

研究报告

不同农艺调控措施对稻田多物种生物被膜形成过程的影响

骆乐丹[#], 赵升[#], 文翊, 严贵丽, 熊轩, 段良霞, 欧阳凯^{*}

湖南农业大学资源学院, 湖南 长沙 410128

骆乐丹, 赵升, 文翊, 严贵丽, 熊轩, 段良霞, 欧阳凯. 不同农艺调控措施对稻田多物种生物被膜形成过程的影响[J]. 微生物学通报, 2024, 51(3): 801-814.

LUO Yuedan, ZHAO Sheng, WEN Yi, YAN Guili, XIONG Xuan, DUAN Liangxia, OUYANG Kai. Effects of different agronomic measures on the formation processes of multispecies biofilms in paddy fields[J]. Microbiology China, 2024, 51(3): 801-814.

摘要:【背景】土壤微生物大多以生物被膜(biofilm)的形式存在, 目前有关不同农艺调控措施对土壤细菌群落结构影响的研究居多, 而农艺措施如何影响多物种生物被膜的形成尚不清楚。【目的】探讨不同农艺调控措施对稻田多物种生物被膜形成过程的影响。【方法】通过采集长期施用石灰(SH)、有机肥(SY)和未施肥(CK)处理的新鲜水稻根际土壤样品, 提取混合菌群作为初始接种液培养多物种生物被膜; 借助衰减全反射傅里叶变换红外光谱(attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy, ATR-FTIR)和激光共聚焦扫描显微镜(confocal laser scanning microscopy, CLSM)等原位检测技术, 结合结晶紫染色法, 探究土壤理化属性和环境因子(如 pH、温度)变化对多物种生物被膜形成的影响。【结果】两种农艺调控措施下土壤多物种生物被膜的形成过程均有 2 个生长周期。多物种生物被膜发育成熟的最适生长温度均为 25 °C, 在不同 pH 条件下土壤多物种生物被膜生物量均呈现出先升高后降低的变化趋势。施石灰处理体系中微生物的成膜能力显著高于施有机肥体系(多物种生物被膜生物量为 SH>SY>CK)。【结论】两种农艺调控措施均显著促进了稻田中多物种生物被膜的形成。

关键词: 稻田土; 农艺调控措施; 多物种生物被膜; 形成过程

资助项目: 国家自然科学基金(42007021); 湖南省自然科学基金(2020JJ5250); 中国博士后科学基金(2020M672498); 湖南农业大学自然科学基金(19QN39)

[#]对本文贡献相同

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (42007021), the Natural Science Foundation of Hunan Province (2020JJ5250), the China Postdoctoral Science Foundation (2020M672498), and the Natural Science Foundation of Hunan Agricultural University (19QN39).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. E-mail: Kai_ouyang@hunau.edu.cn

Received: 2023-08-02; Accepted: 2023-09-20; Published online: 2023-10-26

Effects of different agronomic measures on the formation processes of multispecies biofilms in paddy fields

LUO Yuedan[#], ZHAO Sheng[#], WEN Yi, YAN Guili, XIONG Xuan, DUAN Liangxia, OUYANG Kai^{*}

College of Resources, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China

Abstract: [Background] The vast majority of soil microorganisms exist in the form of biofilms. The available studies mainly focus on the impacts of different agronomic measures on the structures of soil bacterial communities, while the mechanisms of different agronomic measures in regulating the formation of multispecies biofilms remain unclear. **[Objective]** To explore the effects of different agronomic measures on the formation of multispecies biofilms in paddy fields. **[Methods]** Fresh rice rhizosphere soil samples were collected from the fields with long-term application of lime (SH), organic fertilizer (SY), and no fertilizer (CK). The microbial communities were extracted as the initial inocula to cultivate multispecies biofilms. The *in-situ* detection techniques such as attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) and confocal laser scanning microscopy (CLSM), were combined with crystal violet staining to reveal the effects of changes in soil physiochemical properties and environmental factors (pH and temperature) on the formation of multispecies biofilms. **[Results]** The soil multispecies biofilms under both agronomic measures had two growth cycles. The optimal growth temperature for the development and maturity of multispecies biofilms was 25 °C. As the pH value increased, the soil multispecies biofilm biomass showed a trend of first increasing and then decreasing. The biofilm-forming ability in the lime application system was significantly higher than that in the organic fertilizer application system, and the multispecies biofilm biomass followed the trend of SH>SY>CK. **[Conclusion]** Both agronomic measures promote the formation of multispecies biofilms in paddy fields.

Keywords: paddy soil; agronomic measures; multispecies biofilms; formation process

微生物广泛存在于土壤环境中,作为土壤中的固相成分其独特的性质能够促进土壤中养分转化、元素循环、污染物净化和维持土壤生态系统平衡^[1]。不同种属微生物之间存在复杂的交流与合作^[2-3],种间的相互作用和细菌演替过程显著影响着细菌的分布和生物量的产生。大多数微生物以多物种生物被膜(multispecies biofilms)的形式存在^[4-6],通过初始黏附、紧密黏附和形成胞外聚合物等一系列生命活动形成生物被膜。生物被膜具有复杂并高度结构化的性质,能够分泌

大量的多糖、蛋白,组成胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)^[7-8],与单一物种生物被膜相比,混合物种形成的多物种生物被膜广泛存在于自然界,并表现出更大的稳定性^[9]。因此,探究土壤多物种生物被膜的形成、了解不同土壤环境对多物种生物被膜形成过程的影响和多物种生物被膜在土壤中的作用至关重要。

施用石灰和有机肥是常见的改变土壤环境的农艺调控措施。施用石灰可以有效调节土壤酸碱度、加速土壤有机质分解,为农作物提供营养

物质^[10]；施用有机肥能够改善土壤理化性质^[11]、调节土壤营养成分、提高土壤微生物活性并且对土壤微生物的生物量和群落结构有较大的影响^[12-13]。有研究发现，添加有机肥显著提高土壤细菌多样性、酶活性^[14-15]、微生物生物量和活性^[16]。徐赛等^[17]发现增施有机肥能够提高有益微生物的丰度，抑制有害微生物的活性，维持土壤微生物群落稳定。郑沈^[18]提出施用石灰会增大土壤微生物之间的群落差异。Jiao 等^[19]研究结果表明，在农业生态系统中，不同的环境变量(如 pH^[20]、温度^[21])对丰富和稀有细菌类群的群落组装过程起着至关重要的作用。因此，环境的改变会影响微生物的生长、群落结构多样性及生物被膜的形成过程^[22]，但是以往对土壤生物被膜的模拟研究大多以单一菌株^[23]为主，或者是个别已知菌株进行混合^[24]，缺少对自然环境下多物种生物被膜的考量。与以往对单一菌株生物被膜形成过程的研究不同，本研究通过采集两种农艺调控措施(施石灰或有机肥)下的稻田土壤，提取混合菌群作为初始接种液培养多物种生物被膜，探讨多物种生物被膜对环境因子(温度、pH)改变的响应，结合激光共聚焦扫描显微成像技术、衰减全反射傅里叶变换红外光谱和酶标仪等仪器对生物被膜的形成过程进行实时监测，揭示不同农艺调控措施对土壤多物种生物被膜形成过程的影响，以期为调控和利用稻田土壤中的生物被膜提供新思路和理论依据。研究结果对深入理解土壤生物过程的本质、更好地调控生物参与的养分循环和土壤健康具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试土壤

研究试验地设于湖南省株洲市石板桥村宋家湾组(27°53'N, 113°18'E)，选取形状整齐、面

积约为 0.1–0.3 hm² 的双季稻田 8 块，在田块中间修筑高约 30 cm 的田埂隔开，一半设置为未施肥作为对照(CK)，另一半为长期定位施用石灰(SH)或有机肥(SY)处理，施石灰和有机肥处理各 4 个田块作为 4 次重复。有机肥采自长沙绿丰源生物有机肥料有限公司，主要原料为鸡粪(有机质含量≥45%、N+P₂O₅+K₂O≥5%)；石灰 CaO 含量约为 76%。在早晚翻耕时施撒石灰和有机肥，用量为 2 250 kg/hm²。水稻根际土壤(0–20 cm)样品采集于 2021 年 7 月，利用 S 型随机路线进行混合采集，剔除水稻残根和石砾后装入自封袋封存，置于提前准备好的低温泡沫箱带回实验室。

1.1.2 主要试剂和仪器

LB 固体和液体培养基和结晶紫染液，长沙市博仪生物科技有限公司；LIVE/DEADTM BacLightTM 细菌死活染料，湖南玖可诚生物科技有限公司。立式压力蒸汽灭菌器，江阴滨江医疗设备有限公司；智城恒温培养振荡器，上海智城分析仪器制造有限公司；净化工作台和生化培养箱，上海龙跃仪器设备有限公司；成像型多功能微孔板检测仪(酶标仪)，帝肯公司；衰减全反射傅里叶变换红外光谱仪，珀金埃尔默股份有限公司；激光共聚焦扫描显微镜，蔡司公司；TOC 分析仪，艾力蒙塔贸易(上海)有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 土壤理化性质的测定

土壤基本理化性质的测定方法参考文献[25]进行。将土水比调为 1:2.5，采用 pH 计测定 pH 值；土壤有机质采用重铬酸钾容量法-外加热法测定；全氮采用半微量开氏法，自动定氮仪测定；全磷采用 HClO₄-H₂SO₄ 消煮，钼锑抗比色法测定；有效磷采用 0.5 mol/L NaHCO₃ 浸提，钼锑抗比色法测定；速效钾采用冷的 2 mol/L HNO₃ 溶液浸提-火焰光度法测定；土壤溶解性有机碳采用 TOC 分析仪进行测定。

1.2.2 初始接种液的制备

土壤初始接种液的制备参考 Burmølle 等^[26]的试验。称取 150 g 过 100 目筛的土壤鲜样与 300 mL 无菌水混合在大烧杯中。以 28 °C、150 r/min 培养 30 min 后改为 30 r/min 培养过夜,使得土壤中的细菌充分转移到水环境中。

配制 LB 固体培养基涂布于无菌的载玻片上,重复多次,使得载玻片均匀布满 LB 琼脂。制备固定载玻片置物架,将载玻片固定于置物架上,让载玻片充分与土壤样品中的上清液混合却不扰动底层泥浆,28 °C、30 r/min 孵化 7 d 后取出。取出时,将载玻片上的琼脂转移到无菌离心管中,并用 PBS 缓冲液对载玻片进行冲洗,然后 1:1 加入 40%甘油于-80 °C保存,将此作为土壤多物种生物被膜的初始接种液以供后续实验使用。

1.2.3 土壤多物种生物被膜生长曲线的测定

按 1%接种量将初始接种液接种于 LB 培养基中,28 °C、180 r/min 活化 8 h。取 100 μL 活化液加入 10 mL 无菌 LB 培养基中作为扩大培养液,继续 28 °C、180 r/min 培养 12 h 后取出,测定生物被膜生物量(OD_{600} 值),同时用新鲜无菌 LB 培养基调整 OD_{600} 为 1.0 待用。

在 96 孔板中分别加入扩大培养液 1.5 μL 和 LB 培养基 150 μL,置于 25 °C 恒温箱中分别避光培养 6、12、18、24、36、48、60 和 72 h 后,测定在 96 孔板孔壁和孔底部附着的生物被膜生物量。利用结晶紫染色法^[27]和酶标仪测定 OD_{595} 的吸光值以评估生物被膜生物量,并绘制生物被膜生物量的生长曲线,在样品制备过程中需要设置未接种的培养基作为空白对照。选择 OD_{595} 表征生物被膜生物量是因为在这个波长下,结晶紫染色的吸光度与生物被膜的干重有着良好的线性关系^[28];并且对于结晶紫染色后的生物被膜,在 595 nm 波长下的吸光度值具有较高的灵敏度和准确性^[29]。

结晶紫染色法:在无菌操作台中将 96 孔板

中的培养菌液吸出,用无菌水润洗 2 遍培养孔。风干 10 min 后加入结晶紫染液 200 μL 染色 15 min,吸出染液再用无菌水清洗 2 遍,洗去未被吸附的多余结晶紫染液。风干后,加入 200 μL 无水乙醇脱色,将孔板孔壁和孔底部剩余的结晶紫溶解在无水乙醇中,利用酶标仪测量 OD_{595} 的吸光值以评估生物被膜生物量。

1.2.4 不同环境温度、pH 下多物种生物被膜的形成

取多物种生物被膜接种液按照 1:100 的比例接种于 LB 培养基中,再放入培养箱培养 24 h 后测定 OD_{595} 生物被膜生物量。在培养过程中分别设置不同的温度(5、15、25、35 和 45 °C)同时进行培养。

取多物种生物被膜接种液按照 1:100 的比例接种于不同 pH 的 LB 培养基中,25 °C 培养 24 h 后测定 OD_{595} 生物被膜生物量。pH 值分别设置为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0。

1.2.5 生物被膜内组分测定

多糖的测定采用苯酚-硫酸法^[30]。吸取样品 0.1 mL,加入超纯水补至 1 mL 后加入 1 mL 5% 苯酚溶液和 5 mL 的浓硫酸,摇匀后于 96 °C 水浴锅中恒温加热 20 min。冷却后用酶标仪测定 490 nm 下吸光度并绘制标准曲线。

蛋白质的测定采用考马斯亮蓝法^[31]。吸取样品 1 mL,加入 5 mL 考马斯亮蓝试剂,用酶标仪测定 595 nm 下吸光度,同时绘制标准曲线。

标准液的制备:分别称取 0.1 g 葡萄糖和牛血清蛋白,用蒸馏水溶解并定容至 100 mL,得到 1 g/L 的葡萄糖标准母液和牛血清蛋白标准母液。再分别吸取 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.6、0.8 和 1 mL 的标准母液至离心管和比色管中,再加超纯水补至 1 mL,后续操作与上述多糖和蛋白质的测定一致,于 4 °C 避光保存备用。

1.2.6 激光共聚焦扫描显微镜观察

将无菌的细胞爬片放入无菌 6 孔板,加入菌

液 15 μL ，静置 30 min 后再加入新鲜 LB 培养基 1.5 mL，置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 24 h。

观察时，用无菌镊子轻轻取出细胞爬片，利用无菌水洗去多余的培养基和未黏附于细胞爬片的细菌，再将黏附有生物被膜的细胞爬片平铺在无菌的载玻片上，滴加 2.5 $\mu\text{mol/L}$ LIVE/DEADTM BacLightTM 细菌死活染料，在黑暗条件下将生物被膜染色 15 min。死活染料试剂由荧光核酸染料 STYO9 和碘化丙啶(propidium iodide, PI)组成。STYO9 的激发波长为 480–500 nm，激发荧光颜色为绿色，主要用来检测具有活性的细菌；PI 的激发波长为 490–635 nm，激发荧光颜色为红色，主要对失去活性的细菌进行染色；因此可以检测出多物种生物被膜中细胞的死活情况。在激光共聚焦扫描显微镜下以 63 倍油镜对多物种生物被膜的形貌进行观察，每个样品随机观察 3 个点，将观察到的图像用 ZEN3.4 软件进行处理。

1.2.7 衰减全反射傅里叶变换红外光谱分析

将培养 24 h 后形成的多物种生物被膜用衰减全反射傅里叶变换红外光谱仪测定。设置扫描波数范围在 400–4 000 cm^{-1} ，平行扫描 256 次，分辨率为 2 cm^{-1} 。以新鲜 LB 培养基为背景，样品谱均为减去背景谱之后的值。测得结果采用 Origin 2021 软件进行信号平滑处理和数据分析。

1.3 数据处理与分析

采用 Microsoft Excel 2019 和 Origin 2021 对实验数据进行分析 and 可视化，采用 IBM SPSS Statistics 25 进行单因素方差分析(ANOVA)， $P < 0.05$ 具有统计学意义。本实验进行 5 次生物学重复($n=5$)。

2 结果与讨论

2.1 不同农艺调控措施下稻田土壤理化性质分析

如表 1 所示，对不同农艺调控措施下稻田土壤理化性质进行分析比较。与对照相比，施石灰和有机肥处理土壤养分含量均有不同程度的提高，且土壤 pH、可溶性有机碳等养分含量显著高于对照($P < 0.05$)；施石灰的稻田土中土壤 pH、有机质、溶解性有机碳、有效磷、全磷和速效钾较对照分别提升 11.99%、1.11%、15.05%、0.67%、4.88% 和 20.54%；而施有机肥处理的土壤 pH、有机质、溶解性有机碳、有效磷、全磷和全氮较对照分别提高 8.13%、24.07%、89.88%、76.28%、26.83% 和 13.98%，这与前人研究的部分结果相似^[32]。在改良后的土壤中，施有机肥处理对养分含量的提升效果显著优于施用石灰处理，但是对于土壤 pH 的影响则是施石灰处理显著高于施有机肥处理。

表 1 不同农艺调控措施下土壤基本理化性质

Table 1 Basic physicochemical properties of soils with different agronomic control measures

Physicochemical properties	CK	SH	SY
pH	4.92±0.04c	5.51±0.10a	5.32±0.08b
Soil organic matter (g/kg)	35.86±0.14b	36.26±0.05b	44.49±0.05a
Dissolved organic carbon (g/kg)	169.14±11.74c	194.59±6.63b	321.16±3.09a
Available P (mg/kg)	29.51±0.43b	29.71±0.65b	52.02±0.86a
Total P (g/kg)	0.41±0.01b	0.43±0.03b	0.52±0.01a
Available K (mg/kg)	230.42±0.07b	277.74±0.10a	119.68±0.91c
Total N (mg/kg)	1.86±0.03b	1.72±0.05c	2.12±0.05a

CK、SH 和 SY 分别代表未施肥、施石灰和施有机肥处理土壤样品；同行不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)

CK, SH, and SY represent soil samples treated with no fertilizer, lime application, and organic fertilizer application, respectively; Different lowercase letters in a row indicate significant differences among treatments at $P < 0.05$ levels.

2.2 土壤多物种生物被膜生长曲线

为了探究不同农艺调控措施下土壤多物种生物被膜的形成,分别将土壤多物种生物被膜培养 0–72 h,测定其生物被膜生物量,结果如图 1 所示。土壤多物种生物被膜出现 2 个生长周期,0–36 h 为第 1 个生长周期,36–72 h 为第 2 个生长周期,均呈现先升高后降低的趋势,这一现象与 *Vibrio cholerae* O139^[33]、*Pseudomonas aeruginosa* PAO1^[34]、*Escherichia coli* O157:H7^[35] 等单一菌种纯培养生物被膜的生长周期存在一定的差异。这可能是由于多物种生物被膜中微生物种类繁多,导致大多数微生物的生长周期不一致^[36],生物被膜内某些微生物在 36 h 时死亡,之后为膜内存活的其他微生物提供营养物质供应其生长,因此,死亡的微生物细胞增强了膜内微生物的活性,促进了生物被膜的发育,从而形成第 2 个生长周期。

CK、SH 和 SY 这 3 种处理土壤样品中多物种生物被膜生物量 OD_{595} 在 36 h 时分别为 0.47 ± 0.02 、 1.02 ± 0.15 和 1.17 ± 0.10 。在 CK 和 SY

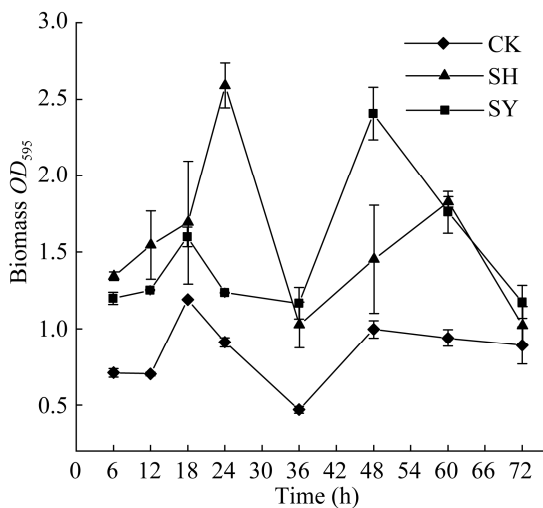


图 1 土壤多物种生物被膜生物量随时间变化曲线 CK: 未施肥; SH: 施石灰; SY: 施有机肥
Figure 1 Growth curve of soil multispecies biofilm biomass with time. CK: No fertilizer; SH: Lime application; SY: Organic fertilizer application.

的土壤样品中,第 1 个生长周期生物被膜生物量在 0–18 h 处于生物被膜指数生长期^[37–38],随着生物被膜的成熟,在 18 h 时其生物被膜生物量达到峰值(OD_{595} 分别为 1.19 ± 0.003 和 1.59 ± 0.06);第 2 个生长周期在 48 h 达到峰值(OD_{595} 分别为 0.99 ± 0.05 和 2.40 ± 0.17)。在 SH 体系中,第 1 个生长周期生物被膜生物量在 24 h 时处于对数生长期峰值($OD_{595}=2.59\pm 0.15$);第 2 个生长周期在 60 h 生物被膜生物量达到峰值 ($OD_{595}=1.82\pm 0.03$)。该土壤多物种生物被膜生物量与上述单一物种生物被膜生物量^[33–35]之间不存在显著差异,这表明土壤微生物的成膜能力一致。在 36–48 h, CK、SH 和 SY 土壤样品的生物被膜生物量持续增加,其原因可能是在第 1 个生长周期结束之后部分细菌细胞裂解甚至死亡成为营养物质,为生物被膜生长提供了营养物质^[39],使得生物被膜的生物量再次增加;3 种体系分别在 48 h 和 60 h 之后下降,表明开始进入生物被膜的解体阶段,细菌细胞逐渐脱落,重新进入游离环境中,这与纪丹丹^[27]研究发现相似。

2.3 不同温度、pH 对多物种生物被膜形成的影响

土壤多物种生物被膜用 Burmølle 等^[26]的方法提取。测定多物种生物被膜在 5 个温度梯度 (5、15、25、35 和 45 °C) 和 6 个 pH (4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0) 条件下的生长状况。由图 2 可知,CK、SH 和 SY 处理下土壤中多物种生物被膜生物量都呈现随温度先升高再下降的趋势。其中,土壤多物种生物被膜生长的最适温度均为 25 °C,这与之前研究发现一致,低温会抑制细菌细胞的生长活性^[40],温度过高可能会使得细菌细胞中的蛋白质发生变异甚至细胞死亡^[41]。

pH 是生物被膜形成的一个重要影响因素^[20,42]。结果表明,同一处理在不同 pH 环境中,多物种

生物被膜生物量均呈现出先升高后降低的趋势(图 3)。在 CK 处理中,生物被膜生长的最适 pH 值为 6.0,表明适宜在弱酸性条件下促进生物被膜的形成,这与前人研究结果相似^[22],在此之后生物被膜生物量下降,说明生物被膜可能正处于裂解阶段;而施用石灰和有机肥处理的生物被膜生物量最适 pH 值分别是 7.0 和 8.0,有研究表明一些菌株在 pH 8.0 时可以诱导生物被膜的形成^[43],这与施用有机肥处理多物种生物被膜形成的 pH 条件一致。施石灰和有机肥处理显著改变了土壤 pH(表 1),这与图 3 所得的结果一致,同一处理在不同的环境 pH 条件下的最适 pH 值有所不同,对多物种生物被膜的形成造成了影响。导致不同 pH 环境条件下适应生长的生物被膜内微生物种类和数量有所不同,从而影响了土壤多物种生物被膜中细菌的群落结构^[44-45],使稻田土壤中多物种生物被膜生物量的最适 pH 也得到提升。

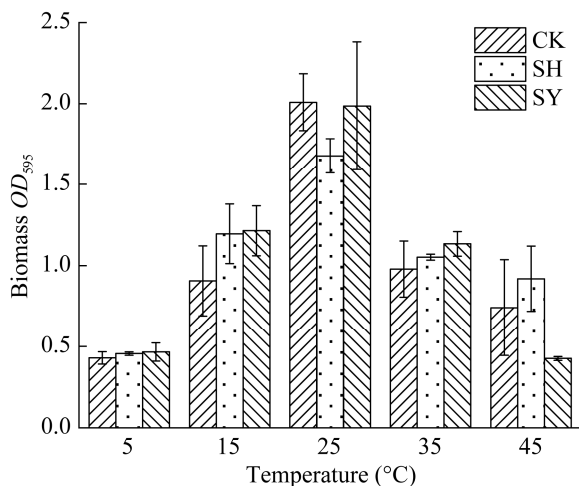


图 2 不同温度下土壤多物种生物被膜生物量
CK: 未施肥; SH: 施石灰; SY: 施有机肥
Figure 2 Soil multispecies biofilm biomass at different temperatures. CK: No fertilizer; SH: Lime application; SY: Organic fertilizer application.

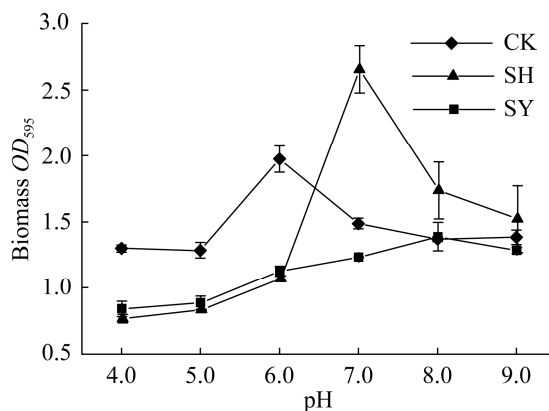


图 3 不同 pH 条件下土壤多物种生物被膜生物量
CK: 未施肥; SH: 施石灰; SY: 施有机肥
Figure 3 Soil multispecies biofilm biomass under different pH conditions. CK: No fertilizer; SH: Lime application; SY: Organic fertilizer application.

2.4 多物种生物被膜内多糖和蛋白质含量的变化

将土壤多物种生物被膜培养 24-60 h 后测定土壤多物种生物被膜基质中多糖和蛋白质含量,结果如表 2 所示。多物种生物被膜基质中多糖和蛋白质含量整体呈现出先降低后升高的趋势,CK 和 SY 处理在 24-36 h 膜内多糖、蛋白质含量下降,但 CK 处理又在 48 h 处达到峰值,而 SY 处理中多糖、蛋白质含量分别是在 48、24 h 最高;SH 处理则分别是在 24、60 h 处于膜内多糖、蛋白质含量的最高值。生物被膜内多糖和蛋白质含量的变化趋势与之前测定生物被膜生物量随时间的变化趋势相一致(图 1),再次证明了多物种生物被膜有 2 个生长周期。在生物被膜形成过程中,生物被膜基质中成分含量并不是一成不变的,多糖和蛋白质的含量随着生物被膜的生长发育而逐渐增加,与大肠杆菌、恶臭假单胞菌和枯草芽胞杆菌等单一物种生物被膜^[46]和活性污泥^[47]的 EPS 产量一致。

有研究表明,多糖主要是可以促进细胞与界面之间的黏附^[48],而蛋白质是促进细胞与细胞之间的聚集^[49]。由表 2 可知,各个处理在前 24 h 多物种生物被膜基质中分泌的优势化合物是蛋

表 2 生物被膜内多糖、蛋白质的含量

Table 2 Contents of polysaccharides and proteins in biofilms (mg/g)

Time (h)	CK		SH		SY	
	Polysaccharides	Proteins	Polysaccharides	Proteins	Polysaccharides	Proteins
24	4.80±0.03a	5.55±0.72a	4.97±0.46a	6.96±0.90a	4.31±0.51a	6.66±0.06a
36	4.64±0.18a	4.96±0.51a	4.33±0.27a	4.84±1.46a	4.26±0.06a	2.21±1.88b
48	5.10±0.20a	10.13±0.87a	4.38±0.04c	7.39±0.43b	4.72±0.04b	5.56±0.53c
60	4.98±0.08a	5.97±0.26b	4.56±0.11a	9.96±1.18a	2.87±0.53b	3.91±0.21c

CK、SH 和 SY 分别代表未施肥、施石灰和施有机肥处理土壤样品；同列不同小写字母表示组间具有显著差异($P<0.05$)

CK, SH, and SY represent soil samples treated with no fertilizer, lime application, and organic fertilizer application, respectively; Different lowercase letters in a column indicate significant differences among treatments at $P<0.05$ levels.

白质, 不存在显著性差异($P>0.05$); SY 处理在 36 h 时生物被膜基质中分泌的优势化合物为多糖, 且显著高于蛋白质($P<0.05$); 与 CK 处理相比, SH 和 SY 处理生物被膜基质中多糖和蛋白质的含量均显著降低($P<0.05$)。这可能是由于土壤多物种生物被膜主要在气-液界面形成, 没有细胞-固相界面之间的作用, 而是细胞之间的团聚, 因此前期多物种生物被膜基质中的优势化合物以蛋白质为主。

2.5 衰减全反射傅里叶变换红外光谱结果分析

衰减全反射傅里叶变换红外光谱是一种常用的检测生物被膜中细菌表面官能团的非破坏性技术^[27], 其细菌表面的功能基团会对不同频率的红外光产生特定的吸收峰^[39]。因此, 对不同农艺调控措施下的土壤提取多物种生物被膜进行了衰减全反射傅里叶变换红外光谱分析, 以检查 24 h 时在其生物被膜形成过程中各种相关官能团和构象的变化^[50-51], 结果如图 4 所示。三种体系中生物被膜的吸收峰有效范围均主要集中在 800–2 000 cm^{-1} 之间。其中在 1 558 cm^{-1} 和 1 643 cm^{-1} 附近主要是有烟酰胺II和烟酰胺I的吸收峰值, 说明其细胞表面含有蛋白质; 在此波长范围内, 主要有 C=O 的伸缩振动和 C-N、-CH、-CH₂ 的弯曲振动; 在 1 226 cm^{-1} 附近有磷酸基团的出现, 主要是反对称伸缩振动。然而对于

800–1 200 cm^{-1} 范围内的峰, 可能与多糖和碳水化合物中的 C-O-H、P-O-P、P=O 伸缩振动和 C-O-C、C-O 的环振动有关。生物被膜内含有较丰富的营养物质, 在生物被膜形成过程中, 膜内多糖和蛋白质的含量也会随之增加。

由图 4 可以看出, 3 种处理土壤样品之间生物被膜的功能基团主要光谱吸收峰的整体形状和位置不存在显著性差异, 表明尽管在不同的农艺调控措施影响下, 生物被膜的形成和解体速率不同, 但是不影响生物被膜内的组分, 这与马文婷^[39]的研究相似。土壤生物被膜内具有相同的化学组成, 使得生物被膜的结构基本未发生改

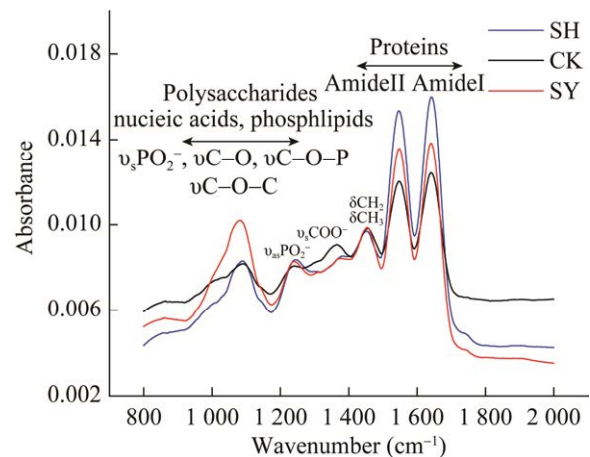


图 4 多物种生物被膜的红外光谱 CK: 未施肥; SH: 施石灰; SY: 施有机肥

Figure 4 Infrared spectra of multispecies biofilm. CK: No fertilizer; SH: Lime application; SY: Organic fertilizer application.

变, 其组分多为蛋白质和多糖^[52]; 说明有可能是膜内多糖和蛋白组分可以有效地稳定生物被膜的结构, 这与前人研究结果类似。例如, Bosch 等^[53]发现 *Bordetella pertussis* 生物被膜细胞的 FTIR 的光谱中多糖和羧基的振动峰比游离态细胞的振动峰更强烈。3 个处理土壤样品的主要吸收峰无显著性差异, 其峰值越高, 代表蛋白和多糖的含量越高(1 558–1 643 cm⁻¹: SH>SY>CK)。因此, 土壤多物种生物被膜的形成可能与含有多糖或者蛋白质的基质有关, 这些组分有利于形成和稳定生物被膜结构^[54]。

2.6 土壤多物种生物被膜的激光共聚焦扫描显微成像

将提取的土壤多物种生物被膜培养 24 h 后用 2.5 μmol/L LIVE/DEAD™ BacLight™ 细菌死活染料进行荧光染色^[55-56], 然后再用激光共聚焦扫描显微镜对生物被膜进行观察(图 5)。CK 处理界面分布着混合微生物和较小的微菌落, 覆盖面积较小, 而 SH 和 SY 处理中生物被膜生物量增加, 表面覆盖率增大, 微菌落聚集, 形成短杆状微生物。与对照相比发现, 施用石灰和有机肥农艺调控措施下的土壤生物被膜中存活的细菌和生物被膜厚度明显高于对照组, 观

察到绿色荧光的细菌较为密集, 因为当时观察的时间点为 24 h, 该时间点正处于第 1 个生长周期中 SH 处理土壤生物被膜的成熟时期, 其生物被膜生物量达到最大值(图 5B), 因此膜内存活的细菌含量较高; 而 CK 和 SY 在该时间点正处于生物被膜开始解体的阶段, 膜内存活的细菌减少, 生物被膜生物量出现下降趋势(图 5A、5C), 所观察到红色荧光的细菌开始增加且高于 SH。因此, 3 个体系中生物被膜的生物量为 SH>SY>CK, 这与结晶紫染色结果基本吻合。与施有机肥处理相比, 施石灰处理显著提升了稻田土中多物种生物被膜的生物量。这可能是由于本文研究的供试土壤为酸性, 施入适量石灰不仅可以减轻土壤酸化, 增加微生物物种丰富度, 提高土壤微生物群落的稳定性, 还可以促进植物生长和抑制致病有关的土壤微生物功能^[57]。而土壤 pH 是土壤多物种生物被膜的重要决定因素之一^[42]。本研究结果表明适量施用石灰对于土壤 pH 的影响显著高于施有机肥(表 1), 这与 Zhang 等^[58]研究结果一致, 施用石灰通过提高土壤 pH 从而改变细菌丰度、多样性和组成, 最终促进土壤多物种生物被膜的形成。

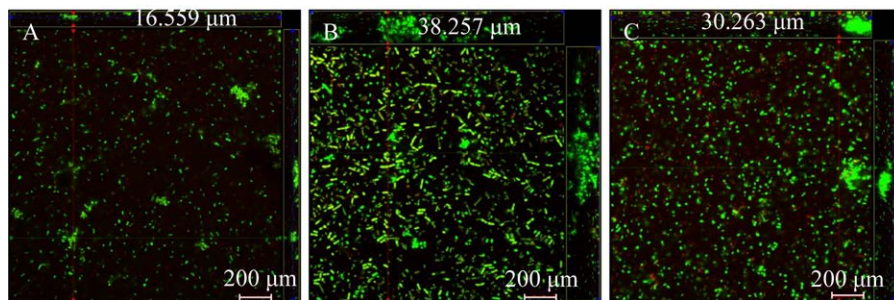


图 5 多物种生物被膜激光共聚焦扫描显微镜图 绿色荧光为生物被膜中存活的细菌, 红色荧光为死亡的细菌, 右侧和上侧方框的宽度代表生物被膜的厚度. A: 未施肥(CK). B: 施石灰(SH). C: 施有机肥(SY)
Figure 5 Confocal laser microscope images of multispecies biofilm. Green fluorescence is the surviving bacteria in the biofilm, red fluorescence is the dead bacteria, and the widths of the right and top boxes represent the thickness of the biofilm. A: No fertilizer (CK). B: Lime application (SH). C: Organic fertilizer application (SY).

结合激光共聚焦扫描显微成像技术,观测到土壤多物种生物被膜生长发育过程中微菌落的变化。前人研究的超滤膜表面的生物被膜^[59]比土壤多物种生物被膜的表面结构相对粗糙一些。该优势微生物形状为短杆状,与王逢武^[60]在周质生物被膜中观测到的优势微生物形状不一致,这可能是由于施肥处理改变了土壤中的微生物群落结构。在施石灰或有机肥处理中土壤多物种生物被膜形成的微菌落较为密集,这与前人观察到的单一物种生物被膜的成熟结构相似^[61]。

3 结论

不同农艺调控措施下的稻田土多物种生物被膜均出现 2 个生长周期,且在 36 h 时均结束第 1 个生长周期。土壤多物种生物被膜生长的最适温度均为 25 °C,在不同 pH 条件下土壤多物种生物被膜生物量均呈现先升高后降低的变化趋势,表明同一处理多物种生物被膜的生长会随着周围环境的改变发生变化。施石灰和有机肥体系中微生物的成膜能力均高于对照,而施石灰处理体系中微生物的成膜能力显著高于施有机肥体系(多物种生物被膜生物量为 SH>SY>CK)。

REFERENCES

- [1] 李琳, 向丹, 武亚芬, 黄玉丹, 李欢, 张小梅, 梁斌. 长期不同施肥方式对日光温室番茄土壤养分和微生物群落结构的影响[J]. 应用生态学报, 2022, 33(2): 415-422.
LI L, XIANG D, WU YF, HUANG YD, LI H, ZHANG XM, LIANG B. Effects of long-term different fertilization patterns on soil nutrients and microbial community structure of tomato in a solar greenhouse[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2022, 33(2): 415-422 (in Chinese).
- [2] BURMØLLE M, WEBB JS, RAO D, HANSEN LH, SØRENSEN SJ, KJELLEBERG S. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(6): 3916-3923.
- [3] RICKARD AH, GILBERT P, HIGH NJ, KOLENBRANDER PE, HANDLEY PS. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms[J]. Trends in Microbiology, 2003, 11(2): 94-100.
- [4] YAO SJ, HAO LY, ZHOU RQ, JIN Y, HUANG J, WU CD. Multispecies biofilms in fermentation: biofilm formation, microbial interactions, and communication[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2022, 21(4): 3346-3375.
- [5] LYNCH JM, BENEDETTI A, INSAM H, NUTI MP, SMALLA K, TORSVIK V, NANNIPIERI P. Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms[J]. Biology and Fertility of Soils, 2004, 40(6): 363-385.
- [6] 文翊, 李宇佳, 柴友正, 盛浩, 段良霞, 骆乐丹, 赵升, 欧阳凯. 土壤生物膜对稻田生态系统功能的影响[J]. 土壤与作物, 2023, 12(1): 1-9.
WEN Y, LI YJ, CHAI YZ, SHENG H, DUAN LX, LUO YD, ZHAO S, OUYANG K. Effects of soil biofilm on the functions of paddy rice field system[J]. Soils and Crops, 2023, 12(1): 1-9 (in Chinese).
- [7] WU YC, CAI P, JING XX, NIU XK, JI DD, ASHRY NM, GAO CH, HUANG QY. Soil biofilm formation enhances microbial community diversity and metabolic activity[J]. Environment International, 2019, 132: 105116.
- [8] 李宇佳, 文翊, 骆乐丹, 赵升, 欧阳凯. 土壤生物膜的生态功能及其研究方法综述[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(10): 1-11.
LI YJ, WEN Y, LUO YD, ZHAO S, OUYANG K. Ecological function and research methods of soil biofilm: a review[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2023, 51(10): 1-11 (in Chinese).
- [9] LEÓN-ROMERO Á, DOMÍNGUEZ-MANZANO J, GARRIDO-FERNÁNDEZ A, ARROYO-LÓPEZ FN, JIMÉNEZ-DÍAZ R. Formation of *in vitro* mixed-species biofilms by *Lactobacillus pentosus* and yeasts isolated from Spanish-style green table olive fermentations[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(2): 689-695.
- [10] 潘香玉. 施用石灰对稻田土壤 pH 值、水稻产量和重金属积累的影响[J]. 农业工程技术, 2020, 40(35):

- 15-18.
- PAN XY. Effects of lime application on soil pH value, rice yield and heavy metal accumulation in paddy field[J]. Applied Engineering Technology, 2020, 40(35): 15-18 (in Chinese).
- [11] 邹湘, 易博, 张奇春, 邸洪杰. 长期施肥对稻田土壤微生物群落结构及氮循环功能微生物数量的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2020, 26(12): 2158-2167.
- ZOU X, YI B, ZHANG QC, DI HJ. Effects of long-term fertilization on the microbial community structure and the population of N cycle-related functional microorganism in paddy soil[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizers, 2020, 26(12): 2158-2167 (in Chinese).
- [12] HARTMANN M, FREY B, MAYER J, MÄDER P, WIDMER F. Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming[J]. The ISME Journal, 2014, 9(5): 1177-1194.
- [13] ZHOU J, JIANG X, ZHOU BK, ZHAO BS, MA MC, GUAN DW, LI J, CHEN SF, CAO FM, SHEN DL, QIN J. Thirty four years of nitrogen fertilization decreases fungal diversity and alters fungal community composition in black soil in northeast China[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2016, 95: 135-143.
- [14] ZHANG YL, LI TT, WU HH, BEI SK, ZHANG JL, LI XL. Effect of different fertilization practices on soil microbial community in a wheat-maize rotation system[J]. Sustainability, 2019, 11(15): 4088.
- [15] LING N, SUN YM, MA JH, GUO JJ, ZHU P, PENG C, YU GH, RAN W, GUO SW, SHEN QR. Response of the bacterial diversity and soil enzyme activity in particle-size fractions of mollisol after different fertilization in a long-term experiment[J]. Biology and Fertility of Soils, 2014, 50(6): 901-911.
- [16] SUN XJ, CAI P, SØRENSEN SJ, MORTIMER M, GAO CH, HUANG QY, WANG YM, LIN XG, WU YC, ZHU D, CHEN RR. Interspecific interactions in dual-species biofilms of soil bacteria: effects of fertilization practices[J]. Journal of Soils and Sediments, 2020, 20(3): 1494-1501.
- [17] 徐赛, 杨延杰, 圣亚男, 王浩恺. 有机无机肥配施对日光温室番茄连作土壤微生物的影响[J]. 土壤通报, 2022, 53(4): 897-906.
- XU S, YANG YJ, SHENG YN, WANG HK. Effects of combined application of organic and inorganic fertilizers on soil microorganisms in continuous cropping in solar greenhouse[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2022, 53(4): 897-906 (in Chinese).
- [18] 郑沈. 稻草/紫云英还田配施石灰水稻降镉效应及土壤微生物响应[D]. 南昌: 江西农业大学硕士学位论文, 2021.
- ZHENG S. Returning straw/chinese milk vetch with lime application on the Cd reducing effect of rice and the response of soil microorganism[D]. Nanchang: Master's Thesis of Jiangxi Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [19] JIAO S, LU YH. Soil pH and temperature regulate assembly processes of abundant and rare bacterial communities in agricultural ecosystems[J]. Environmental Microbiology, 2020, 22(3): 1052-1065.
- [20] 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).
- [21] 高思齐, 宋艳宇, 宋长春, 马秀艳, 蒋磊. 增温和外源碳输入对泥炭地土壤碳氮循环关键微生物功能基因丰度的影响[J]. 生态学报, 2020, 40(13): 4617-4627.
- GAO SQ, SONG YY, SONG CC, MA XY, JIANG L. Effects of warming and exogenous carbon input on the abundance of key microbial functional genes of carbon-nitrogen cycling in peatland soil[J]. Acta Ecologica Sinica, 2020, 40(13): 4617-4627 (in Chinese).
- [22] 李静, 包斐斐, 李家璜, 华子春. 温度、pH 值和 H₂O₂ 对减毒沙门氏菌 VNP20009 的生长及生物膜形成的影响[J]. 药学报, 2021, 56(6): 1606-1611.
- LI J, BAO FF, LI JH, HUA ZC. Effects of temperature, pH, and H₂O₂ on the growth and biofilm formation of attenuated *Salmonella* VNP20009[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2021, 56(6): 1606-1611 (in Chinese).
- [23] XIONG ZH, ZHENG JW, SUN HR, HU JW, SHENG XF, HE LY. Biofilm-overproducing *Bacillus amyloliquefaciens* P29ΔsinR decreases Pb availability and uptake in lettuce in Pb-polluted soil[J]. Journal of Environmental Management, 2022, 302: 114016.
- [24] REN DW, MADSEN JS, SØRENSEN SJ, BURMØLLE M. High prevalence of biofilm synergy among bacterial soil isolates in cocultures indicates bacterial interspecific cooperation[J]. The ISME Journal, 2015, 9(1): 81-89.

- [25] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2000.
BAO SD. Soil and Agricultural Chemistry Analysis[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2000 (in Chinese).
- [26] BURMØLLE M, HANSEN LH, SØRENSEN SJ. Establishment and early succession of a multispecies biofilm composed of soil bacteria[J]. Microbial Ecology, 2007, 54(2): 352-362.
- [27] 纪丹丹. 模拟体系中稻田土壤生物膜形成过程与结构和代谢特性研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2018.
JI DD. The development process, structure and metabolic properties of paddy soil biofilms in simulated environment[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [28] TAKAYANAGI M, KANEMATSU H, MIURA H, KOGO T, KAWAI R, OGAWA A, HIRAI N, KATO T, YOSHITAKE M, TANAKA T, BARRY DM. Biofilms formed on metallic materials by *E. coli* and *S. epidermidis* and their evaluation by crystal violet staining and its reflection[J]. Transactions of the IMF, 2022, 100(4): 200-207.
- [29] KAMIMURA R, KANEMATSU H, OGAWA A, KOGO T, MIURA H, KAWAI R, HIRAI N, KATO T, YOSHITAKE M, BARRY DM. Quantitative analyses of biofilm by using crystal violet staining and optical reflection[J]. Materials (Basel, Switzerland), 2022, 15(19): 6727.
- [30] 罗春萍, 陆友利, 王星星. 苯酚-硫酸法快速测定多糖方法的优化[J]. 化工管理, 2021(3): 90-91, 94.
LUO CP, LU YL, WANG XX. Optimization of rapid determination of polysaccharide by phenol-sulfuric acid method[J]. Chemical Enterprise Management, 2021(3): 90-91, 94 (in Chinese).
- [31] 付林波. 白腐真菌胞外聚合物的提取及其对重金属镉的吸附研究[D]. 桂林: 桂林理工大学硕士学位论文, 2018.
FU LB. The research on extraction of white-rot fungal extracellular polymer substances and its adsorption of heavy metal Cd[D]. Guilin: Master's Thesis of Guilin University of Technology, 2018 (in Chinese).
- [32] 皮杰, 顾祝禹, 涂圣梅, 唐东海, 周志远, 王进文. 土壤调理剂与有机肥对土壤理化性质的影响[J]. 中南农业科技, 2023(3): 56-60.
PI J, GU ZY, TU SM, TANG DH, ZHOU ZY, WANG JW. Effects of soil conditioner and organic fertilizer on soil physicochemical properties[J]. South-Central Agricultural Science and Technology, 2023(3): 56-60 (in Chinese).
- [33] WATNICK PI, LAURIANO CM, KLOSE KE, CROAL L, KOLTER R. The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139[J]. Molecular Microbiology, 2001, 39(2): 223-235.
- [34] RASHID MH, RUMBAUGH K, PASSADOR L, DAVIES DG, HAMOOD AN, IGLEWSKI BH, KORNBERG A. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(17): 9636-9641.
- [35] 刘星. 大肠杆菌 O157:H7 在土壤组分上的界面作用和存活[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2016.
LI X. Interfacial interactions and survival of *Escherichia coli* O157:H7 on soil components[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [36] 段惠然. 合成菌群及其生物膜形成能力对小白菜生长的影响探究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2022.
DUAN HR. Effects of synthetic flora and biofilm formation ability on cabbage growth[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [37] FRENCH EL. Dictionary of microbiology and molecular biology[J]. Fisheries Research, 1989, 7(1-2): 188-189.
- [38] 傅维洁. 关于微生物比生长速率和指数生长期的讨论[J]. 微生物学通报, 1992, 19(2): 114-115.
FU WJ. Discussion on specific growth rate and exponential growth phase of microorganisms[J]. Microbiology China, 1992, 19(2): 114-115 (in Chinese).
- [39] 马文婷. 土壤矿物介导下细菌生物膜形成过程及机制[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2017.
MA WT. The processes and mechanisms of bacteria biofilm formation in the presence of soil minerals[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [40] 陈子玲, 吕恺, 彭党聪. 温度变化对不同污泥形态厌氧氨氧化菌活性的影响[J]. 环境工程学报, 2022, 16(4): 1331-1339.
CHEN ZL, LÜ K, PENG DC. Effect of temperature change on anammox activities with different sludge

- morphology[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2022, 16(4): 1331-1339 (in Chinese).
- [41] 熊涛, 廖良坤, 黄涛, 邓耀军. 植物乳杆菌 NCU116 菌剂的喷雾干燥制备[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(8): 23-29.
XIONG T, LIAO LK, HUANG T, DENG YJ. Application of spray drying on *Lactobacillus plantarum* NCU116 starter culture[J]. Food and Fermentation Industries, 2015, 41(8): 23-29 (in Chinese).
- [42] 简垣材, 张德庆, 邱明. 不同 pH 对变异链球菌体外生物膜形成的影响[J]. 临床口腔医学杂志, 2010, 26(5): 278-281.
JIAN YC, ZHANG DQ, QIU M. Effect of different pH on *Streptococcus mutans* biofilm formation *in vitro*[J]. Journal of Clinical Stomatology, 2010, 26(5): 278-281 (in Chinese).
- [43] ISHAK N, TIKHOMIROVA A, BENT SJ, EHRlich GD, HU FZ, KIDD SP. There is a specific response to pH by isolates of *Haemophilus influenzae* and this has a direct influence on biofilm formation[J]. BMC Microbiology, 2014, 14(1): 47.
- [44] 曾希柏, 王亚男, 王玉忠, 林志灵, 李莲芳, 白玲玉, 苏世鸣, 沈灵凤. 不同施肥模式对设施菜地细菌群落结构及丰度的影响[J]. 中国农业科学, 2013, 46(1): 69-79.
ZENG XB, WANG YN, WANG YZ, LIN ZL, LI LF, BAI LY, SU SM, SHEN LF. Effects of different fertilization regimes on abundance and composition of the bacterial community in greenhouse vegetable soils[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(1): 69-79 (in Chinese).
- [45] 王亚男, 曾希柏, 王玉忠, 白玲玉, 李莲芳, 吴翠霞, 俄胜哲, 马世铭. 施肥模式对设施菜地根际土壤微生物群落结构和丰度的影响[J]. 生态学杂志, 2015, 34(3): 826-834.
WANG YN, ZENG XB, WANG YZ, BAI LY, LI LF, WU CX, E SZ, MA SM. Effects of different fertilization regimes on community structure and abundance of soil microorganisms in greenhouse vegetable rhizosphere soils[J]. Chinese Journal of Ecology, 2015, 34(3): 826-834 (in Chinese).
- [46] CHAO YQ, ZHANG T. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) revealing chemical variation during biofilm formation: from initial attachment to mature biofilm[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012, 404(5): 1465-1475.
- [47] JIA XS, FURUMAI H, FANG HHP. Extracellular polymers of hydrogen-utilizing methanogenic and sulfate-reducing sludges[J]. Water Research, 1996, 30(6): 1439-1444.
- [48] PLANCHON S, GAILLARD-MARTINIE B, LEROY S, BELLON-FONTAINE MN, FADDA S, TALON R. Surface properties and behaviour on abiotic surfaces of *Staphylococcus carnosus*, a genetically homogeneous species[J]. Food Microbiology, 2007, 24(1): 44-51.
- [49] STEENACKERS H, HERMANS K, VANDERLEYDEN J, de KEERSMAECKER SCJ. *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication[J]. Food Research International, 2012, 45(2): 502-531.
- [50] DELILLE A, QUILÈS F, HUMBERT F. *In situ* monitoring of the nascent *Pseudomonas fluorescens* biofilm response to variations in the dissolved organic carbon level in low-nutrient water by attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(18): 5782-5788.
- [51] QUILÈS F, HUMBERT F, DELILLE A. Analysis of changes in attenuated total reflection FTIR fingerprints of *Pseudomonas fluorescens* from planktonic state to nascent biofilm state[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2010, 75(2): 610-616.
- [52] MA WT, PENG DH, WALKER SL, CAO B, GAO CH, HUANG QY, CAI P. *Bacillus subtilis* biofilm development in the presence of soil clay minerals and iron oxides[J]. NPJ Biofilms and Microbiomes, 2017, 3: 4.
- [53] BOSCH A, SERRA D, PRIETO C, SCHMITT J, NAUMANN D, YANTORNO O. Characterization of *Bordetella pertussis* growing as biofilm by chemical analysis and FT-IR spectroscopy[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 71(5): 736-747.
- [54] 高坦坦. 芽胞杆菌生物膜形成机制研究[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2015.
GAO TT. Biofilm formation mechanisms of *Bacillus* spp.[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [55] OKSHEVSKY M, MEYER RL. Evaluation of fluorescent stains for visualizing extracellular DNA in biofilms[J]. Journal of Microbiological Methods, 2014, 105: 102-104.
- [56] GLOAG ES, TURNBULL L, HUANG AL, VALLOTTON P, WANG HB, NOLAN LM, MILILLI

- L, HUNT C, LU J, OSVATH SR, MONAHAN LG, CAVALIERE R, CHARLES IG, WAND MP, GEE ML, PRABHAKAR R, WHITCHURCH CB. Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(28): 11541-11546.
- [57] MADEGWA YM, UCHIDA Y. Liming improves the stability of soil microbial community structures against the application of digestate made from dairy wastes[J]. *Journal of Environmental Management*, 2021, 297: 113356.
- [58] ZHANG KL, CHEN L, LI Y, BROOKES PC, XU JM, LUO Y. The effects of combinations of biochar, lime, and organic fertilizer on nitrification and nitrifiers[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2017, 53(1): 77-87.
- [59] DRESZER C, WEXLER AD, DRUSOVÁ S, OVERDIJK T, ZWIJNENBURG A, FLEMMING HC, KRUIHOF JC, VROUWENVELDER JS. *In-situ* biofilm characterization in membrane systems using optical coherence tomography: formation, structure, detachment and impact of flux change[J]. *Water Research*, 2014, 67: 243-254.
- [60] 王逢武. 周丛生物反应器对污水中 Cu 的去除及机制[D]. 南昌: 华东交通大学硕士学位论文, 2016.
- WANG FW. The copper removal mechanism in the presence of periphyton bioreactor under wastewater[D]. Nanchang: Master's Thesis of East China Jiaotong University, 2016 (in Chinese).
- [61] TOLKER-NIELSEN T, BRINCH UC, RAGAS PC, ANDERSEN JB, JACOBSEN CS, MOLIN S. Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(22): 6482-6489.