

土壤矿物介导下 2 种母质发育水稻土中多物种生物膜的形成

熊轩, 李宇佳, 赵升, 严贵丽, 蒋宇, 汤宇晴, 刘单鹏, 欧阳凯*

湖南农业大学 资源学院, 湖南 长沙 410128

熊轩, 李宇佳, 赵升, 严贵丽, 蒋宇, 汤宇晴, 刘单鹏, 欧阳凯. 土壤矿物介导下 2 种母质发育水稻土中多物种生物膜的形成[J]. 微生物学报, 2025, 65(1): 106-121.

XIONG Xuan, LI Yujia, ZHAO Sheng, YAN Guili, JIANG Yu, TANG Yuqing, LIU Shanpeng, OUYANG Kai. Formation of multi-species biofilms in paddy soils developed from two parent materials mediated by soil minerals[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(1): 106-121.

摘要: 【目的】探究土壤矿物介导下, 不同母质发育的水稻土中多物种生物膜的形成过程, 旨在为揭示土壤组分与多物种生物膜之间的互作机制提供科学依据。【方法】分别提取红黄泥田和酸紫泥田中的多物种生物膜作为研究对象, 选取高岭石和针铁矿作为矿物相介质, 借助现代生物显微技术、高通量测序技术和红外光谱等仪器, 对矿物介导下的生物膜形成过程、结构变化以及膜内细菌群落结构的组成等进行深入研究。【结果】基于 16S rRNA 基因的高通量测序结果显示, 2 种母质发育水稻土中多物种生物膜内的菌群主要由绿弯菌门(*Chloroflexi*)、酸杆菌门(*Acidobacteria*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、硝化螺旋菌门(*Nitrospirae*)和脱硫菌门(*Desulfobacterota*)构成。与未添加矿物体系(对照)相比, 针铁矿和高岭石均显著抑制了以绿弯菌门为主导的酸紫泥田水稻土中多物种生物膜的形成, 其生物膜生物量分别下降了 18.38%和 17.30%; 而在以酸杆菌门占主导的红黄泥田体系中, 针铁矿和高岭石从不同程度上促进了多物种生物膜的形成, 且以高岭石体系促进效果更为显著, 其生物膜厚度明显增加, 膜内多糖分泌提高了 7.69%, 生物膜生物量同比增加 18.99%。【结论】高岭石刺激细菌分泌产生了更多的胞外物质, 并促进了红黄泥田中多物种生物膜的形成, 而对酸紫泥田中多物种生物膜的形成具有抑制作用。针铁矿对酸紫泥田多物种生物膜的形成则表现出显著的抑制效应; 相比高岭石体系, 针铁矿的加入也更易导致细胞失活。本研究进一步揭示了土壤组分与多物种生物膜的互作机制, 为推动土壤健康的可持续发展提供了科学的理论依据。

资助项目: 湖南省自然科学基金(2024JJ5202, 2020JJ5250); 国家自然科学基金(42007021); 中国博士后科学基金(2020M672498)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province (2024JJ5202, 2020JJ5250), the National Natural Science Foundation of China (42007021), and the China Postdoctoral Science Foundation (2020M672498).

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

Received: 2024-07-29; Accepted: 2024-09-29; Published online: 2024-09-30

关键词: 土壤矿物; 多物种生物膜; 细菌群落; 土壤; 母质

Formation of multi-species biofilms in paddy soils developed from two parent materials mediated by soil minerals

XIONG Xuan, LI Yujia, ZHAO Sheng, YAN Guili, JIANG Yu, TANG Yuqing, LIU Shanpeng, OUYANG Kai*

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

Abstract: [Objective] To explore the formation process of multi-species biofilms in paddy soils developed from different parent materials mediated by soil minerals, thus providing a scientific basis for revealing the interaction mechanisms between soil components and multi-species biofilms. **[Methods]** The multi-species biofilms were extracted from reddish clayey soil and acidic purple soil, and kaolinite and goethite were used as the mineral media. Modern biological microscopy, high-throughput sequencing, and infrared spectroscopy were employed to study the mineral-mediated formation process, structural changes, and bacterial community structure of the biofilm. **[Results]** Based on the high-throughput sequencing technology of 16S rRNA gene, the flora in the multi-species biofilms in the paddy soils developed from the two parent materials was dominated by *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Proteobacteria*, *Nitrospirae*, and *Desulfobacterota*. Compared with the control without mineral addition, goethite and kaolinite significantly inhibited the formation of the multi-species biofilm dominated by *Chloroflexi* in the acidic purple soil, decreasing the biofilm biomass by 18.38% and 17.30%, respectively. In the reddish clayey soil dominated by *Acidobacteria*, goethite and kaolinite promoted the multi-species biofilm formation to varying degrees. Kaolinite demonstrated more significant promotion effect, increasing the biofilm thickness, the secretion of polysaccharides in the biofilm by 7.69%, and the biofilm biomass by 18.99%. **[Conclusion]** Kaolinite stimulated bacterial production of extracellular substances, promoted the multi-species biofilm formation in reddish clayey soil, and inhibited the multi-species biofilm formation in acidic purple soil. Goethite inhibited the multi-species biofilm formation in acidic purple soil. Compared with kaolinite, goethite is likely to cause cell inactivation. This study further revealed the interaction mechanism between soil components and multi-species biofilms, and the results provided a scientific theoretical basis for promoting the sustainable development of soil health.

Keywords: soil minerals; multi-species biofilm; bacterial community; soil; parent material

土壤微生物作为土壤的“调控者”和“驱动者”，不断推动着土壤的形成和发育，对土壤团聚体的稳定^[1]、矿物的风化^[2]以及有机质的降解

和合成等过程产生着重要影响^[3]，为物种的演替、生命的孕育以及人类生存环境和自然生态系统的可持续发展等提供了坚实的支撑^[4]。在

真实的土壤环境中,微生物并非以游离态形式存在,而是相互聚集,并被自身分泌的胞外基质(多糖、蛋白质等)包裹形成生物膜,进而以组合、聚集体或群落的形式黏附于生物或非生物界面上^[5-6]。生物膜的形成是一个复杂且动态的过程,主要分为初始黏附、生物膜初步形成、生物膜成熟、生物膜裂解 4 个阶段^[7]。随着生物膜生长发育阶段的不同,其膜内微生物的生长状况和相关基因表达水平等存在差异,这导致在面临环境胁迫时,生物膜内外表现出明显的阶段性差异^[8]。

母质作为土壤发育的形成因素之一,影响着土壤物理化学组成,控制着微生物营养物质的供给^[9]。不同母质发育的土壤中,微生物的功能特征和习性存在差异,同时也影响着微生物的群落结构组成^[10]。由不同细菌菌门所主导构成的生物膜体系,其微生物特性存在差异^[11];在应对不同环境变化和迫害时,其膜内群落结构组成可能发生变化,不同优势菌群所主导的生物膜系统,其结构特征表现也会有所不同^[12-13]。因此,探索不同母质发育土壤中多物种生物膜的形成及其在土壤生态环境中的作用,可为土壤的健康发展及阐明土壤微生物调控机制提供理论依据。土壤矿物作为土壤的重要组成部分之一,对土壤中微生物群落结构和生物地球化学界面的形成有着深刻的影响^[14-15]。在土壤微环境中,土壤矿物颗粒提供了较大的表面积,利于微生物的附着和营养供应,从而促进生物膜的形成和稳定^[5,16]。不同类型的土壤矿物对生物膜的形成有不同的影响,如蒙脱石和高岭石等矿物对细菌的黏附和聚集具有促进作用;细菌生物膜的形成也会导致土壤矿物结构的变化;例如,细菌在生物膜形成过程中可以诱导蒙脱石的层间扩展和结构改变,这种结构变化有助于生物膜的稳定和碳储存^[16]。研究发

现,高岭石与针铁矿会显著抑制恶臭假单胞菌的葡萄糖代谢能力,相比之下,蒙脱石的加入则具有显著的促进作用^[17]。Ma 等研究发现,在菌-矿共培体系中,分别将蒙脱石、高岭石、针铁矿与枯草芽孢杆菌混合培养,发现细菌在 3 种矿物表面的成膜状况存在显著差异,细菌长时间黏附在蒙脱石和高岭石表面仍然保持活性,但黏附于针铁矿表面其活性却会大大降低^[18]。诸如此类,在土壤矿物的介导下生物膜通过自我调控保持膜内外微环境的稳定,以此来应对环境变化和胁迫。然而,前人的研究大多聚焦于单一变量和研究对象与生物膜之间的互作表现,忽视了土壤环境的复杂性,目前有关不同母质、不同矿物类型如何影响多物种生物膜形成的信息仍十分缺乏。

基于此,本研究拟选取红黄泥田(第四纪红色黏土发育)和酸紫泥田(紫色页岩风化物发育)中提取的多物种生物膜作为研究对象,以高岭石和针铁矿为矿物相介质,借助现代生物显微电镜等技术手段,研究土壤矿物介导下 2 种母质发育水稻土中多物种生物膜的形成及膜内细菌群落结构特征,旨在探讨不同母质发育水稻土中多物种生物膜内微生物群落结构差异,揭示土壤矿物对多物种生物膜形成、结构和功能的影响,研究结果有助于优化土壤微环境、提高土壤肥力和促进作物生长。同时,也为精准调控土壤微生物群落评估土壤生态健康,推动土壤的可持续发展提出了基础的科学见解。

1 材料与方 法

1.1 供试土壤

供试土壤为第四纪红色黏土发育的红黄泥田(H)和紫色页岩风化物发育的酸紫泥田(S),2022 年 11 月分别采集于湖南省长沙市(113°09'E, 28°20'N)和湖南省株洲市(113°10'E,

27°32'N)。采集区域均为传统双季稻种植区, 区域内年平均温度分别为 17.2 °C 和 17.5 °C, 年平均降雨量分别为 1 390 mm 和 1 389 mm。供试土壤样品通过“S”型路线随机取样, 采集深度控制在 0–20 cm, 将各取样点土样充分混匀后, 去除石子、根系等非土杂质, 装入取样袋, 置于低温保温箱快速运回实验室, 分别保存于 4 °C 和 -80 °C 冰箱备用。

1.2 土壤多物种生物膜接种液制备

供试菌株分别提取于第四纪红色黏土发育的红黄泥田和紫色页岩风化物发育的酸紫泥田。所提取的菌株后续试验均用溶菌肉汤 LB 培养基进行培育。LB 培养基适用于大部分微生物生长, 是一种广泛应用的基础型培养基^[19]。

生物膜初始接种液制备^[20-21]: 将新鲜土样去除石子、植物根系等杂质后过 2 mm 筛, 称取 150 g 过筛鲜土样于烧杯中, 加入 300 mL 无菌水与之充分混匀。为了使土样中的细菌充分转移至土壤溶液, 将烧杯置于 25 °C、30 r/min 的恒温摇床中振荡培养 12 h, 将涂布有 LB 固体培养基的无菌载玻片悬空固定于烧杯中, 在不扰动底层泥浆的前提下使玻片与土壤悬液上清部分充分接触, 再次 25 °C、30 r/min 摇床振荡培养 7 d 后取出。用 PBS 缓冲液将附着在玻片表面的多物种生物膜冲洗转移至无菌离心管, 并向离心管中加入等体积的 80% 甘油(pH 7.0), 最后将甘油管于 -80 °C 保存备用。

1.3 土壤矿物

高岭石(Kao)购自美国黏土矿物学会。

针铁矿(Goe)参照 Atkinson 等方法进行合成制备^[22], 具体操作: 称取 50 g 九水硝酸亚铁溶解在 825 mL 的超纯水中并剧烈搅拌使其加速溶解, 同时不断滴加氢氧化钠溶液(200 mL、2.5 mol/L), 直至溶液的 pH 值 12.0。将溶液置于烘箱(60 °C)中老化 24 h 后 6 000×g 离心

15 min, 倒去上清液, 将所得沉淀依次使用 KOH 溶液、超纯水和乙醇(95%)反复冲洗 2–3 次; 随后置于烘箱(100 °C, 24 h)烘干得到矿物样品, 经研磨并过 100 目筛后保存备用。

通过 X 射线衍射仪(X-ray diffractometer, XRD)扫描矿物样品, 实现精准的矿物表征。在 XRD 衍射图谱(图 1)中, 试验所制得的样品与标准矿物(针铁矿卡片号 29-0713)吻合度较高, 无明显的杂峰, 矿物结晶度良好, 确定所制样品为针铁矿。

矿物悬液的制备: 分别称取 0.1 g 针铁矿(Goe)和高岭石(Kao)矿物粉末置于 100 mL 去离子水中, 悬液浓度为 1 g/L。将矿物悬液用磁力搅拌器进行搅拌, 并超声处理 30 min 使矿物均匀分散, 置于灭菌锅中灭菌 30 min, 冷却备用。

1.4 土壤多物种生物膜的生长曲线

将甘油管中的生物膜初始液(pH 7.0)接种到灭菌的 LB 培养基中, 在 28 °C、180 r/min 的条件下活化培养 6 h。接着按 1:100 的比例取 0.1 mL 细菌活化液接种至 10 mL 的 LB 培养基中, 孵育 12 h 后得到细菌扩大培养液。在无菌

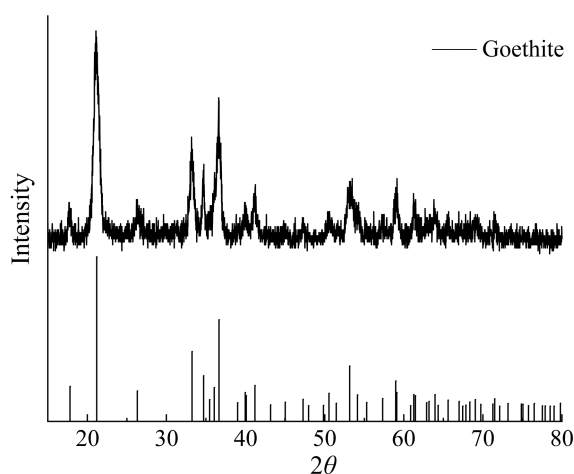


图 1 针铁矿 XRD 图

Figure 1 XRD pattern of synthetic goethite.

环境中使用新配 LB 培养基将细菌扩大液稀释至 OD_{600} 为 1.0。在无菌 96 孔板中接入 200 μL 经稀释后的细菌菌液,并于恒温培养箱(28 $^{\circ}\text{C}$)中分别静置培养 6、12、24、36、48、60、72 h。培养结束后,使用 1%结晶紫染液对各时间段生物膜样本进行染色处理,并用酶标仪测定波长为 595 nm 处的吸光度,记录生物膜生物量。

1.5 胞外聚物质(胞外多糖和蛋白质)含量测定

采用苯酚-硫酸法测定多物种生物膜中多糖含量^[18]。制备 100 mg/mL 的葡萄糖标准溶液。分别吸取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 的葡萄糖标准溶液于 10 mL 比色管中,用超纯水将溶液补至 1 mL,再向比色管中加入 1 mL 的 5% 苯酚溶液,摇匀后继续加入 5 mL 的浓硫酸,再次摇匀后置于 96 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温水浴锅中避光处理 20 min,冷却至室温后用酶标仪测定 490 nm 波长下的吸光值。以葡萄糖浓度为横坐标,吸光值为纵坐标,绘制标准曲线。吸取 0.1 mL 生物膜悬液(生物膜初始接种液、初始接种液+高岭石悬液、初始接种液+针铁矿悬液 3 种处理下分别孵育 24 h 得到)至 6 孔板中,后续操作步骤同标准曲线测定一致,最后根据标准曲线来计算样品溶液中多糖含量。

选用 BCA 蛋白质浓度检测试剂盒测定多物种生物膜中蛋白质的含量^[21]。制备 1% 的 2,2-联喹啉-4,4-二甲酸和 4% 的 CuSO_4 按 50:1 的体积比均匀混合制成 BCA 混合溶液。选取牛血清白蛋白,制成浓度为 5 mg/mL 的蛋白质标准储备液;利用 PBS 溶液将蛋白质标准液稀释 10 倍,得到最终浓度为 0.5 mg/mL 的标准使用液。在 96 孔板中,依次加入 0、2、4、6、8、10、12、16、20 μL 的标准使用液,并用 PBS 补足至 20 μL 。随后,向各孔内加入 200 μL BCA 混合

液,于恒温培养箱(37 $^{\circ}\text{C}$)中静置培养 30 min。最后,借助酶标仪测定 562 nm 波长下的吸光值,根据标准曲线计算蛋白质含量。

1.6 激光共聚焦扫描显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)观察

将生物膜初始接种液接种至无菌 6 孔板中孵育 24 h,用镊子轻轻挑起成熟的多物种生物膜,于无菌水中冲洗掉生物膜周围的游离态细菌和残余培养基。将生物膜均匀铺展于清洁无菌的载玻片上,于避光环境下滴加浓度为 2.5 $\mu\text{mol/L}$,由荧光核酸染料 SYTO 9 和碘化丙啶(propidium iodide, PI)组成的 LIVE/DEAD BacLight™ 细菌死活染料对生物膜进行染色处理。染色 15 min 后借助 CLSM 对生物膜的形貌结构特征以及膜内细菌的存活情况进行观察,激发波长分别设置为 480–500 nm (SYTO 9)和 490–635 nm (PI),每个样品随机监测 3 个区域。最终,利用 ZEN 2012 (blue edition)软件对所捕获图像进行分析和分析。

1.7 衰减全反射傅里叶红外光谱(attenuated total reflectance fourier transform infrared spectroscopy, ATR-FTIR)分析

对土壤矿物介导下多物种生物膜进行红外光谱分析。用镊子缓慢将形成的生物膜转移至 ZnSe 晶体上,调整测定参数进行分析。红外光谱仪设定扫描波长范围为 2 000–800 cm^{-1} ,平行扫描的次数为 256 次,分辨率为 2 cm^{-1} ,采用 Origin 2021 软件进行信号平滑处理和数据分析。

1.8 生物膜在矿物表面的存活

盖玻片前处理:清洗盖玻片,确保表面洁净无杂质。在 $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ 混合溶液(7:3,体积比)中浸泡 60 min 后,超声清洗 15 min;随后将盖玻片浸入无水乙醇中静置 15 min,并再次

超声处理;最后将洗净的盖玻片置于 60 °C烘箱中烘干,储存于干燥器内备用。

矿物覆盖于盖玻片:将 0.4 mL 的矿物悬液均匀涂布于盖玻片表面,于 120 °C的烘箱中高温烘烤 20 min,使矿物牢固附着在盖玻片表面;将附有矿物的盖玻片取出冷却,使用超纯水缓慢冲洗 10 s,去除玻片表面未固定的矿物颗粒,最后烘干备用。

样片制作:将包覆有矿物的盖玻片经高温高压灭菌后,置于无菌 6 孔培养板内,在无菌条件下向盖玻片表面滴加 0.25 mL 的细菌悬液,静置吸附 30 min 后加入 4.75 mL 的 LB 培养基,随后将 6 孔板置于 28 °C 的恒温培养箱中避光静置培养 24 h。

显微镜观察:使用细菌死活染料对附着于盖玻片上的多物种生物膜进行染色,通过 CLSM 进行观察,详细步骤参见 1.6 节。

1.9 土壤多物种生物膜内细菌种类及丰度测定

1.9.1 土壤细菌 DNA 提取

采用 E.Z.N.A.[®] Soil DNA 试剂盒(Omega Bio-Tek 公司)对多物种生物膜内细菌样本的 DNA 进行提取。对细菌 16S rRNA 基因的 V4-V5 区片段,使用引物 515F (5'-GTG CCAGCMGCGG-3')和 907R (5'-CCGTCAATTC MTTRAGTTT-3')进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(20 μ L)^[23]: 5 \times FastPfu Buffer 4 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μ L, 上、下游引物(5 μ mol/L)各 0.8 μ L, FastPfu 聚合酶(5 U/ μ L) 0.4 μ L, 模板 DNA 10 μ L, ddH₂O 补至 20 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 2 min, 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 72 °C 延伸 5 min, 循环 25 次。将 PCR 扩增产物回收后,使用 AxyPrep DNA 凝胶提取试剂盒(Axygen 公司)进行纯化。

纯化后的 PCR 产物用 Qubit[®] 3.0 荧光计定量,每 24 个条形码不同的扩增子平均混合。按照 Illumina 基因组 DNA 文库制备程序,将合并的 DNA 产物用于构建 Illumina 对端文库。用 Illumina MiSeq 平台对扩增文库进行测序,生成 250 bp 配对末端读码。

1.9.2 数据分析

序列分析通过 USEARCH 软件进行^[24],将相似性在 97%以上的序列分配给相同的操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)。应用 KRONA 软件对不同 OTU 的系统发育关系进行重建^[25],并使用 GraPhlAn 软件对样品中物种组成和丰富度信息进行研究^[26]。

试验设置 5 个生物学重复,所得数据采用 IBM SPSS 27.0 进行方差分析(analysis of variance, ANOVA),*P* 值小于 0.05 表示数据组间差异的统计学显著性。采用 Origin 2021 软件,Chiplot、Hiplot 平台对图表进行绘制;采用 Jade 6.5、ImageJ 和 Imaris Viewer 软件对文中 XRD 衍射图谱和 CLSM 图像进行可视化分析。

2 结果与分析

2.1 稻田土壤多物种生物膜的生长曲线分析

如图 2 所示,在 0-72 h 时间段内,2 种母质发育水稻土(红黄泥田和酸紫泥田)中多物种生物膜的生长趋势大致相似,均呈先升高后降低的趋势。在 0-12 h 生物膜生物量迅速增长;培养至 24 h 时,2 种水稻土体系中多物种生物膜生物量均达到最大值且变化量相对较小,其最大生物膜生物量分别为 1.52 \pm 0.08 和 1.85 \pm 0.06,且酸紫泥体系中生物膜的最大生物量显著大于红黄泥体系(*P*<0.01);在 36-72 h 时,生物膜生物量则逐步减少,变化量相对较大。

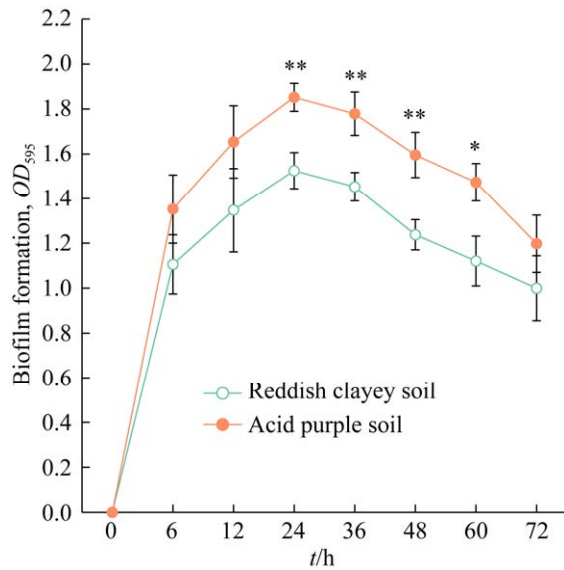


图 2 红黄泥田和酸紫泥田中多物种生物膜的生物量发育曲线

Figure 2 Development curves of biomass of multi-species biofilm in reddish clayey soil and acid purple soil. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

通过比较在 0–72 h 生物膜生长周期中, 2 种母质发育水稻土中生物膜生物量在各培养时间段的显著性差异, 发现在 24、36、48、60 h 时间段中酸紫泥田体系的生物膜生物量均显著高于红黄泥田体系($P < 0.05$)。由此得出, 酸紫泥田体系中多物种生物膜的成膜能力高于红黄泥田体系中多物种生物膜的成膜能力。综合 2 种水稻土中多物种生物膜的生长曲线, 因此选取 24 h 时间段的多物种生物膜为典型来探究后续试验。

2.2 土壤矿物介导下多物种生物膜的形成

在静置条件下, 不同生长时期红黄泥田和酸紫泥田的混合菌群分别在高岭石和针铁矿矿物悬液(1 g/L)中的土壤多物种生物膜形成有所异同(图 3)。2 种母质发育水稻土中的混合菌群均在气-液体表面形成薄膜状生物膜。在红黄泥田体系中(图 3A), 高岭石体系(Kao)多物种生物

膜与对照组(H)表现出相似生物膜生长趋势, 即在 12 h 形成松散的生物膜, 24 h 形成紧致的成熟生物膜, 随后 48 h 生物膜的颜色变浅, 开始出现裂解, 72 h 生物膜破损, 裂解加剧。在针铁矿体系(Goe), 12 h 初步形成生物膜, 在气-液界面的覆盖率高于高岭石和对照组, 后续时期保持一致。在酸紫泥田体系中(图 3B), 针铁矿体系(Goe)和对照组(S)生长状况相似, 均在 24 h 形成紧致成熟生物膜, 生物膜颜色最深, 随后开始出现裂解, 最后生物膜破损; 高岭石体系(Kao)与对照组(S)相比, 12 h 的生物膜覆盖率较低。在高岭石和针铁矿处理下, 红黄泥田和酸紫泥田体系中多物种生物膜的形态存在明显差异, 红黄泥田体系中形成的多物种生物膜表面光滑, 无凸起结构, 而酸紫泥田体系中多物种生物膜表面呈褶皱结构。

采用结晶紫染色法测定波长 595 nm 处的吸光值, 对培养至成熟期(24 h)的土壤多物种生物膜的生物量进行定量, 结果如图 4 所示。在红黄泥系统中, 对照(H)、高岭石(Kao)、针铁矿(Goe)体系的生物膜生物量分别为 1.45 ± 0.06 、 1.79 ± 0.17 和 1.57 ± 0.12 , 高岭石和针铁矿体系的生物膜生物量均高于对照, 且高岭石体系在 3 个体系中的生物膜量最大, 说明高岭石和针铁矿体系均促进了红黄泥体系中多物种生物膜的形成, 但高岭石对红黄泥体系中多物种生物膜形成的促进效果更为显著。在酸紫泥田系统中, 对照(S)、高岭石(Kao)、针铁矿(Goe)体系的生物膜生物量分别为 1.85 ± 0.17 、 1.53 ± 0.05 和 1.51 ± 0.17 , 高岭石和针铁矿体系的生物膜生物量均明显低于对照组, 说明高岭石和针铁矿对酸紫泥田中多物种生物膜具有显著的抑制作用。以上结果表明, 高岭石和针铁矿体系均促进红黄泥田中多物种生物膜的形成, 反之对酸紫泥田中多物种生物膜的形成具有抑制作用。

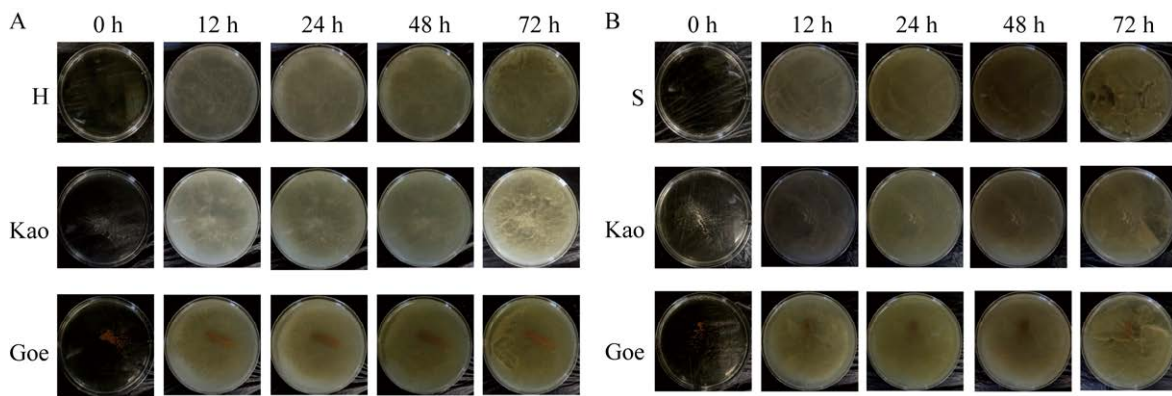


图 3 红黄泥田(A)和酸紫泥田(B)中多物种生物膜在不同矿物悬液中的形成情况

Figure 3 Formation of multi-species biofilms in different mineral suspensions in reddish clayey soil (A) and acid purple soil (B).

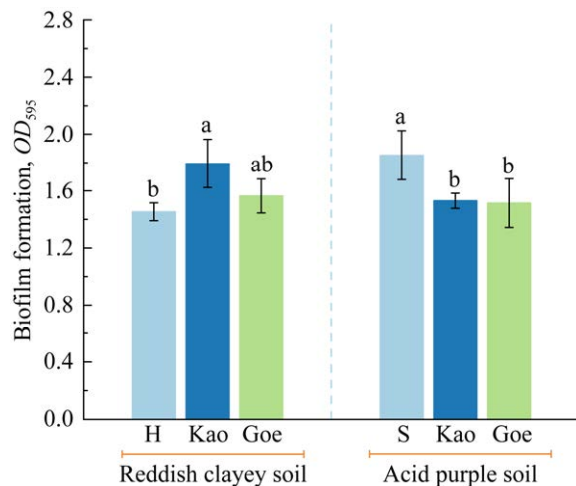


图 4 红黄泥田和酸紫泥田多物种生物膜在矿物体系下培养 24 h 的生物量。不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Figure 4 Biomass of multi-species biofilms of reddish clayey soil and acid purple soil cultured in mineral system for 24 h. Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

2.3 土壤矿物对多物种生物膜形成及结构的影响

基于 CLSM 图像数据(图 5),借助 ZEN 2012 (blue edition)、ImageJ 和 Imaris Viewer 软件,对不同矿物处理下红黄泥田和酸紫泥田多物种生物膜内活细胞和死细胞的比例,以及生物膜

的厚度进行可视化分析,结果如图 6 所示。在红黄泥田系统中,对照(H)、高岭石(Kao)、针铁矿(Goe)体系的生物膜内活细胞比例分别为 75.56%、90.69%、83.38%,生物膜厚度分别为 8.565、17.700、11.800 μm ;高岭石(Kao)体系中生物膜内活细胞比例高于针铁矿(Goe)体系,死细胞比例低于针铁矿(Goe)体系(图 6A);同时,其生物膜厚度明显高于对照(H)和针铁矿(Goe)体系,而针铁矿(Goe)体系与对照(H)的生物膜厚度无明显差异(图 6B)。

在酸紫泥田系统中,对照(S)、高岭石(Kao)、针铁矿(Goe)体系中生物膜内活细胞比例分别为 98.08%、92.79%、79.26%,生物膜厚度分别为 25.124、10.849、7.994 μm ;高岭石(Kao)和针铁矿(Goe)体系的生物膜厚度和膜内活细胞比例均低于对照组(S),针铁矿(Goe)体系中死细胞比例明显高于高岭石体系(图 6)。根据添加针铁矿(S+Goe、H+Goe)的图像显示,死细胞比例均高于高岭石(H+Kao、S+Kao)体系,说明针铁矿更易造成细胞失活。同时,不同母质处理体系之间,外源矿物的添加对生物膜成膜能力会产生不同影响。在未添加矿物的样本中,红黄泥田(H)体系中的生物膜厚度明显低于酸紫泥

田(S)体系, 在添加高岭石(Kao)、针铁矿(Goe)的处理体系中, 红黄泥田(H+Kao、H+Goe)体系的生物膜厚度均高于酸紫泥田(S+Kao、S+Goe)

体系(图 6B)。综上, 高岭石、针铁矿的添加均提升了红黄泥水稻土生物膜的成膜能力, 进一步验证了 2.2 中的结果。

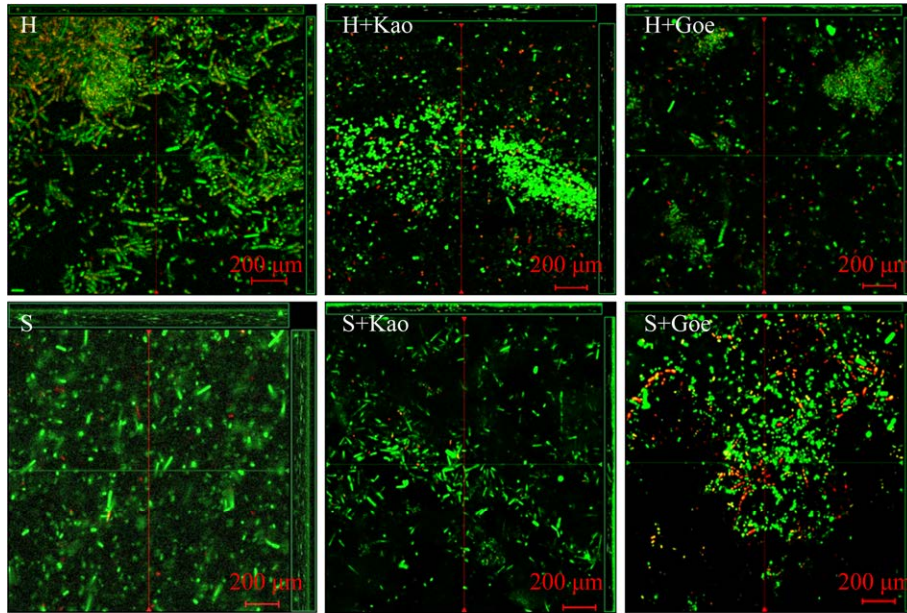


图 5 不同矿物介导下红黄泥田和酸紫泥田多物种生物膜的激光共聚焦扫描显微镜图像

Figure 5 Confocal laser microscope images of multi-species biofilms in reddish clayey soil and acid purple soil mediated by different minerals.

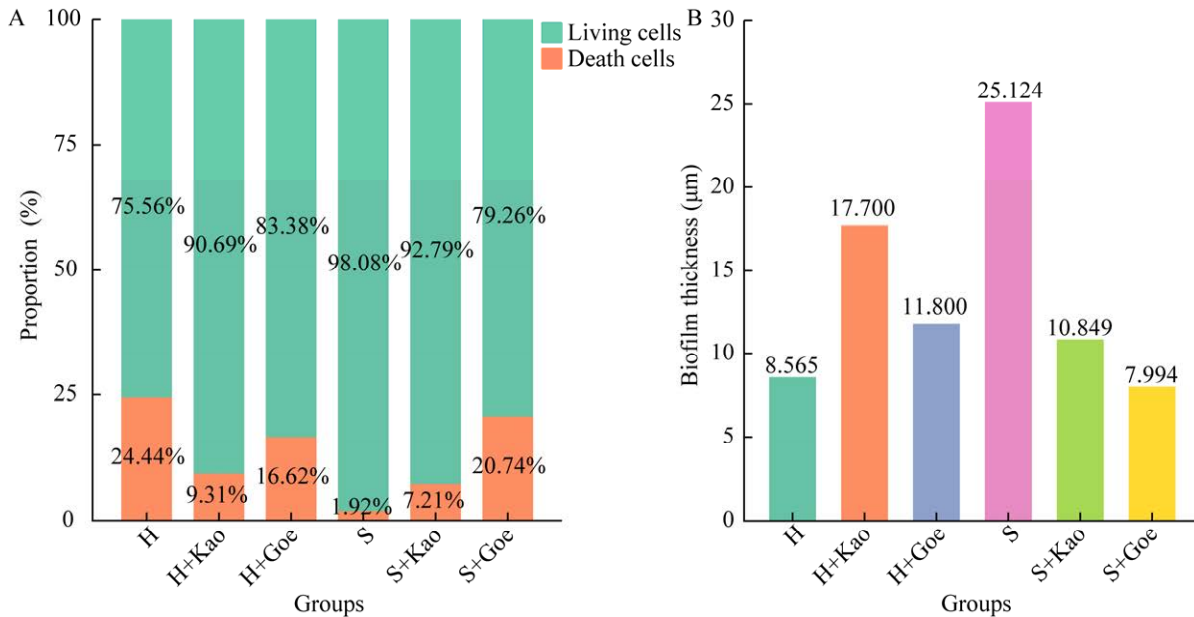


图 6 不同矿物介导下红黄泥田和酸紫泥田多物种生物膜内的细菌存活比例(A)和生物膜厚度(B)

Figure 6 Survival rate of bacteria (A) and biofilm thickness (B) of multi-species biofilms in reddish clayey soil and acid purple soil mediated by different minerals.

2.4 多物种生物膜组分对土壤矿物的响应

不同频率的红外光对多物种生物膜表面的不同功能基团具有特定的吸收波峰, 采用衰减傅里叶红外光谱(ATR-FTIR)分析2种土壤在不同矿物体系影响下的成熟多物种生物膜基质组分的变化情况, 结果如图7和表1所示。在矿物的影响下, 红外光谱显示波长范围在800–2 000 cm^{-1} 波长内有波峰出现。酰胺 I 在 1 640 cm^{-1} 有吸收峰, 由 C=O 伸缩振动引起; 酰胺 II 在 1 550 cm^{-1} 有吸收峰, 由 N-H 弯曲振动和 C-N 伸缩振动引起, 酰胺 I 和酰胺 II 代表的物质是蛋白质, 1 340 cm^{-1} 为羧基的对称伸缩振动; 1 299 cm^{-1} 为核酸中磷酸二酯键的对称伸缩振动; 950–1 225 cm^{-1} 范围内的峰主要是多糖中 C-O、C-O-C 和 C-O-P 的环振动和核酸中 O-P-O 不对称伸缩振动。红外光谱结果显示, 成熟生物膜内含有多糖、蛋白质和核酸等物质;

在矿物的影响下, 多物种生物膜的主要峰形和峰位置不存在明显差异, 说明土壤矿物未改变多物种生物膜的基质组分。在高岭石(Kao)的影响下红黄泥田多物种生物膜分泌的多糖含量明显高于针铁矿(Goe)和对照(H), 而针铁矿(Goe)和对照(H)的多糖分泌含量无显著差异(图 7A)。在酸紫泥田体系中, 多物种生物膜在高岭石和针铁矿的影响下分泌的多糖和蛋白质含量均要低于对照(S), 高岭石和针铁矿间则无显著差异(图 7B)。

同时, 利用化学方法对多糖和蛋白质的含量进行测定, 多物种生物膜内多糖和蛋白质含量与红外光谱结果一致(表 2)。红黄泥田多物种生物膜在高岭石处理下多糖含量为(1.40±0.03) mg/mL, 显著高于对照和针铁矿的多糖含量, 其分别为(1.30±0.02) mg/mL 和(1.32±0.02) mg/mL。酸紫泥田多物种生物膜在高岭石和针铁矿处理下多糖含量分别为(1.34±0.05) mg/mL 和(1.34±0.02) mg/mL, 显著低于对照组多糖含量(1.41±0.03) mg/mL。

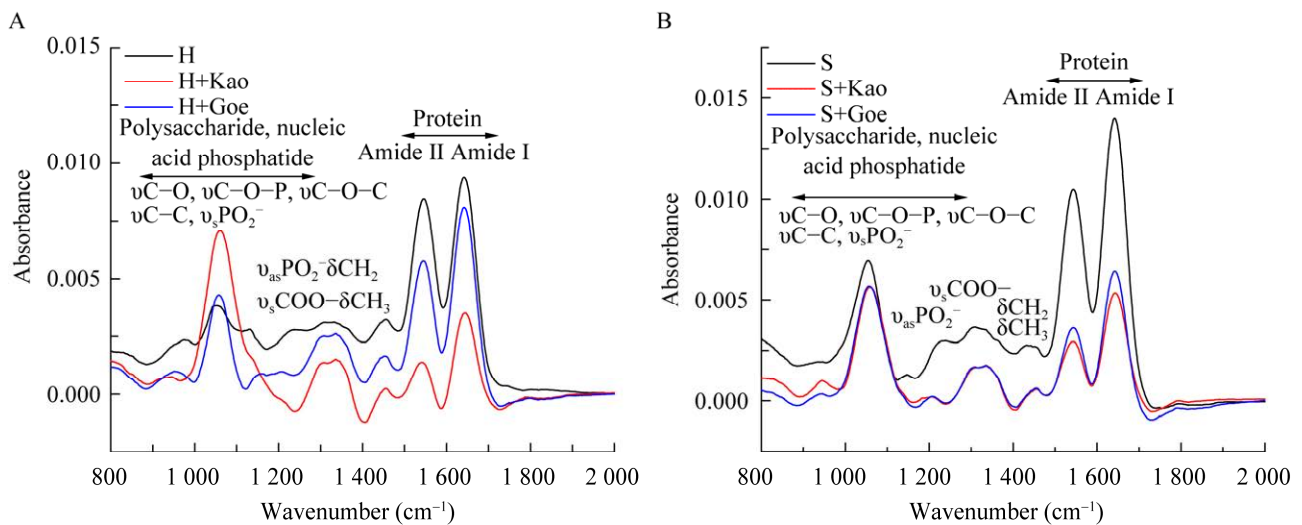


图 7 不同矿物影响下土壤多物种生物膜的红外光谱。A: 红黄泥田中多物种生物膜; B: 酸紫泥田中多物种生物膜。

Figure 7 Infrared spectra of soil multi-species biofilms under the influence of different minerals. A: Multi-species biofilm in reddish clayey soil; B: Multi-species biofilm in acid purple soil.

表 1 多物种生物膜的红外光谱特征吸收峰及其归属

Table 1 Infrared spectral characteristics of multi-species biofilm absorption peak and attribution

Wavenumber (cm ⁻¹)	Functional group	Synthetics
1048–1060	$\nu\text{C-O-C}$, $\nu\text{C-O-P}$	Polysaccharides
1080–1093	$\nu_s\text{PO}_2^-$	Phosphatides
1155–965	C-O, C-C, C-O-H, C-O-C	Polysaccharides
1231–1248	νPO_2^-	Nucleic acids
1388–1413	$\nu_s\text{COO}^-$	Amino acid, fatty acid chains
1445–1465	δCH_2 , δCH_3	Lipids
1540–1550	Amide II ($\delta\text{N-H}$, $\nu\text{C-N}$)	Proteins
1640–1647	Amide I ($\nu\text{C=O}$, $\delta\text{N-H}$)	Proteins

表 2 多物种生物膜中多糖和蛋白质含量

Table 2 Polysaccharide and protein contents in multi-species biofilms (mg/mL)

Biofilm treatment	Contrast		Kaolinite		Goethite	
	Polysaccharide	Protein	Polysaccharide	Protein	Polysaccharide	Protein
Reddish clayey soil	1.30±0.02b	2.66±0.12a	1.40±0.03a	2.47±0.08b	1.32±0.02b	2.51±0.19a
Acid purple soil	1.41±0.03a	2.59±0.11a	1.34±0.05b	2.62±0.30a	1.34±0.02b	2.25±0.19b

Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

2.5 土壤多物种生物膜内细菌群落结构分析

根据细菌群落的 16S rRNA 基因的高通量测序结果,对 2 种母质发育水稻土多物种生物膜中基于门水平相对丰度排名在前 10 的细菌群落进行分析,结果如图 8 所示。不同母质发育水稻土中多物种生物膜内细菌群落分布存在明显差异,红黄泥田多物种生物膜中相对丰度

在 4%以上的细菌菌门有 8 个,酸紫泥田多物种生物膜中相对丰度在 4%以上的细菌菌门有 6 个,红黄泥田和酸紫泥田体系中相对丰度均在 4%以上的细菌菌门有 5 个,分别为绿弯菌门(*Chloroflexi*)、酸杆菌门(*Acidobacteria*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、硝化螺旋菌门(*Nitrospirae*)和脱硫菌门(*Desulfobacterota*),这 5 个菌门的相对丰度平均值分别是 19.6%、18.0%、13.5%、

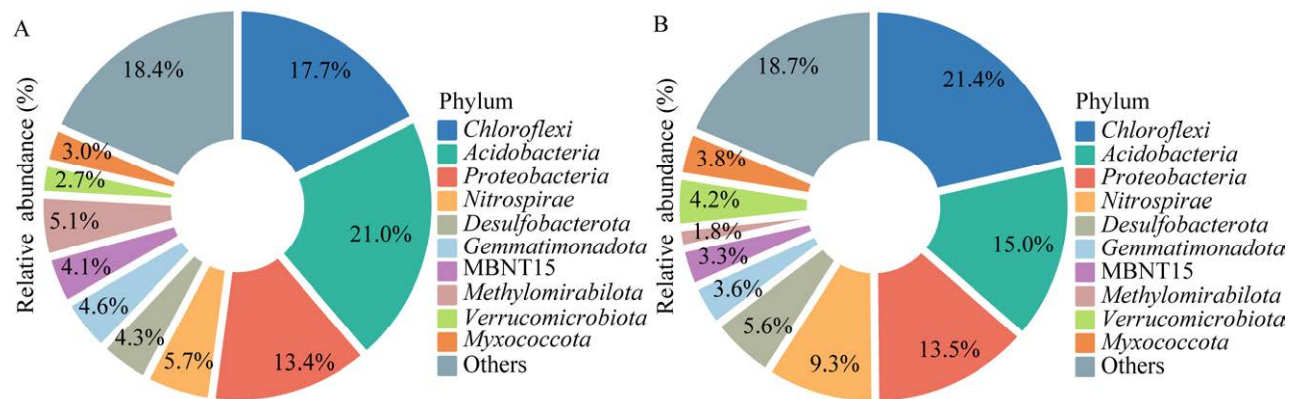


图 8 红黄泥田(A)和酸紫泥田(B)中门水平下的细菌群落组成

Figure 8 Composition of bacteria community under phylum level in reddish clayey soil (A) and acid purple soil (B).

7.5%和 5.0%。2 种母质发育水稻土中多物种生物膜的细菌群落结构分布相对较为稳定, 但是不同母质发育水稻土中多物种生物膜的优势细菌类群有所不同。

在红黄泥田、酸紫泥田多物种生物膜中, 细菌群落占比最大的优势菌群分别为酸杆菌门和绿弯菌门, 变形菌门在红黄泥田和酸紫泥田多物种生物膜中无明显差异, 酸紫泥田多物种生物膜中硝化螺旋菌门和脱硫菌门的平均相对丰度均高于红黄泥田体系。

3 讨论

土壤环境中微生物的种类繁多、数量庞大, 受不同环境因素(如气候、母质、肥力和土壤酸碱度等)影响, 不同母质发育的水稻土中细菌群落结构也有所不同^[27], 水稻土中不同细菌间相互聚集形成的多物种生物膜在土壤矿物的影响下表现出的形貌和结构特征也会存在差异^[28], 阐明土壤矿物对多物种生物膜形成的影响及其相关应激表现, 对土壤生态环境具有重要意义。

本研究中的多物种生物膜生长过程可以划分为 3 个时期(图 2), 即形成初期、成熟期和裂解期^[29]。在 0–12 h (形成初期), 生物膜生物量增长迅速, 其中游离态的细菌通过鞭毛、布朗运动等相互聚集形成微型菌落^[30]; 在 24 h (成熟稳定期)时, 生物膜生物量达到最大值且变化量相对较小, 生物膜在这一时期对外界环境变化、抗生素和重金属等的耐受能力最强, 生物膜空间结构相对稳定^[31]; 在 36–72 h (裂解期), 生物膜生物量急剧减少, 这可能是由于营养物质的消耗及有害物质的累积, 导致生物膜逐渐裂解; 进入裂解期时, 生物膜内的部分细胞会脱离生物膜重新进入环境中^[32]。在长时间的外界环境因素作用下, 细菌菌群不断地生长和扩大, 而土壤中有机质和全氮的含量, 可能是影响微生

物间逐渐进行生物演替的主导因子之一^[7]。在水稻土中分别提取混合菌群, 经过 72 h 的孵育形成了一层致密的生物膜, 其生长趋势呈现出先增加后下降, 且均在 24 h 达到最大生物量, 分别为 1.52 ± 0.08 和 1.85 ± 0.06 (图 2), 此时生物膜的三维结构最为稳定, 对外界不良环境的抗性最强。在整个生物膜生长周期, 酸紫泥田体系中生物膜生物量始终高于红黄泥田体系(图 2)。在外源添加土壤矿物后, 高岭石对红黄泥田中多物种生物膜的形成具有显著的促进作用, 而对酸紫泥田多物种生物膜的形成具有显著的抑制作用, 且高岭石和针铁矿的抑制效果相当(图 4)。

在土壤环境中, 不同类型的矿物, 其物理化学特性有所差异^[33]。研究表明, 枯草芽孢杆菌与针铁矿相互作用, 由于其表面的针状结构特征会对细胞造成损坏, 使得细菌与针铁矿的接触减少, 更多地趋向于气-液界面运动, 阻碍了细菌在矿物表面的定殖^[34-35]。这一论点与本研究结果一致, 针铁矿颗粒的针状结构会更容易穿透细菌外膜刺穿肽聚糖层, 同时阻碍细菌表面的养分吸收, 抑制其活性(图 5)^[36]。随着环境 pH 值的变化, 矿物的带电性也有所差异, 当环境中 $\text{pH} < 7.7$ (针铁矿表面等电点)时, 针铁矿的表面带正电荷^[37]。由一个硅氧四面体和一个铝氧八面体组成的高岭石, 在中性或酸性条件下, 其铝氧八面体的裸露边面或层状结构体的表面羟基也会带正电荷^[38-40]。由于大多数的细菌细胞表面带负电荷^[41-42], 当带正电的矿物与带负电的细菌相遇时会产生静电引力, 利于细菌在矿物表面的黏附; 但较强的静电引力作用可能也会破坏细胞膜结构, 从而抑制细菌的存活^[18,43-44]。

此外, 含铁矿物中 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 的溶出以及高岭石中释放的 Al^{3+} 都会对细菌细胞产生毒害

效应^[45]。针铁矿释放出的 Fe^{2+} 可渗透进入细胞内并被氧化成 Fe^{3+} 沉淀, 产生致命的氢氧自由基, 使细菌失活^[46]; 高岭石中释放出的大量 Al^{3+} 将会抑制细菌细胞间的信号传递, 从而抑制生物膜的形成^[47-48]。在本研究中, 红黄泥田体系中高岭石的加入反而促进了胞外聚合物的分泌, 进而提升了其生物膜的成膜能力。这可能是由于以酸杆菌门(*Acidobacteria*)为主导的红黄泥田多物种生物膜在面对胁迫时所表现出的应激反应。类似的应激反应在细菌生命活动中十分常见, 细菌在受到环境胁迫时, 会启动一系列保护机制, 通过调控相关基因的表达或激活一群特定的调控因子诱导胁迫蛋白的释放以应对胁迫^[49-50]。相反, 在酸紫泥田多物种生物膜中, 矿物(高岭石或针铁矿)的加入却显著抑制了生物膜形成。究其原因, 一方面可能是由于酸紫泥体系自身的成膜能力、细胞活性显著高于红黄泥体系(图 2), 导致其活细胞数量(图 6A)、带负电荷量也高于红黄泥体系^[51]; 而在本研究条件下(pH 7.0), 针铁矿、高岭石的加入, 使得酸紫泥体系中的细菌更容易受到较强静电引力的作用, 造成细胞膜受损进而影响细菌的活性。另一方面, 也有可能由于与红黄泥田中占主导的酸杆菌门相比, 酸紫泥田中以绿弯菌门(*Chloroflexi*)占主导的菌群在应对离子毒害和酸胁迫等极端环境时其敏感性、耐受性以及适应性相对较弱^[51-52], 使其难以迅速地适应环境变化以抵抗离子毒害, 导致生物膜的形成受阻, 成膜能力降低。

综上, 矿物类型的差异(物理、化学特性)、环境因子的波动及微生物种类的多样性等, 综合影响微生物的定殖及代谢活性, 进而影响生物膜的形成^[18,44,53]。适当的胁迫压力对生物膜形成以及膜内菌群的生长有一定的促进作用; 当外部生存环境发生变化时, 细菌会在短时间

内发生应激反应, 通过基因组的改变、蛋白质、酶类物质的分泌、菌群的变化等途径来应对潜在的胁迫^[54]。

4 结论

(1) 不同母质发育水稻土中多物种生物膜内的细菌群落结构组成存在差异。红黄泥田和酸紫泥田体系中多物种生物膜内相对丰度排名前 5 的细菌群落为酸杆菌门、绿弯菌门、变形菌门、硝化螺旋菌门和脱硫菌门; 其中, 在酸紫泥田多物种生物膜内占主导的菌群为绿弯菌门, 而在红黄泥田多物种生物膜内占主导的菌群为酸杆菌门。

(2) 不同类型土壤矿物对不同母质发育水稻土中多物种生物膜形成的影响差异显著。高岭石、针铁矿的加入均促进了以酸杆菌门占主导的红黄泥田多物种生物膜的形成, 其中高岭石的促进效应更为显著; 而对以绿弯菌门为主导的酸紫泥田多物种生物膜则表现出抑制效应。

(3) 在红黄泥田水稻土体系中, 高岭石的加入并未对体系中的细菌群落构成极端威胁, 反而刺激细菌分泌产生了更多的胞外聚物质, 从而促进了多物种生物膜的形成。在红黄泥田和酸紫泥田水稻土体系中, 针铁矿的加入使其体系中死细胞的比例均高于加入高岭石的体系, 因此, 针铁矿的加入更易造成体系中细胞的失活, 进而影响多物种生物膜的形成。

作者贡献声明

熊轩: 方案设计、数据处理与分析、数据管理、实验操作、数据可视化、文稿写作及编辑; 李宇佳: 方案设计、数据管理、实验操作、文稿审查; 赵升: 实验操作、文稿审查; 严贵丽、蒋宇、汤宇晴、刘单鹏: 数据处理、文稿审查; 欧阳凯: 方案设计、项目管理、监督指

导、文稿审查及编辑。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] 王翠丽, 王军强, 陈亮, 栾倩倩, 李彦荣, 赵旭. 不同耕作方式对绿洲区农田土壤团聚体中微生物生物量碳、氮含量的影响[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(12): 246-251.
WANG CL, WANG JQ, CHENG L, LUAN QQ, LI YR, ZHAO X. Effects of different cultivation methods on microbial biomass carbon and nitrogen contents in soil aggregates in oasis area[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2022, 50(12): 246-251 (in Chinese).
- [2] 冯乙晴, 郝立凯, 郭圆, 徐绯, 徐恒. 酸性矿山废水微生物组时空演变特征及微生物-矿物互作机制[J]. 生态环境学报, 2022, 31(5): 1032-1046.
FENG YQ, HE LK, GUO Y, XU F, XU H. Spatio-temporal evolution characteristics of microbiome mechanism[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2022, 31(5): 1032-1046 (in Chinese).
- [3] 储成, 吴赵越, 黄欠如, 韩成, 钟文辉. 有机质提升对酸性红壤氮循环功能基因及功能微生物的影响[J]. 环境科学, 2020, 41(5): 2468-2475.
CHU C, WU ZY, HUANG QR, HAN C, ZHONG WH. Effect of organic matter promotion on nitrogen-cycling genes and functional microorganisms in acidic red soils[J]. Environmental Science, 2020, 41(5): 2468-2475 (in Chinese).
- [4] 王美溪, 刘珂艺, 邢亚娟. 气候变化背景下土壤微生物与植物物种多样性关联分析[J]. 中国农学通报, 2018, 34(20): 111-117.
WANG MX, LIU KY, XING YJ. Association analysis of soil microorganism and plant species diversity under climate change[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2018, 34(20): 111-117 (in Chinese).
- [5] CAI P, SUN XJ, WU YC, GAO CH, MORTIMER M, HOLDEN PA, REDMILE-GORDON M, HUANG QY. Soil biofilms: microbial interactions, challenges, and advanced techniques for *ex-situ* characterization[J]. Soil Ecology Letters, 2019, 1(3): 85-93.
- [6] VU B, CHEN M, CRAWFORD RJ, IVANOVA EP. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation[J]. Molecules, 2009, 14(7): 2535-2554.
- [7] McDOUGALD D, RICE SA, BARRAUD N, STEINBERG PD, KJELLEBERG S. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal[J]. Nature Reviews Microbiology, 2012, 10: 39-50.
- [8] 王茜丹, 路莹, 杨悦锁, 武宇辉, 徐喆, 裴子丞. 微生物堵塞过程中生物膜生长特征对多孔介质渗流特征影响[J]. 中国环境科学, 2022, 42(6): 2771-2778.
WANG XD, LU Y, YANG YS, WU YH, XU Z, PEI ZC. A study of microbial clogging on the variation of seepage characteristics with biofilm growth in porous medium[J]. China Environmental Science, 2022, 42(6): 2771-2778 (in Chinese).
- [9] 赵春梅, 王文斌, Didier Lesueur, 张永发, 薛欣欣, 罗雪华, 李晓波. 不同母质发育橡胶林土壤微生物特征研究[J]. 西南农业学报, 2022, 35(4): 964-971.
ZHAO CM, WANG WB, LESUEUR D, ZHANG YF, XUE XX, LUO XH, LI XB. Characteristics of soil microorganisms in rubber plantation with different parent materials[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2022, 35(4): 964-971 (in Chinese).
- [10] 吴晓玲, 张世熔, 蒲玉琳, 徐小逊, 李云. 川西平原土壤微生物生物量碳氮磷含量特征及其影响因素分析[J]. 中国生态农业学报, 2019, 27(10): 1607-1616.
WU XL, ZHANG SR, PU YL, XU XX, LI Y. Distribution characteristics and impact factors of soil microbial biomass carbon, nitrogen and phosphorus in western sichuan plain[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2019, 27(10): 1607-1616 (in Chinese).
- [11] ZHOU YN, MENG FF, OCHIENG B, XU JN, ZHANG L, KIMIREI IA, FENG MH, ZHU LF, WANG JJ. Climate and environmental variables drive stream biofilm bacterial and fungal diversity on tropical mountainsides[J]. Microbial Ecology, 2024, 87(1): 28.
- [12] TIAN L, WANG L, ZHANG XF, HUANG XD, WANG FH, ZHU SF, LI XQ, GUAN Y. Multi-omics analysis on seasonal variations of the biofilm microbial community in a full-scale pre-denitrification biofilter[J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2023, 30(9): 24284-24298.
- [13] ELUMALAI P, GAO XK, CUI JJ, KUMAR AS, DHANDAPANI P, PARTHIPAN P, KARTHIKEYAN OP, THEERTHAGIRI J, KHEAWHOM S, CHOI MY. Biofilm formation, occurrence, microbial communication, impact and characterization methods in natural and anthropic systems: a review[J]. Environmental Chemistry Letters, 2024, 22(3): 1297-1326.
- [14] DING GC, PRONK GJ, BABIN D, HEUER H, HEISTER K, KÖGEL-KNABNER I, SMALLA K. Mineral composition and charcoal determine the bacterial community structure in artificial soils[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2013, 86(1): 15-25.
- [15] ZHANG L, GADD GM, LI Z. Microbial biomodification of clay minerals[J]. Advances in Applied Microbiology, 2021, 114: 111-139.
- [16] ALIMOVA A, KATZ A, STEINER N, RUDOLPH E, WEI H, STEINER JC, GOTTLIEB P. Bacteria-clay interaction: Structural changes in smectite induced during biofilm formation[J]. Clays and Clay Minerals, 2009, 57(2): 205-212.
- [17] WU HY, CHEN WL, RONG XM, CAI P, DAI K, HUANG QY. Soil colloids and minerals modulate metabolic activity of *Pseudomonas putida* measured using microcalorimetry[J]. Geomicrobiology Journal, 2014, 31(7): 590-596.
- [18] 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.
- [19] 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).
- [20] 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.
- [21] 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 YD, ZHAO S, WEN Y, YAN GL, XIONG X, DUAN LX, OUYANG K. Effects of different agronomic measures on the formation processes of multispecies biofilms in paddy fields[J]. *Microbiology China*, 2024, 51(3): 801-814 (in Chinese).
- [22] ATKINSON RJ, POSNER AM, QUIRK JP. Adsorption of potential-determining ions at the ferric oxide-aqueous electrolyte interface[J]. *The Journal of Physical Chemistry*, 1967, 71(3): 550-558.
- [23] INNIS MA, DAVID H. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications[M]. New York: American Academic Press, 1990.
- [24] EDGAR RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460-2461.
- [25] ONDOV BD, BERGMAN NH, PHILLIPPY AM. Interactive metagenomic visualization in a web browser[J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 385.
- [26] ASNICAR F, WEINGART G, TICKLE TL, HUTTENHOWER C, SEGATA N. Compact graphical representation of phylogenetic data and metadata with GraPhlAn[J]. *PeerJ*, 2015, 3: e1029.
- [27] 王晓洁, 卑其成, 刘钢, 谢祖彬. 不同类型水稻土微生物群落结构特征及其影响因素[J]. *土壤学报*, 2021, 58(3): 767-776.
- WANG XJ, BEI QC, LIU G, XIE ZB. Microbial abundance and community composition in different types of paddy soils in China and their affecting factors[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2021, 58(3): 767-776 (in Chinese).
- [28] MA XL, LIU J, CHEN XF, LI WT, JIANG CY, WU M, LIU M, LI ZP. Bacterial diversity and community composition changes in paddy soils that have different parent materials and fertility levels[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2021, 20(10): 2797-2806.
- [29] BORLEE BR, GOLDMAN AD, MURAKAMI K, SAMUDRALA R, WOZNIAK DJ, PARSEK MR. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix[J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 75(4): 827-842.
- [30] THURNHEER T, GMÜR R, GUGGENHEIM B. Multiplex FISH analysis of a six-species bacterial biofilm[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 56(1): 37-47.
- [31] AMATO SM, FAZEN CH, HENRY TC, MOK WWK, ORMAN MA, SANDVIK EL, VOLZING KG, BRYNILDSEN MP. The role of metabolism in bacterial persistence[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 70.
- [32] 卫雨西, 陈丽娟, 冯起, 席海洋, 郭瑞, 张成琦. 干旱区盐碱土微生物特征及其影响因素研究进展[J]. *中国沙漠*, 2024, 44(3): 18-30.
- WEI YX, CHEN LJ, FENG Q, XI HY, GUO R, ZHANG CQ. Research progress on microbial characteristics and influencing factors of saline-alkali soil in arid area[J]. *Journal of Desert Research*, 2024, 44(3): 18-30 (in Chinese).
- [33] 刘跃东. 典型红壤与黑土地剖面有机质物理化学组成及其控制因素研究[D]. 北京: 中国农业科学院博士学位论文, 2023.
- LIU YD. Physiochemical compositions of organic matter in soil profile under forest in ultisol and mollisol region and its controlling factors[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences Thesis, 2023 (in Chinese).
- [34] 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. Formation process and mechanism of bacterial biofilm mediated by soil minerals[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [35] YAN HC, LIU CC, YU WT, ZHU XM, CHEN BL. The aggregate distribution of *Pseudomonas aeruginosa* on biochar facilitates quorum sensing and biofilm formation[J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 856: 159034.
- [36] GLASAUER S, LANGLEY S, BEVERIDGE TJ. Sorption of Fe (hydr)oxides to the surface of *Shewanella putrefaciens*: cell-bound fine-grained minerals are not always formed *de novo*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(12): 5544-5550.
- [37] 叶波. 土壤胶体矿物诱导羟基自由基降解吡虫啉的机制研究[D]. 淮南: 安徽理工大学硕士学位论文, 2023.
- YE B. Study on mechanism of degradation of imidacloprid by hydroxyl radicals induced by colloidal minerals in soil[D]. Huainan: Master's Thesis of Anhui University of Science & Technology, 2023 (in Chinese).
- [38] 石荣, 贾永锋, 王承智. 土壤矿物质吸附砷的研究进展[J]. *土壤通报*, 2007(3): 584-589.
- SHI R, JIA YF, WANG CZ. A review of arsenic adsorption onto mineral constitutions in the soil[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2007(3): 584-589 (in Chinese).
- [39] YUKSELEN-AKSOY Y, KAYA A. A study of factors affecting on the zeta potential of kaolinite and quartz powder[J]. *Environmental Earth Sciences*, 2011, 62(4): 697-705.
- [40] QUAGHEBEUR M, RATE A, RENGEL Z, HINZ C. Desorption kinetics of arsenate from kaolinite as influenced by pH[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2005, 34(2): 479-486.

- [41] SONI KA, BALASUBRAMANIAN AK, BESKOK A, PILLAI SD. Zeta potential of selected bacteria in drinking water when dead, starved, or exposed to minimal and rich culture media[J]. *Current Microbiology*, 2008, 56(1): 93-97.
- [42] 张瑞玲. 甲基叔丁基醚的生物降解机理与微生物在地下水中的迁移[D]. 天津: 天津大学博士学位论文, 2007.
ZHANG RL. Biodegradation mechanism of methyl tert-butyl ether and migration of microorganisms in groundwater[D]. Tianjin: Doctoral Dissertation of Tianjin University, 2007 (in Chinese).
- [43] 黄颖婷, 范薇, 赵恒, 朱利明, 刘一休, 郑志伟, 史方, 邹曦, 王开诚, 朱稳, 何姗. 不同类型基质对附着细菌定殖演替和群落结构的影响[J/OL]. *水生态学杂志*, 2024. DOI: 10.15928/j.1674-3075.202405110183.
HUANG YT, FANG W, ZHAO H, ZHU LM, LIU YX, ZHENG ZW, SHI F, ZOU X, WANG KC, ZHU W, HE S. Effects of different substrates on colonization succession and community structure of adherent bacteria[J/OL]. *Journal of Hydroecology*, 2024. DOI: 10.15928/j.1674-3075.202405110183 (in Chinese).
- [44] 孙晓洁, 高春辉, 黄巧云, 蔡鹏. 自然环境中的多物种生物膜: 研究方法及社群相互作用[J]. *农业资源与环境学报*, 2017, 34(1): 6-14.
SUN XJ, GAI CH, HUNAG QY, CAI P. Multispecies biofilms in natural environments: an overview of research methods and bacterial social interactions[J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2017, 34(1): 6-14 (in Chinese).
- [45] GUZZO A, DIORIO C, DuBOW MS. Transcription of the *Escherichia coli* *fliC* gene is regulated by metal ions[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(8): 2255-2259.
- [46] WILLIAMS LB, METGE DW, EBERL DD, HARVEY RW, TURNER AG, PRAPAIPONG P, PORET-PETERSON AT. What makes a natural clay antibacterial?[J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(8): 3768-3773.
- [47] YANG SS, QU CC, MUKHERJEE M, WU YC, HUANG QY, CAI P. Soil phyllosilicate and iron oxide inhibit the quorum sensing of *Chromobacterium violaceum*[J]. *Soil Ecology Letters*, 2021, 3(1): 22-31.
- [48] WONG D, SUFLITA JM, McKINLEY JP, KRUMHOLZ LR. Impact of clay minerals on sulfate-reducing activity in aquifers[J]. *Microbial Ecology*, 2004, 47(1): 80-86.
- [49] 杨芊, 金中初. 细菌的氧化应激反应及其基因调控[J]. *国外医学(微生物学分册)*, 1998(2): 21-24.
YANG Q, JIN ZC. Oxidative stress response of bacteria and its gene regulation[J]. *Foreign Medicine (Microbiology Section)*, 1998(2): 21-24.
- [50] GUIDA L, SAIDI Z, HUGHES MN, POOLE RK. Aluminium toxicity and binding to *Escherichia coli*[J]. *Archives of Microbiology*, 1991, 156(6): 507-512.
- [51] 张子新. 海藻裂解液强化修复滨海石油污染土壤研究[D]. 大连: 大连理工大学硕士学位论文, 2018.
ZHANG ZX. Study on enhanced remediation of coastal petroleum contaminated soil by algae lysate[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian University of Technology, 2018 (in Chinese).
- [52] 丁凯, 张毓婷, 张俊红, 柴雄, 周世水, 童再康. 不同密度杉木林对林下植被和土壤微生物群落结构的影响[J]. *植物生态学报*, 2021, 45(1): 62-73.
DING K, ZHANG YT, ZHANG JH, CHAI X, ZHOU SS, TONG ZK. Effects of Chinese fir plantations with different densities on understory vegetation and soil microbial community structure[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2021, 45(1): 62-73 (in Chinese).
- [53] DONG HL, HUANG LQ, ZHAO LD, ZENG Q, LIU XL, SHENG YZ, SHI L, WU G, JIANG HC, LI FR, ZHANG L, GUO DY, LI GY, HOU WG, CHEN HY. A critical review of mineral-microbe interaction and co-evolution: mechanisms and applications[J]. *National Science Review*, 2022, 9(10): nwac128.
- [54] GIULIODORI AM, GUALERZI CO, SOTO S, VILA J, TAVÍO MM. Review on bacterial stress topics[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2007, 1113: 95-104.