、AHLs 合成酶 Lux I 族蛋白、AHLs 受体 LuxR 族蛋白组成^[23]。作为 QS 系统中的关键因子, AHLs 可以调控细菌的生物膜形成、群游现象、抗生素的合成等多种生理生化功能^[24]。关于偏酸性的环境是否对 *Aac* 的群体感应系统存在影响, 这将是后续试验的重点。

参考文献:

- [1] 赵廷昌, 孙福在, 王兵万, 等. 哈密瓜细菌性果斑病原菌鉴定[J]. 植物病理学报, 2001, 31(4): 357-364.
- [2] 林德佩. 瓜类作物细菌性果腐斑病(BFB)防治研究概述[J]. 中国瓜菜, 2005(4): 35-37.
- [3] 李威, 任毓忠, 丁建军, 等. 新疆瓜类细菌性果斑病种抗病性鉴定[J]. 北方园艺, 2007, 2007(3): 186-188.
- [4] 王晓东. 防治哈密瓜细菌性果斑病拮抗酵母菌的筛选及其生防

- 机理研究[D]. 武汉:华中农业大学,2009.
- [5] Web J S, Givskov M, Kjelleberg S. Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity[J]. Curr Opin Microbiol, 2003, 6(6): 578–585.
- [6] Yang L, Aagensen J A, Jelsbak L, et al. *In situ* growth rates and biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa* population in chronic lung infections[J]. J Bacteriol, 2008, 190(8): 2767–2776.
- [7] 陈云. 枯草芽孢杆菌生物膜在青枯病生防中的功能研究及 Cyclic-di-GMP 信号通路初探[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [8] Rigano L A, Siciliano F, Enrique R, et al. Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2007, 20(10): 1222–1230.
- [9] 刘国勇, 王泳珊, 程超, 等. 细菌生物膜抑制剂 3,4-二氯喹-2(5H)-酮联合庆大霉素对铜绿假单胞菌的抑制作用[J]. 中国新药杂志, 2010(4): 327–331.
- [10] Vu B, Chen M, Crawford R J, et al. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation[J]. Molecules, 2009, 14(7): 2535–2554.
- [11] Potera C. Forging a link between biofilms and disease[J]. Science, 1999, 283(5409): 1837–1839.
- [12] Costerton J W, Stewart P S, Greenberg E P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections[J]. Science, 1999, 284(5418): 1318–1322.
- [13] Olson M E, Ceri H, Morck D W, et al. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics[J]. Canadian Journal of Veterinary Research, 2002, 66(2): 86–92.
- [14] Christensen G D, Simpson W A, Younger J J, et al. Adherence of coagulase-negative *Staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *Staphylococci* to medical device[J]. J Clin Microbiol, 1985, 22(6): 996–1006.
- [15] Li X Z, Hauer B, Rosche B. Single species microbial-biofilm screening for industrial applications[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 76(6): 1255–1262.
- [16] 彭晓云, 黄晓敏, 郑秋桦, 等. 不同培养条件对金黄色葡萄球菌生物膜生长影响实验研究[J]. 陕西医学杂志, 2009, 38(7): 780–782.
- [17] 陈建贞. 温度、CO₂ 浓度变化对自然生物膜的影响[D]. 南京: 南京林业大学, 2013.
- [18] Sutherland I W. The biofilm matrix: an immobilized but dynamic microbial environment[J]. Trends in Microbiology, 2001, 9(5): 222–227.
- [19] Burgemeister S, Decker E M, Weiger R, et al. Bacterial effect of delmopinol on attached and planktonic *Streptococcus sanguinis* cells[J]. European Journal of Oral Sciences, 2001, 109(6): 425–427.
- [20] 杨虹, 药飞, 李晓霞, 等. 不同浓度葡萄糖对多药耐药鲍氏不动杆菌生物膜形成能力的影响[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(3): 498–501.
- [21] 刘文竹, 李红月, 范学亭, 等. 环境因素对溶藻弧菌 HN08155 生物膜形成的影响[J]. 海南大学学报(自然科学版), 2015, 33(4): 365–371.
- [22] 姜颖, 张铁柱, 杨锦波, 等. 酸性环境对变形链球菌黏附力的影响[J]. 广东牙病防治, 2008, 16(9): 398–399.
- [23] 陈静, 刘显军, 边连全, 等. 细菌生物膜及细菌群体感应系统的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2010(5): 32–33.
- [24] Ansaldi M, Marolt D, Stebe T, et al. Specific activation of the *Bacillus quorum*-sensing systems by isoprenylated pheromone variants[J]. Molecular Microbiology, 2002, 44(6): 1561–1573.
- (上拉接第 63 页)
- RcMYB* 基因在烟草中的成功表达有效地提高了转基因植株的抗旱性。本试验可为今后利用转基因技术提高烟草抗逆性, 扩大其应用范围提供可行性依据, 也为其他植物的抗逆性分子机制的研究提供理论参考。
- 参考文献:**
- [1] Gonda T J. The c-Myb oncoprotein[J]. Int J Biochem Cell Biol, 1998, 30(5): 547–551.
- [2] Ito M. Factors controlling cyclin B expression[J]. Plant Mol Biol, 2000, 43(5/6): 677–690.
- [3] 刘蕾, 杜海, 唐晓凤, 等. MYB 转录因子在植物抗逆胁迫中的作用及其分子机理[J]. 遗传, 2008, 30(10): 1265–1271.
- [4] 陈俊, 王宗阳. 植物 MYB 类转录因子研究进展[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2002, 28(2): 81–88.
- [5] 赵世杰, 许长成, 邹琦. 植物组织中丙二醛测定方法的改进[J]. 植物生理学通讯, 1994, 30(3): 207–210.
- [6] 李孝凯, 沙伟, 国春晖, 等. 低温胁迫对毛尖紫萼藓、东亚砂藓生理生化及光合特性的影响[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(10): 355–359.
- [7] 单长卷, 郝文芳, 张慧成. 土壤干旱对冬小麦幼苗生理特性的影响[J]. 河北农业大学学报, 2006, 29(4): 6–10, 18.
- [8] 覃鹏, 刘叶菊, 刘飞虎. 干旱胁迫对烟草叶片丙二醛含量和细胞膜透性的影响[J]. 亚热带植物科学, 2004, 33(4): 8–10.
- [9] 吴晓丽, 甘丽萍, 钟彦. 外源 NO 供体硝普钠对干旱胁迫下裸大麦幼苗光合特性、游离脯氨酸及抗氧化酶的影响[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(5): 85–88.
- [10] Morgan J A. The effects of N nutrition on the water relations and gas exchange characteristics of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Plant Physiology, 1986, 80(1): 52–58.
- [11] Singh T N, Aspinall D, Paleg L G. Proline accumulation and varietal adaptability to drought in barley: a potential metabolic measure of drought resistance[J]. Nature New Biol, 1972, 236: 188–190.
- [12] 李洁. 干旱胁迫对青稞幼苗可溶性蛋白的影响[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(12): 124–126.
- [13] 史玉炜, 王燕凌, 李文兵, 等. 水分胁迫对刚毛怪柳可溶性蛋白、可溶性糖和脯氨酸含量变化的影响[J]. 新疆农业大学学报, 2007, 30(2): 5–8.
- [14] 徐心诚. 外源腐胺和精胺对弱光胁迫下黄瓜叶片可溶性糖含量的影响[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(7): 130–134.
- [15] 赵江涛, 李晓峰, 李航, 等. 可溶性糖在高等植物代谢调节中的生理作用[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(24): 6423–6425, 6427.