

福氏志贺菌 *mdoC* 基因对其在洗菜水中生长及生物膜形成的影响

刘 柳^{1,2}, 樊明涛¹, Bhagwat A Arvind²

(1 西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100; 2 U S Department of

Agriculture Agricultural Research Service Environmental Microbial and Food Safety Laboratory, Beltsville, MD20705, USA)

【摘 要】 【目的】研究福氏志贺菌 *mdoC* 基因对细菌在不同洗菜水中生长及生物膜形成的影响。【方法】以福氏志贺菌野生型和敲除 *mdoC* 基因的 *opgC* 突变体为出发菌株, 采用生长曲线法和结晶紫染色法, 在低渗透压及正常渗透压的菠菜、芹菜、生菜及白菜洗菜水中, 研究福氏志贺菌野生型和 *opgC* 突变体生长及生物膜的产生能力。【结果】在不同洗菜水中, 福氏志贺菌 *opgC* 突变体生长速率明显较野生型慢, 加盐提高渗透压之后, 野生型和 *opgC* 突变体稳定生长期均提前。野生型和 *opgC* 突变体的生物膜产量在菠菜水、生菜水和白菜水中有显著区别; 提高渗透压之后, 福氏志贺菌野生型在菠菜水中的生物膜产量显著提高, 而在生菜水和白菜水中生物膜产量显著下降, *opgC* 突变体在菠菜水、生菜水和白菜水中生物膜产量均显著提高。【结论】低渗条件下, 福氏志贺菌 *mdoC* 基因的缺失显著地延缓了细菌生长。提高渗透压后, 在菠菜、生菜和白菜洗菜水中, *mdoC* 基因的缺失促进了生物膜的形成。

【关键词】 福氏志贺菌; *opgC* 突变体; 渗透调节周质葡聚糖; 生物膜; 洗菜水

【中图分类号】 X503. 231

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)12-0175-06

Study on the effects of gene *mdoC* of *Shigella flexneri* on the growth of bacteria and biofilm formation in vegetable wash waters

LIU Liu^{1,2}, FAN Ming-tao¹, BHAGWAT A Arvind²

(1 College of Food Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 U S Department of Agriculture Agricultural Research Service Environmental Microbial and Food Safety Laboratory, Beltsville, MD20705, USA)

Abstract: 【Objective】 This study was to explore the effect of gene *mdoC* of *Shigella flexneri* on the growth of bacteria and biofilm formation in the different vegetable wash water. 【Method】 The growth curves of *Shigella flexneri* and *mdoC* gene knock-out *opgC* mutant were measured and the biofilm was quantified by crystal violet assay to study the growth of bacteria and biofilm formation under hypoosmotic and normal conditions in spinach, green celery, lettuce and cabbage wash water. 【Result】 The results showed that the growth rate of *opgC* mutant was lower than wild type in different wash water, while the wild type and *opgC* mutant grew faster under normal osmolarity than hypoosmotic wash water; there were significant differences between the biofilm formation of wild type and that of *opgC* mutant in spinach, lettuce and cabbage wash water. After increasing the osmolarity of wash water, the quantity of biofilm formed by wild type in spinach wash water increased significantly, while the biofilm in lettuce and cabbage wash water decreased. There were significant increases for the biofilm formation of *opgC* mutant in spinach, let-

* [收稿日期] 2009-05-20

[基金项目] 陕西省科技攻关项目(2008K01-06)

[作者简介] 刘 柳(1980—), 女, 黑龙江明水人, 在读博士, 主要从事食品微生物与食品安全研究。

E-mail: liuliu19800502@yahoo. com. cn

[通信作者] 樊明涛(1963—), 男, 陕西富平人, 教授, 博士生导师, 主要从事食品微生物和食品安全研究。

E-mail: fanmt@nwsuaf. edu. cn

tuce and cabbage wash water when the osmolarities were adjusted up to the normal ones. 【Conclusion】 The gene *mdoC* deletion in *Shigella flexneri* retarded significantly the growth at hypoosmotic condition, while the deletion increased the biofilm formation in cabbage wash water after increasing the osmolarity to normal level.

Key words: *Shigella flexneri*; *opgC* mutant; osmoregulated periplasmic glucans; biofilm; vegetable wash water

福氏志贺菌是细菌性痢疾的主要病原菌,又称痢疾杆菌。近年来,由于生食了受到福氏志贺菌污染的瓜果蔬菜,特别是由鲜切蔬菜引起的痢疾发病率呈上升趋势,而含有福氏志贺菌的农业灌溉水是鲜切蔬菜污染源的主要来源之一。福氏志贺菌存在于自然界与某些工业生产环境(如鲜切蔬菜清洗、发酵工业和废水处理)以及人和动物的体内外,附着在有生命或无生命物体的表面,以生物膜(Biofilm, BF)方式生长在这种低渗低营养的环境中。福氏志贺菌对这种水生环境的抵抗能力较强,在蔬菜水果上能生存 10 d 左右,在河水中的存活时间却长达 3 个月。福氏志贺菌在低渗透压条件下生长时,主要依靠周质空间中的渗透调节周质葡聚糖(Osmoregulated Periplasmic Glucans, OPGs)来抵抗外界渗透压对细胞质膜的破坏^[1]。渗透调节周质葡聚糖是膜衍生的寡糖类化合物,*mdoC* 基因是控制其合成的基因之一,*mdoC* 基因编码了一种高疏水性的膜结合蛋白 OpgC,该蛋白将来自琥珀酰辅酶 A 的琥珀酸残基通过膜在周质空间中传递给渗透调节周质葡聚糖^[2]。但是高渗透压会完全抑制 *mdoC* 基因的表达,不能正确合成渗透调节周质葡聚糖,同时环境的渗透压变化也经常导致细菌生长的延缓反应^[3]。目前,有部分学者就 *mdo* 基因家族的功能做了一些研究工作,如合成渗透调节周质葡聚糖基因的缺失导致细菌鞭毛蛋白减少,影响细菌运动性;软腐欧文氏菌 *opg* 突变体对胆盐的敏感性增加等^[4],但是关于福氏志贺菌 *mdoC* 基因在低渗、低营养条件下,对细菌生长及生物膜产生中的功能研究尚未见报道。

本试验以福氏志贺菌及渗透调节周质葡聚糖缺陷型 *opgC* 突变体(*mdoC* 基因缺失突变体)为出发菌株,采用洗菜水来模拟福氏志贺菌在鲜切蔬菜中的生长环境,研究福氏志贺菌野生型以及 *opgC* 突变体在不同洗菜水中的生长,明确福氏志贺菌中与渗透调节周质葡聚糖合成密切相关的 *mdoC* 基因,在不同条件下对细菌生长的影响,并检测福氏志贺菌及 *opgC* 突变体在洗菜水中产生生物膜的能力,以期为进一步研究福氏志贺菌在鲜切蔬菜中是否造

成污染提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

福氏志贺菌(*Shigella flexneri* 2457T, ATCC 700930),购买于中国工业微生物菌种保藏管理中心。

福氏志贺菌渗透调节周质葡聚糖合成缺陷型突变体 *opgC*,构建于美国农业部产品质量与安全实验室,敲除了福氏志贺菌 *mdoC* 基因。

1.2 洗菜水性质的控制

菠菜(圆叶菠菜, *Spinacia oleracea*)、芹菜(旱芹, *Oenanthe javanica*)、生菜(美生菜, *Lactuca sativa*)和白菜(结球白菜, *Brassica rapa pekinensis*)购买于陕西杨凌蔬菜市场。模拟鲜切蔬菜的准备过程:取菠菜、芹菜、生菜和白菜各 250 g,切成 2 cm×2 cm 小块,加入 500 g 去离子水,震荡 30 min,用 8 层纱布过滤除去杂质。将洗菜水在室温下 12 000 r/min 离心 10 min,将上清液用 Millipore 滤膜(孔径 0.22 μm,直径 13 mm)过滤灭菌后备用,为保证获得质量稳定的洗菜水,使用蒸汽式渗透压仪和 pH 计检测洗菜水的渗透压和 pH 值。

1.3 生长曲线的测定

试验使用的标准培养基为无盐 LB(Lauria-Bartani)液体培养基。为模拟洗菜水中低营养环境,使用去离子水将无盐 LB 液体培养基进行 2, 4, 8, 10 倍稀释,得到的培养基分别记为 LBNS, 1/2LBNS, 1/4LBNS, 1/8LBNS, 1/10LBNS。向得到的培养基中加入 NaCl,当培养基的渗透压提高到正常培养基渗透压水平时,培养基的 NaCl 浓度为 0.15 mol/L,以 1/2LBNS+S, 1/4LBNS+S, 1/8LBNS+S, 1/10LBNS+S 表示。

菌株活化时,将单菌落接种到 10 mL LB 液体培养基中,37 ℃摇动培养 20 h。将活化好的野生型和突变体培养液分别按照体积比 1:100 000 添加到培养基和洗菜水中,于 96 孔培养皿的每孔中加入 200 μL,每个样品做 72 个重复,摇动培养 24 h,每 1

h 取 3 个重复样品检测吸光值($A_{600\text{ nm}}$),以吸光值为纵坐标,时间为横坐标,绘制生长曲线。

1.4 生物膜产量的测定

使用结晶紫染色法测定生物膜产量。细菌必须静置培养,保证细菌在培养皿内正常生长是检测生物膜的基础。细菌形成的生物膜附着在培养容器内表面,可以被结晶紫染色,染色后生物膜可被乙醇溶解,通过比色法即可将产生的生物膜定量^[5]。

将活化好的野生型和突变体培养液分别按照体积比 1 : 100 000 添加到培养基和洗菜水中,于 96 孔培养皿的每孔中加入 200 μL ,以未添加细菌的洗菜水作为空白对照,每个样品做 3 个重复。30 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 24 h,检测吸光值($A_{600\text{ nm}}$)后,将培养皿用清水冲洗 5 次以除去生物膜中的细胞,每孔添加 250

μL 结晶紫溶液,室温染色 45 min,再用清水洗 5 次,每孔添加体积分数 95%乙醇溶液 300 μL ,室温下静置脱色 1 h。检测乙醇脱色液的吸光值($A_{600\text{ nm}}$),将吸光值作为生物膜产量指标。

1.5 数据处理

各试验均进行 3 次重复,取平均值。所得数据采用 Sigmaplot10.0 软件进行处理与分析。

2 结果与分析

2.1 试验用洗菜水的性质

试验对 4 种洗菜水的性质进行了测定,结果如表 1 所示。由表 1 可见,4 种洗菜水的 pH 差别不大,加盐前后的渗透压有一定差异,但差异不是很大,这可能与洗菜水的营养物含量不同有关。

表 1 试验用洗菜水的性质测定

Table 1 Characteristics of vegetable wash water

种类 Variety	pH	加盐前渗透压/kPa Osmolarity before adding salt	加盐后渗透压/kPa Osmolarity after adding salt
菠菜 Spinach	5.81±0.02	89.8±2.6	698.2±10.3
芹菜 Green celery	5.78±0.02	84.7±1.3	662.3±21.3
生菜 Lettuce	5.62±0.07	77.0±0.8	711.0±14.4
白菜 Cabbage	5.80±0.01	95.0±4.1	690.5±6.4

注:加入 NaCl 后的洗菜水中 NaCl 浓度为 0.15 mol/L。

Note:The density of NaCl after adding into the wash water is 0.15 mol/L.

2.2 福氏志贺菌生长试验低渗培养基的选择

由于 *mdoC* 基因在低渗条件下控制渗透调节周质葡聚糖的合成,且自然界中细菌多存在于低营养条件之下。因此在本试验中,首先对所使用的培养基进行稀释调节,通过模拟自然的低渗低营养状态来研究福氏志贺菌野生型及 *opgC* 突变体的生长情况,结果见图 1。

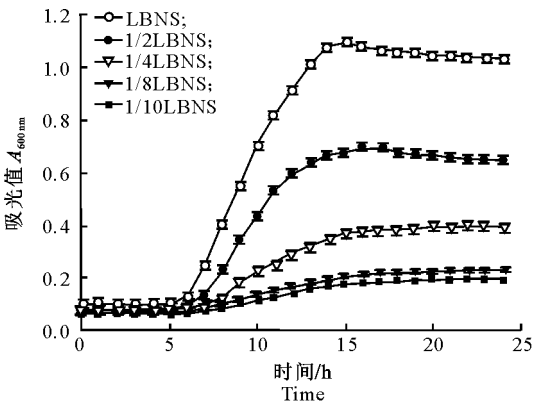


图 1 福氏志贺菌生长试验低渗培养基的选择

Fig. 1 Hypoosmotic medium selection for *Shigella flexneri* in growth experiment

由图 1 可见,随着营养物质的减少和渗透压的降低,细菌的生长有一定变化,生长曲线上最终吸光

值降低。将培养基稀释至 8 倍,培养时间达到 15 h 时,生长开始进入稳定期(吸光值达到最大后,生长速率趋向于零);当稀释到 10 倍时,培养过程中生长吸光值始终增加,没有明显的稳定期。因此,本试验选择稀释 8 倍的培养基(1/8LBNS)作为低渗、低营养培养基。

2.3 福氏志贺菌在低渗低营养条件下的生长

由图 2A 可知,福氏志贺菌野生型及 *opgC* 突变体在低渗低营养条件下产生了不同的生长曲线,*opgC* 突变体达到生长稳定期的时间较野生型多了 3 h 左右,且生长吸光值始终较野生型小,这说明在低渗、低营养环境下,细菌如果缺失 *mdoC* 基因,其生长将得到延缓。若加盐将低渗、低营养培养基中的渗透压提高到正常水平时,野生型与 *opgC* 突变体的生长曲线几乎一致,如图 2B 所示。由此可知,只有在低渗低营养条件下,*mdoC* 基因的功能才能得以体现,在正常渗透压及低营养条件下,野生型和突变体的生长与 *mdoC* 基因是否缺失的关系不大。

2.4 福氏志贺菌在洗菜水中的生长

福氏志贺菌野生型和 *opgC* 突变体在 4 种洗菜水中的生长情况如图 3 所示。由图 3 可见,福氏志贺菌野生型菌株和 *opgC* 突变体在 4 种洗菜水中生

长的最大吸光值只有 0.14 左右,较标准培养基中的最大吸光值(图 2)要小,生长达到稳定期后生长吸光值仍有波动,这可能是由于洗菜水缺乏营养并且含有微量色素物质所致。在低渗的菠菜水、芹菜水和生菜水中,野生型和 *opgC* 突变体的生长有显著区别,*opgC* 突变体进入稳定期的时间较野生型延缓了约 5~6 h,这说明在低渗低营养的洗菜水中,若

mdoC 基因的功能不能表达,即在福氏志贺菌不能正常合成渗透调节周质葡聚糖的情况下,细菌需要时间来适应低渗环境,表现出生长延缓。在低渗的白菜水中,突变体几乎不能生长,这可能是由于在相同处理条件下,白菜水的营养渗出较其他 3 种洗菜水更少。

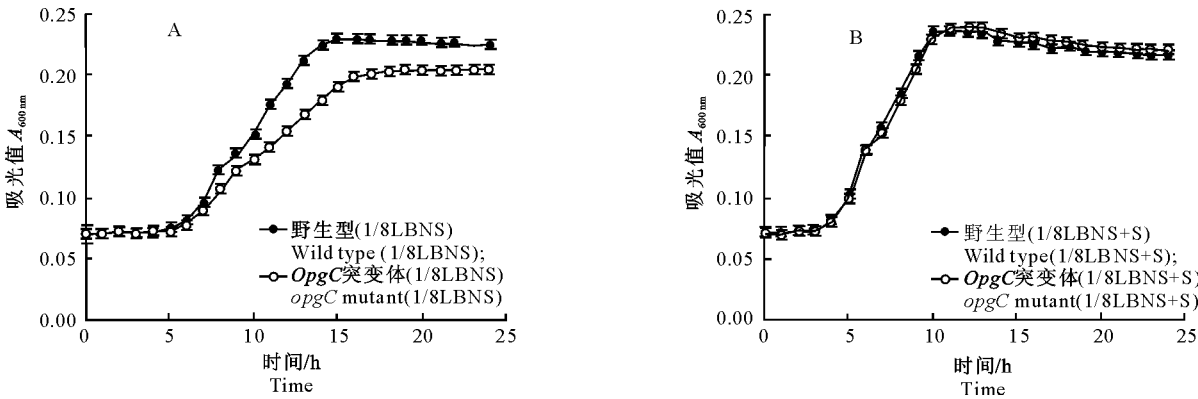


图 2 福氏志贺菌野生型及 *opgC* 突变体在 1/8LBNS 培养基中的生长
Fig. 2 Growth of *Shigella flexneri* wild type and *opgC* mutant in 1/8LBNS

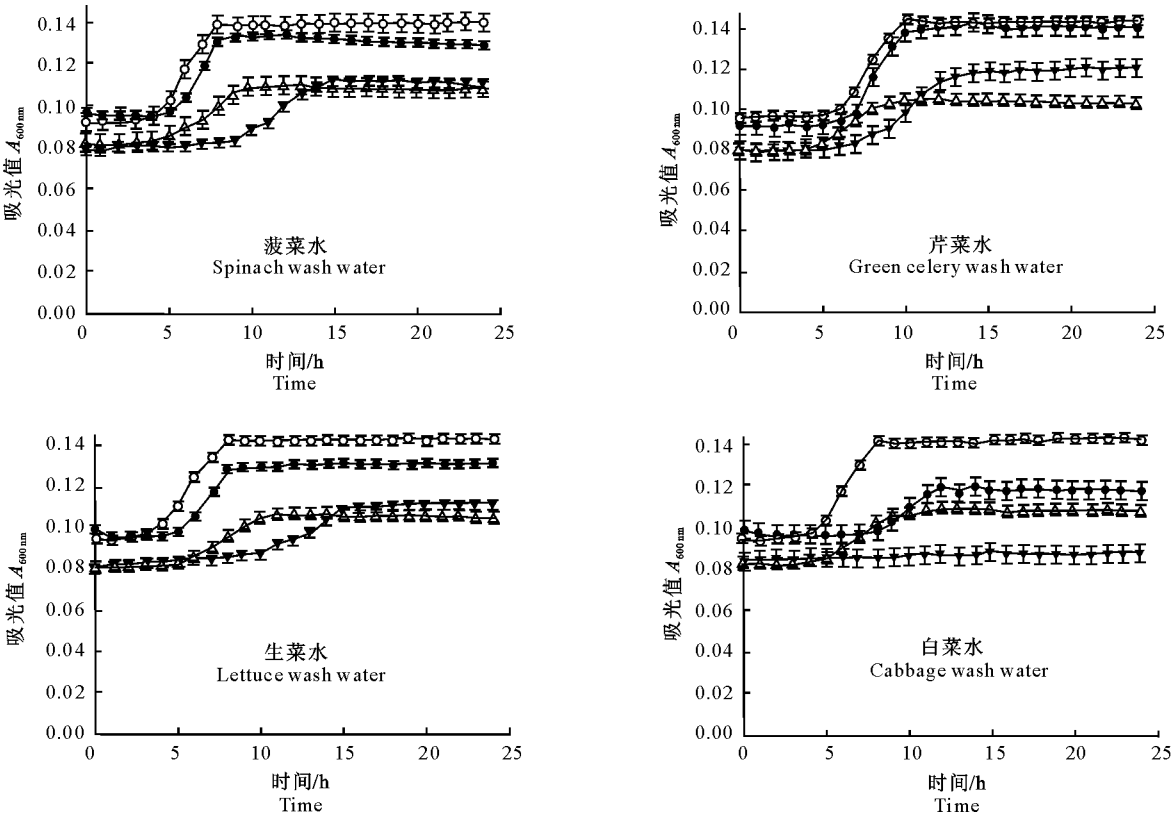


图 3 福氏志贺菌野生型及 *opgC* 突变体在洗菜水中的生长

—●—野生型(不加 NaCl); —○—野生型(加 NaCl); —▼—*opgC* 突变体(不加 NaCl); —△—*opgC* 突变体(加 NaCl)

Fig. 3 Growth of *Shigella flexneri* wild type and *opgC* mutant in wash water

—●—Wild type (without NaCl); —○—Wild type (with NaCl); —▼—*opgC* mutant (without NaCl); —△—*opgC* mutant (with NaCl)

加盐提高菠菜水、芹菜水、生菜水和白菜水的渗透压之后,如图 3 所示,野生型进入生长稳定期的时间稍有提前,而 *opgC* 突变体进入生长稳定期的时间在菠菜水、芹菜水和生菜水中均较加盐前提前了 5 h,这说明在低渗条件下,*mdoC* 基因对福氏志贺菌的生长发挥了作用,正常表达了渗透调节周质葡聚糖,使细菌能够在低渗环境正常生长;当洗菜水渗透压提高后,细菌的生长不再受到 *mdoC* 基因的影响,因此进入生长稳定期的时间提前。

2.5 福氏志贺菌在洗菜水中生物膜的形成

福氏志贺菌野生型与 *opgC* 突变体在低渗洗菜水中的生长情况如表 2 所示。由表 2 可见,以空白值(试验测得对照的吸光值为 0.035)为标准,所有细菌在洗菜水中的生长均较为理想。向洗菜水中添加 NaCl 提高渗透压之后,福氏志贺菌野生型与

opgC 突变体的生长情况发生了变化,在菠菜水和白菜水中,菌株的生长吸光值较加盐前有所提高,但是在芹菜水和生菜水中,野生型和 *opgC* 突变体的生长却较加盐前显著降低。

由表 3 可见,以空白值(试验测得对照的吸光值为 0.06)为标准,在菠菜水中,尽管细菌生长均衡,但是几乎不产生生物膜;在芹菜水中,生长理想的野生型和 *opgC* 突变体也未产生明显的生物膜;在白菜水中,野生型和突变体均产生了大量的生物膜。提高渗透压后,福氏志贺菌野生型和 *opgC* 突变体在菠菜水中的生物膜产量显著提高,而在芹菜水中,*opgC* 突变体的生物膜产量变化不大,在白菜水中,*opgC* 突变体的生物膜产量显著提高,而野生型的生物膜产量显著下降。

表 2 洗菜水中福氏志贺菌野生型及 *opgC* 突变体的生长吸光值

Table 2 Absorbance (A _{600 nm}) of growth of <i>Shigella flexneri</i> wild type and <i>opgC</i> mutant in wash water					
菌种 Strain	处理 Treatment	菠菜水 Spinach wash water	芹菜水 Green celery wash water	生菜水 Lettuce wash water	白菜水 Cabbage wash water
野生型 Wild type	不加盐 Before adding salt	0.050±0.002 a	0.058±0.002 a	0.032±0.002 a	0.094±0.017 a
	加盐 After adding salt	0.053±0.002 a	0.022±0.001 b	0.021±0.005 b	0.127±0.001 b
<i>opgC</i> 突变体 <i>opgC</i> mutant	不加盐 Before adding salt	0.044±0.004 a	0.065±0.001 a	0.044±0.004 a	0.095±0.008 a
	加盐 After adding salt	0.066±0.007 b	0.023±0.005 b	0.024±0.003 b	0.102±0.012 a

注:表中生长吸光值均为实际生物膜值与空白对照(0.035)的差值,品种内同列数据后标不同小写字母表示在 5% 水平差异显著。下表同。

Note:The values of growth are the differences between absorbance values and control (0.035),different letters under the same cultivar after the data in the same volumn indicate significant difference at 5%. The same as below.

表 3 洗菜水中福氏志贺菌野生型及 *opgC* 突变体的生物膜吸光值

Table 3 Absorbance (A _{600 nm}) of biofilm formation of <i>Shigella flexneri</i> wild type and <i>opgC</i> mutant in wash water					
菌种 Strain	处理 Treatment	菠菜水 Spinach wash water	芹菜水 Green celery wash water	生菜水 Lettuce wash water	白菜水 Cabbage wash water
野生型 Wild type	不加盐 Before adding salt	0.002±0.001 a	0.009±0.000 a	0.034±0.000 a	0.210±0.008 a
	加盐 After adding salt	0.023±0.001 b	0.005±0.002 b	0.029±0.002 b	0.177±0.009 b
<i>opgC</i> 突变体 <i>opgC</i> mutant	不加盐 Before adding salt	0.005±0.001 a	0.008±0.000 a	0.028±0.001 a	0.099±0.004 a
	加盐 After adding salt	0.024±0.001 b	0.007±0.001 a	0.030±0.001 b	0.275±0.006 b

注:表中生物膜吸光值均为实际生物膜值与空白对照(0.06)的差值。

Note:The values of biofilm are the differences between absorbance values and control (0.06).

3 讨 论

渗透压是水或溶剂经由半透膜从低溶质环境转运到高溶质环境的动力^[6]。细菌能在低渗透压环境下生存,可能得益于细菌对环境渗透压变化的反应导致生理和表型特征的饰变^[7]。福氏志贺菌野生型

及 *opgC* 突变体受低渗透压影响表现出的生长延缓现象,证明了在低渗低营养条件下 *mdoC* 基因对细菌生长的作用,在低渗低营养的洗菜水中,细菌受到环境刺激需要 *mdoC* 基因的表达,以适应细胞质膜内外的渗透压差,因此生长的起始时间延迟。然而在类球红细菌中,与 *mdoC* 基因同家族的控制渗透

调节周质葡聚糖合成的 *mdoGH* 基因,在渗透压提高前后却对细菌生长没有影响^[8],这可能与基因的多重功能性相关。*mdoC* 基因编码的跨膜蛋白 OpgC,其功能是连接琥珀酸残基与渗透调节周质葡聚糖,敲除 *mdoC* 基因后,由于缺乏跨膜蛋白 OpgC,导致福氏志贺菌 *opgC* 突变体产生的渗透调节周质葡聚糖上没有琥珀酸残基,使渗透调节周质葡聚糖的分子结构发生了变化,可能影响到细胞壁的结构,进而影响了福氏志贺菌 *opgC* 突变体在不同洗菜水中的生长。福氏志贺菌 *opgC* 突变体在加盐后洗菜水中的生长得以加快,说明在渗透压提高后,福氏志贺菌的生长不需要 *mdoC* 基因表达渗透调节周质葡聚糖以抵抗外界的低渗透压,可更快的进入生长稳定期,这与对假单胞菌中 *mdoC* 基因的研究结果一致^[9],*mdoC* 基因是细菌低渗适应性所必需的。

生物膜的形成与许多环境诱导因素有一定相关性,如温度、pH 值、氧气水平、渗透压、特殊离子、营养成分等。对于特定细菌生物膜的形成,这些因素可能共同发挥作用^[10]。虽然生物膜的研究已成为微生物研究的一个新领域,但研究过程中发现,生物膜在试验条件下较难重复,生物膜的形态取决于溶剂的渗透压高低^[11],渗透压的变化能够极大地影响形成生物膜结构必需的胞外多糖的合成^[12]。对假单胞菌 *mdoGH* 基因的研究显示,低渗条件下 *mdoGH* 基因对生物膜的形成具有重要作用^[13],这与本试验在白菜水中的研究结果类似,福氏志贺菌野生型较 *opgC* 突变体产生了更多的生物膜,*mdoC* 基因显著影响福氏志贺菌生物膜的形成。提高渗透压后的洗菜水中,福氏志贺菌野生型在菠菜水中、*opgC* 突变体在菠菜水和白菜水中的生物膜产量均有显著提高,说明在适宜的渗透压条件下,菠菜比芹菜和生菜更适合致病菌的生物膜生成。

4 结 论

1)在低渗条件下,福氏志贺菌 *mdoC* 基因的缺失显著地延缓了细菌的生长。

2)在研究的 4 种洗菜水中,*opgC* 突变体生长明显较野生型慢,加盐提高渗透压之后,福氏志贺菌 *opgC* 突变体和野生型的稳定生长期均有所提前。

3)福氏志贺菌野生型和 *opgC* 突变体的生物膜

产量在菠菜水、生菜水和白菜水中有显著区别。白菜水中加盐提高渗透压后,可以极大地促进生物膜的形成。

[参考文献]

- [1] Miller K J, Kennedy E P, Reinhold V N. Osmotic adaptation by gram-negative bacteria: Possible role for periplasmic oligosaccharides [J]. Science, 1986, 231: 48-51.
- [2] Lacroix J M, Lanfroy E, Cofez V. The *mdoC* gene of *Escherichia coli* encodes a membrane protein that is required for succinylation of osmoregulated periplasmic glucans [J]. J Bacteriol, 1999, 181: 3626-3631.
- [3] Dens E J, Bernaerts K, Standaert A R, et al. Cell division theory and individual-based modeling of microbial lag Part I [J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 101: 303-318.
- [4] Bohin J P. Osmoregulated periplasmic glucans in *Proteobacteria*-a mini review [J]. FEMS Microbiol Lett, 2000, 186: 11-19.
- [5] Shannon M H, George A O. Biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365: a role for *LapD* [J]. Microbiology, 2006, 152: 1375-1383.
- [6] Widmaier E P, Hershel R, Kevin T S. Vander's human physiology: The mechanisms of body function [M]. 11th ed. Boston: McGraw-Hill, 2008: 108-112.
- [7] Piuri M, Sanchiez-Rivas C, Ruzal A M. Cell wall modifications during osmotic stress in *Lactobacillus casei* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 98: 84-95.
- [8] Virginie C, Evgueni G, Agnes P, et al. The *opgGIH* and *opgC* genes of *Rhodobacter sphaeroides* form an operon that controls backbone synthesis and succinylation of osmoregulated periplasmic glucans [J]. Eur J Biochem, 2002, 269: 2473-2484.
- [9] Eunae C, Yukyoung J, Seunho J. Novel succinylated and large-sized osmoregulated periplasmic glucans of *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* [J]. Carbohydrate Research, 2009, 344: 996-1000.
- [10] Goller C C, Romeo T. Environmental influences on biofilm development [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2008, 322: 37-66.
- [11] Cogan N G, Keener J P. The role of the biofilm matrix in structural development [J]. Math Med Biol, 2004, 21: 147-166.
- [12] Sledjeski D D, Gottesman S. Osmotic shock induction of capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12 [J]. J Bacteriol, 1996, 178: 1204-1206.
- [13] Yannick L, Eglantine R, Aurélie D, et al. Linear osmoregulated periplasmic glucans are encoded by the *opgGH* locus of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Microbiology, 2007, 153: 3255-3263.