

# 与植物联合的细菌生物膜及其形成机制的研究进展<sup>\*</sup>

刘洋 刘琳 邹媛媛 宋未<sup>\*\*</sup>

首都师范大学生命科学学院, 北京 100048

**摘要** 自然界中大多数微生物保持附着在生物或非生物体表面, 处在一种具有结构的生物膜生态系统中, 而不是自由游动状态. 与植物联合的细菌在植物组织表面形成生物膜的能力是它们有效定殖和发挥促生作用的前提, 与植物联合的细菌生物膜的研究已成为植物微生态研究领域的热点. 文中系统介绍了与植物相联合的细菌生物膜的概念、形成机制及其基质组成成分, 并提出了研究过程中应注意的主要问题.

**关键词** 与植物联合的细菌生物膜 形成机制 基质组分

虽然在 20 世纪 30 年代就有关于细菌在介质表面附着的报道<sup>[1-4]</sup>, 但人们对于细菌是单细胞生活的观念仍然根深蒂固. 因为细菌可被稀释为单细胞在液体中培养, 这个操作模式已被应用于许多细菌活性的研究. 传统的细菌培养方法可用于研究微生物的致病性, 并启迪了人们对微生物生理学的深入认识, 但在自然界中, 微生物的纯培养浮游生长 (planktonic growth) 的情况着实少见. 虽然环境微生物学家早已认识到, 复杂的微生物群落对实现生物地化良性循环以保持生物圈生态平衡方面具有重要性<sup>[5]</sup>, 然而直至最近, 由于原位研究方法的相对缺乏仍妨碍了这一领域的详尽研究. 所幸的是, 近年来显微镜和分子技术的发展已使得不用液体培养而对微生物群落进行原位分析成为可能. 通过对大量微生物天然栖居地原位观察后发现, 大多数微生物保持附着在生物或非生物体表面, 处在一种具有结构的生物膜生态系统中, 而不是以自由游动状态存在的<sup>[6]</sup>, 并且这些在生物膜中的细菌是以一种关系复杂的“协作联合体” (cooperative consortium) 的形式聚集存在的<sup>[6,7]</sup>. 因此, 微生物虽然可具有独立的浮游生活方式, 但更为普遍的是作为一个相互

依存的群落的一部分. 现今人们已经开始认识到生物膜群落 (biofilm community) 的重要性, 以多细胞的思路观察细菌正在改变着人们对微生物学的总体观念.

近十年来, 关于生物膜的研究已引起各国科学家的广泛重视. 自 1996 年以来美国等发达国家已先后组织召开了多次生物膜会议, 进入 21 世纪, 由于愈加成熟的生理学、显微镜、遗传学和分子生物学手段的应用, 使得生物膜研究特别是处于生物膜状态的微生物种类和形式的多样性研究取得了长足的进展, 但在研究体系和方案设计中存在着缺乏标准化的问题. 此外, 生物膜涉及环境、工业、医学和农学等多学科领域, 各个领域的研究者往往顾此失彼, 难以取得同步进展. 应当说, 目前对于生物膜的研究尚处于早期, 许多问题还是只知其然而不知其所以然, 特别是对生物膜形成和稳定性保持等复杂过程的研究才刚刚开始. 对全面彻底了解这一过程还需要众多相关科研工作者继续努力探索和研究. 现在最为紧迫的任务是应当整合现有各方面的关于生物膜的相关知识, 找出共同的线索和机制, 提出基础概念和实践意义上的新见解, 推动生物膜

2009-04-23 收稿, 2009-05-26 收修修改稿

<sup>\*</sup> 国家自然科学基金 (批准号: 30770069)、教育部博士点专项科研基金 (批准号: 20060028001) 和北京市自然科学基金 (批准号: 5092004) 资助项目

<sup>\*\*</sup> 通信作者, E-mail: songwei@mail.cnui.edu.cn

©1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

研究领域各方面的发展<sup>[1]</sup>。

## 1 与植物联合的细菌生物膜(plant-associated bacterial biofilm)

在微生物特别是细菌与植物相互作用关系的研究中,常常可以在植物表皮细胞凹陷的接合处观察到细菌以聚合形式存在,这种结构被称为聚集体(aggregate)、微菌落(microcolonies)、共质体(sytoplasmata)或生物膜(biofilm)<sup>[8]</sup>。对植物表面的微菌落和“类生物膜”(biofilm-like)的首次观察分别源于20世纪60年代早期有关叶面<sup>[9]</sup>和70年代早期有关根面<sup>[10]</sup>的报道。近四十年中,大部分关于植物上微菌落的研究集中在它们的发生、定位和丰富度等方面。直至最近,人们才开始把植物表面的聚集体和微菌落现象与生物膜状态及其诸多的潜在功能和性质联系起来<sup>[11]</sup>,并启发人们对与植物联合的细菌的生物学和生态学提出了新问题:细菌形成这种聚集体结构是否为适应与植物联合生存的特异行为?生物膜是如何促进细菌的存活和增殖的?植物组织表面的细菌是否会以非聚集的状态出现?细菌如何能够在不同的环境中生存和定殖以及促进生物膜细胞表现型表达?关于这些问题的研究已取得令人振奋的进展<sup>[12-14]</sup>。特别是近年来的研究表明,许多种类的细菌在高细胞密度条件下能释放一种自体诱导物(autoinducer)信号分子(如高丝氨酸内脂类、AHL等),通过细胞间信息传递系统进行对基因的表达调控,这一现象被称为“群体感应”(quorum sensing, QS)<sup>[15]</sup>。植物表面细菌生物膜的形成也是细菌利用细胞间的群体感应效应,在一定的细胞密度下协同表达的一种表现型能力的体现<sup>[16,17]</sup>。这些成果已大大提高了植物微生物学家对上述问题进行深入研究的兴趣。

### 1.1 植物根际附生的细菌生物膜(epiphytic bacterial biofilm in rhizosphere)

根据“根际效应”的原理,植物对根面定殖的细菌具有选择压,只有一定的微生物种群能选择与植物根际相互作用。所以,可以将附着于植物根表的微生物群落结构看作“根际生物膜群落”(rhizosphere biofilm community, RBFC)<sup>[18]</sup>。应用显微镜对细菌在根际的定殖研究表明,许多细菌会在根面

形成非均匀分布的微菌落或聚集体,其中包括附生的荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)<sup>[19-21]</sup>,它们具有生物防治潜力;能促进植物生长的植物促生细菌如成团肠杆菌(*Enterobacter agglomerans*)等<sup>[22-24]</sup>;自生固氮细菌如蓝细菌(*Cyanobacteria*)<sup>[25]</sup>和巴西固氮螺菌(*Azospirillum brasilense*)<sup>[26]</sup>等;与水稻根联合的氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)<sup>[27]</sup>等。用显微镜可清楚地观察到这些微菌落和聚集体处于胞外多聚体基质(exopolymetric matrix)的包埋之中<sup>[24-27]</sup>。

### 1.2 植物气生表面附生的细菌生物膜(epiphytic bacterial biofilm on aerial surfaces)

定殖在植物气生表面的细菌处于营养和水分高度变化的环境之中,它们大都借助于风雨的吹洒在植物茎、叶上沉积,并不时移动到新的部位<sup>[28]</sup>。植物的叶面可以划分为众多的微栖息部位,其中在叶脉、毛状体和气孔周围常常出现一些较大的细菌聚集体<sup>[29]</sup>。与叶联合的细菌种群中一大部分是被包埋在具有抗胁迫性的聚集体中,其余的单个菌体细胞则分散在叶面,进而能够形成新的微菌落结构。在菊苣和甜瓜植物叶面上,荧光假单胞菌在细菌聚集体内部或外部的种群结构是相似的<sup>[30]</sup>。对于附生定殖在豌豆叶面而不引起病害症状的地毯草黄单胞菌(*Xanthomonas axonopodis*)也具有同样类似的情况,虽然在生物膜中该菌的种群大小在整个生长期保持稳定,但生物膜外部单个菌体细胞的种群大小则随气候的改变而变化<sup>[31]</sup>。另一方面,研究发现定殖在叶部的革兰氏阳性细菌更利于形成聚集体<sup>[30]</sup>。植物气生表面的附生菌必须在形成聚集体结构和转移定殖到新的叶面部位之间取得平衡,才能有利于其生存条件的改善。

### 1.3 植物内生细菌与生物膜(endophytic bacteria and biofilm)

植物内生菌可定殖在许多植物组织内的细胞间隙而不引起病症。从植物中分离得到的内生菌按其能否在土壤中生活分为专性内生菌和兼性内生菌,后者常常是定殖在根际,并通过根面伤口的有利部位、侧根基部、表皮细胞之间以及根毛上的开口进入植物体内。在通常情况下,细菌能够在根际和幼苗上形成生物膜是它们在植物内有效定殖的先决条

件。

在植物内生菌中, 研究最多的是固氮细菌, 这是因为它们具有作为生物肥料的潜力<sup>[32]</sup>。内生菌联合体能保护固氮酶不受氧引起的损伤, 并给其中的细菌提供大量有机碳, 同时保护它们避免与其他根际细菌的竞争。重氮营养葡萄糖酸醋杆菌 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) 是甘蔗中天然存在的内生固氮菌, 并且也能够定殖在青豆等其他作物的根际<sup>[33]</sup>, 虽然该菌的细胞表面可能会与甘蔗的糖蛋白相结合, 也可能菌体与宿主植物之间具有某种特殊的作用, 但是关于它们的定殖和形成生物膜的情况还鲜为人知<sup>[34]</sup>。此外, 该菌在固体培养基上能够形成一种胶状基质, 其厚度既可保证氧气的穿透以维持菌体的需氧生长, 又不会抑制固氮酶的活性<sup>[35]</sup>, 在植株内由基质包埋的聚集体可能具有类似的功能。

在非结瘤固氮细菌中, 研究最多的是固氮螺菌属 (*Azospirillum*)<sup>[36]</sup>, 这一类菌的大多数代表性菌种能够定殖于植物表面, 而固氮螺菌、织片草螺菌 (*Herbaspirillum seropedicae*) 和固氮弧菌属 (*Azotarcus*) 则属于专性内生菌。关于内生菌表面粘附作用方面的信息十分有限。最近发表的固氮弧菌 BH72 菌株基因组测序的结果令人惊奇地发现, 该菌缺少毒性因子, 但含有编码合成胞外多糖的基因, 该基因和其他与植物联合的细菌, 如豌豆根瘤菌中与生物膜形成相关的 *pps* 基因具有同源性<sup>[37]</sup>。研究发现 BH72 菌株具有极性鞭毛和趋化性基因, 推测细菌在与植物外表面互作联合时所运用的机制很可能在植物内部也受用, 因此已有提议将兼性内生菌作为防治植物维管组织病原菌的生防制剂<sup>[38]</sup> 或化学农药的植物修复剂<sup>[39]</sup>。

本研究组曾从水稻品种“越富”中分离得到一株植物内生细菌成团泛菌 (*Pantoea agglomerans*) YS19<sup>[40]</sup>, 并发现其具有固氮和分泌生长素促进植物生长的功能<sup>[40-42]</sup>, 随后冯永君等<sup>[43, 44]</sup> 研究发现, 该菌生长到一定阶段时, 菌体聚集形成一种簇凝块状共质体结构, 即 *symploasmata* 结构 (生物膜的一种), 通过形成这种生物膜结构, 细菌细胞可免受环境波动的影响, 从而将有助于更好地实现其对植物的促生作用。

## 2 与植物联合的细菌生物膜的形成机制 (mechanisms of plant-associated bacterial biofilm formation)

### 2.1 调节机制 (regulatory mechanisms)

细菌生物膜的形成是一个高度协调的过程, 该过程受到众多环境因子, 如温度、渗透压、营养成分及氧化还原电位等<sup>[45]</sup> 以及细菌菌体自身的特性等条件的影响<sup>[46]</sup>。一般来说要经历粘附、生长和成熟三个阶段<sup>[47]</sup>, 尽管每种细菌对环境的刺激都有一套自己相应的独特分子机制, 但在上述三个阶段中有几种对与植物联合的细菌都是同样重要的调节系统在起作用。

#### 2.1.1 群体感应 (quorum sensing)

群体感应是细菌根据细胞密度变化进行基因表达调控的一种生理行为。具有群体感应的细菌所释放的自体诱导物信号分子会随着细胞密度增加而同步增加, 当积累到一定浓度时, 会改变细菌特定基因的表达。细菌生物膜通常是群体感应的部位, 而群体感应又影响着生物膜的形成<sup>[48]</sup>。与植物联合的细菌通常应用这个信息机制调整和协调与植物的相互作用, 包括防治宿主植物组织的侵解、抗生素的产生、毒素的释放和水平基因转移 (HGT) 等<sup>[49]</sup>。在与植物联合的细菌中有几种不同的信号传递分子, 包括变形细菌 (*Proteobacteria*) 中的酰基高丝氨酸内酯 (AHLs)、放线菌中的丁酸内酯、黄单胞菌 (*Xanthomonas*) 和木杆菌 (*Xylella*) 等相关的细菌中的甲基正十二烷酸 (DSF)、革兰氏阳性细菌中的寡肽以及一些扩散性的信号分子等都能促进或控制细菌在植物上的定殖。研究表明, 与散土中的细菌种群相比, 产 AHLs 的细菌大多是与植物联合生活的<sup>[50]</sup>。丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*) 利用 AHLs 群体感应控制在青豆叶上的运动和胞外多糖的合成, 并通过传递信号物质影响其存活状态以及与叶联合的该菌聚集体的毒性<sup>[51]</sup>。生防菌荧光假单胞菌 2P42 依赖 AHLs 形成生物膜以防治小麦猝倒病<sup>[52]</sup>。对恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 在马铃薯和小麦根部释放的 AHL 的统计结果表明, 群体感应所需要的细胞密度很低, 但在细胞间感应传递距离可长达  $78\mu\text{m}$ <sup>[53]</sup>, 这说明 AHL 具有在生物膜内及生物

膜间超长距离发送信息的潜力。

**2.1.2 对缺磷胁迫的响应调节 (regulation in response to phosphorus starvation)** 对于与植物相关的细菌来说, 一些关键的可被利用的营养物质, 如磷元素, 在控制菌体的聚集和在介质表面的附着过程中具有重要的作用。大多数细菌中存在类似于大肠杆菌中的能够激活缺磷胁迫应答的双组分调节系统, 即 PhoR-PhoB。缺磷胁迫对于与植物相关的细菌生物膜的影响取决于菌体及其在生态系统中的作用, 在缺磷胁迫条件下, 绿针假单胞菌 (*Pseudomonas aureofaciens*) PA147-2 的 PhoB 系统抑制生物膜的形成<sup>[54]</sup>, 与之相反, 在根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 形成生物膜的过程中, 缺磷胁迫起到促进作用<sup>[55]</sup>。

**2.1.3 相变异 (phase variation)** 在某些情况下, 相变异有利于与植物相关的细菌分化产生行为方式不同的两组, 这样既保持了菌体原始的基因型, 同时降低了由于各种原因导致的整体风险, 这是因为相变异能够通过基因的微小的并且可逆转的改变来实现对表型的大幅变化。例如, 假单胞菌 *Pseudomonas brassicacearum* NFM 421 通过相变异过量表达鞭毛蛋白, 从而提高运动性, 有利于其进一步定殖到拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 根尖<sup>[56]</sup>。但需要指出的是, 由于生物膜中所包含的菌体基数庞大, 相变异的发生几率是很低的。

## 2.2 趋化性 (chemotaxis) 和运动性 (motility)

植物能够在其特定部位释放分泌物, 许多细菌可以通过趋化作用定殖到植物表面有效营养的最佳部位。与甘蔗内生重氮营养葡萄糖酸醋杆菌类似, 巴西固氮螺菌也能够利用趋氧性识别最佳的氧浓度, 由此既能维持其正常呼吸又不致损伤固氮酶<sup>[57]</sup>, 对氧和其他吸引子的趋化作用促进了巴西固氮螺菌在根部的定殖。我们在对从水稻品种“越光”根面分离得到的一株植物促生细菌肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) NG14 的趋化性研究中利用蔗糖作为吸引剂, 采用半固体平板实验观察该菌对蔗糖的趋化作用, 得到了对应于趋化运动效果最明显时的蔗糖浓度; 同时, 将水稻种子分泌物作为 NG14 趋化研究中的吸引剂, 分别利用两种不同基

因型水稻种子分泌物配制不同浓度的半固体天然营养物培养基, 同样得到了 NG14 趋化圈半径最大、趋化作用最明显时的种子分泌物浓度 (数据尚未发表)。

许多微生物的运动性也参与了其生物膜的形成, 运动性缺失的突变菌株在植物组织表面定殖形成生物膜的几率总是比具有运动性的菌株要小得多<sup>[58, 59]</sup>。细菌通过不同的机制移动, 包括: 鞭毛和伞毛的运动, 不同细菌对各种营养物质的趋化性取决于菌种自身以及趋化吸引子。通常细菌对它们的天然宿主具有较强的反应, 内生菌的反应又比根细菌强<sup>[60]</sup>。此外, 对于与植物联合的细菌而言, 宿主植物的分泌物比非宿主植物更具有趋化吸引力<sup>[59]</sup>。某些趋化能力缺失的病原菌突变种与其运动性障碍突变种在侵染植物方面存在差异, 而且前者与其野生型相比侵染能力低得多<sup>[59, 61]</sup>。细菌运动性参与了其生物膜的起始、生长与成熟, 是生物膜蔓延和定殖到新部位的重要机制<sup>[62]</sup>。对于某些维管病原菌来说, 从原定殖部位迁移到其他部位会对其宿主植物的健康产生重要的影响, 而运动性驱动了这种迁移。对于其他与植物联合的微生物来说, 生物膜的蔓延扩展同样会影响着其所在的微生态环境。

## 2.3 表面粘附 (adhesion) 和定殖 (colonization)

与植物联合的细菌形成生物膜结构, 有时是因为细菌菌体被水流冲击而在植物表面上沉积所致, 但大多时候, 生物膜的形成依赖于细菌细胞主动粘附的过程, 并且细菌分泌某些物质会加强生物膜在植物表面的附着力。由于不同的植物组织有着各自独特的化学和生理特性, 对与植物联合的细菌聚集体结构会产生不同的影响<sup>[63]</sup>, 因此当细菌聚集定殖在特定的植物组织表面时, 植物组织细胞与细菌细胞之间的相互作用很可能是两者相互适应的结果<sup>[64]</sup>。

细菌表面的粘附结构, 包括胞外多糖和富含蛋白质的伞毛, 参与菌体对惰性表面、植物组织和其他微生物表面的附着过程, 胞外多糖和蛋白质的相互作用以及它们的特异性结合通常能够促进与植物联合的微生物在介质表面的附着和聚集。根瘤菌科 (Rhizobiaceae) 中的许多种类, 例如根癌土壤杆菌能产生少量的钙离子结合蛋白, 即根钙粘素 (rhi-

cadhesin), 它在根癌土壤杆菌中的功能尚未明确, 但在根瘤菌(*Rhizobium*)中, 根钙粘素参与了其在根部的附着过程<sup>[65-67]</sup>, 目前根钙粘素基因尚未得到鉴定, 但 Ausmees 等<sup>[68]</sup>分离并鉴定得到根瘤菌粘附蛋白 Raps, 这种蛋白可以结合钙离子和凝集素细胞, Raps 的分泌量远大于根钙粘素, 这与豌豆根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum*)和菜豆根瘤菌(*Rhizobium etli*)有很大不同. 在豌豆根瘤菌中有几种 Rap 的同源物, 它们由 I 型分泌系统 PrsDE 分泌<sup>[37]</sup>. 豌豆根瘤菌中的 Rap 粘附素能够识别细胞极性表面的相应受体, 这是因为该部位含有凝集素域(lectin domains)<sup>[68]</sup>. 最近, 在位于能使豌豆和紫云英结瘤的豌豆根瘤菌细胞表面发现了高分子量的葡甘露聚糖, 它能与豌豆和紫云英的凝集素结合<sup>[69]</sup>, 研究还发现不产葡甘露聚糖的豌豆根瘤菌突变种, 在原本适宜的酸性条件下, 不能侵染植物根毛进而与其共生. 此外, 豌豆根瘤菌利用根钙粘素与根结合, 最初是在 pH 值大于 6.5 的条件下进行的, 这时钙离子和根钙粘素能结合到根部, 若此过程在酸性条件下进行, 则与根的结合将依赖于粘附素, 例如葡甘露聚糖.

有研究报道, 巴西固氮螺菌胞外多糖, 其中含有阿拉伯糖, 参与了细胞的凝聚<sup>[70, 71]</sup>, 并发现巴西固氮螺菌细胞的表面蛋白具有类凝集素的性质, 可促进细胞的自凝聚并能借助阿拉伯糖在植物上附着, 其外膜蛋白也可能在细胞凝聚过程中起作用<sup>[72]</sup>. 苛养木杆菌(*Xylella fastidiosa*)产生的凝血素介导了细胞之间的联系, 其凝血素缺失的突变种不能凝聚, 而仅能在植物木质部导管中形成单层结构, 不像野生型那样形成多细胞层结构. 凝血素介导的凝聚能够起到控制细胞增殖速度从而减弱对宿主植物损伤的作用, 而其突变种则会导致宿主植物组织严重的损伤, 这可能是由于突变种能通过植物较快地散布以及生长速度较快等缘故造成的<sup>[73]</sup>. 这种细菌细胞的散布和毒性之间的关联也可在其他微管病原菌, 如野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)和玉米枯萎病黄单胞菌(*Pseudomonas stewartii*)中观察到. I 型伞毛(鞭毛)是苛养木杆菌形成生物膜所需要的另一种表面结构, 研究发现 *fimA* 突变种完全不能形成生物膜<sup>[74]</sup>.

粘附素蛋白 LapA 是假单胞菌属某些种的一种

十分重要的粘附素. 在恶臭假单胞菌中, 它参与了对非生物表面和种子表面的附着<sup>[75, 76]</sup>. 近年的研究表明, 粘附作用还涉及到一些较小的细菌表面蛋白(外膜蛋白 OmpA)及鞭毛基因等, 表明了粘附素系统具有复杂性<sup>[77]</sup>. 我们对水稻植物促生细菌肺炎克雷伯氏菌 NG14 生物膜形成前后的外膜蛋白变化情况进行了研究, 发现若干种蛋白特别是外膜蛋白表达量发生明显变化(数据尚未发表), 将为进一步研究细菌生物膜形成相关因子提供依据.

### 3 与植物联合的细菌生物膜基质组分(matrix components in plant-associated bacterial biofilm)

#### 3.1 胞外多糖和蛋白质(extracellular polysaccharides and proteins)

细菌生物膜基质与其中的细胞相联接, 并赋予生物膜许多重要的特性, 如保护细胞抗干旱等逆境胁迫的能力. 基质通常是由胞外多糖组成, 此外还包括蛋白质及 DNA<sup>[78]</sup>. 细菌可以变换它们的基质组分, 同一个种的不同菌株也可能运用不同的基质组分以适应环境条件的变化.

有研究表明细菌与植物根面细胞相互接触并能产生多种生物化学物质的机制<sup>[79, 80]</sup>. 某些生物膜也可能是一些微菌落融合的结果. 胞外多糖(extracellular polysaccharides, EPS)和其他胞外多聚物, 如蛋白质和酶类的产生, 以及最终形成生物膜本身可能提高了细菌在植物根部的存活和定殖能力. 也有研究者认为, 根面微菌落的胞外多聚物基质对于细菌的生物防治能力可能有利也可能有弊, 这取决于细菌产生的抗病原真菌化合物是否始终被包埋在生物膜中或是否可通过调控和自然扩散而达到生物防治的效果<sup>[81]</sup>. 荧光假单胞菌 CHAO 的突变种能产生过量的粘液类物质(mucoid), 从而大大增强了对植物根部和丛枝菌根真菌菌丝体的附着<sup>[82]</sup>, 这些植物促生细菌(plant growth-promoting bacteria, PG-PB)的突变种将可能作为农业接种剂发挥重要的应用价值. 在中华苜蓿根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)和根癌土壤杆菌中, 主要的胞外多糖 SCG(琥珀酸聚糖)是该菌在宿主植物根上的定殖和结瘤所必需的, 缺失 SCG 的 *exoY* 突变株会形成不成熟的生

物膜, 而产生过量的 SCG 会形成厚但不稳定的生物膜<sup>[83]</sup>. 豌豆根瘤菌能合成一种酸性胞外多糖, 而缺失该胞外多糖的 *psaA* 突变株形成生物膜的量显著减少<sup>[49]</sup>.

在豌豆根瘤菌中, 生物膜的形成受 PrsDE I 型蛋白质分泌系统突变的影响, 这是由于该系统的突变导致调节胞外多糖链大小的聚糖酶 PlyA 和 PlyB 不能输出, 所以能够影响生物膜的成熟<sup>[37]</sup>. 在野油菜黄单胞菌中, 胞外多糖黄原胶 (xanthan) 是一种重要的毒性因子, 为凝聚体的形成所需要, 胞外多糖黄原胶缺失的突变种加快了菌体初始的附着. 生物膜的扩散需要一种  $\beta$ -1, 4-甘露聚糖酶, 但该酶的底物尚不清楚<sup>[84]</sup>. 在苜蓿木杆菌中, *gum* 基因与野油菜黄单胞菌的胞外多糖黄原胶合成基因具有同源性, 在一定的生长条件下 *gum* 突变株会减缓其生物膜的形成<sup>[85]</sup>. 但目前对根面细菌生物膜形成聚集体结构和基质的总体机制尚不清楚.

### 3.2 纤维素和藻酸盐 (cellulose and alginate)

研究表明, 细菌产生纤维素的能力与其在植物上的附着和生物膜的形成有关<sup>[86]</sup>. 不能合成纤维素的根癌土壤杆菌的突变种会减弱其在植物表面的附着, 而过量产生纤维素的突变种则会在表皮组织或根毛上形成厚实的生物膜<sup>[87, 88]</sup>. 研究发现与植物联合的假单胞菌分离物所形成的生物膜的结构大都有差异, 其中 1/5 产生一种  $\beta$  型胞外多糖, 据推测是纤维素<sup>[89]</sup>. 荧光假单胞菌 SBW25 的有皱折的突变种产生的乙酰化纤维素也是生物膜基质的重要组成部分<sup>[90]</sup>, 与野生型相比, 该突变种过量产生的纤维素在其生物膜形成时能够与膜脂多糖相互作用, 诱导这种有皱折的突变可提高某些假单胞菌的纤维素产量、表面附着和生物膜形成能力<sup>[89]</sup>. 菊欧文氏菌 (*Erwinia chrysanthemi*) 的生物膜组分中也有纤维素, 可起到稳定性作用<sup>[91]</sup>. 有研究表明, 恶臭假单胞菌在干燥脱水条件下生长时在空气界面上会形成具有较厚胞外多糖层的多孔生物膜<sup>[92]</sup>, 受干燥胁迫而被激活的基因与藻酸盐的合成相关<sup>[93]</sup>.

## 4 研究中存在的问题

与植物联合的细菌生物膜及其形成机制的研究是在当今“与植物联合的生物膜”和“微生物生态

学”两个领域研究前沿的结合点上, 将与植物联合的细菌生物膜的形成和结构组分与细菌在植物上的定殖能力相联系而提出的新课题, 有利于把两个领域的知识进行整合, 为深入揭示植物与其联合的细菌相互作用机理提出新的见解. 由于与植物联合的细菌生物膜是细菌和植物与土壤(非生物介质)相互作用的共同界面(interface), 处于复杂的能量流动与物质循环的体系之中, 研究还涉及细菌膜蛋白质组学等问题, 我们在研究实践的基础上提出以下建议:

首先, 在与植物联合的细菌生物膜的研究中, 生物膜与其定殖的植物组织表面(如种子表面、根面等)构成一个复杂的体系, 因此, 研究植物和微生物之间的相互作用的特异性, 在各项实验测试中, 选择单一可变因子分析法十分重要. 其次, 研究与植物联合的细菌在植物组织表面形成生物膜的情况的同时, 我们设置细菌在非生物材料表面所形成生物膜作为对照, 比较其差异, 可以更好地了解植物和微生物之间的相互作用的特异性. 第三, 细菌膜蛋白的提取方法较多, 我们曾采用试剂盒提取膜蛋白, 该方法的优点是操作简便、体积小及所需时间短. 但是其缺点也是显而易见的: (1) 膜蛋白提取的操作上易受人为因素的影响, 存在着重复性差的问题; (2) 该方法操作获得的样品量少, 需要多次制备样品, 从而造成电泳的重复性较差; (3) 该方法所提取的蛋白定义并不清晰, 提取出的样品并非定位在膜上的蛋白质, 而更应该是含有一定疏水结构域的蛋白质, 易受胞质蛋白的干扰, 因此为后期的数据处理及分析工作带来不便. 故建议使用传统的膜蛋白提取方法, 即碱沉淀超速离心法, 这一方法的过程容易控制, 重复性较好, 可以提取的蛋白量大, 电泳重复性好. 第四, 对与植物联合的细菌生物膜的研究属于交叉学科领域, 涉及不同学科和研究方向, 从不同学科角度出发解释同一现象, 有时难免会有所出入, 因此研究过程中需要根据研究实际辩证地整合各类相关的知识, 综合分析所得实验结果.

## 5 结语

植物微生态系统是一个多种营养生物联合 (multitrophic association) 的独特微环境, 植物支持

着在根部、根际、维管以及气生组织中的多种寄生性、互生性、共生性和病原性的细菌类群。细菌形成生物膜是细菌细胞在一个特定部位保持其临界聚集质量的一种方式，与植物联合的细菌生物膜是植物与微生物相互作用的界面，是进行信息交流、能量传递和物质交换的活跃平台。细菌在生物膜上的生存具有多种优势，细菌的高种群密度可执行单细胞无法有效完成的特定程序，如分泌某种代谢物或胞外酶，当它们达到一定阈值浓度才会起作用，使其在一定期限内足以起始与宿主植物的有益或拮抗的相互作用，对植物的健康和生产力的影响至关重要<sup>[94]</sup>。

与植物联合的细菌生物膜的研究途径仍然涉及微生物生态学和植物病理学两个方面，特别是在植物根际附生病原菌和维管内生病原菌方面的研究比较深入<sup>[94]</sup>，这对于有益细菌生物膜的研究具有重要的借鉴意义。当前，与植物联合的细菌生物膜研究前沿问题包括：生物膜的形成对与植物联合的细菌生活史的影响、生物膜中细菌的种群多样性、生物膜的结构和环境的理化性质以及生物膜的组分在植物和微生物相互关系中的作用等方面<sup>[31]</sup>。近年来，与植物联合的细菌生物膜的研究工作进展很快，但仍有许多复杂的机制尚无定论，目前对植物根际、叶际和内生生物膜还知之甚少，特别是在生物膜的形成过程和调节方面还有相当多的知识空缺，将新的原位测定和观察技术，特别是分子探针等技术运用于该领域的研究，并将关键过程的知识片段进行整合，应用于植物微生态系统的有效管理实践，是对各国科学工作者的重要挑战<sup>[95]</sup>，并将可能对植物微生物学科的发展起到不可估量的推动作用<sup>[31]</sup>。

### 参 考 文 献

- Parsek MR, Fuqua C. Biofilms 2003: Emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. *J Bacteriol* 2004, 186(14): 4427-4440
- Michiels KW, Croes CL, Vanderleyden J. Two different moods of attachment of *Azospirillum brasilense* SP7 to wheat roots. *J Gen Microbiol* 1991, 137: 2241-2246
- Zobell CE. The effects of solid surfaces upon bacterial activity. *J Bacteriol* 1943, 46: 39-56
- Zobell CE. The influence of solid surface upon the physiological activities of bacteria in sea water. *J Bacteriol* 1937, 33: 86

- Makin SA, Beveridge TJ. The influence of A-band and B-band lipopolysaccharide on the surface characteristics and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces. *Microbiology*, 1996, 142: 299-307
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, et al. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*, 1995, 49: 711-745
- Caldwell DE. Cultivation and study of biofilm communities. In: Lappin Scott HM, Costerton JW. eds. *Microbial Biofilms*. Cambridge: University Press, 1995, 64-79
- Forster RC. The ultrastructure of the rhizoplane and the rhizosphere. *Annu Rev Phytopathol* 1986, 24: 1338-1345
- Ruinen J. The Phyllosphere: An ecologically neglected milieu. *Plant Soil*, 1961, 15: 81-109
- Rovira AD, Campbell R. Scanning electron microscopy of microorganisms on the roots of wheat. *Microbiol Ecol* 1974, 1: 15-23
- Morris CE, Barnes MB, McLean RJC. Biofilms on Leaf Surface: Implications for the Biology Ecology, and Management of Populations of Epiphytic Bacteria. *Phyllosphere Microbiology*. St. Paul: APS Press, 2002, 138-154
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, et al. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*, 1995, 49: 711-745
- Prigent-Combaret C, Vidal O, Dorel C, et al. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1999, 181(19): 5993-6002
- Watnick P, Kolter R. Biofilm: City of microbes. *J Bacteriol* 2000, 182(10): 2675-2679
- Gulgun BT. Quorum sensing in Gram-negative Bacteria. *Turk J Biol* 2003, 27: 85-93
- Susanne B, von Bodman W, Dietz B, et al. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 2003, 41: 455-482
- Arevalo-Ferro C, Reil G, Gorg A, et al. Biofilm formation of *Pseudomonas putida* IsoF: The role of quorum sensing as assessed by proteomics. *Syst Appl Microbiol* 2005, 28(2): 87-114
- Davey ME, O'Toole GA. Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000, 64(4): 847-867
- Bianciotto V, Andreotti S, Balestrini R, et al. Mucoid mutants of the biocontrol strain *pseudomonas fluorescens* CHA0 show increased ability in biofilm formation on mycorrhizal and nonmycorrhizal carrot roots. *Mol Plant-Micro Inter* 2001, 14(2): 255-260
- Bloemberg GV, Wijfjes AH, Lamers GE, et al. Simultaneous imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 populations expressing three different autofluorescent proteins in the rhizosphere: new perspectives for studying microbial communities.

- Mol Plant-Micro Inter, 2000, 13(11): 1170—1176
- 21 Dandurand LM, Schotzko DJ, Knudsen G R. Spatial patterns of rhizoplane populations of *Pseudomonas fluorescens*. Appl Environ Microbiol, 1997, 63: 3211—3217
  - 22 Fukui R, Poinar EI, Bauer PH, et al. Spatial colonization patterns and interaction of bacteria on inoculated sugar beet seed. Phytopathology, 1994, 84: 1338—1345
  - 23 Wiehe W, Schoter M, Hartmann A, et al. Detection of colonization by *Pseudomonas* PsA 12 of inoculated roots of *Lupinus albus* and *Pisum sativum* in greenhouse experiments with immunogold techniques. Symbiosis, 1996, 20: 129—145
  - 24 Achouak W, Heulin T, Villemin G, et al. Root colonization by symplasmata-forming *Enterobacter agglomerans*. FEMS Microbiol Ecol, 1994, 13: 287—294
  - 25 Toledo G, Bashan Y, Soeldner A. *In vitro* colonization and increase in nitrogen fixation of seedling roots of black mangrove inoculated by a filamentous cyanobacteria. Can J Microbiol, 1995, 41: 1012—1020
  - 26 Schlöter M, Borlinghaus R, Bode W, et al. Direct identification and localization of *Azospirillum* in the rhizosphere of wheat using fluorescence-labelled monoclonal antibodies and confocal scanning laser microscopy. J Microscopy, 1993, 171: 173—177
  - 27 Aurelio M, Briones J, Satoshi O, et al. Ammonia-oxidizing bacteria on root biofilms and their possible contribution to N use efficiency of different rice cultivars. Plant Soil, 2003, 250: 335—348
  - 28 Pedgley DE. Aerobiology: The atmosphere as a source and sink for microbes. In: Microbial Ecology of Leaves. New York: Springer-Verlag, 1991, 43—59
  - 29 Monier JM, Lindow SE. Frequency, size, and localization of bacterial aggregates on bean leaf surfaces. Appl Environ Microbiol, 2004, 70: 346—355
  - 30 Bureau T, Jacques MA, Berruyer R, et al. Comparison of the phenotypes and genotypes of biofilm and solitary epiphytic bacterial populations on broad-leaved endive. Microb Ecol, 2004, 47: 87—95
  - 31 Jacques MA, Josi K, Darrasse A, et al. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* is aggregated in stable biofilm population sizes in the phyllosphere of field-grown beans. Appl Environ Microbiol, 2005, 71: 2008—2015
  - 32 Cocking EC. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. Plant Soil, 2003, 252: 169—175
  - 33 Trujillo L, Camargo ZO, Salgado GR, et al. Association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* with roots of common bean (*Phaseolus vulgaris*) seedlings is promoted *in vitro* by UV light. Can J Bot, 2006, 84: 321—327
  - 34 Blanco Y, Arroyo M, Legaz ME, et al. Isolation from *Gluconacetobacter diazotrophicus* cell walls of specific receptors for sugarcane glycoproteins which act as recognition factors. J Chromatogr, 2005, 1093: 204—211
  - 35 Dong Z, Zelmer CD, Canny MJ, et al. Evidence for protection of nitrogenase from O<sub>2</sub> by colony structure in the aerobic diazotroph *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Microbiology, 2002, 148: 2293—2298
  - 36 Steenhoudt O, Vanderleyden J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses; Genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiol Rev, 2000, 24: 487—506
  - 37 Russo DM, Williams A, Edwards A, et al. Proteins exported via the PrsD-PrsE type I secretion system and the acidic exopolysaccharide are involved in biofilm formation by *Rhizobium leguminosarum*. J Bacteriol, 2006, 188: 4474—4486
  - 38 Andreote FD, Lacava PT, Gai CS, et al. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. Can J Microbiol, 2006, 52: 419—426
  - 39 Gemaine KJ, Liu X, Cabellos GG, et al. Bacterial endophyte enhanced phytoremediation of the organochlorine herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. FEMS Microbiol Ecol, 2006, 57: 302—310
  - 40 冯永君, 宋 未. 水稻内生优势成团泛菌 GFP 标记菌株的性质与标记丢失动力学. 中国生化与分子生物学报, 2002, 18(1): 85—91
  - 41 沈德龙, 冯永君, 宋 未. 内生成团泛菌 YS19 对水稻乳熟期光合产物在旗叶、穗分配中的影响. 自然科学进展, 2002, 12(8): 863—865
  - 42 Feng YJ, Shen DL, Song W. Rice endophyte *Pantoea apploverans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. J Appl Microbiol, 2006, 100: 938—945
  - 43 Feng YJ, Shen DL, Dong XZ, et al. *In vitro* symplasmata formation in the rice diazotrophic endophyte *Pantoea apploverans* YS19. Plant Soil, 2003, 255: 435—444
  - 44 Duan JY, Yi T, Feng YJ, et al. Rice endophyte *Pantoea apploverans* YS19 forms multicellular symplasmata via cell aggregation. FEMS Microbiol Lett, 2007, 270: 220—226
  - 45 王丽英. 生物膜的形成与控制. 食品工业科技, 1998, 6: 69—70
  - 46 Reynolds TB, Fink GR. Baker's yeast, a model for fungi biofilm formation. Science, 2001, 291: 878—881
  - 47 唐 娅, 刘国生, 谢志雄, 等. 细菌生物膜的结构及形成机制研究进展. 氨基酸和生物资源, 2006, 28(3): 30—33
  - 48 Fuqua C, Greenberg EP. Listening in on bacteria: Acyl-homoserine lactone signalling. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3: 685—695
  - 49 von Bodman SB, Bauer WD, Coplin DL. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. Annu Rev Phytopathol, 2003, 41: 455—482

- 50 Elasri M, Delorme S, Lemanceau P, et al. Acyl-homoserine lactone production is more common among plant-associated *Pseudomonas* spp. than among soilborne *Pseudomonas* spp. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 1198—1209
- 51 Quinones B, Dulla G, Lindow SE. Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility and virulence in *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2005, 18: 682—693
- 52 Wei HL, Zhang LQ. Quorum-sensing system influences root colonization and biological control ability in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2006, 89: 267—280
- 53 Gantner S, Schmid M, Durr C, et al. *In situ* quantitation of the spatial scale of calling distances and population density-independent N-acylhomoserine lactone-mediated communication by rhizobacteria colonized on plant roots. *FEMS Microbiol Ecol*, 2006, 56: 188—194
- 54 Monds RD, Silby MW, Mahanty HK. Expression of the Pho regulon negatively regulates biofilm formation by *Pseudomonas aureofaciens* PA147-2. *Mol Microbiol*, 2001, 42: 415—426
- 55 Danhorn T, Hentzer M, Givskov M, et al. Phosphorous limitation enhances biofilm formation of the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* through the PhoR-PhoB regulatory system. *J Bacteriol*, 2004, 186: 4492—4501
- 56 Achouak W, Conrod S, Cohen V, et al. Phenotypic variation of *Pseudomonas brassicacearum* as a plant root-colonization strategy. *Mol Plant-Micro Inter*, 2004, 17: 872—879
- 57 Greer-Phillips SE, Stephens BB, Alexandre G. An energy taxis transducer promotes root colonization by *Azospirillum brasilense*. *J Bacteriol*, 2004, 186: 6595—6604
- 58 Tumbull GA, Morgan JAW, Whipps JM, et al. The role of bacterial motility in the survival and spread of *Pseudomonas fluorescens* in soil and in the attachment in bacterial-plant interactions. *FEMS Microbiol Ecol*, 2001, 35: 57—65
- 59 Yao J, Allen C. Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *J Bacteriol*, 2006, 188: 3697—3708
- 60 Bacilio-Jimenez M, Aguilar-Flores S, Ventura-Zapata E, et al. Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. *Plant Soil*, 2003, 249: 271—277
- 61 Tans-Kersten J, Huang H, Allen C. *Ralstonia solanacearum*-needs motility for invasive virulence on tomato. *J Bacteriol*, 2001, 183: 3597—3605
- 62 Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, et al. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol*, 2002, 184: 1140—1154
- 63 Rudrappa T, Biedrzycki ML, Bais HP. Causes and consequences of plant-associated biofilm. *FEMS Microbiol Ecol*, 2008, 64: 153—166
- 64 Ramey BE, Koutsoudis M, Bodman SB, et al. Biofilm formation in plant-microbe associations. *Curr Opin Microbiol*, 2004, 7: 602—609
- 65 Dardanelli M, Angelini J, Fabra A. A calcium-dependent bacterial surface protein is involved in the attachment of rhizobia to peanut roots. *Can J Microbiol*, 2003, 49: 399—405
- 66 Smit G, Logman TJJ, Boerrigter MET, et al. Purification and partial characterization of the Ca<sup>2+</sup> dependent adhesin from *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae which mediates the first step in attachment of Rhizobiaceae cells to plant root hair tips. *J Bacteriol*, 1989, 171: 4054—4062
- 67 Swart S, Smit G, Lugtenberg BJJ, et al. Restoration of attachment, virulence and nodulation of *Agrobacterium tumefaciens* chvB mutants by rhicadhesin. *Mol Microbiol*, 1993, 10: 596—605
- 68 Ausmees N, Jacobsson K, Lindberg M. A unipolarly located, cell-surface-associated agglutinin, RapA, belongs to a family of *Rhizobium*-adhering proteins (Rap) in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Microbiology*, 2001, 147: 549—559
- 69 Laus MC, Logman TJ, Lamers GE, et al. A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin. *Mol Microbiol*, 2006, 59: 1704—1713
- 70 Burdman S, Okon Y, Jurkevitch E. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. *Crit Rev Microbiol*, 2000, 26: 91—110
- 71 Castellanos T, Ascencio F, Bashan Y. Cell-surface lectins of *Azospirillum* spp. *Curr Microbiol*, 1998, 36: 241—244
- 72 Burdman S, Jurkevitch E, Schwartsburd B, et al. Involvement of outer membrane proteins in the aggregation of *Azospirillum brasilense*. *Microbiology*, 1999, 145: 1145—1152
- 73 Guilhabert MR, Kirkpatrick BC. Identification of *Xylella fastidiosa* antivirulence genes: Hemagglutinin adhesins contribute to *X. fastidiosa* biofilm maturation and colonization and attenuate virulence. *Mol Plant-Micro Inter*, 2005, 18: 856—868
- 74 Meng Y, Li Y, Galvani CD, et al. Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilus-driven twitching motility. *J Bacteriol*, 2005, 187: 5560—5567
- 75 Espinosa-Urgel M, Salido A, Ramos JL. Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds. *J Bacteriol*, 2000, 182: 2363—2369
- 76 Hinsa SM, Espinosa-Urgel M, Ramos JL, et al. Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Mol Microbiol*, 2003, 49: 905—918
- 77 Torres AG, Jeter C, Langley W, et al. Differential binding of *Escherichia coli* O157: H7 to alfalfa human epithelial cells and plastic is mediated by a variety of surface structures. *Appl Envi-*

- ron Microbiol. 2005, 71: 8008—8015
- 78 Branda SS, Vik S, Friedman L, et al. Biofilms: The matrix revisited. Trends Microbiol. 2005 13: 20—26
- 79 Amellal N, Burtin G, Bartoli F, et al. Colonization of wheat roots by an exopolysaccharide-producing *Pantoea agglomerans* strain and its effect on rhizosphere soil aggregation. Appl Environ Microbiol. 1998, 64: 3740—3747
- 80 Van Elsas JD, Trevor JT, Starodub ME. Bacterial conjugation between *Pseudomonads* in the rhizosphere of wheat. FEMS Microbiol Lett. 1988, 53: 299—306
- 81 Morris CE, Monier JM. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. Annu Rev Phytopathol. 2003, 41: 429—453
- 82 Bianciotto V, Andreotti S, Balestrini R, et al. Mucoïd mutants of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 show increased ability in biofilm formation on mycorrhizal and non mycorrhizal carrot roots. Mol Plant-Micro Inter. 2001, 14: 255—260
- 83 Fujishige NA, Kapadia NN, De Hoff PL, et al. Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. FEMS Microbiol Ecol. 2006, 56: 195—206
- 84 Dow JM, Crossman L, Findlay K, et al. Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. Proc Natl Acad Sci USA. 2003, 100: 10995—11000
- 85 Souza LC, Wulff NA, Gaurivaud P, et al. Disruption of *Xylella fastidiosa* CVC *gumB* and *gumF* genes affects biofilm formation without a detectable influence on exopoly saccharide production. FEMS Microbiol Lett. 2006, 257: 236—242
- 86 Romling U. Molecular biology of cellulose production in bacteria. Res Microbiol. 2002, 153: 205—212
- 87 Matthyse AG. Role of bacterial cellulose fibrils in *A. tumefaciens* infection. J Bacteriol. 1983, 154: 906—915
- 88 Matthyse AG, Marry M, Krall L, et al. The effect of cellulose overproduction on binding and biofilm formation on roots by *Agrobacterium tumefaciens*. Mol Plant-Micro Inter. 2005, 18: 1002—1010
- 89 Ude S, Arnold DL, Moon CD, et al. Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates. Environ Microbiol. 2006, 8: 1997—2011
- 90 Spiers AJ, Rainey PB. The *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader biofilm requires attachment factor, cellulose fibre and LPS interactions to maintain strength and integrity. Microbiology. 2005, 151: 2829—2839
- 91 Yap MN, Yang CH, Barak JD, et al. The *Erwinia chrysanthemi* type III secretion system is required for multicellular behavior. J Bacteriol. 2005, 187: 639—648
- 92 Chang WS, Halverson LJ. Reduced water availability influences the dynamics, development, and ultrastructural properties of *Pseudomonas putida* biofilms. J Bacteriol. 2003, 185: 6199—6204
- 93 van de Mortel M, Halverson LJ. Cell envelope components contributing to biofilm growth and survival of *Pseudomonas putida* in low-water-content habitats. Mol Microbiol. 2004, 52: 735—750
- 94 Thomas D, Clay F. Biofilm formation by plant associated bacteria. Annu Rev Microbiol. 2007, 61: 401—422
- 95 Hinsinger B, Gobran GR, Gregory PJ, et al. Rhizosphere: A unique environment. [http://www.gsf.de/iboe/congres/Rhizosphere04\\_Abstracts\\_OP.pdf](http://www.gsf.de/iboe/congres/Rhizosphere04_Abstracts_OP.pdf) [2008-03-01]