

DOI: 10.13376/j.cbbs/2014025

文章编号: 1004-0374(2014)02-0161-08

沉水植物附着细菌群落结构及其多样性研究进展

何 聃^{1,2}, 任丽娟^{1,2}, 邢 鹏¹, 吴庆龙^{1*}

(1 中国科学院南京地理与湖泊研究所, 南京 210010; 2 中国科学院大学, 北京 100039)

摘 要: 与陆生植物类似, 沉水植物的叶表也存在着大量的附着细菌。附着细菌拥有独特的生态位和显著的生态功能, 与沉水植物构成了复杂的共生体系。针对附着细菌的群落结构及其多样性进行了简单的综述。在方法学上, “表面活性剂 + 超声处理” 的方式能够比较有效地洗脱叶表的附着细菌。显微计数和分离培养的方法分别发现, 某些沉水植物附着细菌的多度在 $10^5 \sim 10^7$ 个/cm² 以及 10^6 CFU/cm 左右。克隆测序的研究表明沉水植物附着细菌的 OTU 在几十到上百的范围内。在群落结构上, *Betaproteobacteria*、*Bacteroidetes*、*Alphaproteobacteria*、*Actinobacteria*、*Planctomycetes*、*Cyanobacteria* 等门类的细菌较为常见。先锋物种在附着细菌生物膜的形成过程中发挥着关键作用, 环境条件和植物体都会对附着细菌的多样性造成影响。富营养化水体观察到较高的附着细菌丰度, 溶解性有机物比无机营养物更加适合附着细菌的利用。植物体的叶片化学组成、渗出物以及物理结构等会影响附着细菌的多样性及群落结构。对沉水植物附着细菌群落结构形成的机理进行了假说性质的总结, 并对附着细菌的研究前沿进行了展望。

关键词: 沉水植物; 附着细菌; 多样性; 群落结构

中图分类号: Q178

文献标志码: A

Research progress of diversity and community structure of epiphytic bacteria on submerged macrophytes

HE Dan^{1,2}, REN Li-Juan^{1,2}, XING Peng¹, WU Qing-Long^{1*}

(1 Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China;

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: Similar to terrestrial plants, aquatic submerged plants harbor abundant epiphytic bacteria on their leaves. With unique ecological niche and significant ecological function, epiphytic bacteria develop complex symbiotic relationship with submerged plants. This paper focused on diversity and community structure of epiphytic bacteria on submerged plants. In methodology, the surfactant + ultrasonic processing way can wash epiphytic bacteria effectively. Based on microscopic count and cultivation methods, it's found that on some submerged plants, the number of epiphytic bacteria ranges $10^5 \sim 10^7$ cells/cm² and 10^6 CFU/cm, respectively. Cloning sequencing studies indicate that OTU numbers of epiphytic bacteria on submerged plants are in the range of tens to hundreds. *Betaproteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Planctomycetes*, *Cyanobacteria* are the common bacteria phyla found on the surface of submerged macrophytes. Pioneering species of bacteria play key roles in the process of biofilm development of epiphytic bacteria. Environmental characteristics and plant types can affect the diversity of epiphytic bacteria. Higher epiphytic bacteria abundance is observed in eutrophic waterbody. And dissolved organic matter is more suitable for epiphytic bacteria than inorganic nutrients. Chemical composition, leach or exudates and physical structure of plant leaves are likely to affect epiphytic bacteria diversity and structure. Here we proposed several hypotheses on the mechanism of epiphytic bacterial community structure moulding. At last we had an overall envisage about the study of epiphytic bacteria on submerged macrophytes.

Key words: submerged macrophytes; epiphytic bacteria; diversity; community composition

收稿日期: 2013-12-27

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目(31225004); 中国科学院国际伙伴计划项目(KZZD-EW-TZ-08)

*通信作者: E-mail: qlwu@niglas.ac.cn; Tel: 025-86882107

细菌是主要的分解者,拥有丰富多样的种类和巨大的数目,是生态系统的重要一环,在生物地球化学循环过程中发挥着重要的作用。在内陆水体中,除了水柱中的浮游细菌和沉积物细菌外,在生物及非生物的界面还生长有大量的附着细菌。沉水植物是浅水岸带的关键种,在抑制沉积物悬浮、维持水体透明度、去除营养盐和污染物、减轻富营养化危害等方面发挥着重要的功能^[1]。沉水植物的表面也生长有大量的附着细菌,它们对沉水植物的生理状况及生态过程施加着有利或有害的作用。一方面,附着细菌产生的次生代谢产物可以用来抵御无脊椎动物及有害微生物对植物的不利影响^[2];另一方面,附着细菌介导形成的生物膜也可能遮蔽阳光,影响沉水植物的光合作用^[3]。在植物体的死亡衰败过程中,连同其他分解者,附着细菌也参与到将有机物质分解矿化的过程中。相对于浮游细菌,附着细菌拥有更高的多样性指数,并且由于沉水植物具有比较大的比表面积,附着细菌在整个水生生态系统中占有重要的位置。沉水植物附着细菌生物膜单位体积的生产力是浮游细菌的4~5倍。20%篦齿眼子菜覆盖率的Stigsholm湖中,附着细菌的生产力约等于全湖浮游细菌的生产力^[4]。篦齿眼子菜附着细菌的脱氮作用明显,其反硝化能力可以在高营养条件下得到极大的提高,并且受光照、水流和植物年龄的影响^[5]。附着细菌同样可以进行铵的同化利用,在某些无机碳缺乏的微环境下,这部分附着细菌受到铵的促进而加快对有机碳的分解,从而减轻宿主植物及蓝细菌等自养生物的碳缺乏^[6]。在其他元素的生物地球化学循环过程中,虽然目前缺乏详细的文献资料,但是附着细菌在C循环^[7]、P吸收和释放^[8]以及重金属吸附和去除方面的作用^[9-10]在一些文献中有所讨论。

相对于沉水植物附着细菌重要的生态角色和地位,目前对于它们还缺乏系统的研究工作。特别是关于附着细菌在元素循环过程中的功能及作用,鲜有文献透露机理方面的细节或者具体量化指标。基于此,本文并不打算将重点放在附着细菌的生态功能上。群落结构及多样性是生态学的一个基本组成部分,也是了解生态系统功能和演变的基础。在人类活动逐渐加剧的今天,湖泊生态系统的各种问题凸显,特别是沉水植物退化等问题,严重影响了湖泊的结构和功能。在有些文献中,认为附着细菌在沉水植物衰亡的过程中可能发挥作用^[11],这些作用是如何发挥的,可能与哪些细菌类别相关,这也需

要附着细菌结构及多样性的相关知识。附着细菌作为一种界面微生物,关于其多样性及群落结构形成等方面的知识,可以丰富人们对生物界面这一特殊生境下的生物多样性的认识,加深人们对于细菌乃至生命科学中关于物种、进化、多样性保护、生物资源挖掘及利用等方面的理解。本文在当前的文献基础上,对沉水植物附着细菌的概念、细菌群落多样性及系统分类、群落动态及其影响因素进行简单的综述,并对附着细菌的研究前沿进行了展望。

1 植物附着细菌的概念及特征

“Epiphytic”的词义是生长在植物表面上的。Web of Science 上的搜索结果显示,最初(1953年)的文献使用“epiphytic microflora”来表示植物表面的微生物群落^[12]，“epiphytic bacterium”在1965年的一篇文献中被首次使用,指出一种附着细菌在黄瓜和玉米叶片枯萎病害中的作用^[13]。在水生环境中最初使用“epiphytic bacteria”是在1971年的一篇文献,作者研究了湖泊滨岸几种大型植物的附着细菌和藻类的初级生产力、物质代谢能力以及和植物的相互作用^[14]。植物附着细菌指的就是一类生长在植物表面,依靠或者不依靠植物的代谢产物作为营养,和植物形成紧密或者松散的共生关系的一类细菌,以叶片附着细菌为主。与内生细菌(endophytic bacteria)相对,生长在植物表面的附着细菌可以洗刷下来^[13],或者通过紫外照射及化学消毒剂进行杀菌处理^[15]。附着细菌和内生细菌并不是严格区分开的,植物叶片的气孔、腺体或者物理缺口都可能成为这两类细菌扩散转化的通道。在有些文献中,会将附着细菌和内生细菌一并研究,称为植物关联细菌(associated bacteria)^[16]。附着细菌在叶片的分布是非均一的,在叶脉、腺毛、远轴端有比较密集的聚集^[17]。大部分附着细菌都不是孤立分布的,它们通过向胞外分泌多聚物彼此联系形成生物膜聚集体^[18],而生物膜的构造对于细菌修饰局部微环境、抵御不良条件有着重要的意义^[19]。根据某些学者的观点,在营养充分的条件下,细菌更喜欢附着的生活方式,而形成生物膜是细菌进行附着方式生活的一个关键条件^[20-21]。

2 附着细菌洗脱方法的介绍

良好的方法学是准确评估细菌多样性的基础。在一些研究中,针对表皮较厚、叶片较宽的叶片组织,先将叶片表皮剥离下来,然后进行染色、制片,

可以在荧光显微镜或者激光共聚焦显微镜下, 直接观察叶表的细菌分布^[22]。这种方法直观、生动, 但是对于叶片结构及处理有着较高的要求, 在评估细菌数目上不够准确, 也不能了解细菌的系统分类和组成。因此, 绝大多数对附着细菌的研究都是先将附着细菌从叶片上解离下来, 然后再对细菌进行显微观察、分离培养、分子技术等后续分析。在解离附着细菌的过程中, 关键是要把细菌有效地从叶片上洗脱下来, 同时要避免对叶片物理结构的破坏, 以免植物内容物、内生细菌对结果的干扰。尽管有的研究者仅仅采用无菌水冲洗^[23]、简单涡旋或振荡的方式去除细菌^[24], 这样的方式并不让人信服。在无菌水中添加适当浓度的去污剂或者表面活性剂(Tween 80、焦磷酸钠等), 加入 pH 缓冲液, 再辅以超声、振荡处理, 可以加快附着细菌从植物表面的解离, 同时对附着细菌生物膜中的聚集体进行破碎均一化, 有利于对细菌多样性的研究^[25]。在使用超声处理时, 可以选择超声探针或者超声水浴的方式。Buesing 和 Gessner^[26] 在研究中比较了 4 种不同的去除方式, 发现超声探针(功率 80 W)对芦苇沉水叶片附着细菌的去除效果要好一些, 2~3 min 的处理时间就足够了。Hempel 等^[27] 的研究中发现, 超声探针(功率 57 W, 20 kHz)的方式破坏了狐尾藻等植物的组织结构, 并且去除效果也不理想, 而采用“超声水浴(35 kHz)+剧烈振荡”的方式可以比较好地去除附着细菌, 并且不会对叶片造成损害。在具体实验中, 应该根据植物材料、仪器的功率和频率、样品数量等因素选择一个合适的实验方案。

3 沉水植物附着细菌的群落结构及多样性

3.1 附着细菌的多度及物种丰度

通过染料标记显微观察计数, 可以对附着细菌的数目进行量化研究。沉水植物附着细菌的数目范围在 $10^5 \sim 10^7$ 个/cm²^[27-29], 这一结果和陆生植物($10^6 \sim 10^7$ 个/cm²)类似^[18]。基于分离纯培养的技术, 在培养基上观察到的菌落单元(colony-forming unit, CFU)数目, 是反映附着细菌群落中可培养细菌多度的重要指标。Chand 等^[30] 的研究表明, 狐尾藻片段附着细菌的纯培养菌落的数目为 $1.08 \times 10^6 \sim 7.82 \times 10^6$ CFU/cm。分离纯培养的细菌只能反映细菌群落的很少一部分, 基于细菌 DNA 的分子技术可以对整个群落的 DNA 进行分析处理, 从而可以帮助全面了解细菌群落的多样性。16S 核糖体基因

具有适中的保守性和可变性, 与细菌的种类分化和分子进化有着很好的耦合性, 也是研究细菌分类的标签基因。Crump 和 Koch^[31] 对 4 种沉水植物的关联细菌进行了 16S 核糖体基因的变性梯度凝胶电泳(denatured gradient gel electrophoresis, DGGE)分析及克隆测序研究, 4 种植物的 DGGE 条带数在 28~63 条不等, 细菌序列的操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)数目总共为 152 个。He 等^[32] 研究了苦草和轮叶黑藻的附着细菌多样性, 苦草附着细菌的 OTU 数目为 55 个, 轮叶黑藻的 OTU 数目为 43 个。需要指出的是, 基于克隆测序的研究, 由于测序深度的限制, 不能完全表明细菌群落的多样性。DGGE 条带数、OTU 数目只能看作是附着细菌中优势种类的数目。未来通过高通量测序技术, 增加测序深度, 可以更加全面地了解附着细菌的多样性信息。

3.2 附着细菌的群落结构组成

在分子手段之前, 研究者们就通过分离纯培养的手段, 对细菌的菌落形态及生理生化特征进行观察, 根据这些特征把细菌区分为不同的类别。Chand 等^[30] 把从培养的狐尾藻叶片上分离到的菌株, 按特征分为 *Acinetobacter*、*Cytophaga*、*Flavobacterium*、*Moraxella*、*Pseudomonas*、*Alcaligenes*、*Vibrio*/Aeromonas spp. 等几类; 还在从野外狐尾藻样品中分离到的菌株中发现了 *Micrococcus* spp. 和 *Enterobacters*。Caslake 等^[33] 研究汞污染湖泊中沉水植物附着细菌的抗汞性能, 在分离细菌中发现了属于 *Pseudomonas* 的 2 种, 绿针假单胞菌(*P. chlororaphis*)和腐败假单胞菌(*P. putrefaciens*), 它们都具备在含汞培养基上生长的能力。PCR-DGGE、克隆测序等分子技术的使用, 可以了解附着细菌整体群落的 16S 核糖体基因的序列信息。通过比对算法, 找出和 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 或者 RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>) 等数据库中最相似的典型菌落的序列, 从典型菌落的已知分类单位来推测样品序列的分类单位。Crump 和 Koch^[31] 的研究中, 淡水环境下的美洲苦草(*Vallisneria americana*)的关联细菌主要包括(按比例大小顺序, 下同) *Bacteroidetes*、*Acidobacteria*、*Actinobacteria* 等门类, 咸水环境下的穿叶眼子菜(*Potamogeton perfoliatus*)的关联细菌主要包括 *Betaproteo-bacteria*、*Bacteroidetes*、*Alphaproteobacteria*、*Gamma-proteobacteria*、*Deltaproteobacteria*、*Spirochaetes* 等门类, 咸水环境下的一种眼子菜科的植物(*Stuckenia pectinata*)的关联

细菌主要包括 *Bacteroidetes*、*Alpha-proteobacteria*、*Deltaproteobacteria*、*Betaproteobacteria*、*Gamma-proteobacteria*、*Epsilonproteobacteria*、*OD1*、*Deinococcus-Thermus* 等门类。He 等^[32]的研究中, 苦草附着细菌主要包括 *Betaproteobacteria*、*Cyanobacteria*、*Gammaproteobacteria*、*Alphaproteobacteria*、*Bacteroidetes*、*Planctomycetes*、*Actinobacteria*、*Epsilonproteobacteria*、*Acidobacteria* 等门类, 轮叶黑藻附着细菌主要包括 *Betaproteobacteria*、*Gammaproteobacteria*、*Alphaproteobacteria*、*Cyanobacteria*、*Chloroflexi*、*Bacteroidetes*、*Planctomycetes*、*Acidobacteria*、*Deltaproteobacteria* 等门类。在属的水平上, 苦草主要包含与 *Methylophilus*、unclassified *Burkholderiales*、*Cellvibrio*、unclassified *Microbacteriaceae*、*Sulfurospirillum* 等属相似的细菌序列; 轮叶黑藻主要包含与 *Methylibium*、*Methylosoma*、*Pelomonas*、*Hydrogenophaga*、*Hyphomicrobium*、*Pirellula*、*Methylobacter*、*Caldilinea*、*Anaerolinea*、*Byssovorax*、*Caldilinea* 等属相似的细菌序列。苦草和轮叶黑藻附着细菌的群落结构在系统分类上有着很大的差异。

3.3 附着细菌多样性及群落结构的影响因素

除了受到温度、光照等物理条件的普遍性作用外, 附着细菌生长在植物和水体的界面上, 会受到来自于植物和水体两方面的影响。从附着细菌的来源及迁移的角度来讲, 水体中的浮游细菌自主运动(如鞭毛细菌)或随水流运动到叶片表面^[34], 碰到合适的生存条件, 就可能定植下来, 形成复杂的生物膜, 最后发育成一个成熟稳定的菌群; 相反, 水流冲刷, 原生动物和后生动物的取食、沾附携带等, 也会把一部分附着细菌带入水中或者其他植物表面^[35]。植物体内的一部分内生细菌, 在植物体表的缺口, 比如气孔、表皮破损处等, 可能会迁移到植物体表^[36], 并形成稳定的附着细菌群落; 有些研究者认为, 植物种子等繁殖体所携带的内生细菌, 会通过垂直转移的方式进入生长发育后的子一代植物体中。Ponder 等^[37]发现菠菜种子的内生细菌和叶片的附着细菌的丰度和结构有着明显的关联, 在种子发育过程中内生细菌可能通过胚层发育最终定植在植物体表。附着细菌也可能会进入植物体内, 在细胞间隙或者细胞内获得合适的生态位, 并形成稳定的内生细菌群落^[38]。在一些陆生植物的研究中, 丁香假单胞菌中的某些致病菌种先在植物体表附着生长, 然后通过气孔、叶片开口等进入植物体内, 营内生生活进而对植物造成病害^[39-40]。尽管如此,

附着细菌在植物表面的迁移及生长并不是任意的, 会受到植物本身、表面已经存在的生物膜以及周围环境条件的影响和调控。目前有些研究发现, 植物-细菌、细菌-细菌之间存在着一些信号分子, 对相应细菌的一系列的迁移和生长演替过程进行调控^[41-44]。以丁香假单胞菌的一个菌株 *P. syringae* pv *syringae* B728a (*PsyB728a*) 为例, 该菌株的 III 型分泌系统 (type III secretion system) 释放的效应器分子对于维持细菌接种后的早期附着生存是必要的。但是 HopZ3 和 HopAA4 这两种效应蛋白会抑制 *PsyB728a* 在本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 后期(接种 48 h 以后)的附着生活, 而其在番茄 (*Solanum lycopersicum*) 中能够一直促进附着细菌的大量生长。针对致病菌, 植物体表拥有的防卫蛋白家族可以识别不同的效应器, 进而激发相应的防卫效应。在该实验中, 苯并噻唑作为一种添加的效应器, 就激发了本氏烟草对附着 *PsyB728a* 的杀灭作用^[45]。在另一项研究中, 7% 的植物体表业已存在的附着细菌群落, 会释放出一种高丝氨酸内酯物质 (3-oxohexanoyl-homoserine lactone), 它和 *P. syringae* pv *syringae* (*Pss*) 的群体感应 (quorum sensing, QS) 效应物质是同家族的, 可以在 *Pss* 的群体感应过程中发挥交叉效应, 影响 *Pss* 的活动性能, 降低其对植物的毒害^[2]。虽然以上的例子是基于陆生植物附着细菌的研究, 但是可以推测, 在沉水植物的表面, 植物-细菌、细菌-细菌之间的交互作用也存在着类似的效应器、信号转导现象。

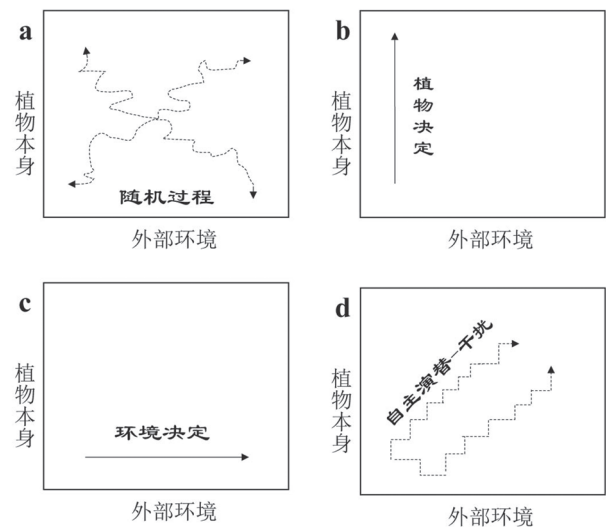
水体中的化学物质, 包括氮磷营养盐、溶解性有机物等; 植物叶片分泌或渗出的物质, 比如糖类、脂蛋白、有机酸、酚类等, 它们作为细菌生长的营养物质、干扰物质或者信号转导物质, 都会对细菌群落的多样性造成影响。Mvungi^[46]的研究表明, 几种大型海洋植物在富营养化水体自然生长或者富集培养条件下, 增加的氮磷会提高附着细菌的生物量; 在寡营养条件下, 附着细菌中的蓝细菌的比重会升高。细菌丰度在不同植物及营养条件的组合下有着显著的差异。Olapade 和 Leff^[47]研究了河流中附着生物膜对不同类别营养物质的响应情况, 在溶解性有机物的培养条件下附着细菌生物量比在无机营养物培养下的要高, 对应于低相对分子质量的有机物, 附着细菌的多度最大。Lachnit 等^[48]的研究表明, 墨角藻 (*Fucus vesiculosus*) 的叶片萃取物对附着细菌的丰度及结构有着显著的改变, 极性萃取物对弧菌目 (*Vibrionales*) 的细菌有着明显的促进生

长效效应,而非极性萃取物(叶黄素、墨角藻黄素等)对附着细菌的多度造成80%的减少。454测序结果表明,对附着细菌的减少主要是针对细菌的数目,而群落结构内部的相对比例并没有明显的变化。Hengst等^[49]对来自于两个不同海域(铜污染和未污染)的三种大型藻类的附着细菌进行了研究,铜离子污染对附着细菌结构的影响在石莼上显著,在淡黑巨海藻上不显著,三种植物获得的附着细菌群落结构有着显著的差异。石莼附着细菌的主要门类拟杆菌、 α -变形菌在两个地点的比例接近,而次要门类中的疣微菌只在铜离子污染海域发现,由此他们认为附着细菌的影响因素作用:植物种类>时间变化>铜离子污染。关于植物种类对附着细菌群落结构的影响方面,很多文献都提到了宿主专一性,不同种类的植物叶片由于其独特的化学组成、叶片渗出物、物理结构等因素,具备结构差异显著的专一性附着细菌群落^[32, 50-51]。Hempel等^[27]的研究中,狐尾藻和轮藻所含有的截然不同的化学组分和多酚类物质对附着细菌的群落结构有着显著的影响,拟杆菌门的细菌数目和植物的碳元素、叶绿素以及总酚类物质的含量有着显著的正相关作用。浮霉菌门的细菌在多酚类含量丰富的狐尾藻上基本没有发现,在轮藻上却有着较高的比例。在该研究中还比较了叶片年龄对附着细菌的影响,老叶的细菌数目要比新叶的多。除了不同种类的宿主植物对附着细菌的影响外,同一种植物的不同个体之间也观察到了不同的细菌组成情况。Burke等^[52]研究了某种石莼类海藻的附着细菌组成情况,同种海藻的6个不同个体,在种水平的OTU划分(0.03)上,共有的OTU只有6个(总共528个),而且比例上有着显著的差别。这和水体细菌的情况形成鲜明对比,水体细菌一共有21个OTU,在每个平行样品中都有发现。Hunter等对陆生植物的研究也发现了类似的情况,同种植物不同个体的附着细菌在属的水平上有着类别和相对丰度的分化;该研究还发现同种植物在植物形态、叶表特征以及溶出性碳水化合物上也存在着种内差异,这些差异对附着细菌的种内分化起着解释的作用^[9]。除了以上的植物类型和时间对附着细菌结构的影响以外,地点因素同样可以造成附着细菌结构上的分化。Knief等^[53]的研究认为,相对于植物类型,地点因素会对附着细菌的结构组成造成更大的影响。考虑到作为附着细菌主要来源的浮游细菌具备着生物地理学的特征^[54],沉水植物附着细菌可能也具备一定的生物地理学特征,这一

点需要在更大地理尺度上进行研究和验证。

4 关于附着细菌群落结构形成的机理

在本文前面的内容中,已经介绍了沉水植物附着细菌具备独特的生态特征,并且拥有丰富的种类和结构的多样性,这些多样性会受到来自于植物体、周围环境以及地理位置的影响;不同的文献由于研究主题、技术手段的差别,出现了一些不统一、甚至相互抵牾的结论。在这里,拟就沉水植物附着细菌群落的形成和演替过程进行机理方面的假说和总结。(1)随机过程(图1a)。该过程类似于群落演替中的抽彩式竞争假说。细菌随机地从周围水体迁移到植物叶片表面。先到达的细菌通过生长适应,形成了稳定的细菌群落,构造了成熟的生物膜结构。它们占据了叶片表面的生态位,由于竞争排斥及化感作用,一些种类的细菌难以在已经有成熟生物膜的叶片上进行有效地定植。附着细菌的群落结构表现出随机性,其构成和最初定植的先锋物种有很大的关系。在概念图上,细菌群落演替也会呈现出某种方向性(箭头所示),但方向是不确定的,影响因素也难以有效甄别,以虚线框表示。(2)植物决定(图1b)。这包含两个方面。其一,植物的内生细菌和植物形成了专一性的共生关系。它们可以通过繁殖体在植物的世代之间进行传递。在植物生长发育过程中,内生细菌通过组织缝隙及表皮裂口等物理通道迁移到植物表面,它们在竞争上处于有利地位,并且在附着细菌生物膜的发育中处于核心位



本图为概念图,箭头表示附着细菌群落演替的方向,虚线表示不确定因素。

图1 附着细菌群落结构形成机理

置,最终形成了专属于宿主植物的附着细菌群落结构。其二,本来和宿主植物没有专一性对应关系的细菌,从植物体内或者周围水体迁移到植物叶表。在定植过程中,由于不同植物的表面拥有种类不一的代谢渗出物,以及特有的物理结构,形成了专属于植物类型的表面微环境,细菌群落受到专一性微环境的塑造,最终形成了宿主专一性的群落结构。在概念图上,细菌群落的演替只受植物因素的影响。(3)环境决定(图1c)。这和Baas-Becking^[55]的“任何地方都存在有任何细菌,环境条件起选择作用”是一脉相承的。植物表面只是作为一种普通介质存在,细菌的生长繁殖最终是和它周遭的微环境紧密相连的。这里的微环境包括生物和非生物的因素。在附着细菌的定植及群落演替过程中,周围的环境条件,特别是在微小尺度上各种化学物质梯度、细菌捕食者的存在状况等构成的微环境,最终影响了附着细菌群落中哪些细菌最终生存下来,并且形成与环境条件相适应的群落结构类型。地点因素对附着细菌群落结构的影响可能来源于不同地点的环境条件之间的差异。在概念图上,细菌群落的演替只由环境条件来决定。(4)自主演替-干扰(图1d)。附着细菌的群落演替不是随机的,也不会受到外界的决定作用,而是一个自发进行的过程。先锋物种定植到植物表面后,针对植物表面的特殊生境,在生理生态上进行一定程度的调整。难以说明哪些种类的细菌会成为先锋物种,相反,任何通过生理调控可以在植物表面微生境定植成功的细菌都可以成为先锋物种。随后附着细菌生物膜的发育过程,在内部会受到植物体影响,外部会受到周围水体的影响。这些影响可以看作外部条件对附着细菌群落演替的干扰。它们通过特定的化学物质或基团来完成。信号物质被附着细菌所识别,会激发附着细菌特有的反应,通过转录、翻译及蛋白质修饰的调控,附着细菌表现出相应的代谢类型。代谢物质对细菌的群落结构进行一定程度的影响和塑造。这一过程会随着外界影响的不同而进行着动态的变化,但是附着细菌群落构成的生物膜本身拥有一定的独立性。在概念图上,细菌群落的演替会展现出一定的方向性,在微小的时空尺度内,可能表现出与植物因素密切相关,也可能表现出与环境条件密切相关,但整体来看,细菌群落的演替不受外在单一因子的限制。

5 关于沉水植物附着细菌研究的展望

从本课题组收集到的资料来看,目前关于附着

细菌的研究,主要集中在陆生植物和大型海洋植物上,湖泊沉水植物附着细菌的研究还非常匮乏。这也是本文只针对沉水植物附着细菌的多样性进行综述的原因。虽然如此,在文章的最后,笔者打算对附着细菌的整体研究进行展望。首先,对附着细菌的多样性和结构组成进行更加全面和准确的研究。以往的研究中,囿于技术手段的限制,往往不能完全地去除附着细菌,或者排除内生细菌的影响。在群落结构及分类的研究上,荧光原位杂交(fluorescent *in situ* hybridization, FISH)和克隆测序等的分辨率和覆盖率不足,有必要采用高通量测序手段,对附着细菌的群落结构及多样性信息进行较全面的研究。在附着细菌多样性影响因素的研究上,通过精密的仪器和巧妙的实验设计,尽量排除干扰因素的作用,保证观察到准确的结果,并且和具体明确的因子联系起来。特别是关于环境条件和宿主植物的影响方面,看看具体是那种机理能够最准确地解释附着细菌群落结构的形成过程。其次,对附着细菌的功能进行更多的研究。关于C、H、O、N、P、S等元素的循环和利用,应该有更加精细和确定的研究,阐明附着细菌具体参与哪些生物地球化学循环的过程之中,是否存在着功能和结构上的耦合和对应,在元素的平衡计算中附着细菌发挥着多大的作用和比重。另外,针对细菌-植物相互作用,阐明附着细菌和沉水植物的生长及代谢的具体关系如何。沉水植物的衰退对湖泊生态系统的结构和功能造成了很大的影响,在衰退过程中,附着细菌是否发挥着一定的作用,是否存在着类似于陆生植物的细菌病害现象;在植物-细菌相互影响中,是否也有特定的化学物质作为信号分子,诱导相应的生态过程。人们观察到的沉水植物生态功能,往往是沉水植物-微生物复合体系的功能,比如减轻富营养化,去除重金属等。在这些生态过程中,微生物特别是附着细菌的具体作用如何,有着怎样的重要性,这些都需要更多的观察和具体细致的研究。最后,应该针对不同的时空尺度,从微观到宏观,从局部到立体,对附着细菌的遗传、物种及群落多样性进行全面的研究。同时,将对细菌的研究和其他微生物如古菌、真菌,以及原生动物、后生动物等的研究整合起来,将附着细菌和浮游细菌、沉积物细菌以及植物根系细菌的研究也联系起来。通过研究各种时空、生境条件下多种微生物以及真核生物的相互关系,构建一个立体的食物网和生态系统通路,进而理解附着细菌的结构是具体如何塑造出

来的, 更加深入地认识沉水植物及湖泊生态系统的生态规律。

[参 考 文 献]

- [1] Jeppesen E, Søndergaard M, Søndergaard M, et al. The structuring role of submerged macrophytes in lakes[M]. New York: Springer, 1998
- [2] Hashidoko Y. Ecochemical studies of interrelationships between epiphytic bacteria and host plants via secondary metabolites. *Biosci Biotech Biochem*, 2005, 69(8): 1427-41
- [3] Sand-Jensen K, Borum J. Interactions among phytoplankton, periphyton, macrophytes in temperate freshwaters and estuaries. *Aquat Bot*, 1991, 41(1): 137-75
- [4] Theil-Nielsen J, Søndergaard M. Production of epiphytic bacteria and bacterioplankton in three shallow lakes. *Oikos*, 1999, 86: 283-92
- [5] Eriksson PG, Weisner SEB. Functional differences in epiphytic microbial communities in nutrient-rich freshwater ecosystems: An assay of denitrifying capacity. *Freshwater Biol*, 1996, 36(3): 555-62
- [6] Paerl HW, Pinckney JL. A mini-review of microbial consortia: Their roles in aquatic production and biogeochemical cycling. *Microb Ecol*, 1996, 31(3): 225-47
- [7] Bohn TJ, Lettenmaier DP, Sathulur K, et al. Methane emissions from western Siberian wetlands: heterogeneity and sensitivity to climate change. *Environ Res Lett*, 2007, 2(4): 045015
- [8] Reddy KR, Wetzel RG, Kadlec RH. Biogeochemistry of phosphorus in wetlands. [M]// Sims JT, Sharpley AN, Pierzynski GM. Phosphorus: Agriculture and the environment. Madison: American Society of Agronomy, 2005: 263-316
- [9] 徐永健, 廖律, 倪梦菊. 龙须菜几株附生细菌对铜离子吸附性能的比较. *微生物学通报*, 2009, 36(2): 170-4
- [10] Guilizzoni P. The role of heavy metals and toxic materials in the physiological ecology of submersed macrophytes. *Aquat Bot*, 1991, 41(1): 87-109
- [11] Phillips G, Eminson D, Moss B. A mechanism to account for macrophyte decline in progressively eutrophicated freshwaters. *Aquat Bot*, 1978, 4: 103-26
- [12] Khudiakov IP. Handling of epiphytic microflora. *Doklady Akademii nauk SSSR*, 1953, 93(5): 907-9
- [13] Leben C, Daft GC. Influence of an epiphytic bacterium on cucumber anthracnose early blight of tomato and northern leaf blight of corn. *Phytopathology*, 1965, 55(7): 760-2
- [14] Allen HL. Primary productivity, chemo-organotrophy, nutritional interactions of epiphytic algae and bacteria on macrophytes in littoral of a lake. *Ecol Monographs*, 1971, 41(2): 98-127
- [15] Henis Y, Bashan Y. Epiphytic survival of bacterial leaf pathogens [M]//Fokkema NJ, van den Heuvel J. Microbiology of the phyllosphere. Cambridge: Cambridge University Press, 1986: 252-68
- [16] Kuklinsky-Sobral J, Araújo WL, Mendes R, et al. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ Microbiol*, 2004, 6(12): 1244-51
- [17] Hossell JC, Baker JA. Note on the enumeration of epiphytic bacteria by microscopic methods with particular reference to two freshwater plants. *J Appl Microbiol*, 1979, 46(1): 87-92
- [18] Lindow SE, Brandl MT. Microbiology of the phyllosphere. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(4): 1875-83
- [19] Kiraly Z, El-Zahaby H, Klement Z. Role of extracellular polysaccharide (EPS) slime of plant pathogenic bacteria in protecting cells to reactive oxygen species. *J Phytopathol*, 1997, 145(2-3): 59-68
- [20] Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, et al. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*, 1995, 49(1): 711-45
- [21] Stanley NR, Lazazzera BA. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol Microbiol*, 2004, 52(4): 917-24
- [22] Morris CE, Monier J, Jacques M. Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(4): 1570-6
- [23] Vaidya S, Vala A, Dube H. Epiphytic bacteria and fungi associated with two marine plants (*Sueda* sp. and *Zoysia maritima*) at Bhavnagar coast. *P Natl Acad Sci India B*, 2000, 70(2): 165-9
- [24] Jensen P, Kauffman C, Fenical W. High recovery of culturable bacteria from the surfaces of marine algae. *Mar Biol*, 1996, 126(1): 1-7
- [25] Velji MI. Improved microscopic enumeration of attached aquatic bacteria following deflocculant and ultrasound treatment[D]. Simon Fraser University, 1983
- [26] Buesing N, Gessner MO. Comparison of detachment procedures for direct counts of bacteria associated with sediment particles, plant litter and epiphytic biofilms. *Aquat Microb Ecol*, 2002, 27(1): 29-36
- [27] Hempel M, Blume M, Blindow I, et al. Epiphytic bacterial community composition on two common submerged macrophytes in brackish water and freshwater. *BMC Microbiol*, 2008, 8: 58
- [28] Fry J, Humphrey N. Techniques for the study of bacteria epiphytic on aquatic macrophytes[M]//Lovelock DW, Davies R. Techniques for the study of mixed populations. London: Academic Press, 1978: 1-29
- [29] Kudryavtsev V. Bacteria on vascular aquatic plants. *Hydrobiologia*, 1984, 19(3): 50-5
- [30] Chand T, Harris RF, Andrews JH. Enumeration and characterization of bacterial colonists of a submersed aquatic plant, Eurasian watermilfoil (*Myriophyllum spicatum* L.). *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58(10): 3374-9
- [31] Crump BC, Koch EW. Attached bacterial populations shared by four species of aquatic angiosperms. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(19): 5948-57
- [32] He D, Ren LJ, Wu QL. Epiphytic bacterial communities on two common submerged macrophytes in Taihu Lake:

- diversity and host-specificity. *Chn J Oceanol Limnol*, 2012, 30(2): 237-47
- [33] Caslake L, Harris S, Williams C, et al. Mercury-resistant bacteria associated with macrophytes from a polluted lake. *Water Air Soil Poll*, 2006, 174(1-4): 93-105
- [34] Rimes CA, Goulder R. A note on the attachment rate of suspended bacteria to submerged aquatic plants in a calcareous stream. *J Appl Microbiol*, 1985, 59(4): 389-92
- [35] Underwood GJ, Thomas J. Grazing interactions between pulmonate snails and epiphytic algae and bacteria. *Freshwater Biol*, 1990, 23(3): 505-22
- [36] Sanilkumar M, Thomas AM, Vijayalakshmi K, et al. Endophytic bacteria—do they colonize within the plant tissues if applied externally? *Curr Sci*, 2012, 103(6): 626-8
- [37] Ponder M, Carder P, Lopez-Velasco G, et al. The development of spinach (*Spinacia oleracea*) phyllo-epiphytic bacterial community from seed through mature leaf stages ss influenced by environment[C]. XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): International Symposium on 938, 2010
- [38] Whipps J, Hand P, Pink D, et al. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *J Appl Microbiol*, 2008, 105(6): 1744-55
- [39] Sabaratnam S, Beattie GA. Differences between *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and *Pantoea agglomerans* BRT98 in epiphytic and endophytic colonization of leaves. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(2): 1220-8
- [40] Underwood W, Melotto M, He SY. Role of plant stomata in bacterial invasion. *Cell Microbiol*, 2007, 9(7): 1621-9
- [41] Harder T, Campbell AH, Egan S, et al. Chemical mediation of ternary interactions between marine holobionts and their environment as exemplified by the red alga *Delisea pulchra*. *J Chem Ecol*, 2012, 38(5): 442-50
- [42] Hunter PJ, Hand P, Pink D, et al. Both leaf properties and microbe-microbe interactions influence within-species variation in bacterial population diversity and structure in the lettuce (*Lactuca* species) phyllosphere. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(24): 8117-25
- [43] Ikeda S, Okubo T, Anda M, et al. Community-and genome-based views of plant-associated bacteria: plant-bacterial interactions in soybean and rice. *Plant Cell Physiol*, 2010, 51(9): 1398-410
- [44] Ryan RP, Dow JM. Communication with a growing family: diffusible signal factor (DSF) signaling in bacteria. *Trends Microbiol*, 2011, 19(3): 145-52
- [45] Lee J, Teitzel GM, Munkvold K, et al. Type III secretion and effectors shape the survival and growth pattern of *Pseudomonas syringae* on leaf surfaces. *Plant Physiol*, 2012, 158(4): 1803-18
- [46] Mvungi EF. Seagrasses and Eutrophication: interactions between seagrass photosynthesis, epiphytes, macroalgae and mussels[M]. Stockholm: Universitetsercive, 2011
- [47] Olapade OA, Leff LG. Influence of dissolved organic matter and inorganic nutrients on the biofilm bacterial community on artificial substrates in a northeastern Ohio, USA, stream. *Can J Microbiol*, 2006, 52(6): 540-9
- [48] Lachnit T, Fischer M, Künzel S, et al. Compounds associated with algal surfaces mediate epiphytic colonization of the marine macroalga *Fucus vesiculosus*. *FEMS Microbiol Ecol*, 2013, 84(2): 411-20
- [49] Hengst M, Andrade S, González B, et al. Changes in epiphytic bacterial communities of intertidal seaweeds modulated by host, temporality, copper enrichment. *Microb Ecol*, 2010, 60(2): 282-90
- [50] Lachnit T, Meske D, Wahl M, et al. Epibacterial community patterns on marine macroalgae are host-specific but temporally variable. *Environ Microbiol*, 2011, 13(3): 655-65
- [51] Whipps JM, Hand P, Pink D, et al. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *J Appl Microbiol*, 2008, 105(6): 1744-55
- [52] Burke C, Thomas T, Lewis M, et al. Composition, uniqueness and variability of the epiphytic bacterial community of the green alga *Ulva australis*. *ISME J*, 2011, 5(4): 590-600
- [53] Knief C, Ramette A, Frances L, et al. Site and plant species are important determinants of the *Methylobacterium* community composition in the plant phyllosphere. *ISME J*, 2010, 4(6): 719-28
- [54] Dolan JR. Biogeography of aquatic microbes. *Aquat Microb Ecol*, 2005, 41: 39-48
- [55] Baas-Becking LGM. Geobiologie of inleiding tot de milieukunde[M]. The Hague, the Netherlands: W.P. Van Stockum & Zoon (in Dutch), 1934