

杨 威, 闫海霞, 刘雨昕, 等. 芽孢杆菌 1JN2 产胞外多糖协助寄主植物缓解镉胁迫[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(6): 211–216.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.06.034

芽孢杆菌 1JN2 产胞外多糖协助寄主植物缓解镉胁迫

杨 威¹, 闫海霞², 刘雨昕¹, 周丹妮¹, 董光辉¹, 李正鹏¹, 罗玉明¹

(1. 淮阴师范学院生命科学学院/江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室, 江苏淮安 223300;

2. 淮安市农业技术推广中心, 江苏淮安 223300)

摘要:笔者所在课题组前期筛选到 1 株芽孢杆菌, 能够通过胞外分泌物吸附作用协助寄主植物缓解镉离子胁迫。为了深入研究该菌株吸附镉离子的胞外分泌物组分, 构建菌株胞外多糖缺失突变体, 首先通过共培养试验比较野生型及突变体菌株在镉离子处理后的生长量变化、镉离子吸附能力; 其次通过温室试验评价菌株协助寄主缓解镉胁迫效果及菌株定殖量变化; 最后通过扫描电镜比较镉离子共培养后的野生型菌株和突变体菌体及胞外分泌物形态。结果表明, 镉离子处理后野生型与突变体菌株生长量无明显差异, 但是突变体菌株对镉离子吸附性明显降低。在以番茄作为寄主进行的温室试验中, 野生型与突变体菌株定殖量在镉离子处理后先下降后上升, 在移栽后 21 d 与对照组无明显差异, 二者均能够增强寄主植物的耐受性, 与空白对照相比植物鲜质量分别增加 12%、38%, 叶绿素含量分别增加 14%、1%, 根系活力分别增加 507%、233%, 叶片相对电导率分别降低 41%、58%。但是突变体菌株处理组相对于野生型番茄茎中镉离子浓度提高了 84%。另外, 在镉离子共培养 12、24、36、48 h 后分别收集菌体, 通过扫描电镜发现野生型和突变体菌株在镉离子处理后 24 h 开始菌体能够进行自我复原。说明菌株 1JN2 主要通过胞外多糖吸附作用降低镉离子在寄主体内积累从而协助寄主植物缓解镉胁迫。

关键词: 镉胁迫; 枯草芽孢杆菌; 胞外多糖; 耐镉机制; 突变体

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2022)06-0211-06

随着工业化进程的加快和人口的持续增长, 重金属污染已成为全球性的问题^[1]。其中镉是威胁农业生产的罪魁祸首, 最新公布的《全国土壤污染状况调查公报》^[2]中显示, 土壤镉超标率居无机污染物超标率第 1 位。其中农用地土壤是受人类活动强烈影响的一类特殊土壤, 其环境质量与人们的身体健康密切相关。由于农作物的吸收作用, 重金属元素从土壤中迁移转化到农作物根茎叶及果实中去, 从而危害人们的健康^[3]。我国仅农田镉污染的面积已超过 $2.0 \times 10^5 \text{ hm}^2$, 每年生产镉含量超标农产品达 $14.6 \times 10^5 \text{ t}$ ^[4]。可以看出, 我国农用地土壤镉污染态势已经非常严峻。

利用自然环境中分离得到的有益微生物来修

复农田及水体的重金属污染就可以克服目前工程修复、电动修复以及化学修复中存在的一些弊端。其中细菌生物被膜作为细菌存在于自然界生物体或者非生物体表面的重要形态, 在重金属污染修复中具有重要作用^[5]。芽孢杆菌的生物被膜组分以及调控机制在近些年的研究中日渐清晰, 其生物被膜基质主要包括胞外多糖、蛋白质、胞外核酸及其他多聚体分子等^[6-8]。近几年国内外学者对细菌生物被膜在修复重金属污染方面开展了大量研究, 但是对生物膜中特定组分的作用还有待进一步明确。Nocelli 等发现 1 株能够固氮的苜蓿中华根瘤菌, 通过构建其胞外多糖中最主要的 2 个组分——琥珀酰聚糖和半乳糖聚糖的突变体, 证明了胞外多糖对于该菌株抵御汞和砷胁迫的必要性^[9]。Chien 等也证明了胞外多糖的产生及生物被膜的形成在假单胞菌 EJ01 抗重金属中的作用, 相对于无重金属胁迫的对照组, 处理组的胞外多糖产量提高了 50%, 通过构建生物被膜缺失突变体发现, 即使和野生型菌株产生相当量的胞外多糖, 但是该突变体对镉离子的抗性却减弱了^[10]。

本研究前期筛选得到 1 株能够有效协助寄主植

收稿日期: 2021-07-07

基金项目: 江苏省高校自然科学基金(编号: 21KJA210005); 江苏省自然科学基金(编号: BK20170467); 江苏省大学生创新训练计划(编号: 201910323013Z, 202110323060Y)。

作者简介: 杨 威(1983—), 男, 河北承德人, 博士, 副教授, 主要从事生物防治研究。E-mail: yangw107@126.com。

通信作者: 罗玉明, 教授, 主要从事生物防治研究。E-mail: yumingluo@163.com。

物缓解镉胁迫的芽孢杆菌 1JN2, 该菌株能够通过胞外分泌物吸附环境中镉离子从而缓解对寄主植物的胁迫压力^[11]。但是还不清楚胞外分泌物中哪一组分能够吸附镉离子。为了深入了解这一问题, 本研究构建了胞外多糖缺失突变体, 并比较实际作用效果中野生型和突变体菌株生长、形态变化、镉离子吸附能力的差异, 旨在为该菌株的实际应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 芽孢杆菌 1JN2 胞外多糖突变体构建及抗生素标记

根据陈云的方法^[12], 通过 Long Flanking Homology PCR (LFH-PCR) 同源重组方法首先在驯化的高感受态枯草芽孢杆菌 PY79 中构建芽孢杆菌胞外多糖糖基转移酶基因 *epsH* 突变体, 后通过噬菌体转导方式构建在 NCBI3610 菌株背景中的突变体, 再通过基因组 DNA 转化方式转入菌株 1JN2 中。相关质粒和载体由南京农业大学郭坚华教授提供。

根据郑丽的方法^[13], 分别利用利福平和氯霉素浓度梯度平板法对野生型菌株及突变体进行抗性筛选, 其中菌株 1JN2 筛选得到 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 利福平抗性菌株, 突变体菌株 1JN2 (Δeps) 筛选得到 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素抗性菌株。

1.2 菌体生长情况检测

首先, 将活化后的野生型菌株及突变体接种到 LB 培养液中, 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 摇床中培养 24 h。通过平板稀释涂布法检测培养液中菌体浓度并稀释至 10^7 CFU/mL。按照 1% 接种量接种到含有终浓度为 15 mg/L 硫酸镉的 LB 培养液中(配制培养液的水为去离子水), 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 摇床中培养 24 h, 对照组不加硫酸镉溶液。每隔 3 h 从中吸取菌液 1 mL, 通过梯度稀释涂布法检测其中菌体浓度, 每个处理 3 次重复。

1.3 离体条件下菌株镉吸附活性检测

按上述方法将野生型菌株及突变体分别接种到终浓度为 15 mg/L 硫酸镉的 LB 培养液中(培养液配制用水为去离子水), 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 摇床中培养 24 h, 对照组不加硫酸镉溶液。分别从培养后的培养液中吸取 1 mL 培养液, 离心后取上清液进行消化, 用以测定其中镉离子浓度, 溶液中镉离子浓度由淮阴师范学院分析测试中心利用电感耦

合等离子体发射光谱法测定。

1.4 盆栽条件下菌株协助寄主缓解镉胁迫活性检测

温室试验所用寄主植物为番茄, 品种为上海合作 903, 所用基质购自淮安市柴米河农业科技有限公司。首先用穴盘育苗, 待苗长出 3~4 张真叶后移栽到盆钵中, 每盆 1 株。盆钵高 10 cm, 口径为 12 cm, 每盆装基质 400~500 g。温室条件: 30 $^{\circ}\text{C}$, 每天光照时间为 16 h, 黑暗时间为 8 h。

温室试验共设 4 个处理组, 每组 3 次重复, 每个重复 24 株植株。处理组分别为菌株 1JN2 (T1JN2) 和胞外多糖缺失突变体菌株 1JN2 (Δeps) [T1JN2 (Δeps)]: 移栽时用 10^9 CFU/mL 菌悬液灌根处理, 20 mL/盆, 移栽 1 周后用 30 mg/L 硫酸镉灌根处理, 20 mL/盆。对照组 1 (CK1) 不接种菌株, 移栽 1 周后采用 30 mg/L 硫酸镉灌根处理, 20 mL/盆; 对照组 2 (CK2) 不接种菌株, 正常培养。

1.5 野生型菌株及突变体定殖量检测

重复上述温室试验, 共设 4 个处理组, 其中对照组在移栽时用 10^9 CFU/mL 菌悬液灌根处理, 20 mL/盆。处理组在移栽 1 周后用 30 mg/L 硫酸镉灌根处理, 20 mL/盆。分别在镉离子处理后的 1、3、7、14、21 d, 通过平板稀释涂布法检测菌株在番茄根部定殖量变化。

1.6 温室试验植株生理指标检测

温室试验中植株移栽后 21 d 分别检测各处理组根长、鲜质量、叶绿素含量、根系活力以及叶片相对电势, 检测方法参照《植物生理学实验指导》^[14]。

植物组织中镉离子浓度采用如下方法进行测定: 每个处理组随机选取 3 株植株, 准确称取 1 g 植物茎, 采用干法灰化(600 $^{\circ}\text{C}$ 灰化 4 h), 用 1% 盐酸洗脱灰分, 去离子水定容至 5 mL, 其中镉离子浓度测定方法同“1.3”节。

1.7 镉离子处理后菌体及胞外分泌物形态检测

将浓度为 10^7 CFU/mL 的 1JN2 和 1JN2 (Δeps) 菌悬液按照 1% 接种量接入含有 15 mg/L 硫酸镉的 LB 培养液中(培养液配制用水为去离子水), 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 摇床中培养, 分别在 12、24、36、48 h 吸取培养液, 离心收集菌体, 经超纯水洗脱后利用 2.5% 戊二醛固定, 通过扫描电镜观察菌株的群体以及单细胞形态(由淮阴师范学院分析测试中心进行检测)。以不加镉离子的处理组作为对照。

1.8 数据分析方法

温室试验结果在 Excel 中进行基本处理后,用 SPSS 16.0 通用线性模型中的 *LSD* 法进行检测 ($P = 0.05$),并进行单因素方差(One – Way ANOVA)分析。

1.9 试验时间及地点

本测验开展时间为 2019—2020 年,试验地点为江苏省淮安市、江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室及淮阴师范学院分析测试中心。

2 结果与分析

2.1 野生型菌株及突变体镉离子吸附能力变化

分别检测了芽孢杆菌 1JN2 及胞外多糖缺失突变体菌株 1JN2(Δ*eps*) 在镉离子共培养条件下吸附镉离子的能力。与未添加菌株的空白对照相比,野生型菌株在培养后上清液中镉离子去除率达到 79%,说明在 15 mg/L 镉离子浓度条件下,该菌株能够显著去除培养液中镉离子。但是,其胞外多糖缺失突变体虽然也能够吸附培养液中镉离子,但是去除率与野生型差异明显,仅为 61%,相对于野生型下降了 22.8%。说明菌株 1JN2 胞外多糖在镉离子吸附过程中具有重要作用。

2.2 镉离子对野生型菌株及突变体生长的影响

从图 1 可以看出,无论是野生型菌株还是突变体,镉离子添加后菌体的累积量均下降了。未添加镉离子条件下,在接种后 15 h,野生型及突变体菌体累积量均达到最高值,均超过 10^8 CFU/mL,随后逐渐下降,在 24 h 时仍保持在 10^8 CFU/mL。在添加镉离子后,野生型菌株菌体累积量在 12 h 达到最高值,随后呈现逐渐下降趋势,24 h 时保持在

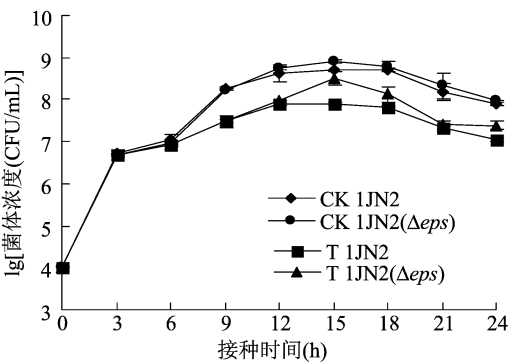


图1 镉离子对菌株 1JN2 及胞外多糖缺失突变体生长量的影响

10^7 CFU/mL;而突变体菌株在 15 h 达到最高累积量,最终菌体累积量与野生型无明显差异。

2.3 野生型菌株及突变体协助寄主植物缓解镉胁迫效果比较

从表 1 可知,无论是野生型菌株 1JN2 还是其胞外多糖缺失突变体菌株,均能够有效保护寄主免受镉离子胁迫。其中叶片相对电势相对于无菌对照组(CK1)分别降低了 41% 和 58%,与无镉离子处理对照组(CK2)相当。根系活力分别增加了 507% 和 233%,说明有益微生物的加入有效缓解了镉离子对植物的胁迫。从寄主体内镉离子累积量来看,虽然与未添加菌株的对照组相比,野生型菌株和突变体处理组番茄茎中镉离子浓度分别降低 82% 和 67%,但是与离体吸附试验相一致的是,突变体处理组番茄茎中镉离子浓度比野生型处理组高 84%。说明突变体菌株虽然在一定程度上能够增强寄主植物抗性,但是胞外多糖的缺失使菌株失去了固定镉离子的效果,导致寄主植物体内镉离子积累量增加。

表 1 温室条件下不同处理对番茄生长指标及体内镉积累的影响

处理	根长 (cm)	鲜质量 (g)	根系活力 [mg/(g·h)]	叶绿素含量 (mg/g)	叶片相对 电势	镉离子浓度 (mg/kg)
1JN2	5.43 ± 0.79a	1.42 ± 0.16ab	0.46 ± 0.08c	1.87 ± 0.05b	14.43 ± 2.11a	0.19 ± 0.06ab
1JN2(Δ <i>eps</i>)	6.22 ± 0.37a	1.74 ± 0.13c	0.25 ± 0.04b	1.66 ± 0.14a	10.35 ± 1.97a	0.35 ± 0.13b
CK1	7.33 ± 0.40b	1.26 ± 0.07a	0.08 ± 0.01a	1.64 ± 0.03a	24.51 ± 5.13b	1.06 ± 0.14c
CK2	8.83 ± 0.42c	1.57 ± 0.13bc	0.35 ± 0.06b	1.68 ± 0.05a	10.18 ± 2.51a	0.03 ± 0.00a

注:同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)。

从寄主番茄的生长指标来看,各处理组变化规律不明显,其中突变体菌株处理组番茄鲜质量显著高于对照组。但是从根长指标来看,菌株处理组反而低于无菌处理组。根据根部形态来判断,菌株处理组根系相比于无菌对照组更发达,主根长度低于无菌对照组,但是须根生长更旺盛。从寄主叶绿素

含量来看,野生型菌株处理组显著高于其他 3 组。

2.4 镉离子处理后菌株定殖量检测

为了比较镉离子处理后菌株在寄主植物根围的定殖情况,利用抗生素标记和梯度稀释涂平板法检测了野生型菌株和突变体的定殖量。从图 2 可以看出,在未添加镉离子条件下,野生型和突变体菌

株在番茄根部的定殖量随着时间的延长呈现逐渐递减趋势,最终在移栽后 28 d (镉离子处理组处理后 21 d)保持在 10^6 CFU/mL。在添加镉离子条件下,野生型和突变体菌株定殖量均出现先下降后提高再持续降低的趋势。在镉离子处理后 3 d,菌株定殖量明显降低,并且突变体菌株明显低于野生型;在镉离子处理后 21 d,无论是野生型还是突变体菌株,定殖量与未添加镉离子对照组相比处于同等数量级。由结果可以推论,无论是野生型还是突变体菌株,在镉离子处理后定殖受到抑制,随后逐渐适应

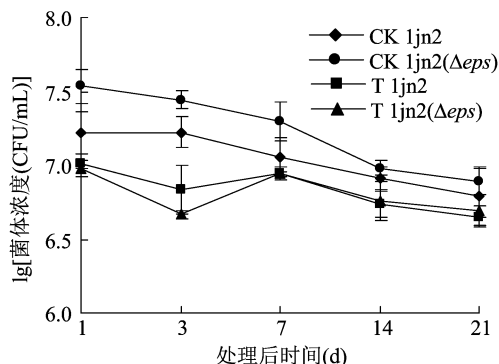


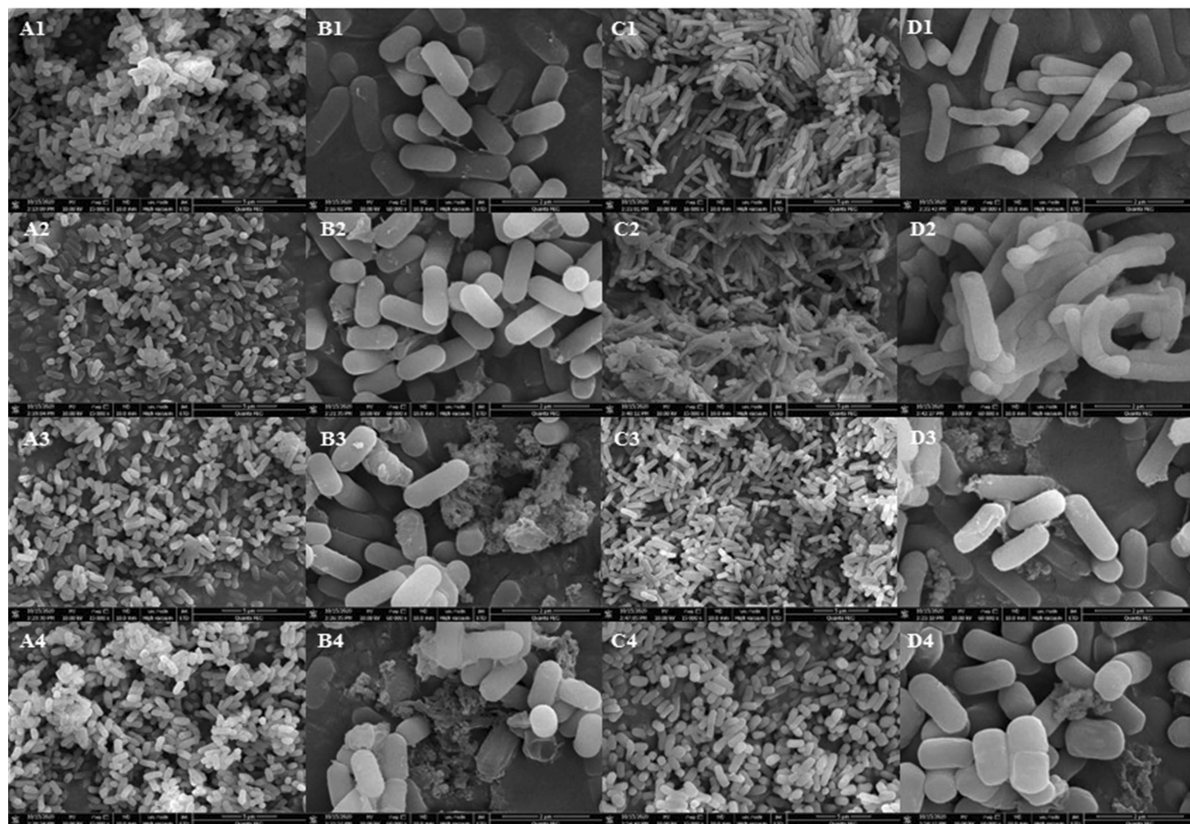
图2 镉离子处理后野生型和突变体菌株在番茄根部定殖量变化

镉离子的存在并恢复在番茄根部的定殖能力,从而实现对寄主植物的有效保护,这与温室试验中植物指标的试验结果相一致。

2.5 镉离子共培养后菌株形态观测

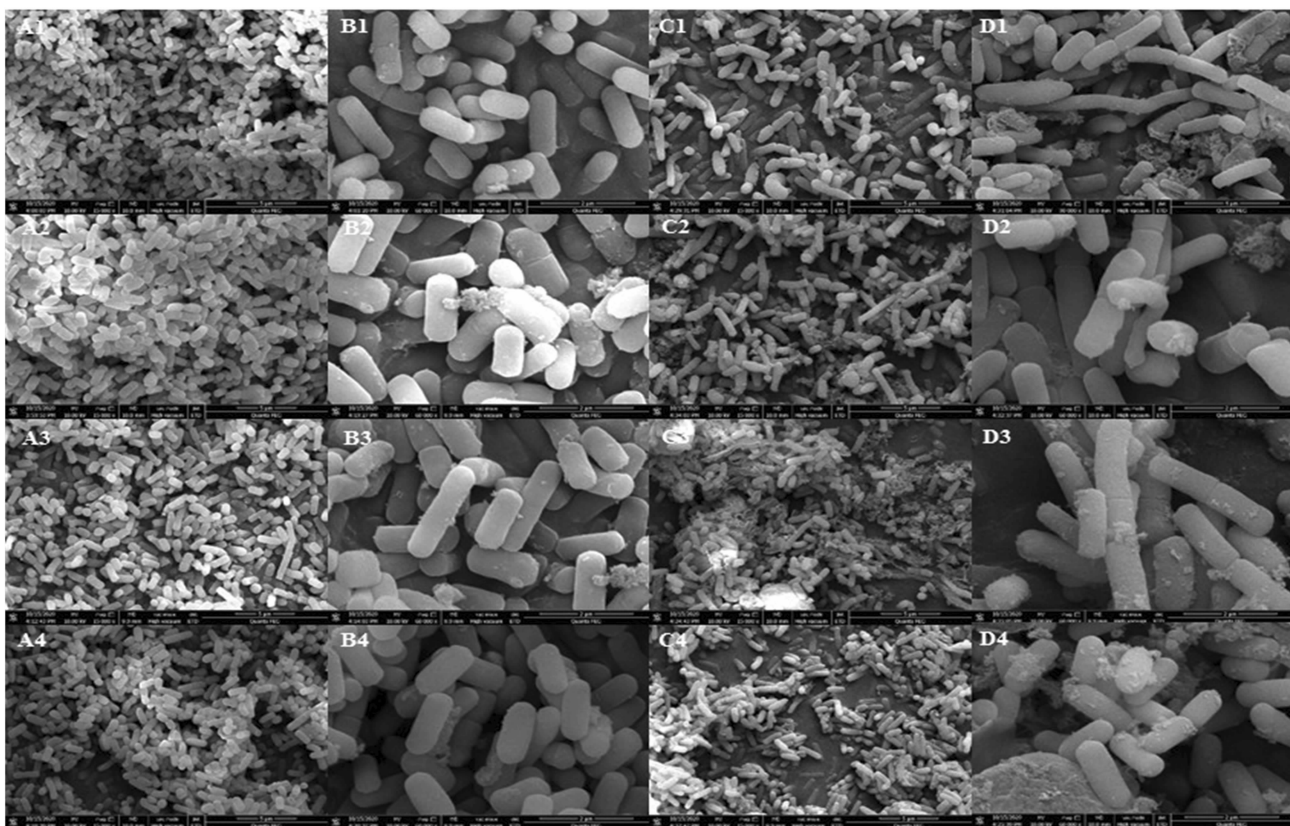
笔者所在课题组前期研究结果认为,芽孢杆菌胞外多糖在缓解镉胁迫中具有重要作用,能够在保护菌体免受伤害的同时,吸附环境中镉离子从而保护寄主植物^[11]。为了更深入了解胞外多糖在其中的作用,本研究构建了胞外多糖缺失突变体,在镉离子共培养后与野生型菌株进行形态比较。

从图 3、图 4 可以看出,无论是野生型菌株还是突变体菌株,在接触到镉离子后菌体形态均发生明显变化,菌体出现弯曲甚至胞壁破损,但随着共培养时间的延长,菌体均能够自我恢复,其中野生型菌株菌体复原更快。随着处理时间进一步延长,在 36 h 和 48 h 采集的样品中,菌体形态和对照组基本一致。有趣的是,胞外多糖缺失突变体菌株在与镉离子共培养过程中,有别于野生型菌株的是其胞外分泌物略有增加。对于新出现的胞外分泌物的种类及调控机制还有待进一步深入研究。



图中 A、B 分别为未添加镉离子对照组的群体和单细胞状态; C、D 分别为镉离子共培养处理组的群体和单细胞状态; 其中数字序号 1~4 分别为接种后 12、24、36、48 h 采样

图3 野生型菌株 1JN2 镉离子共培养后的形态变化



图中 A、B 分别为未添加镉离子对照组的群体和单细胞状态；C、D 分别为镉离子共培养处理组的群体和单细胞状态；其中数字序号 1~4 分别为接种后 12、24、36、48 h 采样

图4 突变体菌株1JN2(Δeps) 镉离子共培养后的形态变化

3 讨论

在农业种植过程中,寄主植物往往同时面临多重逆境胁迫,如病虫害侵染等生物胁迫,干旱、重金属污染等非生物胁迫等。以往研究中不管是针对病虫害侵染的生物防治还是针对重金属污染的生物修复,都取得了较大进步并且实现了一定程度的实际应用^[15-16]。但是,利用有益微生物协同缓解寄主植物所面临的生物胁迫与非生物胁迫研究还不够。根据报道,二者之间无论是发生原因,还是防治方法都有很高相关性^[17]。而细菌胞外分泌物在菌株定殖以及重金属吸附中均具有重要作用^[18-20],也有越来越多的生防菌株被用来协助寄主缓解非生物胁迫,因此,探讨生防菌株胞外分泌物在菌株定殖及重金属吸附中的作用机制将为其实际应用提供基础。

笔者所在课题组前期研究结果显示,1株有效防治青枯病的生防芽孢杆菌1JN2胞外分泌物在协助寄主缓解镉胁迫中具有重要作用,通过构建胞外多糖缺失突变体,并与野生型菌株比较其在镉离子

吸附作用、定殖能力以及镉离子共培养后的细胞形态,能够帮助我们了解菌株胞外多糖在吸附镉离子中的作用。从试验结果可以看出,与未添加菌株的对照组相比,野生型及突变体菌株均能够协助寄主缓解镉离子胁迫,使寄主植物抗性提高。但是在对镉离子的吸附固定中,胞外多糖作用显著。无论是离体试验还是温室试验中,胞外多糖的缺失均使菌株的吸附能力降低。另外,有意思的是,根据报道细菌胞外多糖在菌株定殖中具有重要作用,胞外多糖缺失会使菌株定殖能力减弱^[9]。但是本研究中,突变体菌株相对于野生型菌株来说,定殖能力并未降低。而在镉离子共培养后,突变体菌株的胞外分泌物略有增加,对于新增加的胞外分泌物的种类以及其是否能够替代胞外多糖在菌株定殖中的作用还有待进一步研究。

芽孢杆菌胞外分泌物主要包括胞外多糖、蛋白质、胞外核酸及其他多聚体分子等。据报道,芽孢杆菌能够产生的一类胞外分泌物为分子量在10~1000 ku的聚- γ -谷氨酸^[21]。最近研究证明了聚- γ -谷氨酸在芽孢杆菌生物被膜的多态性和稳

固性中具有明显作用(产聚- γ -谷氨酸会增强生物被膜的黏滞性),同时发现调控聚- γ -谷氨酸产生和胞外多糖产生的信号通路存在开关式相互作用^[22],有趣的是,无论是胞外多糖还是聚- γ -谷氨酸都能赋予菌株很好的吸附性,帮助菌株实现寄主根部定殖。结合本研究,我们推测,对于胞外多糖缺失突变体在镉离子共培养后可能会诱导聚- γ -谷氨酸的产生,从而帮助菌株有效定殖与寄主根表。对于上述假设还有待进一步研究确定,也将是我们下一步的工作重点之一。

参考文献:

- [1] Chen H Y, Teng Y G, Lu S J, et al. Contamination features and health risk of soil heavy metals in China [J]. *Science of the Total Environment*, 2015, 512/513: 143–153.
- [2] 环境保护部, 国土资源部. 全国土壤污染状况调查公报 [EB/OL]. (2014-04-17) [2021-06-07]. http://www.zhb.gov.cn/gkml/hbb/qt/201404/t20140417_270670.html.
- [3] Zhang X Y, Zhong T Y, Liu L, et al. Impact of soil heavy metal pollution on food safety in China [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (8): e0135182.
- [4] 赵其国, 沈仁芳, 滕应, 等. 中国重金属污染区耕地轮作休耕制度试点进展、问题及对策建议 [J]. *生态环境学报*, 2017, 26 (12): 2003–2007.
- [5] Soni R, Dash B, Kumar P, et al. Microbes for bioremediation of heavy metals [M]//Microbial interventions in agriculture and environment. Singapore: Springer Singapore, 2019: 129–141.
- [6] Branda S S, González-Pastor J E, Ben-Yehuda S, et al. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(20): 11621–11626.
- [7] Branda S S, Chu F, Kearns D B, et al. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix [J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 59(4): 1229–1238.
- [8] 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.
- [9] Nocelli N, Bogino P C, Banchio E, et al. Roles of extracellular polysaccharides and biofilm formation in heavy metal resistance of rhizobia [J]. *Materials*, 2016, 9(6): 418.
- [10] Chien C C, Lin B C, Wu C H. Biofilm formation and heavy metal resistance by an environmental *Pseudomonas* sp. [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2013, 78: 132–137.
- [11] 杨威, 闫海霞, 汪家璐, 等. 一株协助寄主植物缓解镉胁迫的芽孢杆菌筛选及其耐镉机制 [J]. *江苏农业学报*, 2015, 31(4): 806–810.
- [12] 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.
- [13] 郑丽. 黄瓜霜霉病的生物防治研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [14] 张志良, 瞿伟菁, 李小方. 植物生理学实验指导 [M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2009.
- [15] Kröber M, Verwaaijen B, Wibberg D, et al. Comparative transcriptome analysis of the biocontrol strain *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 as response to biofilm formation analyzed by RNA sequencing [J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 231: 212–223.
- [16] Kumar A, Singh V K, Tripathi V, et al. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): perspective in agriculture under biotic and abiotic stress [M]//Prasad R, Gill S S, Tuteja N. Crop improvement through microbial biotechnology. Amsterdam: Elsevier, 2018: 333–342.
- [17] Khan N, Bano A, Ali S, et al. Crosstalk amongst phytohormones from planta and PGPR under biotic and abiotic stresses [J]. *Plant Growth Regulation*, 2020, 90(2): 189–203.
- [18] Berendsen R L, Pieterse C M J, Bakker P A H M. The rhizosphere microbiome and plant health [J]. *Trends in Plant Science*, 2012, 17 (8): 478–486.
- [19] 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.
- [20] Chen Y, Yan F, Chai Y R, et al. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation [J]. *Environmental Microbiology*, 2013, 15(3): 848–864.
- [21] Ogunleye A, Bhat A, Irorere V U, et al. Poly- γ -glutamic acid: production, properties and applications [J]. *Microbiology*, 2015, 161 (1): 1–17.
- [22] Yu Y Y, Yan F, Chen Y, et al. Poly- γ -glutamic acids contribute to biofilm formation and plant root colonization in selected environmental isolates of *Bacillus subtilis* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1811.