

研究报告

Zn 对解淀粉芽孢杆菌 JK-JS8 生物膜形成及拮抗能力的影响

汤雨葳, 于孟, 叶建仁*

南京林业大学林学院 南方现代林业协同创新中心, 江苏 南京 210037

汤雨葳, 于孟, 叶建仁. Zn 对解淀粉芽孢杆菌 JK-JS8 生物膜形成及拮抗能力的影响[J]. 微生物学通报, 2022, 49(10): 4134-4143

Tang Yuwei, Yu Meng, Ye Jianren. Biofilm formation and antagonistic ability of *Bacillus amyloliquefaciens* JK-JS8 under Zn stress[J]. Microbiology China, 2022, 49(10): 4134-4143

摘要:【背景】锌(Zn)是一种微量元素,对细菌细胞的结构和调节系统非常重要。细菌在环境中会受到高浓度锌离子影响,进而影响其自身的功能。【目的】研究 Zn 对解淀粉芽孢杆菌 JK-JS8 生物膜及拮抗松枯梢病菌能力的影响,探讨二者之间的联系和可能的作用机制,为生防菌在不同环境条件下的应用提供理论依据。【方法】观察解淀粉芽孢杆菌 JK-JS8 在不同浓度锌离子条件下生物膜的形成情况,采用平板对峙法探究非致死浓度的锌离子对解淀粉芽孢杆菌 JK-JS8 拮抗松枯梢病菌效果的影响,通过 RT-qPCR 检测 ZnCl₂ 处理后生物膜相关基因的表达,检测抗菌产物的生成情况。【结果】300 μmol/L ZnCl₂ 对解淀粉芽孢杆菌 JK-JS8 的生长量无影响,但显著抑制了 JK-JS8 生物膜形成能力及拮抗病原菌能力。Zn 胁迫下, *tasA*、*spo0A* 和 *bamD* 等生物膜相关基因的表达量与对照组相比明显下调,通过液相色谱检测到抑菌产物 bacillomycin D 的产量在 24、48 和 72 h 时分别降低了 39.1%、58.8% 和 61.0%。【结论】环境中的锌离子浓度过高会影响解淀粉芽孢杆菌 JK-JS8 的生物膜形成,进而降低其拮抗病原菌的能力。

关键词: Zn; 解淀粉芽孢杆菌; 生物膜; 拮抗作用

基金项目: 国家林业局林业公益性行业科研专项项目(201304404)

Supported by: Special Research Program for Forestry Sectors Beneficial to the Public of Chinese State Forestry Administration (201304404)

*Corresponding author: E-mail: jrye@njfu.edu.cn

Received: 2022-02-11; Accepted: 2022-03-15; Published online: 2022-04-22

Biofilm formation and antagonistic ability of *Bacillus amyloliquefaciens* JK-JS8 under Zn stress

TANG Yuwei, YU Meng, YE Jianren*

Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China

Abstract: [Background] Zinc (Zn) is an important trace element for the structure and regulatory system of bacterial cells. In the environment, bacteria exposed to high levels of Zn ions can be affected on their functions. [Objective] To study the effect of Zn on *Bacillus amyloliquefaciens* JK-JS8 biofilms and its antagonistic ability against *Sphaeropsis sapinea*, and to explore the possible mechanism between them, so as to provide theoretical basis for the application of biocontrol bacteria in different environmental conditions. [Methods] The formation of *B. amyloliquefaciens* JK-JS8 biofilms under different concentrations of Zn ions was observed, and the effect of non-lethal concentration of Zn on the antagonistic ability of *B. amyloliquefaciens* JK-JS8 against *S. sapinea* was explored by the plate confrontation method. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the expression of biofilm-related genes and the generation of antibacterial products after the treatment of ZnCl₂. [Results] The concentration of Zn ions at 300 μmol/L had no effect on the growth of *B. amyloliquefaciens* JK-JS8, but significantly inhibited the formation of its biofilms and the antagonism against pathogenic organisms. Under Zn stress, the expression levels of biofilm-related genes such as *tasA*, *spo0A* and *bamD* were markedly down-regulated compared with the conditions in control group. The production of bacillomycin D decreased by 39.1%, 58.8% and 61.0% at 24 h, 48 h and 72 h, respectively, which was determined by the liquid chromatography. [Conclusion] High concentration of Zn ions in the environment can affect the formation of *B. amyloliquefaciens* JK-JS8 biofilms and reduce its ability to antagonize the pathogenic organisms.

Keywords: Zn; *Bacillus amyloliquefaciens*; biofilm; antagonism

解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)是一种极具生防价值的益生菌,其防治病害能力不仅取决于产生的抑菌物质,还需要益生菌能够有效定殖于植物表面^[1]。芽孢杆菌的生物膜是由其自身产生的多糖、蛋白质和核酸等物质聚集而成的具有黏附能力的膜状结构,此类生防菌应用于农田时能够借助该结构定殖于植物根系,使得群体数量维持在较高水平,从而阻挡其他病原物的侵害^[2-3]。目前生物膜已作为评价芽孢杆菌定殖能力的重要指标之一,其形成受到多种因素的影响,如植物根系

分泌物、菌株培养的环境条件、菌种的表型特征等^[4-7]。

研究证明,芽孢杆菌的生物膜能够吸附土壤中的重金属来改善植物的生长环境^[8-9],但当环境中的金属离子浓度过高时也会影响其生物膜的形成^[10]。Zn 作为生物体必需的微量元素,维持着细菌的细胞稳态,影响细菌生长和毒力^[11]。高浓度的 Zn 对芽孢杆菌同样有毒害作用,并能抑制其生物膜相关基因的表达,使其无法形成致密的生物膜^[12]。

解淀粉芽孢杆菌 JK-JS8 是从马尾松松枯梢

病叶上分离得到的一株对松枯梢病病菌有明显抑制作用的生防菌株,经发酵培养后能产生明显的生物膜^[13-14]。前期研究发现,其产生的主要抑菌物质为杆菌霉素 bacillomycin D,而一些抑菌物质(如杆菌霉素和表面活性素)会在不同的细菌中诱导生物膜的形成^[15-16]。当解淀粉芽孢杆菌生物膜形成受到环境中 Zn 的影响后,其产生抑菌物质的能力以及拮抗能力是否会受到影响尚未可知。

本研究通过探究 Zn 胁迫对解淀粉芽孢杆菌 JK-JS8 生物膜的影响,进一步探讨生物膜消失后 JK-JS8 抑菌产物产量及拮抗能力的变化,以期了解淀粉芽孢杆菌在不同环境中的应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) JK-JS8、松枯梢病病原菌松杉球壳孢(*Sphaeropsis sapinea*) J7 均由南京林业大学森林病理实验室保存。

1.2 培养基

酵母浸出粉胨蔗糖培养基(yeast extract sucrose peptone medium, YSP 培养基):蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, 蔗糖 20 g, 去离子水 1 L, 调节 pH 7.0; 固体培养基另加琼脂 20 g。此培养基适合菌株 JK-JS8 的生长及生物膜形成。

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar medium, PDA 培养基): 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 18 g, 去离子水 1 L。

1.3 主要试剂和仪器

ZnCl₂、结晶紫, 国药集团化学试剂有限公司; 蛋白胨、酵母粉, Oxoid 公司; 琼脂粉, BioFroxx 公司; RNA 提取试剂盒和 SYBR Green qPCR 试剂盒, 湖南艾科瑞生物有限公司。pH

计, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; 紫外分光光度计, 珀金埃尔默股份有限公司; 恒温生化培养箱, 上海一恒实业有限公司; 荧光定量 PCR 仪, ABI 公司; 高效液相色谱仪, Waters 公司。

1.4 Zn 对 JK-JS8 生长的影响

1.4.1 JK-JS8 种子液的制备

于固体 YSP 平板上活化菌株 JK-JS8, 用无菌枪头蘸取 JK-JS8 单菌落于 20 mL 液体 YSP 培养基中, 在 30 °C、200 r/min 的摇床中振荡培养 12 h 获得种子液。

1.4.2 Zn 对 JK-JS8 生长量的影响

参考 Huang 等^[12]的实验方法, 分别将 100、200、300、400 和 500 μmol/L 浓度的 ZnCl₂ 添加入 20 mL 的液体 YSP 培养基中, 以不加 ZnCl₂ 的 YSP 培养基为对照组, 按照 1% 的接种量将种子液转接至上述培养基中, 置于 30 °C、200 r/min 摇床中振荡培养, 每隔 2 h 测定 OD₆₀₀, 每个处理重复 3 次。

1.4.3 Zn 对 JK-JS8 生物膜形成的影响

以生长量测定实验结果为基础, 分别将 100、200、300 μmol/L 浓度的 ZnCl₂ 加入 20 mL 的液体 YSP 培养基中, 以不加 ZnCl₂ 的 YSP 培养基为对照组, 按照 1% (体积分数) 的接种量将种子液转接至上述培养基中, 于 30 °C、200 r/min 摇床中振荡培养 24 h。

向无菌 12 孔细胞培养板每孔加入 3 mL 培养 24 h 的菌液, 置于 30 °C 恒温培养箱中静置培养 24 h。参照王倩楠等^[10]的方法对不同 ZnCl₂ 浓度下生物膜生长量进行测定。具体操作: 将静置后的细胞培养板取出, 吸净膜下方的菌液后, 仅保留生物膜在细胞培养板内, 用 3 mL 无菌磷酸缓冲盐溶液(phosphate-buffered saline, PBS)漂洗 3 次后再用 2 mL 的无水甲醇进行冲洗, 15 min 后吸去甲醇, 使细胞培养板自然干燥, 最后用 1 mL 结晶紫染液充分浸泡染色

5 min 后吸出多余的染液。待细胞培养板中的染液干燥后,用 2 mL 体积分数为 33%的冰醋酸溶液对结合在生物膜上的结晶紫染液进行溶解,以稀释 100 倍的 33%的冰醋酸溶液作为空白对照,在波长 570 nm 处下测定溶液的吸光度,每个处理重复 3 次。

1.5 Zn 胁迫下 JK-JS8 的抑菌效果测定

利用平板对峙法^[17]对 ZnCl₂ 处理后的 JK-JS8 进行抑菌效果检测,具体操作:用无菌打孔器(直径 6 mm)在已活化好的松枯梢病菌 J7 平板边缘打孔,将菌饼接入 PDA 平板的中央;将直径为 6 mm 的圆形无菌滤纸片置于病原菌菌饼的两侧(距离平板中央 2.5 cm 处),根据 JK-JS8 生长量及生物膜形成的实验结果,分别将 300 μmol/L ZnCl₂ 处理 24 h 后以及未经 ZnCl₂ 处理的菌液浓度为 1×10⁷ CFU/mL 的 5 μL JK-JS8 滴于滤纸片上。以未经 ZnCl₂ 处理的平板为对照组,置于 28 °C 恒温培养箱中黑暗环境培养 10 d,实验重复 3 次,计算相对抑菌率。相对抑菌率=(对照菌落直径-处理菌落直径)/(对照菌落直径-菌饼直径)×100%。

1.6 Zn 胁迫下 JK-JS8 的生物膜相关基因转录水平检测

收集 300 μmol/L ZnCl₂ 处理 12 h 和 24 h 的细菌,以相同时间点未经 ZnCl₂ 处理的细菌为对照组,按照 AG RNAex Pro Reagent 说明书提取细菌总 RNA。将 RNA 溶于 50 μL 的焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)处理后的超纯水,然后用反转录试剂盒 Evo M-MLV RT Kit 获得 cDNA。使用 SYBR[®] Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit,以 cDNA 为模板,采用 qPCR 检测生物膜相关基因在不同时期的转录水平。以 16S rRNA 基因为内参基因^[12],所用引物见表 1。采用 2^{-ΔΔC_T} (Livak)法分析所得数据,计算不同培养时间 JK-JS8 中生物膜相关基因的转录水平。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer	Sequences (5'→3')	Bases No.
q-16S-F	GCATGTGGTTTAATTCGA	18
q-16S-R	CTGGCAACTAAGATCAAG	18
q-epsA-F	TTCGCTGCTTGTCGTG	16
q-epsA-R	TGATTCGCCCCGTTTA	16
q-spo0A-F	CCGAACAGTGAAGAAAT	17
q-spo0A-R	GGCAGCATCACAAAAGTCC	19
q-tasA-F	GCACTCGGTTTAGCATT	18
q-tasA-R	CTTCCGAGATTCATTTTC	18
q-bamD-F	CCGCCGTGACTCACCTCT	18
q-bamD-R	GCCGCTCCCTTTTCCTCC	18

1.7 Zn 胁迫下 JK-JS8 的 bacillomycin D 产量检测

收集 300 μmol/L ZnCl₂ 处理 24、48 和 72 h 的细菌,以相同时间点未经 ZnCl₂ 处理的细菌为对照组,参照李伟等^[18]的方法对 ZnCl₂ 处理前后 JK-JS8 抗菌肽 bacillomycin D 的含量进行测定。先用冷冻干燥的方法获得 bacillomycin D 粗品,然后用 C18 制备型反相色谱柱进行检测分析,样品和流动相在经过 0.22 μm 微孔滤膜过滤后上柱。流动相 A:含 0.1%三氟乙酸的乙腈;流动相 B:含 0.1%三氟乙酸的去离子水,流速为 1 mL/min,检测波长为 210 nm。用不同浓度的 bacillomycin D 标准溶液进样测定,回归分析得到峰面积与浓度的校正曲线。

2 结果与分析

2.1 Zn 对 JK-JS8 生长量的影响结果

如图 1 所示,菌株 JK-JS8 在 ZnCl₂ 浓度不高于 300 μmol/L 的 YSP 培养基中的生长速率与在不含 ZnCl₂ 的 YSP 培养基中的生长速率相近,400 μmol/L ZnCl₂ 对 JK-JS8 的生长量有轻微抑制,而 500 μmol/L ZnCl₂ 能够显著抑制 JK-JS8 的生长。结果表明,当 YSP 培养基中的 ZnCl₂ 浓度不高于 300 μmol/L 时,锌离子的存在不会

抑制 JK-JS8 的生长；当 YSP 培养基中的 $ZnCl_2$ 浓度高于 $300 \mu\text{mol/L}$ 时，锌离子能够显著抑制 JK-JS8 的生长。

2.2 Zn 对 JK-JS8 生物膜形成的影响结果

由于 $ZnCl_2$ 浓度过高会导致细胞数量减少，选择非致死浓度的 $ZnCl_2$ 作为 JK-JS8 的培养条件。当 YSP 培养基中的 $ZnCl_2$ 浓度处于一个对 JK-JS8 生长无抑制作用的范围时 ($\leq 300 \mu\text{mol/L}$)， $ZnCl_2$ 对细菌生物膜形成的影响如图 2 所示。与对照组相比， $ZnCl_2$ 的存在能够在不影响菌体数量的情况下显著抑制 JK-JS8 生物膜的形成，并且随着 $ZnCl_2$ 浓度的增加，生物膜厚度明显变薄、褶皱变少，生物膜总量也在减少。

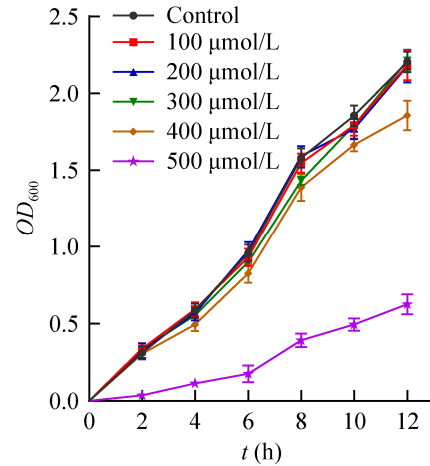


图 1 不同浓度 $ZnCl_2$ 条件下的 *B. amyloliquefaciens* JK-JS8 生长速率

Figure 1 The growth rate of *B. amyloliquefaciens* JK-JS8 at different concentrations of $ZnCl_2$.

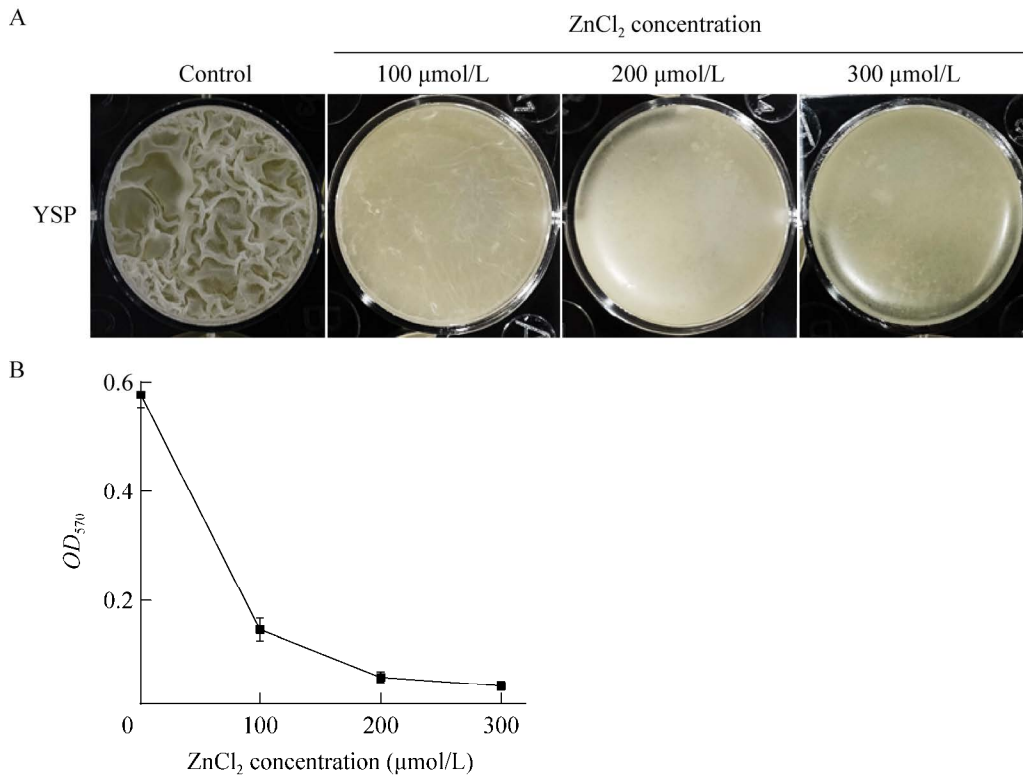


图 2 不同浓度 $ZnCl_2$ 对 *B. amyloliquefaciens* JK-JS8 生物膜形成的影响 A: 不同浓度 $ZnCl_2$ 条件下的生物膜形态；B: 结晶紫染色法测定生物膜总量

Figure 2 Biofilm formation of *B. amyloliquefaciens* JK-JS8 at different concentrations of $ZnCl_2$. A: The morphology of biofilms at different concentrations of $ZnCl_2$; B: The total amount of biofilm was determined by crystal violet staining.

2.3 Zn 对 JK-JS8 拮抗松枯梢病菌的影响结果

JK-JS8 经过 300 $\mu\text{mol/L}$ ZnCl_2 处理后抑菌能力明显减弱。如图 3 所示, ZnCl_2 处理后菌株 JK-JS8 对松枯梢病菌 J7 的抑制率减少了 29.2%, 并且 ZnCl_2 处理后菌株 JK-JS8 在平板上未出现明显褶皱的生物膜结构, 同时病原菌菌丝的生长状况出现差异, ZnCl_2 处理后的菌株 JK-JS8 对菌丝的抑制作用有明显减弱, 菌丝体

更加健壮饱满。

2.4 Zn 胁迫下 JK-JS8 生物膜相关基因的转录水平

ZnCl_2 影响菌株 JK-JS8 生物膜形成相关基因 *epsA*、*tasA*、*spo0A* 和 *bamD* 的表达量结果见图 4。 ZnCl_2 处理菌株后, *epsA* 的表达无明显变化, 而 *tasA* 和 *spo0A* 随着处理时间的增加其相对表达量显著下调($P<0.05$), 在处理 24 h 时相较于对照组分别下调了 4.1 倍和 3.1 倍。

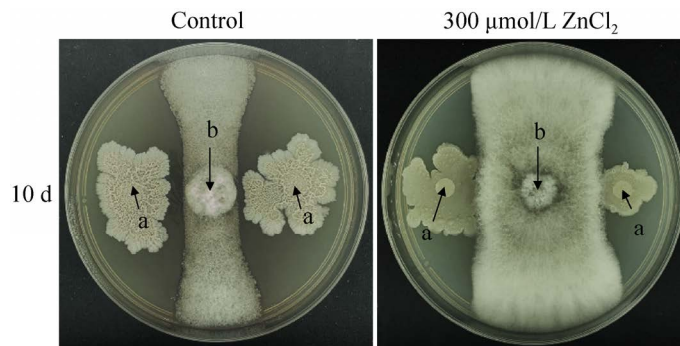


图 3 ZnCl_2 处理前后 JK-JS8 拮抗能力的比较 a: 拮抗菌株 JK-JS8; b: 松枯梢病菌, 箭头指向位置为两种菌的接种位置

Figure 3 Comparison of the antagonistic capacity of JK-JS8 after the treatment of ZnCl_2 . a: Antagonist strain JK-JS8; b: Pathogen of pine shoot blight, the arrow points to the inoculation site.

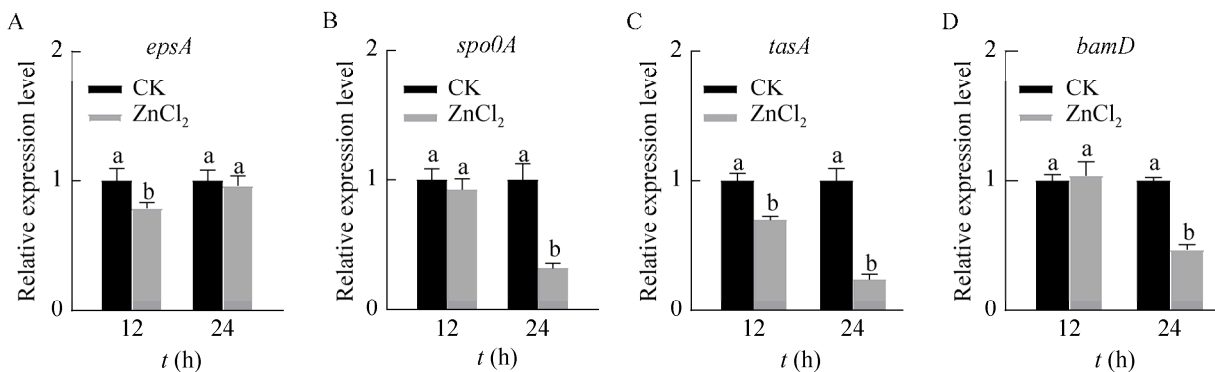


图 4 ZnCl_2 对不同培养时期 JK-JS8 生物膜形成相关基因表达量的影响 A: *epsA* 基因相对表达量; B: *spo0A* 基因相对表达量; C: *tasA* 基因相对表达量; D: *bamD* 基因相对表达量。 ZnCl_2 处理的终浓度为 300 $\mu\text{mol/L}$ 。不同小写字母表示差异显著, $P<0.05$

Figure 4 Effect of ZnCl_2 treatments on the related gene of biofilm formation expressions during different cultivation time. A: Relative expression level of *epsA*; B: Relative expression level of *spo0A*; C: Relative expression level of *tasA*; D: Relative expression level of *bamD*. ZnCl_2 was added to the medium at a final concentration of 300 $\mu\text{mol/L}$. The different lowercase letters mean significant difference, $P<0.05$.

由于 *spo0A* 基因参与调控下游杆菌霉素 bacillomycin D 的合成, 而 bacillomycin D 也是菌株 JK-JS8 主要的抑菌物质^[19]。我们通过对 bacillomycin D 合成关键基因 *bamD* 表达量的检测发现, *bamD* 同样在 $ZnCl_2$ 处理后呈现下调趋势。

2.5 Zn 胁迫下 JK-JS8 的 bacillomycin D 产量

为了探究 Zn 胁迫对 JK-JS8 抑菌物质产量的影响, 通过液相色谱对该菌株主要抑菌物质 bacillomycin D 的产量进行定量分析。

$ZnCl_2$ 处理对 bacillomycin D 产量的影响如图 5 所示。与对照组相比, $ZnCl_2$ 处理 24、48、72 h 后 bacillomycin D 的产量分别下降了 39.1%、58.8% 和 61.0%。表明由于菌株 JK-JS8 生物膜形成受到抑制, *spo0A* 基因表达水平下降, 而受到 *spo0A* 基因调控的杆菌霉素 bacillomycin D 合成相关基因 *bamD* 的表达量及 bacillomycin D 产量也都随之降低。

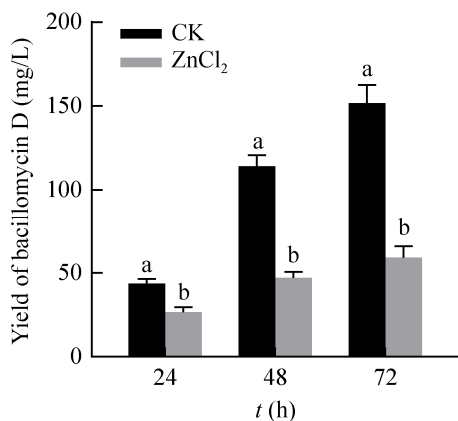


图 5 $ZnCl_2$ 处理对 bacillomycin D 产量的影响 $ZnCl_2$ 处理的终浓度为 300 $\mu\text{mol/L}$ 。不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$

Figure 5 Effect of $ZnCl_2$ treatments on the yield of bacillomycin D. $ZnCl_2$ was added to the medium at a final concentration of 300 $\mu\text{mol/L}$. The different lowercase letters mean significant difference, $P < 0.05$.

3 讨论与结论

越来越多的研究表明, 某些细菌生物膜的形成对改善土壤环境、促进植物生长有重要作用^[19,20], 并能帮助菌体更好地附着于植物表面, 在激活植物防御反应、拮抗病原微生物等方面帮助植物抵御病害侵袭^[21-22]。

对于有益微生物来说, 土壤是其与植物互作过程中最适合的栖息地之一。然而重金属离子能够通过干湿沉降和地表径流、地下水等方式进入林分土壤, 尤其是一些工业区附近的林场或农田, 工业污染加上施肥灌溉等活动会导致土壤中的重金属积累, 对植物和微生物产生不利影响^[23]。在一些铅锌矿区, 其地表水中水溶性锌浓度甚至达到了 0.198 mg/L ^[24], 远高于本研究中锌离子的供试浓度, 对微生物的影响更大。

目前的研究大多聚焦于细菌生物膜对环境中重金属的吸附作用^[25-26], 以及生物膜是如何帮助细菌抵御外界不良环境^[27]。然而当一些细菌应用于环境中时, 生物膜形成受到抑制, 细菌在植物根际的定殖数量减少, 进而使其拮抗病原菌的能力减弱^[17,28-30]。如若环境胁迫使其生物膜形成受到抑制, 除了定殖能力, 由于生物膜的形成与一些脂肽类抑菌物质密切相关, 其细菌本身的拮抗能力也可能会受到影响。因此, 在一些重金属污染地区的生态环境修复和治理中, 某些生防细菌的功效或许会大打折扣。

相关研究发现, Zn 能够阻断基质胞外多糖和蛋白积累, 抑制响应调节器 *spo0F* 的表达, 影响细菌生物膜的形成^[12]。然而生物膜的形成与杆菌霉素 bacillomycin D 有着密不可分的关系, bacillomycin D 通过与转录因子 *Btr* 结合, 促进铁转运蛋白 *FeuABC* 的转录, 增加细胞内铁离子浓度, 激活 *KinB-spo0A-SinI-SinR* 依赖的

生物膜基质成分合成^[31]。*spo0A* 的过表达会提高 bacillomycin D 的产量, 但 *spo0A* 的缺失又会抑制 bacillomycin D 的产生, 表明 *spo0A* 可能直接参与了 bacillomycin D 合成和分泌的调控^[19]。

本研究证实 ZnCl₂ 能够抑制 *B. amyloliquefaciens* JK-JS8 的生物膜形成。生物膜的消失可能有一部分与生物膜吸附作用有关, 整体带负电的生物膜与带正电的锌离子可以发生相互作用, 导致生物膜的解离^[32]。当 ZnCl₂ 浓度在 300 μmol/L 及以下时, 对菌株生长量无影响, 而生成生物膜的量随 ZnCl₂ 浓度升高逐渐减少。用 300 μmol/L 浓度的 ZnCl₂ 处理解淀粉芽孢杆菌 JK-JS8 后, 其生物膜形成受到明显抑制, 同时拮抗松枯梢病菌的能力明显减弱。Huang 等^[12]的研究也表明, 当锌离子浓度在 200 μmol/L 时能够在不影响 *B. amyloliquefaciens* FZB42 生长的情况下抑制其生物膜形成, 说明不同的芽孢杆菌对锌离子的耐受性不同, 在环境中受影响的程度也不同。

通过研究 ZnCl₂ 处理前后生物膜形成相关基因的表达量, 发现 *tasA* 基因和 *spo0A* 基因的表达发生了显著下调。据研究报道, *tasA* 基因表达的蛋白为芽孢杆菌生物膜的主要组成成分之一, 并且该蛋白具有拮抗病原菌的作用^[33-34]。菌株 JK-JS8 拮抗能力的减弱可能与该蛋白表达量的降低有关。同时有研究表明, *spo0A* 基因缺失突变株中 bacillomycin D 的产量显著降低^[19]。本研究中, Zn 胁迫致使菌株 JK-JS8 的生物膜形成受到抑制, *spo0A* 基因表达下调, 进而使受到 *spo0A* 调控的抑菌脂肽 bacillomycin D 的产量减少, 同样可能造成菌株 JK-JS8 拮抗能力的减弱。

综上所述, 环境中的 Zn 浓度过高时, 菌株 JK-JS8 生物膜的形成会受到明显抑制, 并且其抑菌产物产量降低, 拮抗病原菌的能力减弱。

当芽孢杆菌这类益生菌应用于环境中时, 也需要考虑外界环境条件对菌体自身功能的影响, 是否能够做到改善土壤、吸附重金属、促进植物生长及生物防治这些功能的“一菌多用”, 有待进一步的研究。

REFERENCES

- [1] 王世伟, 王卿惠. 解淀粉芽孢杆菌相关功能机制研究进展[J]. 生物技术通报, 2020, 36(1): 150-159
Wang SW, Wang QH. Research advances in functional mechanisms of *Bacillus amyloliquefacien*[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(1): 150-159 (in Chinese)
- [2] Arnauteli S, Bamford NC, Stanley-Wall NR, Kovács ÁT. *Bacillus subtilis* biofilm formation and social interactions[J]. Nature Reviews Microbiology, 2021, 19(9): 600-614
- [3] Davey ME. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR, 2000, 64(4): 847-867
- [4] Wu K, Fang ZY, Guo R, Pan B, Shi W, Yuan SF, Guan HL, Gong M, Shen B, Shen QR. Pectin enhances bio-control efficacy by inducing colonization and secretion of secondary metabolites by *Bacillus amyloliquefaciens* SQY 162 in the rhizosphere of tobacco[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0127418
- [5] Martins SJ, Medeiros FHV, Lakshmanan V, Bais HP. Impact of seed exudates on growth and biofilm formation of *Bacillus amyloliquefaciens* ALB629 in common bean[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 8: 2631
- [6] 陈兰兰, 邱慧珍, 董爱菊, 魏茹云. 马铃薯根系分泌物及酚酸类物质对萎蔫芽孢杆菌促生菌株 QHZ3 趋化成膜的介导作用[J]. 微生物学通报, 2021, 48(10): 3642-3654
Chen LL, Qiu HZ, Dong AJ, Wei RY. Effects of potato root exudates and phenolic acids on inducing chemotaxis of *Bacillus atrophiae* isolate QHZ3[J]. Microbiology China, 2021, 48(10): 3642-3654 (in Chinese)
- [7] 潘晓鸿, 洪纤纤, 方云, 饶文华, 陈芳容, 聂丹玥, 郭雪萍, 张顶洋, 关雄. 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 XH, Hong XX, Fang Y, Rao WH, Chen FR, Nie DY, Guo XP, Zhang DY, Guan X. 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)
- [8] Pal A, Bhattacharjee S, Saha J, Sarkar M, Mandal P. Bacterial survival strategies and responses under heavy metal stress: a comprehensive overview[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2022, 48(3): 327-355
- [9] Xiong ZH, Zheng JW, Sun HR, Hu JW, Sheng XF, He LY. Biofilm-overproducing *Bacillus amyloliquefaciens* P29 Δ sinR decreases Pb availability and uptake in lettuce in Pb-polluted soil[J]. *Journal of Environmental Management*, 2022, 302: 114016
- [10] 王倩楠, 宋王慧, 刘有华, 皮乔木, 马子航, 李联泰, 安贤惠. 环境条件对解淀粉芽孢杆菌 X8 生物膜形成的影响[J]. *江苏海洋大学学报(自然科学版)*, 2020, 29(3): 7-12
Wang QN, Song WH, Liu YH, Pi QM, Ma ZH, Li LT, An XH. Effects of environmental conditions on the formation of biofilms from *Bacillus amyloliquefaciens* X8[J]. *Journal of Jiangsu Ocean University: Natural Science Edition*, 2020, 29(3): 7-12 (in Chinese)
- [11] 牛艳婷, 王帅涛, 成娟丽, 林金水. 铜绿假单胞菌锌离子摄取系统的研究进展[J]. *微生物学报*, 2021, 61(7): 1856-1872
Niu YT, Wang ST, Cheng JL, Lin JS. Zinc uptake systems in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(7): 1856-1872 (in Chinese)
- [12] Huang ZY, Wu LM, Li X, Ma LM, Borriss R, Gao XW. Zn(II) suppresses biofilm formation in *Bacillus amyloliquefaciens* by inactivation of the Mn(II) uptake[J]. *Environmental Microbiology*, 2020, 22(4): 1547-1558
- [13] 王凤各, 叶建仁. 松枯梢病拮抗细菌的筛选、鉴定及拮抗活性的初步研究[J]. *宜春学院学报*, 2016, 38(3): 88-93, 123
Wang FG, Ye JR. Preliminary study on isolation, identification and antagonistic activity of antagonistic bacteria against *Sphaeropsis sapinea*[J]. *Journal of Yichun University*, 2016, 38(3): 88-93, 123 (in Chinese)
- [14] 王凤各, 叶建仁. JK-JS8 菌株对松树枯梢病菌的拮抗作用及机理[J]. *辽东学院学报(自然科学版)*, 2016, 23(2): 117-121
Wang FG, Ye JR. Antagonism and mechanism of JS-JK8 on antagonistic activity against *Sphaeropsis sapinea*[J]. *Journal of Eastern Liaoning University: Natural Science*, 2016, 23(2): 117-121 (in Chinese)
- [15] Zhang Y, Qi JS, Wang YQ, Wen JH, Zhao XY, Qi GF. Comparative study of the role of surfactin-triggered signalling in biofilm formation among different *Bacillus* species[J]. *Microbiological Research*, 2022, 254: 126920
- [16] 徐志辉, 张慧慧, 张钰婷, 冯元韬, 张馨玉, 仇美华. Bacillomycin D 突变体在生物膜形成中的转录组分析[J]. *南京农业大学学报*, 2017, 40(5): 850-858
Xu ZH, Zhang HH, Zhang YT, Feng YT, Zhang XY, Qiu MH. Transcriptome analysis of antibiotic bacillomycin D-deficient mutant on biofilm formation[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2017, 40(5): 850-858 (in Chinese)
- [17] Fu HH, Chen FF, Liu WH, Kong WL, Wang CE, Fang XQ, Ye JR. Adding nutrients to the biocontrol strain JK-SH007 promotes biofilm formation and improves resistance to stress[J]. *AMB Express*, 2020, 10(1): 32
- [18] 李伟, 孙静, 林福兴, 刘今, 吕凤霞, 别小妹, 陆兆新. 枯草芽孢杆菌 M364 高产抗菌肽 bacillomycin D 工业培养基优化[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(22): 192-199
Li W, Sun J, Lin FX, Liu J, Lv FX, Bie XM, Lu ZX. Optimization of bacillomycin D high-yield industrial fermentation medium of *Bacillus subtilis* M364[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(22): 192-199 (in Chinese)
- [19] Sun J, Liu Y, Lin F, Lu Z, Lu Y. CodY, ComA, DegU and Spo0A controlling lipopeptides biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* fmbJ[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2021, 131(3): 1289-1304
- [20] Kwak Y, Rhee IK, Shin JH. Application of biofilm-forming bacteria on the enhancement of organophosphorus fungicide degradation[J]. *Bioremediation Journal*, 2013, 17(3): 173-181
- [21] She QX, Hunter E, Qin YX, Nicolau S, Zalis EA, Wang HK, Chen Y, Chai YR. Negative interplay between biofilm formation and competence in the environmental strains of *Bacillus subtilis*[J]. *mSystems*, 2020, 5(5): e00539-e00520
- [22] 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
- [23] 江行玉, 赵可夫. 植物重金属伤害及其抗性机理[J]. *应用与环境生物学报*, 2001, 7(1): 92-99
Jiang XY, Zhao KF. Mechanism of heavy metal injury and resistance of plants[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2001, 7(1): 92-99 (in Chinese)
- [24] 肖筱瑜, 梁文寿, 唐名富, 余谦. 广西某铅锌矿区水环境质量演变分析[J]. *矿产与地质*, 2021, 35(4): 775-780
Xiao XY, Liang WS, Tang MF, Yu Q. Analysis on evolution of water environment quality in a lead-zinc mining area in Guangxi[J]. *Mineral Resources and*

- Geology, 2021, 35(4): 775-780 (in Chinese)
- [25] Zuo RJ. Biofilms: strategies for metal corrosion inhibition employing microorganisms[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 76(6): 1245-1253
- [26] 江娜, 宁增平, 郭圆, 郝立凯. 环境 pH 对微生物生物膜吸附重金属的影响研究进展[J]. 地球与环境, 2021, 49(2): 216-226
- Jiang N, Ning ZP, Guo Y, Hao LK. Research progress of the effect of pH on the adsorption of heavy metals by microbial biofilms[J]. Earth and Environment, 2021, 49(2): 216-226 (in Chinese)
- [27] 刘娟, 凌婉婷, 盛月慧, 顾玉骏, 高彦征. 根表功能细菌生物膜及其在土壤有机污染控制与修复中的潜在应用价值[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(11): 2112-2117
- Liu J, Ling WT, Sheng YH, Gu YJ, Gao YZ. Biofilm formation of functional bacteria on root surfaces and its potential applications on organic contaminant control and soil remediation[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2013, 32(11): 2112-2117 (in Chinese)
- [28] 唐萍, 何鹏飞, 袁远, 吴毅歆, 叶敏, 何月秋. 黄曲霉生防菌 DJB5 在玉米种子中的定殖研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学版), 2020, 35(3): 409-414
- Tang P, He PF, Yuan Y, Wu YX, Ye M, He YQ. Colonization of the biocontrol bacterial strain DJB5 against *Aspergillus flavus* in maize grains[J]. Journal of Yunnan Agricultural University: Natural Science, 2020, 35(3): 409-414 (in Chinese)
- [29] 周华飞, 杨红福, 姚克兵, 庄义庆, 束兆林, 陈志谊. FliZ 调控枯草芽孢杆菌 Bs916 生物膜形成及其对水稻纹枯病的防治效果[J]. 中国农业科学, 2020, 53(1): 55-64
- Zhou HF, Yang HF, Yao KB, Zhuang YQ, Shu ZL, Chen ZY. 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 (in Chinese)
- [30] Zhu ML, Wu XQ, Wang YH, Dai Y. 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
- [31] Xu ZH, Mandic-Mulec I, Zhang HH, Liu Y, Sun XL, Feng HC, Xun WB, Zhang N, Shen QR, Zhang RF. Antibiotic bacillomycin D affects iron acquisition and biofilm formation in *Bacillus velezensis* through a btr-mediated FeuABC-dependent pathway[J]. Cell Reports, 2019, 29(5): 1192-1202.e5
- [32] Ghosh A, Ghosh Dastidar M, Sreekrishnan TR. Recent advances in bioremediation of heavy metals and metal complex dyes: review[J]. Journal of Environmental Engineering, 2016, 142(9): C4015003
- [33] 刘通, 陈云鹏, 李琼洁, 顾振芳. 短小芽孢杆菌抑菌蛋白 *TasA* 基因克隆及功能分析[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2014, 32(5): 48-52, 56
- Liu T, Chen YP, Li QJ, Gu ZF. Cloning and functional analyses of *TasA*, an antimicrobial protein gene from *Bacillus pumilus* DX01[J]. Journal of Shanghai Jiao Tong University: Agricultural Science, 2014, 32(5): 48-52, 56 (in Chinese)
- [34] 张淑梅, 姜威, 孟利强, 刘宇帅, 曹旭, 胡基华, 李晶, 高娃. 解淀粉芽孢杆菌 TF28 抗菌蛋白基因 *TasA* 克隆与表达[J]. 生物技术, 2016, 26(2): 130-135
- Zhang SM, Jiang W, Meng LQ, Liu YS, Cao X, Hu JH, Li J, Gao W. Cloning and expression of antifungal protein gene *TasA* from *Bacillus amyloliquefaciens* TF28[J]. Biotechnology, 2016, 26(2): 130-135 (in Chinese)