



潜在植物根际促生菌副地衣芽孢杆菌 HMPM220325 生物膜培养条件优化

代妮妮^{1,2}, 梁笑^{1,2}, 闫致会^{1,2}, 仰凡^{1,2}, 杨欣婷^{1,2}, 卢恒谦^{1,2}, 王永中^{1,2*}

1 安徽大学生命科学学院, 安徽 合肥 230601

2 安徽大学 安徽省人体微生态与精准医药重点实验室, 安徽 合肥 230601

代妮妮, 梁笑, 闫致会, 仰凡, 杨欣婷, 卢恒谦, 王永中. 潜在植物根际促生菌副地衣芽孢杆菌 HMPM220325 生物膜培养条件优化[J]. 微生物学报, 2024, 64(8): 2784-2798.

DAI Nini, LIANG Xiao, YAN Zhihui, YANG Fan, YANG Xinting, LU Hengqian, WANG Yongzhong. Optimization of culture conditions for biofilm formation of the potential plant growth-promoting rhizobacterial strain *Bacillus paralicheniformis* HMPM220325[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(8): 2784-2798.

摘要: 副地衣芽孢杆菌(*Bacillus paralicheniformis*)是一种革兰氏阳性、兼性厌氧、运动杆状的内生孢子形成细菌, 其可作为潜在植物根际促生菌使用。本研究团队从水果发酵乳中分离出一株副地衣芽孢杆菌 HMPM220325, 该菌株在静置培养过程中可在气-液界面形成生物膜。【目的】探究不同环境因子对副地衣芽孢杆菌 HMPM220325 生物膜生物量的影响, 为后期将其作为植物根际促生菌剂的开发利用提供数据支撑。【方法】采用结晶紫染色法定量检测不同环境因素和营养物质对副地衣芽孢杆菌生物膜形成的影响, 并结合正交试验优化副地衣芽孢杆菌生物膜形成的最佳条件。【结果】副地衣芽孢杆菌生物膜形成的最佳环境条件是温度 50 °C、pH 值 9.0、培养 36 h; 最适培养基组成为麦芽糖 15.0 g/L、尿素 10.0 g/L、硫酸镁 20.0 mmol/L、磷酸氢二钠 2.5 g/L、牛心浸粉 17.5 g/L。优化后的培养条件使得生物膜产量相较原培养条件提高约 58.28%。【结论】本研究对副地衣芽孢杆菌在多种环境中的生物膜形成能力进行了深入探讨, 并优化出该菌株生物膜培养的最佳条件, 为其进一步作为植物根际促生菌剂的开发提供实验基础。

关键词: 植物根际促生细菌; 副地衣芽孢杆菌; 生物膜; 正交优化

资助项目: 国家自然科学基金(31770066, 32200042)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31770066, 32200042).

*Corresponding author. E-mail: yzwang@ahu.edu.cn

Received: 2024-01-12; Accepted: 2024-05-10; Published online: 2024-05-15

Optimization of culture conditions for biofilm formation of the potential plant growth-promoting rhizobacterial strain *Bacillus paralicheniformis* HMPM220325

DAI Nini^{1,2}, LIANG Xiao^{1,2}, YAN Zhihui^{1,2}, YANG Fan^{1,2}, YANG Xinting^{1,2}, LU Hengqian^{1,2}, WANG Yongzhong^{1,2*}

1 School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230601, Anhui, China

2 Key Laboratory of Human Microenvironment and Precision Medicine of Anhui Province, Anhui University, Hefei 230601, Anhui, China

Abstract: *Bacillus paralicheniformis*, a Gram-positive, facultative anaerobic, motile rod-shaped endospore-forming bacterium, can be used as a species of potential plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). In this study, *B. paralicheniformis* HMPM220325 was isolated from the fruit fermented milk. This strain can form biofilms at the gas-liquid interface during static cultivation. **[Objective]** To study the effects of different environmental factors on the biofilm biomass of *B. paralicheniformis* HMPM220325 and provide data support for the later development and application of HMPM220325 as a PGPR strain. **[Methods]** Effects of different environmental factors and nutrients on the biofilm formation of *B. paralicheniformis* HMPM220325 were quantitatively detected by crystal violet staining, and the optimal conditions for the biofilm formation of the strain were optimized by orthogonal experiments. **[Results]** The optimal environmental conditions for the biofilm formation of *B. paralicheniformis* HMPM220325 were incubation at 50 °C and pH 9.0 for 36 h. The optimal medium was composed of maltose 15.0 g/L, urea 10.0 g/L, magnesium sulphate 20.0 mmol/L, disodium hydrogen phosphate 2.5 g/L, and bovine heart infusion 17.5 g/L. The optimized culture conditions increased the biofilm biomass by 58.28% compared with the original culture conditions. **[Conclusion]** This study explored the biofilm formation of *B. paralicheniformis* in a variety of environments and optimized the culture conditions for biofilm formation of this strain, providing an experimental basis for further development of PGPR.

Keywords: plant growth-promoting rhizobacteria; *Bacillus paralicheniformis*; biofilm; orthogonal optimization

植物根际促生细菌(plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)是一类重要的生防菌,其可吸附在植物的根部,保护植物不受病原菌的侵害,提高对营养物质的吸收和利用、促进植物生长并增加植物的产出^[1-3]。研究表明,PGPR可通过多重作用影响植物的生长,其可以直接产生植物激素,如生长素、赤霉素和细胞分裂

素等,从而促进植物生长^[4],也可通过固氮、溶磷以及解钾等方式改善植物对营养物质的利用^[5]。此外,部分PGPR还能通过产生抗生素、细菌素和几丁质酶等方式与病原菌竞争植物根际生态位,进而增强植物的防御能力^[6]。同时,PGPR具备螯合重金属离子的能力^[7],这不仅能够提高植物对各种胁迫的抗性,还可

以提高土壤和环境的自我修复能力^[6]。例如, Shahzad 等研究发现解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) RWL-1 可以通过合成脱落酸增加水稻对盐胁迫的抗性^[8]; Dimkpa 等研究表明链霉菌属(*Streptomyces*) F4 可以显著提高向日葵对重金属 Cd 的吸收^[9]; Silambarasan 等研究发现香茅醇假单胞菌(*Pseudomonas citronellolis*) SLP6 具有很强大的定殖潜力, 可用于生物修复 Cu 污染的土壤^[10]。

PGPR 在农业应用中发挥着不可或缺的作用, 值得注意的是, PGPR 给予植物有益作用的前提是其必须具有较强的根际定殖和生态位竞争能力, 即在病原微生物存在时, 其能够长时间定居于植物根际, 并保持一定存活数量^[11]。若 PGPR 不能在植物根际稳定存活, 其生防活性就会逐渐降低, 也就不能发挥生防效果^[12]。土壤中的环境变量极为复杂, 为应对这一复杂生境, 通过让 PGPR 形成结构致密的生物膜(biofilm)^[13], 使其能稳定附着在植物根部来保护自身的定殖位点, 减少病原菌对根系周围营养物质的利用, 是提高 PGPR 生物防治能力的有效策略^[14]。生物膜是细菌在生物或非生物表面形成的一种由胞外聚合物包裹而成的微生物群落, 当细菌受到外界环境的各种胁迫, 如营养不足、营养过剩、高渗透压和抗生素胁迫等, 胞外聚合物可帮助细菌抵御这些不良因素的侵袭^[15]。目前已有多项利用 PGPR 生物膜发挥生防作用的报道。例如: Bais 等利用枯草芽孢杆菌在拟南芥的根际周围形成生物膜可有效抑制丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)的侵袭^[16]; Haggag 等发现多黏类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)可通过在花生根部形成生物膜来阻止黑曲霉的侵害, 从而防治花生褐腐病^[17]。

副地衣芽孢杆菌(*Bacillus paralicheniformis*)是一种革兰氏阳性、兼性厌氧、运动杆状的内

生孢子形成细菌, 于 2015 年首次被报道^[18]。目前, 已有多个研究团队证明副地衣芽孢杆菌具有作为 PGPR 的潜力。Wang 等发现副地衣芽孢杆菌 MDJK30 可以产生凤霉素(一种环状脂肽), 对丝状真菌具有很强的抗菌活性^[19]; Valenzuela-Ruiz 等对副地衣芽孢杆菌 TRQ65 基因组进行解析, 并通过验证发现其不仅能够通过合成脂肽和抗生素来抑制植物病原体, 还能够通过合成生长素来促进植物生长^[20]; Annapurna 等研究发现副地衣芽孢杆菌 KMS80 具有促进水稻生长的能力^[21]。然而, 目前国内外对副地衣芽孢杆菌生物膜的研究几乎空白, 本团队在前期研究中分离获得了一株副地衣芽孢杆菌 HMPM220325, 通过对其基因组解析和实验验证发现其在静置培养过程中能够在气-液界面形成稳定的生物膜^[22], 因此本研究选取副地衣芽孢杆菌 HMPM220325 作为实验对象, 探究了氧气、温度、pH 以及培养时间对其生物膜形成的影响, 并通过调整金属离子、改变碳源和氮源等因素对其生物膜培养策略进行优化, 以期后续将其深入开发为 PGPR 菌剂提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

副地衣芽孢杆菌(*Bacillus paralicheniformis*) HMPM220325, 保藏于广东省微生物菌种保藏中心(保藏编号为 GDMCC No: 63458)。

1.1.2 培养基

LB 液体培养基(g/L): 氯化钠 10.0, 胰蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, 调整 pH 值至 7.2; LB 固体培养基(g/L): 在 LB 液体培养基中另加琼脂粉 15.0。脑心浸液(brain heart infusion, BHI)液体培养基(g/L): 葡萄糖 2.0, 磷酸氢二钠 2.5, 胰蛋白胨 10.0, 牛心浸粉 17.5, 氯化钠 5.0。

MRS 液体培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 4.0, 磷酸氢二钾 2.0, 牛肉浸膏 8.0、葡萄糖 20.0, 无水乙酸钠 5.0, 柠檬酸三氨 2.0, 吐温-80 1.0, 硫酸镁 0.2, 硫酸锰 0.05。以上培养基 121 °C 灭菌 30 min 备用。

1.1.3 主要试剂和仪器

甲醇、无水乙醇, 国药集团化学试剂有限公司; 冰醋酸, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 结晶紫染液, 上海碧云天生物技术股份有限公司; PBS 磷酸盐缓冲液, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

酶标仪, BioTek 公司; 智能生化培养箱, 上海三发科学仪器有限公司; 厌氧培养箱, 上海龙跃仪器设备有限公司; 扫描电镜, 卡尔蔡司光学(中国)有限公司。

1.2 菌种培养

将保藏于-80 °C的副地衣芽孢杆菌菌株按 1%接种量接种到 LB 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 培养 24 h, 然后取少许菌液于 LB 平板上进行平板划线, 培养 24 h 后挑取单菌落于 LB 液体培养基中进行培养, 重复上述操作一次, 取活化后的菌液用于后续研究。

1.3 生物膜量测定

参照 Peeters 等^[23]的方法, 通过结晶紫染色法对生物膜产量进行测定。具体操作如下: 待生物膜生成后, 去除培养基, 加入无菌 PBS 缓冲液清洗 3 次, 加入 2 mL 甲醇固定 15 min, 除去甲醇, 培养板自然干燥, 加入 1 mL 0.1%结晶紫染液充分浸泡染色 1 h 后吸出多余的染液, 用无菌 PBS 缓冲液漂洗生物膜至流出的液体为无色。待培养板干燥后, 加入 2 mL 体积分数为 33%的冰醋酸溶液, 待生物膜中结晶紫完全溶解后, 精密吸取 200 μ L 溶液于波长 570 nm 处测定吸光度^[24], 以 33%的冰醋酸溶液作为空白对照, 每个处理重复 3 次。

1.4 副地衣芽孢杆菌生物膜显微观察

参照《食品微生物学实验原理与技术》^[25]中方法, 将过夜培养的副地衣芽孢杆菌生物膜平铺于玻璃片上, 置于 2%戊二醛磷酸缓冲液中固定冷藏过夜。PBS 缓冲液漂洗 3 次(每次 15 min), 依次利用 30%、50%、70%、80%、90%、95%和 100%的乙醇溶液梯度脱水, 每次 15 min^[26], CO₂ 临界干燥后喷金处理, 置于扫描电镜下观察并拍照。

1.5 单因素试验

1.5.1 环境因素的影响

氧气对副地衣芽孢杆菌生物膜成膜能力的影响: 按 1%接种量将副地衣芽孢杆菌接种到 LB 培养基中, 将接种后的菌液分别置于 37 °C 恒温培养箱和厌氧培养箱中静置培养 24 h 后进行生物膜量测定。

培养时间对副地衣芽孢杆菌生物膜成膜能力的影响: 按 1%接种量将副地衣芽孢杆菌接种到 LB 培养基中, 将接种后的菌液分别置于 37 °C 恒温培养箱中静置培养 12、24、36、48 和 72 h, 于不同时间点取出后进行生物膜量测定。

培养温度对副地衣芽孢杆菌生物膜成膜能力的影响: 按 1%接种量将副地衣芽孢杆菌接种到 LB 培养基中, 将接种后的菌液分别置于 20、30、40、45、50、55 和 60 °C 的恒温培养箱中静置培养 36 h, 随后进行生物膜量测定。

不同初始 pH 对副地衣芽孢杆菌生物膜成膜能力的影响: 按 1%接种量将副地衣芽孢杆菌接种至 pH 值分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 的 LB 培养基中, 将接种后的菌液置于 50 °C 恒温培养箱中静置培养 36 h, 随后进行生物膜量测定。

1.5.2 培养基组分对副地衣芽孢杆菌生物膜成膜能力的影响

培养基种类对副地衣芽孢杆菌生物膜成膜

能力的影响:按 1%接种量将副地衣芽孢杆菌分别接种于 LB、MRS 和 BHI 培养基中,将接种后的菌液置于 50 °C 恒温培养箱静置培养 36 h 后进行生物膜量测定。

碳源对副地衣芽孢杆菌生物膜成膜能力的影响:以 BHI 为基础培养基,分别以蔗糖、麦芽糖和可溶性淀粉替换其中的葡萄糖,添加量均为 2.0 g/L。按 1%接种量将副地衣芽孢杆菌分别接种于含有蔗糖、麦芽糖和可溶性淀粉的 BHI 培养基中,将接种后的菌液置于 50 °C 恒温培养箱静置培养 36 h 后进行生物膜量测定。最后选取对生物膜形成影响较大的麦芽糖进行试验,考察麦芽糖添加量为 0、5.0、10.0、15.0、20.0 g/L 的培养基对副地衣芽孢杆菌生物膜形成能力的影响。

氮源对副地衣芽孢杆菌生物膜成膜能力的影响:以 BHI 为基础培养基,分别以蛋白胨、尿素和硫酸铵替换其中的胰蛋白胨,添加量均为 10.0 g/L。按 1%接种量将副地衣芽孢杆菌分别接种于含有蛋白胨、尿素和硫酸铵的 BHI 培养基中,将接种后的菌液置于 50 °C 恒温培养箱静置培养 36 h 后进行生物膜量测定。最后选取对生物膜形成影响较大的尿素进行试验,考察尿素添加量为 0、5.0、10.0、15.0、20.0 g/L 的培养基对副地衣芽孢杆菌生物膜形成能力的影响。

金属离子对副地衣芽孢杆菌生物膜成膜能力的影响:以 BHI 为基础培养基,分别向培养基中加入 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 以及 K^+ ,添加量均为 5.0 mmol/L。按 1%接种量将副地衣芽孢杆菌分别接种于含有 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 和 K^+ 的 BHI 培养基中,将接种后的菌液置于 50 °C 恒温培养箱静置培养 36 h 后进行生物膜量测定。最后选取对生物膜形成影响较大的 Mg^{2+} 进行试验,考察 Mg^{2+}

添加量为 0、5.0、10.0、15.0、20.0 mmol/L 的培养基对副地衣芽孢杆菌生物膜形成能力的影响。

1.6 正交试验设计

根据单因素试验结果,选择麦芽糖(A)、尿素(B)和 Mg^{2+} (C)浓度进行正交试验(表 1),以副地衣芽孢杆菌生物膜形成量作为考察指标,确定最佳培养基组分。

1.7 数据分析

试验数据采用 SPSS 16.0 和 GraphPad Prism 8 进行统计分析和图标制作,采用 *t* 检验检测显著性差异, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 生物膜形态观察

如图 1 所示,副地衣芽孢杆菌生物膜呈多孔结构,菌体表面被致密的胞外聚合物所包被,菌体长度大约在 2.0–4.0 μm ,宽度大约在 0.4 μm ;菌体间由丝状胞外聚合物紧密相连,具有典型的生物膜结构。

2.2 环境条件对副地衣芽孢杆菌生物膜成膜能力的影响

2.2.1 氧气对副地衣芽孢杆菌生物膜成膜能力的影响

副地衣芽孢杆菌在有氧和无氧环境中均能在气-液界面形成致密的生物膜(图 2A、2B)。对生物膜量进行测定,结果表明有氧环境下产生的生物膜量显著高于厌氧环境(图 2C),因此有氧环境更利于副地衣芽孢杆菌形成生物膜。

表 1 正交因素水平表

Table 1 Table of orthogonal factor levels

Level	A Maltose (g/L)	B Urea (g/L)	C Mg^{2+} (mmol/L)
1	10.0	10.0	10.0
2	15.0	15.0	15.0
3	20.0	20.0	20.0

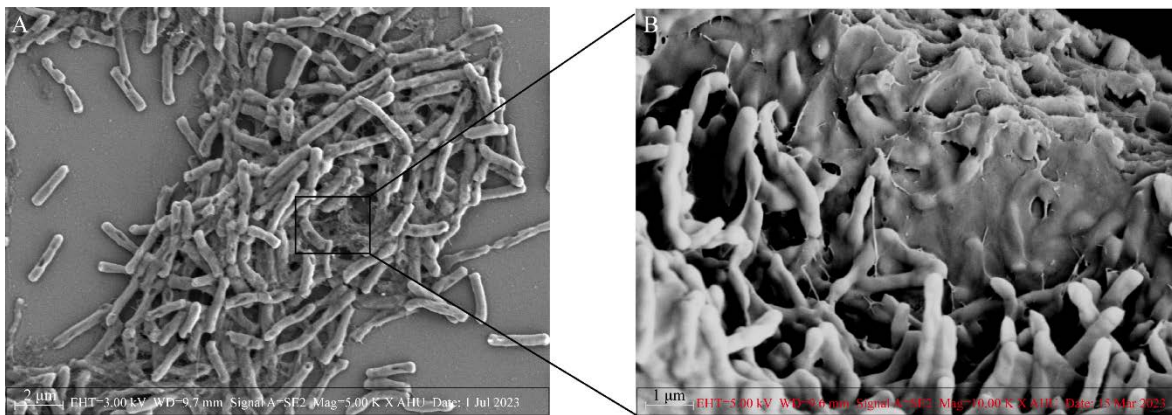


图 1 副地衣芽孢杆菌生物膜扫描电镜图

Figure 1 Scanning electron microscope image of *Bacillus paralicheniformis* biofilm. A: 5 000 \times ; B: 10 000 \times .

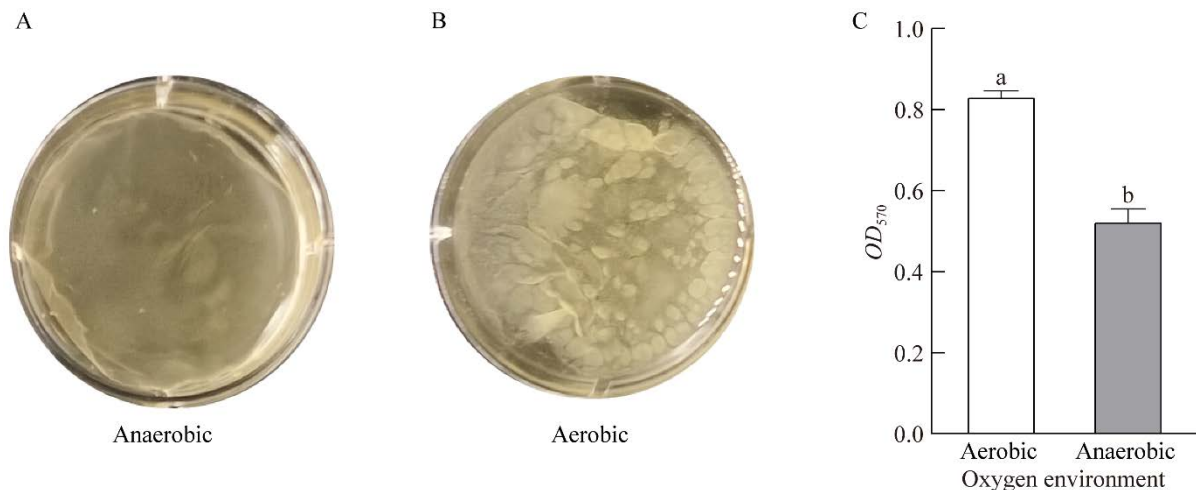


图 2 氧气对副地衣芽孢杆菌生物膜成膜能力的影响

Figure 2 Effect of oxygen on the biofilm formation capacity of *Bacillus paralicheniformis*. A: Biofilm morphology of *Bacillus paralicheniformis* formed in anaerobic environment. B: Biofilm morphology of *Bacillus paralicheniformis* formed in aerobic environment. C: Biofilm volume quantitative results of *Bacillus paralicheniformis* formed in aerobic and anaerobic environment. Data with different letters are significantly different ($P < 0.05$) among different groups.

2.2.2 培养时间对副地衣芽孢杆菌生物膜成膜能力的影响

如图 3 所示, 副地衣芽孢杆菌在 36 h 生物膜产量最高, 其形成量显著高于其他培养时间 ($P < 0.05$), 表明 36 h 为副地衣芽孢杆菌生物膜成熟期。培养超过 36 h 后, 副地衣芽孢杆菌生物膜由成熟阶段向脱落/扩散阶段发展, 生物膜

中细菌逐渐脱离, 进而导致生物膜量逐渐降低。

2.2.3 培养温度对副地衣芽孢杆菌生物膜成膜能力的影响

对副地衣芽孢杆菌进行 20–60 °C 的培养温度测试, 结果如图 4 所示, 随着温度的升高, 生物膜形成量逐渐增加, 在 50 °C 时, 生物膜产量达到峰值, 继续升高温度, 生物膜量则显著降低。

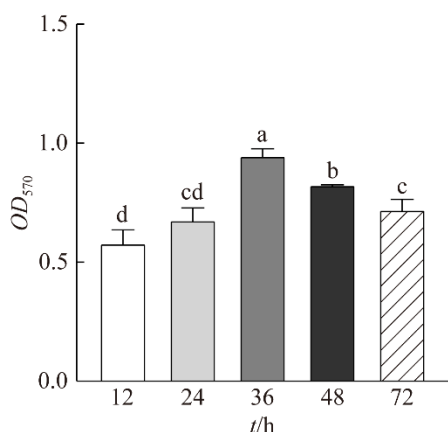


图 3 不同培养时间对副地衣芽孢杆菌生物膜形成能力的影响

Figure 3 Effect of different incubation times on the biofilm formation capacity of *Bacillus paralicheniformis*. Data with different letters are significantly different ($P < 0.05$) among different groups.

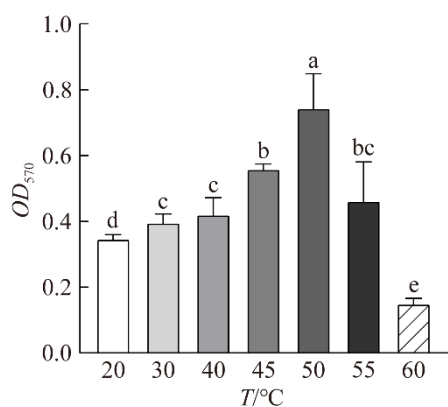


图 4 不同培养温度对副地衣芽孢杆菌生物膜形成能力的影响

Figure 4 Effect of different incubation temperatures on the biofilm formation capacity of *Bacillus paralicheniformis*. Data with different letters are significantly different ($P < 0.05$) among different groups.

2.2.4 不同初始 pH 对副地衣芽孢杆菌生物膜成膜能力的影响

对副地衣芽孢杆菌在不同 pH 环境的生物膜形成情况进行评估发现, pH 值过低或过高, 生物膜产量都会受到抑制, 在 pH 值为 9.0 时副地衣芽孢杆菌成膜量最大(图 5)。

2.3 培养基组分对副地衣芽孢杆菌生物膜成膜能力的影响

2.3.1 培养基种类对副地衣芽孢杆菌生物膜成膜能力的影响

副地衣芽孢杆菌在 3 种培养基中均可形成生物膜(图 6), 其中在 BHI 培养基中形成的生物

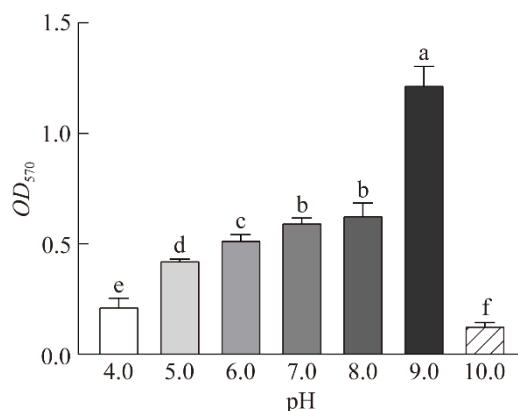


图 5 不同初始 pH 对副地衣芽孢杆菌生物膜形成能力的影响

Figure 5 Effect of different initial pH on the biofilm formation capacity of *Bacillus paralicheniformis*. Data with different letters are significantly different ($P < 0.05$) among different groups.

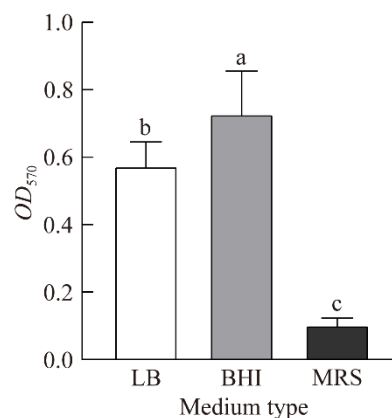


图 6 不同培养基种类对副地衣芽孢杆菌生物膜形成能力的影响

Figure 6 Effect of different media types on the biofilm formation capacity of *Bacillus paralicheniformis*. Data with different letters are significantly different ($P < 0.05$) among different groups.

膜量显著高于其他 2 种培养基, 结果表明 BHI 培养基更适合副地衣芽孢杆菌生物膜的生长。

2.3.2 碳源对副地衣芽孢杆菌生物膜成膜能力的影响

在 BHI 培养基的基础上对碳源进行考察, 结果如图 7A 所示, 相较于其他 3 种碳源, 麦芽糖对副地衣芽孢杆菌生物膜的形成有显著促进作用。进一步对麦芽糖浓度进行测试, 结果如图 7B 所示, 麦芽糖在一定浓度内能促进副地衣芽孢杆菌生物膜形成, 随着浓度的增加, 其生物膜形成量呈现先增加后减少的趋势。在添加量为 15.0 g/L 时, 生物膜形成量达到峰值, 继续增加麦芽糖浓度, 反而对副地衣芽孢杆菌生物膜的形成产生一定抑制作用。

2.3.3 氮源对副地衣芽孢杆菌生物膜成膜能力的影响

不同氮源物质对生物膜形成的影响如图 8A 所示, 尿素的添加对副地衣芽孢杆菌生物膜的形成有显著的促进作用。进一步对尿素添加量

进行测试, 结果如图 8B 所示, 尿素添加量为 15.0 g/L 时对生物膜形成的促进作用最强。

2.3.4 金属离子对副地衣芽孢杆菌生物膜成膜能力的影响

如图 9A 所示, 相较 Cu^{2+} 和 K^{+} , Mg^{2+} 对副地衣芽孢杆菌生物膜形成的促进作用更为显著。如图 9B 所示, 低浓度的 Mg^{2+} 对副地衣芽孢杆菌生物膜产量的影响无显著性差异, 随着 Mg^{2+} 浓度的增加, 生物膜的形成量逐渐增加, 在 15.0 mmol/L 时生物膜形成量达到最大。

2.4 正交试验

在单因素基础上选取麦芽糖(A)、尿素(B)、 Mg^{2+} (C)进行 3 因素 3 水平正交试验, 以生物膜量为评定指标, 利用极差分析法对结果进行极差分析。由表 2 可以看出, 3 个因素中对副地衣芽孢杆菌生物膜形成影响的主次顺序为 $B>A>C$, 即尿素>麦芽糖> Mg^{2+} , 得出最佳组合水平为 $A_2B_1C_3$, 即麦芽糖添加量为 15.0 g/L, 尿素添加量为 10.0 g/L 以及 Mg^{2+} 添加量为 20.0 mmol/L。

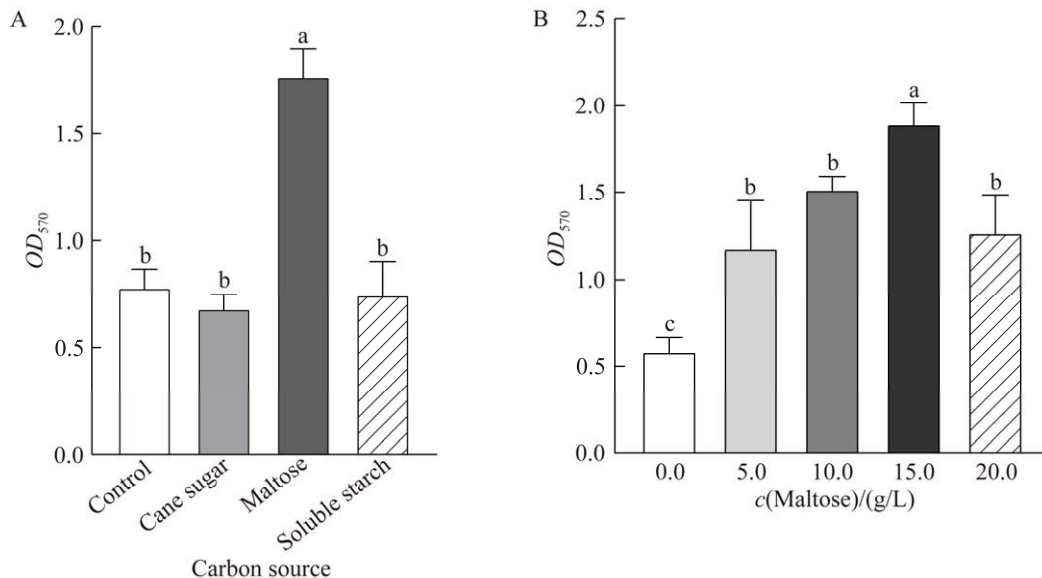


图 7 碳源对副地衣芽孢杆菌生物膜形成能力的影响

Figure 7 Effect of carbon sources on the biofilm formation capacity of *Bacillus paralicheniformis*. A: Different types of carbon sources. B: Concentration of maltose. Data with different letters are significantly different ($P<0.05$) among different groups.

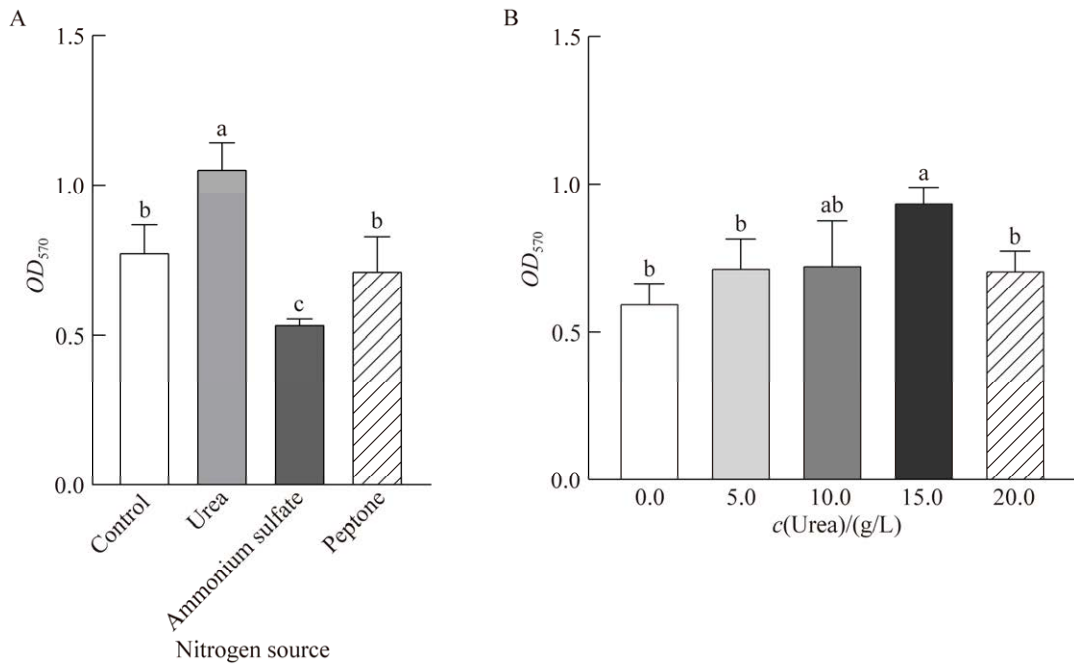


图 8 氮源对副地衣芽孢杆菌生物膜形成能力的影响

Figure 8 Effect of nitrogen sources on the biofilm formation capacity of *Bacillus paralicheniformis*. A: Different types of nitrogen sources. B: Concentration of urea. Data with different letters are significantly different ($P < 0.05$) among different groups.

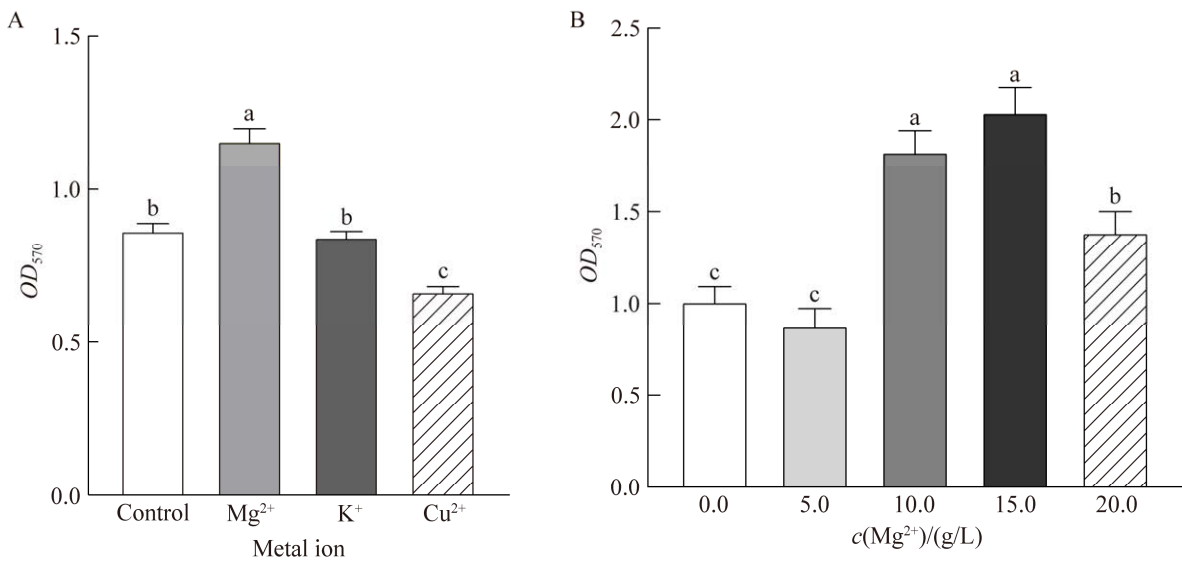


图 9 金属离子对副地衣芽孢杆菌生物膜形成能力的影响

Figure 9 Effect of metal ions on the biofilm formation capacity of *Bacillus paralicheniformis*. A: Different types of metal ions. B: Concentration of Mg^{2+} . Data with different letters are significantly different ($P < 0.05$) among different groups.

2.5 副地衣芽孢杆菌最佳培养条件验证

副地衣芽孢杆菌在优化后的培养基中形成的生物膜量显著高于原培养基, 生物膜产量相较原培养基提高约 58.28% (图 10)。

表 2 正交试验结果分析

Table 2 Analysis of orthogonal experiment results

Experimental group	A	B	C	Biofilm (OD_{570})
1	1	1	1	1.536
2	1	2	2	1.505
3	1	3	3	1.574
4	2	1	2	1.713
5	2	2	3	1.570
6	2	3	1	1.565
7	3	1	3	1.603
8	3	2	1	1.480
9	3	3	2	1.482
K_1	4.616	4.853	4.581	
K_2	4.849	4.556	4.701	
K_3	4.567	4.621	4.748	
k_1	1.538	1.618	1.005	
k_2	1.616	1.518	1.567	
k_3	1.522	1.540	1.582	
r	0.094	0.099	0.056	

Order of influencing factors: $B>A>C$

The optimal combination: $A_2B_1C_3$

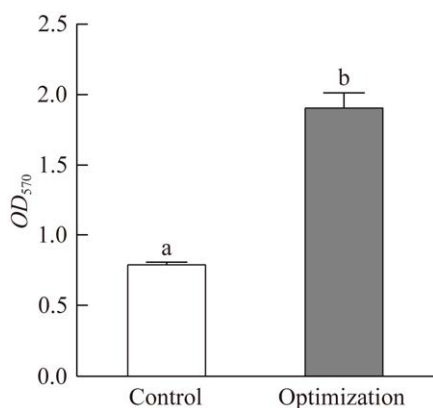


图 10 副地衣芽孢杆菌最佳培养条件验证结果

Figure 10 Validation results of optimal culture conditions of *Bacillus paralicheniformis*. Data with different letters are significantly different ($P<0.05$) among different groups.

3 讨论与结论

近年来, 国内外关于 PGPR 的研究已取得不少成果^[27-29], 但是由于土壤环境是一个动态且复杂的生态位, PGPR 需要不断适应新的环境条件和营养条件, 这导致 PGPR 在实际应用中的效果并不理想^[30]。例如: 曹景勤研究表明土壤中的水分含量是影响根瘤菌在豆科植物体内稳定存活及定殖的关键因素^[31]; 姚槐应等研究发现, 温度会影响 PGPR 的活性, 从而使其在植物根际的定殖^[32]。因此, 促进 PGPR 形成生物膜是提高其应对多变环境的能力, 有效改善菌株在植物根际的定殖能力, 增强植物病原菌拮抗能力, 发挥优异生防作用的有效策略^[33]。

温度变化可影响细菌的生理状态进而影响生物膜的形成^[34], 在不同温度环境中, 细菌的成膜量呈现较大波动, 研究结果发现在低温 (20 °C) 培养下, 副地衣芽孢杆菌生物膜形成量受到显著抑制, 其原因可能是由于温度过低, 导致酶活力受到影响, 而细菌营养代谢则需要依靠酶的活性, 低温环境会使细菌代谢速度减慢, 进而延长生物膜形成的时间^[35]。彭晓云等发现温度与金黄色葡萄球菌生物膜生长存在正比例关系, 生物膜表面积会随着温度的增加而增加^[36]。本研究中也发现类似变化, 副地衣芽孢杆菌成膜量随着温度的升高而增加。不过当温度达到 60 °C 时, 生物膜形成量显著减少, 这可能是因为温度过高会使细菌细胞中一些组分产生不可逆转的失活, 从而抑制菌体的生长, 导致菌体积累量不足, 难以形成紧密的生物膜^[37]。总体来说虽然副地衣芽孢杆菌 HMPM220325 在不同环境中形成的生物膜量不同, 但其在 20–55 °C 的培养温度中均能形成生物膜, 展现出优异的温度适应性, 有助于菌株在不同区域和季节中应用。此外研究显示副地衣芽孢杆菌

HMPM220325 在 50 °C 时, 生物膜形成量最大, 表明其具有耐受高温的能力, 其无疑是热带 PGPR 的优异候选者。

微生物的生长及其生物膜形成行为与环境 pH 息息相关^[38-40]。当 pH 值过低时, 菌体的生长受到抑制; 随着 pH 值的增加, 胞外聚合物的电离程度逐渐升高, 絮凝作用不断增强; 而当 pH 值超过一定范围后, 胞外聚合物的絮凝作用开始下降, 生物膜的形成能力也会随之降低^[41]。在本研究中, 副地衣芽孢杆菌在低 pH 环境下, 生物膜生长受到抑制, 这与前人研究结果相似。刘文竹等在研究 pH 对溶藻弧菌的试验中发现, 在低 pH 环境下溶藻弧菌几乎不形成生物膜, 生物膜形成能力受到显著抑制^[42]; 姜颖等研究也发现, 低 pH 环境会减弱变形链球菌的黏附力, 从而影响其生物膜的形成能力^[43]。当 pH 达到 9.0 时, 生物膜形成量达到最大, 这表明副地衣芽孢杆菌 HMPM220325 可耐受强碱性环境。碱胁迫是影响植物生长的重要因素, 高 pH 环境会强烈抑制植物根系对合成代谢所需离子的吸收, 进而造成营养不足^[44-45], 同时还会严重破坏植物细胞膜的完整性, 降低根系活力和光合性能^[46]。因此, 具有耐强碱效应的副地衣芽孢杆菌 HMPM220325 可改善植物在过碱环境中的生长和抗胁迫能力, 其可作为生物肥料促进盐碱地区作物的生长。

本研究在确定副地衣芽孢杆菌生物膜形成的最佳培养环境的基础上, 进一步探究了不同碳源、氮源以及金属离子等营养物质等对菌株生物膜形成量的影响, 结果显示麦芽糖、尿素和 Mg^{2+} 对副地衣芽孢杆菌生物膜的形成有显著促进作用。其原因是碳源和氮源均会影响细菌的生长速率以及黏附蛋白基因的表达^[47], 碳氮比的改变会影响生物膜胞外聚合物中蛋白质以

及多糖等含量, 从而影响生物膜的形成^[48]。本研究发现副地衣芽孢杆菌 HMPM220325 生物膜生长对碳氮源为麦芽糖和尿素表现更为偏好, 而其他研究中, 例如张国丽等发现植物乳杆菌 SCP53 的最适碳氮源为葡萄糖和乳粉^[37], 徐文生等发现长双歧杆菌 CICC6069 的最适碳氮源为葡萄糖和牛肉膏^[49]。因此, 不同细菌生物膜的生长与其对碳氮源的喜好以及利用率密切相关^[50], 选择合适的碳氮源将有助于 PGPR 更好形成生物膜。同时, 金属二价阳离子也能够提高细菌的黏附能力以及胞外聚合物的产量, 从而促进细菌生物膜的形成^[51]。本研究结果发现添加 Mg^{2+} 可显著提高副地衣芽孢杆菌生物膜形成量, 该结果与前人研究结果类似。尹清干等的研究表明 Mg^{2+} 对鳗弧菌的生物膜成膜量有促进作用^[52], 其原因可能是由于带正电荷的 Mg^{2+} 可以中和细菌细胞表面的负电荷, 使细胞更容易聚合^[53], 并且 Mg^{2+} 还可以结合 EPS 中带负电的官能团, 形成微生物之间连接的桥梁, 从而保持生物膜结构的完整性^[54]。然而当 Mg^{2+} 浓度超过 15.0 mmol/L 时生物膜的形成能力减弱, 这可能是由于在高浓度下, 带正电的 Mg^{2+} 使微生物表面的聚合能力增强, 影响了细菌对营养物质的吸收利用, 从而抑制生物膜的形成^[55]。因此, 金属离子对于生物膜的形成来说存在一个临界点, 通过调节金属离子浓度可以精准调控细菌生物膜生物量。最后, 为进一步优化出副地衣芽孢杆菌生物膜生长的最适培养条件, 结合单因素考察结果, 以麦芽糖、尿素和 Mg^{2+} 为变量进行 3 因素 3 水平正交试验, 以生物膜量为评定指标, 确定最佳培养基组分。

本研究通过正交试验确定副地衣芽孢杆菌生物膜生长的最适培养基为麦芽糖 15.0 g/L、尿素 10.0 g/L、硫酸镁 20.0 mmol/L、磷酸氢二钠

2.5 g/L 以及牛心浸粉 17.5 g/L。对正交优化结果进行验证, 结果显示副地衣芽孢杆菌在优化后的培养基中形成的生物膜量显著高于原培养基, 生物膜产量相较原培养基提高近 58.28%。综上所述, 本研究对副地衣芽孢杆菌在气-液界面形成生物膜的最适培养策略进行了优化, 为将其作为 PGPR 的开发利用提供实验基础。

参考文献

- [1] KLOPPER JW, LEONG J, TEINTZE M, SCHROTH MN. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria[J]. *Nature*, 1980, 286: 885-886.
- [2] MAZUMDAR D, SAHA SP, GHOSH S. Isolation, screening and application of a potent PGPR for enhancing growth of chickpea as affected by nitrogen level[J]. *International Journal of Vegetable Science*, 2020, 26(4): 333-350.
- [3] LIU JL, TANG L, GAO H, ZHANG M, GUO CH. Enhancement of alfalfa yield and quality by plant growth-promoting rhizobacteria under saline-alkali conditions[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2019, 99(1): 281-289.
- [4] 余斐, 苏艳, 李吉跃, 陈晓阳, 何茜. 植物根际促生菌促生理研究[J]. *林业与环境科学*, 2017, 33(2): 107-112.
YU F, SU Y, LI JY, CHEN XY, HE Q. Plant growth-rhizobacteria promoting mechanism research[J]. *Forestry and Environmental Science*, 2017, 33(2): 107-112 (in Chinese).
- [5] 张典利, 孟臻, 亓文哲, 乔康. 植物根际促生菌的研究与应用现状[J]. *世界农药*, 2018, 40(6): 37-43, 50.
ZHANG DL, MENG Z, QI WZ, QIAO K. The research and application status of plant growth promoting rhizobacteria[J]. *World Pesticides*, 2018, 40(6): 37-43, 50 (in Chinese).
- [6] 邱思鑫. 防病、促生植物内生芽孢杆菌的研究[D]. 福州: 福建农林大学博士学位论文, 2004.
QIU SX. Biological control and plant growth promoting endophytic *Bacillus* sp.[D]. Fuzhou: Doctoral Dissertation of Fujian Agriculture and Forestry University, 2004 (in Chinese).
- [7] BURD GI, DIXON DG, GLICK BR. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2000, 46(3): 237-245.
- [8] SHAHZAD R, KHAN AL, BILAL S, WAQAS M, KANG SM, LEE IJ. Inoculation of abscisic acid-producing endophytic bacteria enhances salinity stress tolerance in *Oryza sativa*[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2017, 136: 68-77.
- [9] DIMKPA CO, MERTEN D, SVATOS A, BüCHEL G, KOTHE E. Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*), respectively[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107(5): 1687-1696.
- [10] SILAMBARASAN S, LOGESWARI P, VALENTINE A, CORNEJO P, KANNAN VR. *Pseudomonas citronellolis* strain SLP6 enhances the phytoremediation efficiency of *Helianthus annuus* in copper contaminated soils under salinity stress[J]. *Plant and Soil*, 2020, 457(1): 241-253.
- [11] COMPANT S, REITER B, SESSITSCH A, NOWAK J, CLÉMENT C, AIT BARKA E. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(4): 1685-1693.
- [12] 潘培培. 多黏类芽孢杆菌 P8-1 的生防效果及其根际定殖特性研究[D]. 郑州: 河南农业大学硕士学位论文, 2021.
PAN PP. Biocontrol effect and rhizosphere colonization characteristics of *Paenibacillus polymyxa* P8-1[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [13] WELLER D. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1988, 26: 379-407.
- [14] BENEDUZI A, AMBROSINI A, PASSAGLIA LM. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents[J]. *Genetics and Molecular Biology*, 2012, 35(suppl): 1044-1051.
- [15] DONLAN RM, COSTERTON JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2002, 15(2): 167-193.
- [16] BAIS HP, WEIR TL, PERRY LG, GILROY S, VIVANCO JM. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2006, 57: 233-266.
- [17] HAGGAG WM, TIMMUSK S. Colonization of peanut roots by biofilm-forming *Paenibacillus polymyxa*

- initiates biocontrol against crown rot disease[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 104(4): 961-969.
- [18] DUNLAP CA, KWON SW, ROONEY AP, KIM SJ. *Bacillus paralicheniformis* sp. nov., isolated from fermented soybean paste[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(10): 3487-3492.
- [19] WANG Y, LIU H, LIU K, WANG CQ, MA HL, LI YH, HOU QH, LIU FC, ZHANG TR, WANG HD, WANG BB, MA JJ, GE RF, XU BC, YAO G, XU WF, FAN LC, DING YQ, DU BH. Complete genome sequence of *Bacillus paralicheniformis* MDJK30, a plant growth-promoting rhizobacterium with antifungal activity[J]. *Genome Announcements*, 2017, 5(25): e00577-17.
- [20] VALENZUELA-RUIZ V, ROBLES-MONTOYA RI, PARRA-COTA FI, SANTOYO G, DEL CARMEN OROZCO-MOSQUEDA M, RODRÍGUEZ-RAMÍREZ R, DE LOS SANTOS-VILLALOBOS S. Draft genome sequence of *Bacillus paralicheniformis* TRQ65, a biological control agent and plant growth-promoting bacterium isolated from wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) rhizosphere in the Yaqui Valley, Mexico[J]. *3 Biotech*, 2019, 9: 436.
- [21] ANNAPURNA K, GOVINDASAMY V, SHARMA M, GHOSH A, CHIKARA SK. Whole genome shotgun sequence of *Bacillus paralicheniformis* strain KMS 80, a rhizobacterial endophyte isolated from rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *3 Biotech*, 2018, 8: 223.
- [22] LIANG X, DAI NN, YANG F, ZHU HM, ZHANG GH, WANG YZ. Molecular identification and safety assessment of the potential probiotic strain *Bacillus paralicheniformis* HMPM220325 isolated from artisanal fruit dairy products[J]. *Food & Function*, 2024, 15(2): 747-765.
- [23] PEETERS E, NELIS HJ, COENYE T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2008, 72(2): 157-165.
- [24] 范素素. 解淀粉芽孢杆菌 PEBA20 生物膜表型特征及其与抑菌活性的关系[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2011.
- FAN SS. Biofilm Phenotype of *Bacillus amyloliquefaciens* PEBA20 and its correlation with antimicrobe activity[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2011 (in Chinese).
- [25] 李平兰, 贺稚非. 食品微生物学实验原理与技术[M]. 2版. 北京: 中国农业出版社, 2011.
- LI PL, HE ZF. Principle and Technology of Food Microbiology Experiment[M]. 2nd edition. Beijing: China Agriculture Press, 2011 (in Chinese).
- [26] 赵子舒, 李吉年, 郭谦, 叶翔宇, 胡梦欣. 副干酪乳杆菌在多巴胺改性聚丙烯纤维膜上形成生物膜及其发酵性能[J]. *食品科学*, 2017, 38(14): 71-77.
- ZHAO ZS, LI JN, GUO Q, YE XY, HU MX. Surface modification of polypropylene fiber membranes with dopamine to enhance the formation of *Lactobacillus paracasei* biofilms and its fermentation performance for lactic acid production[J]. *Food Science*, 2017, 38(14): 71-77 (in Chinese).
- [27] NAGÓRSKA K, BIKOWSKI M, OBUCHOWSKI M. Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent[J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2007, 54(3): 495-508
- [28] 杨少波, 刘训理. 多黏类芽孢杆菌及其产生的生物活性物质研究进展[J]. *微生物学通报*, 2008, 35(10): 1621-1625.
- YANG SB, LIU XL. Research advances in *Paenibacillus polymyxa* and their bioactive substances[J]. *Microbiology China*, 2008, 35(10): 1621-1625 (in Chinese).
- [29] 闫洪雪, 刘露, 李丽, 张鹏鹏, 梁文辉, 赵宏涛. PGPR 的研究进展及其在农业上的应用[J]. *黑龙江农业科学*, 2016(6): 148-151.
- YAN HX, LIU L, LI L, ZHANG PP, LIANG WH, ZHAO HT. Research progress on agriculture of plant growth promoting rhizobacteria[J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2016(6): 148-151 (in Chinese).
- [30] 周益帆, 白寅霜, 岳童, 李庆伟, 黄艳娜, 蒋玮, 何川, 王金斌. 植物根际促生菌促生特性研究进展[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(2): 644-666.
- ZHOU YF, BAI YS, YUE T, LI QW, HUANG YN, JIANG W, HE C, WANG JB. Research progress on the growth-promoting characteristics of plant growth-promoting rhizobacteria[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(2): 644-666 (in Chinese).
- [31] 曹景勤. 影响三叶草根瘤菌生存条件的研究和分析[J]. *微生物学通报*, 1994, 21(4): 199-201.
- CAO JQ. The Effect of soil factors on the survival of *Rhizobium Trifoli*[J]. *Microbiology China*, 1994, 21(4): 199-201 (in Chinese).
- [32] 姚槐应, 黄昌勇. 土壤微生物生态学及其实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2006.
- YAO HY, HUANG CY. Soil Microbial Ecology and

- Its Experimental Technology[M]. Beijing: Science Press, 2006 (in Chinese).
- [33] ALTAF M, AHMAD I. *In vitro* and *in vivo* biofilm formation by *Azotobacter* isolates and its relevance to rhizosphere colonization[J]. *Rhizosphere*, 2017, 3: 138-142.
- [34] 龙冬艳, 胡少平, 陈新才, 刘磊, 陈英旭. 滞留菌及其对微生物膜的耐受性影响研究进展[J]. *应用生态学报*, 2010, 21(10): 2707-2714.
LONG DY, HU SP, CHEN XC, LIU L, CHEN YX. Persisters and their effects on microbial biofilm tolerance: a review[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010, 21(10): 2707-2714 (in Chinese).
- [35] GARRETT TR, BHAKOO M, ZHANG ZB. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces[J]. *Progress in Natural Science*, 2008, 18(9): 1049-1056.
- [36] 彭晓云, 黄晓敏, 郑秋桦, 李海妙. 不同培养条件对金黄色葡萄球菌生物膜生长影响实验研究[J]. *陕西医学杂志*, 2009, 38(7): 780-782.
PENG XY, HUANG XM, ZHENG QH, LI HM. Experimental research of membrane growth of *staphylococcus aureus* under different culture conditions[J]. *Shaanxi Medical Journal*, 2009, 38(7): 780-782 (in Chinese).
- [37] 张国丽, 彭瑶, 魏露, 余茜, 敖晓琳, 刘书亮, 赵珂. 植物乳杆菌 SCP53 生物膜的形成条件[J]. *食品与发酵工业*, 2017, 43(4): 7-14.
ZHANG GL, PENG Y, WEI L, YU X, AO XL, LIU SL, ZHAO K. Study on biofilm formation conditions of *Lactobacillus plantarum* SCP53[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2017, 43(4): 7-14 (in Chinese).
- [38] DERVAUX J, MAGNIEZ JC, LIBCHABER A. On growth and form of *Bacillus subtilis* biofilms[J]. *Interface Focus*, 2014, 4(6): 20130051.
- [39] NOSTRO A, CELLINI L, Di GIULIO M, D'ARRIGO M, MARINO A, BLANCO AR, FAVALORO A, CUTRONEO G, BISIGNANO G. Effect of alkaline pH on staphylococcal biofilm formation[J]. *Journal of Pathology, Microbiology and Immunology*, 2012, 120(9): 733-742.
- [40] BORGES S, SILVA J, TEIXEIRA P. Survival and biofilm formation by Group B streptococci in simulated vaginal fluid at different pHs[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2012, 101(3): 677-682.
- [41] PAVONI JL, TENNEY MW, ECHELBERGER WF. Bacterial exocellular polymers and biological flocculation[J]. *Journal Water Pollution Control Federation*, 1972, 44(3): 414-29.
- [42] 刘文竹, 李红月, 范学亭, 周永灿, 王世峰, 谢珍玉. 环境因素对溶藻弧菌 HN08155 生物膜形成的影响[J]. *海南大学学报(自然科学版)*, 2015, 33(4): 365-371.
LIU WZ, LI HY, FAN XT, ZHOU YC, WANG SF, XIE ZY. Effects of Several Environmental Factors on the Biofilm Formation of *Vibrio alginolyticus* HN08155[J]. *Natural Science Journal of Hainan University*, 2015, 33(4): 365-371 (in Chinese).
- [43] 姜颖, 张铁柱, 杨锦波, 刘天佳, 陈坤. 酸性环境对变形链球菌黏附力的影响[J]. *广东牙病防治*, 2008, 16(9): 398-399.
JIANG Y, ZHANG TZ, YANG JB, LIU TJ, CHEN K. Study on the effect of acidic environment on the initial adherence of *Streptococcus mutans*[J]. *Journal of Dental Prevention and Treatment*, 2008, 16(9): 398-399 (in Chinese).
- [44] GUO HJ, HUANG ZJ, LI MQ, HOU ZN. Growth, ionic homeostasis, and physiological responses of cotton under different salt and alkali stresses[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 21844.
- [45] ZHANG BL, CHEN XG, LU XK, SHU N, WANG XG, YANG XM, WANG S, WANG JJ, GUO LX, WANG DL, YE WW. Transcriptome analysis of *Gossypium hirsutum* L. reveals different mechanisms among NaCl, NaOH and Na₂CO₃ stress tolerance[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 13527.
- [46] ZHANG H, LIU XL, ZHANG RX, YUAN HY, WANG MM, YANG HY, MA HY, LIU D, JIANG CJ, LIANG ZW. Root damage under alkaline stress is associated with reactive oxygen species accumulation in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1580.
- [47] JIN Y, SAMARANAYAKE LP, SAMARANAYAKE Y, YIP HK. Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars[J]. *Archives of Oral Biology*, 2004, 49(10): 789-798.
- [48] 张燕. 碳氮比及 Ca²⁺对生物膜及其胞外多聚物组成的研究[D]. 昆明: 昆明理工大学硕士学位论文, 2014.
ZHANG Y. Effect of C/N ratio and Ca²⁺ on biofilm and component of extracellular polymeric substances[D]. Kunming: Master's Thesis of Kunming University of Science and Technology, 2014 (in Chinese).
- [49] 徐文生, 张艳艳, 黄漫青, 艾启俊, 王晓东, 张磊, 仝其根. 环境因素对长双歧杆菌 CICC6069 生物膜生成的影响[J]. *中国食品学报*, 2012, 12(4): 36-42.
XU WS, ZHANG YY, HUANG MQ, AI QJ, WANG

- XD, ZHANG L, TONG QG. Impact of environmental factors on biofilm formation by *Bifidobacterium longium* CICC6069[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2012, 12(4): 36-42 (in Chinese).
- [50] 张国丽. 植物乳杆菌 SCP53 生物膜形成条件及其耐受性研究[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2017.
- ZHANG GL. The study of formation conditions and tolerance of *Lactobacillus plantarum* SCP53 biofilm[D]. Ya'an: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [51] CHEN FR, LIU PC, LEE KK. Purification and partial characterization of a toxic serine protease produced by pathogenic *Vibrio alginolyticus*[J]. *Microbios*, 1999, 98(390): 95-111.
- [52] 尹清干, 程俊茗, 刘腾飞, 董龙香, 苏惠冰, 胡鲲, 杨先乐. 环境因子对鳃弧菌生物膜形成的影响[J]. *微生物学通报*, 2018, 45(1): 138-145.
- YIN QG, CHENG JM, LIU TF, DONG LX, SU HB, HU K, YANG XL. Characteristics of biofilm formation of pathogenic *Vibrio anguillarum*[J]. *Microbiology China*, 2018, 45(1): 138-145 (in Chinese).
- [53] 刘倩倩, 李小明, 杨麒, 曾光明, 胡劲梅, 贾斌, 刘医琳, 朱小峰. Mg²⁺对 SBR 中好氧颗粒污泥培养的影响研究[J]. *中国给水排水*, 2008, 24(17): 31-35.
- LIU QQ, LI XM, YANG Q, ZENG GM, HU JM, JIA B, LIU YL, ZHU XF. Effect of Mg²⁺ on cultivation of aerobic granular sludge in SBR[J]. *China Water & Wastewater*, 2008, 24(17): 31-35 (in Chinese).
- [54] MAYER C, MORITZ R, KIRSCHNER C, BORCHARD W, MAIBAUM R, WINGENDER J, FLEMMING HC. The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1999, 26(1): 3-16.
- [55] 赵佳伟. 植物乳杆菌 RS66CD 生物膜形成条件优化及形成前后差异基因分析[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2020.
- ZHAO JW. Optimization of *Lactobacillus plantarum* RS66CD biofilm formation conditions and comparative transcriptomic analysis[D]. Ya'an: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2020 (in Chinese).