

中華民國第 62 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 農業與食品學科

佳作

052201

絹雲母促進生物膜發育應用於提升土壤介質保肥能力之研究

學校名稱：國立臺東高級中學

作者： 高二 葉柏亨 高二 柯竣翔 高二 黃哲溪	指導老師： 黃千姿 黃韋嘉
-----------------------------------	---------------------

關鍵詞：絹雲母、生物膜、保肥

摘要

本研究旨在確認加入絹雲母培養的菌液是否可提升生物膜產量，進一步提升保肥能力並幫助作物生長。研究結果顯示，菌液中加入絹雲母確實可以提升生物膜產量及部分菌株的菌液黏度，且這可能和絹雲母具有恆定 pH 值的功能有關。而在模擬土壤實驗中，菌液加入絹雲母後有較高的多醣含量，並且進一步提升保肥能力，且分別可減少 31%的鉀肥以及 17%的磷肥流失量。最後將絹雲母菌液做為保肥製劑應用於尖葉 A 菜 (*Lactuca sativa*) 的種植，實驗結果顯示：加入絹雲母的菌液與未加入絹雲母的菌液組別相比，提升了 30%的收成量。本研究結果顯示，絹雲母菌液可實際應用作為保肥製劑，透過恆定菌液 pH 值，促進生物膜發育，提供土壤穩定的高多醣含量，進而提高肥料之利用率而幫助作物生長。

壹、前言

1960 年代，農業世界掀起了第三次革命，即所謂的綠色革命。(亞曼達·利特，民 110) 在綠色革命後，全球農業對於化肥的需求量逐漸增加，僅以氮肥為例，每年全球耗費的能源中就有 1-2%被用於製造氮肥(江佩津，民 107)。並且，化肥大量使用導致許多全球性的環境問題，例如土壤鹽化、土壤退化(鄭傑憶，民 108)以及環境優養化。

歸根結底，這些問題的源頭都來自於低效且不當的化肥使用。以土壤鹽化和酸化而言，主要原因是化肥被植物吸收前就已和其他離子結合成鹽類，而無機鹽無法被植物吸收，日積月累就導致了土壤鹽化的問題(潘子祁，民 105)。而環境優養化則和低效的化肥使用有關：硝酸鹽(NO_3^-)本身帶負電，難以被土壤團粒吸附，導致其容易被淋洗流失到環境水域中，造成優養化問題(許博凱，民 96)。

根據統計，大約 40 - 70% 的氮，80 - 90%的磷以及 50 - 70%的鉀在被植物吸收之前就已經由淋洗流失或揮發(Rabat, Hashim, & Majid, 2016)，如此低效的化肥使用是急需解決的重大困境。

其中一種解決困境的方式是利用黏土礦減少肥料流失。黏土礦具有高陽離子交換力(Cation Exchange Capacity, CEC)的特性，這使黏土礦可以吸附土壤中陽離子，避免肥分流失並供給植物吸收(Basak, Pal, & Datta, 2012)。

而另一種解決方法是使用生物膜(Biofilm)和胞外聚合物(Extracellular polymeric

substance, EPS) 保肥。微生物會經由自身產生之 EPS 附著於液體或是惰性物質表面，這樣的結構群落稱為生物膜 (Biofilm) (Ma, Peng, & Walker, 2017)。它們可以幫助土壤以及植物抵抗鹽分、水分、酸鹼或是溫度逆境，並且有助於土壤團粒 (aggregation) 形成，改善土壤性質 (Costa, Raaijmakers, & Kuramae, 2018)。

生物膜內部帶有大量羧基及羥基，可吸附陽離子 (Costa et al., 2018)。事實上其本身是一個十分複雜的系統，有各式各樣的吸附機制，包括對陽離子以及陰離子的交換，不僅止於羧基以及羥基對陽離子的吸附 (Flemming et al., 2016)，這樣的特性可以減少肥份流失 (Hettiarachchi et al., 2014)。

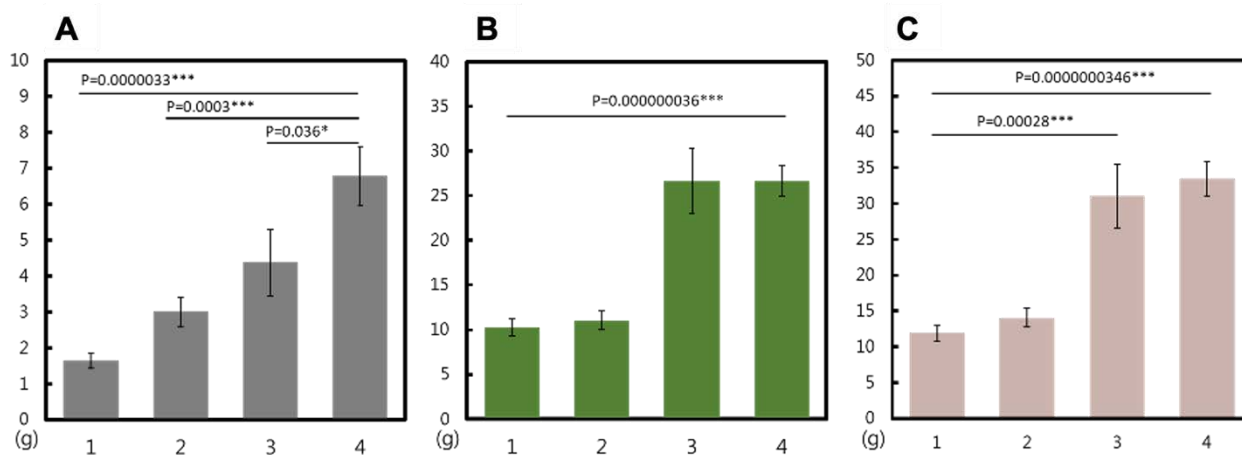
前人文獻單獨使用生物膜或是黏土礦都可以達到保肥效果，那兩者結合是否能得到更好的效果?這是一個值得研究的主題。關於礦物促進細菌生長的文獻中，多使用粒徑較小的礦物進行實驗，且較少人使用生物膜這項指標對細菌生長進行量化，多以細菌數量作為量化標準。少數使用生物膜作為量化指標的其中一篇文獻指出小粒徑 (<2 μm) 的黏土礦，如針鐵礦等，可促進生物膜分泌 (Ma et al., 2017)。也有文獻提及大粒徑的澎潤土 (smectite) 可以提供細菌附著，幫助生物膜成形，但是卻未對生物膜的生產量進行量化 (Han et al., 2021)。小粒徑黏土礦也可以和生物膜形成複合體 (Lünsdorf, Erb, Abraham, & Timmis, 2000)。雖然 Vieira 等人曾以粒徑約 18 μm 的高嶺石顆粒進行實驗，發現其可促進生物膜生成，然而其生物膜只生成在有液體流動的管壁上，並未討論一般狀態的培養或在土壤中是否也有這樣的結果 (Vieira & Melo, 1995)。

為何黏土類礦物可以促進細菌生長?其中一種常見的理論認為黏土礦可以平衡菌液的 pH 值，因為黏土礦具有高 CEC 的特性，可以幫助吸附菌液中過多的質子 (H^+)，達到避免菌液過酸的效果 (Vieira & Melo, 1995)。

有鑑於以上原因，大粒徑卻同樣具有黏土高陽離子交換力性質的粉粒 (silt) 是否可以促進生物膜發育就成為一個重要且有趣的問題。我們想要以粒徑較大 (平均粒徑 13 μm ，最大粒徑 45 μm) 的台東特產礦物--絹雲母 (Sericiticite, 化學式為 $\text{KAl}_2(\text{Si},\text{Al})_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$) 作為材料 (陳家齊、方建能、陳惠芬、林怡君，民 103)，研究其是否也可以提升生物膜產量。

在過去未發表的實驗中，我們發現絹雲母可以顯著促進蘿蔓的根系發展以及鮮重。若與

複合益菌（植殖旺，內含可分泌生物膜的枯草桿菌 *Bacillus subtilis*）混合添加能夠更好地促進根系發展（圖一，第 1 組處理是種植十二盆蘿蔓，使用 2000 g 的土進行種植。第 2 組處理是十二盆蘿蔓，並在每盆加入 0.3 g 的複合益菌。第 3 組處理則是在每一盆土中加入 100 g 的矽力康絹雲母粉。第 4 組處理則是在每一盆土壤中同時加入 100 g 矽力康絹雲母粉和 0.3 g 殖殖旺複合益菌。）



圖一、圖片說明 (A)：第 1 組到第 4 組各組平均地下部鮮重 (n=12, 公克 ± SEM)。第 4 組分別和第 1 組以及第 2 組達到顯著差異 ($p < 0.05$)。第 4 組和第 3 組達到顯著差異 ($p < 0.05$)。(B)：第 1 組到第 4 組各組平均地上部鮮重 (n=12, 公克 ± SEM)。第 4 組和第 1 組達到顯著差異 ($p < 0.05$)。(C)：第 1 組到第 4 組各組平均全株鮮重 (n=12, 公克 ± SEM)。第 3、4 組分別和第一組達到顯著差異 ($p < 0.05$)。

在本研究中，我們推測一種新的保肥機制假說：絹雲母可以協助恆定菌液 pH 值，促進細菌產生生物膜，並且提升整體菌液黏度，最終在固態介質中提升保肥力。

實驗假設：

1. 絹雲母可以協助穩定菌液 pH 值。
2. 絹雲母可以促進細菌分泌生物膜。
3. 絹雲母可以提升細菌菌液的黏度。
4. 加入絹雲母培養之菌液可以：
 - (1) 使介質多醣含量比對照組高。
 - (2) 提升介質保肥能力。
 - (3) 提升作物產量。

貳、 研究設備及器材

一、 實驗設備

表一、 實驗設備

1. 無菌操作台(laminar flow) (淳美科技有限公司, 3VF)	2. 震盪培養箱 (台灣海博特股份有限公司, 721SR)	3. 高溫高壓滅菌釜 (東明儀器有限公司, TM-327)	4. DV數位式旋轉黏度計 (Chromtech, DV Serial)
5. 分光光度計 (星宇儀器有限公司)	6. 離心機 (德彥醫技儀器股份有限公司, DSC-200T)	7. Biolog MicroLog (MicroStation)	8. 恆溫震盪水槽 (裕德科技有限公司, BT-150D)
9. 電磁加熱攪拌器 (見誠科技有限公司, JS-H)	10. pH計 (德記儀器有限公司, 5011)	11. 感應耦合電漿-原子放射光譜儀(inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy, ICP-AES)	12. Motic 雙眼複式顯微鏡

二、 實驗用品

表二、 實驗用品

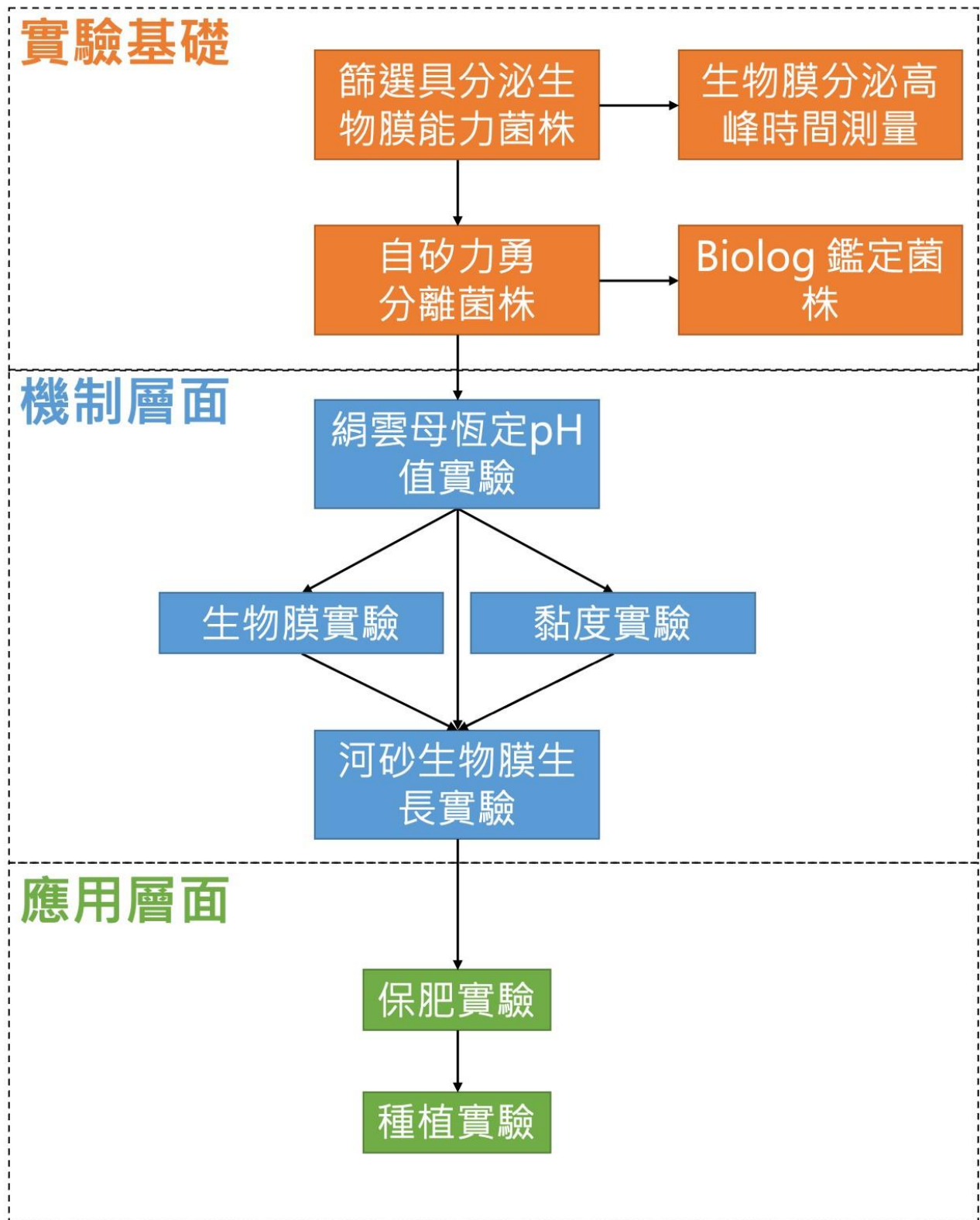
1. 胰蛋白酶大豆瓊脂 (Tryptic Soy Agar, TSA) (Becton, Dickinson and Company)	2. 胰蛋白酶大豆培養液 (Tryptic Soy Broth, TSB) (Becton, Dickinson and Company)	3. 即融化肥(5-0-40)以及 (18-18-18) (翠筠有限公司)	4. 磷酸二氫鈉 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (島久藥品株式會社)
5. 磷酸鈉($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) (景明化工股份有限公司)	6. 98.7%硫酸(H_2SO_4) (景明化工股份有限公司)	7. 氫氧化鈣($\text{Ca}(\text{OH})_2$) (和光純藥工業株式會社)	8. 99.96%苯酚(phenol) (景明化工股份有限公司)
9. 氯化鈉(NaCl) (NS日本試藥)	10. 氯化鉀(KCl) (島久藥品株式會社)	11. 氯化氫(HCl) (景明化工股份有限公司)	12. 氯化鈣(CaCl) (景明化工股份有限公司)
13. 絹雲母粉：矽力勇 (向陽礦業股份有限公司, 植保製字第00436號)	14. 結晶紫(crystal violet) (LOBA Feinchemie GmbH)	15. 培養土 (名荒農場)	16. 河砂
17. 95%酒精 (景明化工股份有限公司)	18. RO水		

三、 實驗器材

表三、 實驗器材

1. 血球計數器	2. 血清瓶	3. 移液器(pipette)和吸管尖 (tips)	4. 9公分培養皿
5. 試管和試管架	6. 石臘膜(parafilm)	7. 塗盤用玻璃珠	8. 移植環
9. 96孔盤	10. 15ml離心管	11. 三吋盆	12. 水管
13. 鋁箔紙	14. 微孔盤		

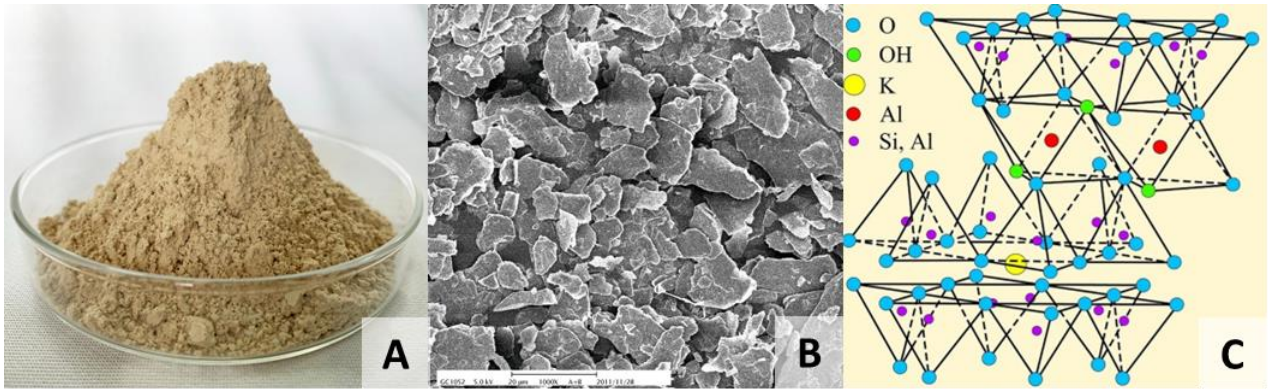
參、研究過程與方法



圖二、實驗架構圖

一、礦物

實驗使用採集自台東向陽山區的絹雲母矽力勇礦石粉（圖三），平均粒徑 $13\mu\text{m}$ ，最大粒徑 $45\mu\text{m}$ 。



圖三、(A) 矽力勇絹雲母礦粉實體照。(B) 矽力勇絹雲母礦粉掃描式電子顯微鏡照。
(C) 矽力勇絹雲母礦粉化學結構圖。(圖片皆為向陽礦業提供)

二、前置實驗—菌株篩選

(一) 自絹雲母分離菌株

絹雲母上本身具有一些菌株，這些菌株長期附著在絹雲母上，可能和絹雲母具有交互作用。因此我們以未滅菌的絹雲母和無菌水混合，並以玻璃珠塗盤法塗於 TSA 上，經培養後分離出菌落型態不同的菌株，並以四區畫線法純化，記錄菌落特徵（表四）。

(二) 菌種鑑定

使用 Biolog MicroLog 以代謝形態特徵鑑定所分離出之菌株（表六）。

(三) 篩選生物膜分泌較佳菌株

參考前人文獻測量生物膜方式—結晶紫法（楊秋忠，民 100），對八株不同菌株形成生物膜的能力進行量化。結晶紫會吸附到生物膜中，若生物膜越多則可吸附越多結晶紫，吸光度越高。

做此實驗前需先確定結晶紫濃度和吸光度（ 590nm ）之間呈現線性相關，結果如（圖五 A）所示。

（四）確定菌株的生長高峰時間

以結晶紫法測量生物膜分泌能力較佳的菌株：C1、C2、C7、C8 分別在 12、24、36、48 小時的生物膜分泌量，找出生物膜分泌量之高峰時間。結果如（圖五）所示，36 小時為生物膜分泌高峰，因此後續實驗皆以此為培養時間為基準。

三、細菌培養方法

欲使用之菌株接種到 10 mL TSB 中，30°C 恆溫震盪培養 24 小時，作為初始菌液。取 400 μ L 初始菌液和 34 mL 之 TSB 和 6 mL 的無菌水（未加絹雲母的組別）或是 6 mL 的 1%（W/V）滅菌絹雲母懸浮液（加絹雲母的組別，也就是 S（sericite）組）混合，30°C 恆溫培養 36 小時。

四、生物膜量化方法

以「細菌培養方法」配置菌液，並將其培養於 100 mL 之燒杯中，燒杯開口以鋁箔紙和石臘膜密封。為了讓生物膜可以順利成形，僅恆溫培養 36 小時但不震盪。36 小時過後，以小湯匙將浮在上層之生物膜撈出，秤其重量並比較加入絹雲母與否之差異。

五、黏度量化方法

以「細菌培養方法」配置菌液，並將其培養於 150 mL 之錐形瓶中，錐形瓶開口以鋁箔紙和石臘膜密封，以 200 rpm 轉速進行 36 小時恆溫震盪培養。36 小時過後，取出菌液至 50 mL 燒杯中，以旋轉式黏度計測其黏度，比較加入絹雲母與否之差異。

六、絹雲母濃度對生物膜和 pH 值影響實驗方法

由於實驗量能有限，自此實驗開始到最後的實驗皆以生物膜分泌效果最好的菌株 C8（圖五 A）作為實驗菌株。

實驗做法同「生物膜量化方法」，唯一不同之處是加入的絹雲母懸浮液濃度。這個實驗所加入的絹雲母懸浮液共有 10 種不同濃度，分別是：20.000%、10.000%、5.000%、2.500%、1.250%、0.625%、0.313%、0.156%、0.078%、0.039%，每個濃度執行三重複。另外，撈取完生物膜後會以 pH 計測量殘存菌液之 pH 值，並換算成 H^+ 濃度。

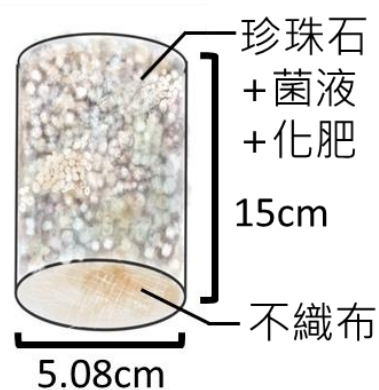
七、模擬土壤實驗方法

為了確認加入絹雲母培養的菌液是否可以提升土壤介質的多醣含量，我們參考了 Redmile-Gordon 等人在 2014 年發表的論文 (Redmile-Gordon, Brookes, Evershed, Goulding, & Hirsch, 2014)，其比較數種衡量土壤中胞外聚合物的方法，並認為最適合的方法應該是透過陽離子交換樹脂法 (Cation Exchange Resin, CER) 量化土壤中的多醣。因此，我們以 40 g 的滅菌河砂加上 5 g 的 TSB 混合模擬土壤情形，並分別加入 5g 的絹雲母培養菌液或是無絹雲母培養菌液，將上述材料混合均勻於 150 mL 燒杯中，以鋁箔紙和石臘膜封口並 30°C 恆溫培養一個禮拜，期間每天取 0.8 g 河砂利用 CER 法及苯酚硫酸法測其吸光度 (490 nm)，也就是其多醣含量，並比較加入絹雲母與否之差異。

實驗前先繪製兩條檢量線，一條是葡萄糖做苯酚硫酸法的檢量線 (圖九 A)，另一條則是在河砂中混入不同比例的菌液 (圖九 B)，測量其最終吸光度，以確定此方法可行性。

八、保肥實驗方法

此實驗主要目的是確認加入絹雲母促進生物膜發育是否可以提升保肥能力，同樣以「細菌培養方法」培養菌液，並取 30 mL 菌液和 1 g 化肥 (18-18-18) 混合均勻，吸附於 15 g 珍珠石中。



圖四、保肥實驗裝置圖

實驗裝置如（圖四）所示，透過使菌液和化肥吸附於珍珠石中，在澆灌菌液-化肥混合液後 12 小時後將淋洗出之液體送到台東農改場利用感應耦合電漿-原子放射光譜儀（Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy, ICP-AES）測量磷、鉀含量。

最後計算肥份流失率，公式如下：

$$\text{肥份流失率} = \frac{(\text{淋洗出的水量} \times \text{肥份離子濃度})}{\text{初始添加肥份重量}}$$

九、種植實驗

三月份進行為期三個禮拜的尖葉 A 菜 (*Lactuca sativa*) 種植實驗。種植實驗共分成兩組，分別以加入絹雲母培養的菌液或是未加入絹雲母培養的菌液澆灌，菌液製作方法同「細菌培養方法」。而菌液的施用方式為一個禮拜澆灌一次，每次將菌液以自來水稀釋 30 倍，並每盆澆灌 100 mL。三個禮拜後，收成尖葉 A 菜主要的經濟部分，也就是其葉片，測其濕重，並比較加入絹雲母和未加入絹雲母的組別是否具有顯著差異。

十、統計方法

本實驗所有處理的樣本數都小於 10 ($n < 12$)，如此小的樣本數易受極值影響，部分樣本也未符合常態分布。故統計方法除了以 t-test 進行檢定外，亦輔以較為穩健 (Robust) 的無母數統計方法 Mann-Whitney U test 進行檢定。

肆、研究結果

一、前置實驗

(一) 絹雲母細菌分離實驗

共分離出八株菌株，各菌株特徵如（表四）所示。

表四、從絹雲母上分離的菌株特徵。

代號	顏色	表面	邊緣	黏液	大小	生長速度	其他
C1	乳白	光滑	規則	黏稠	大	快	
C2	乳白	凹凸不平	不規則	黏稠	大	快	
C8	乳白	光滑	不規則	黏稠	大	快	
C3	乳白	光滑	不規則	黏稠	大	快	swarming growth
C4	皮膚色	光滑	規則	較少	小	慢	
C5	黃色	光滑	規則	較少	小	慢	
C6	乳白色	光滑	規則	較少	小	慢	
C7	乳白色			乾燥	小		菌落型態較特殊

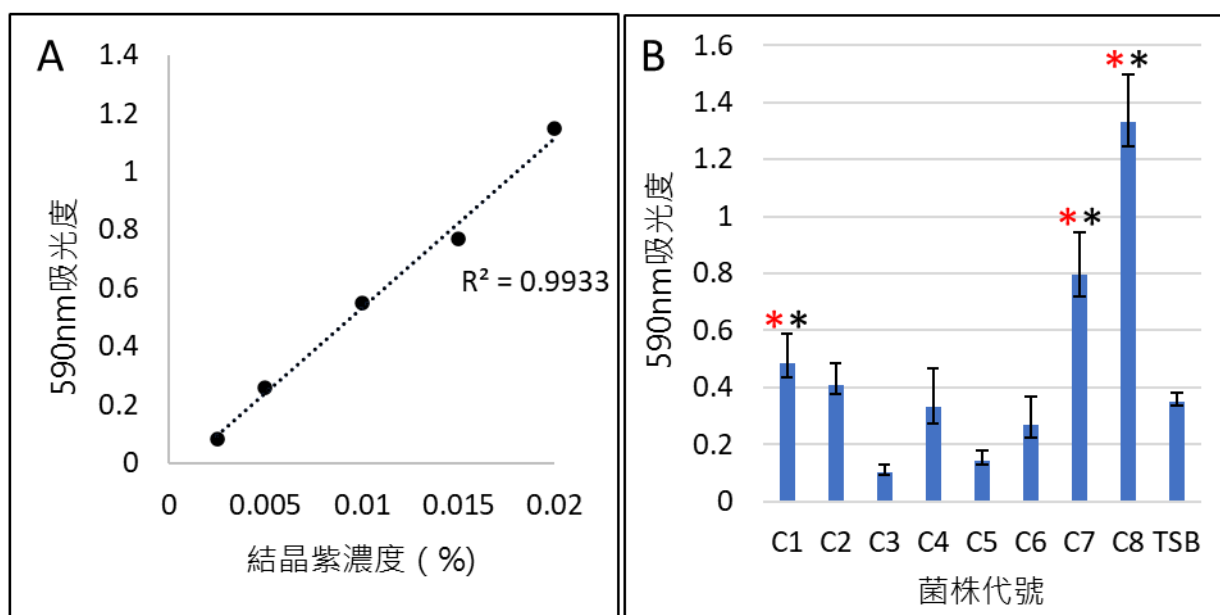
MicroLog 菌種鑑定的結果如（表五）所示。可確定實驗所使用的菌株皆屬於芽孢桿菌（*Bacillus*），但由於 MicroLog 僅透過代謝特徵鑑定菌株，僅能鑑定至屬的分類位階，因此在種小名的部分無法完全確定。

表五、菌株鑑定結果

菌株代號	C1	C2	C3	C4
屬名(generic name)	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>
種小名(specific epithet)	<i>mojavensis/ subtilis/ atrophaeus/ amyloliquefaciens</i>	<i>mojavensis/ subtilis</i>	<i>amyloliquefaciens/ atrophaeus</i>	<i>vietnamensis</i>
菌株代號	C5	C6	C7	C8
屬名(generic name)	<i>unknown</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>
種小名(specific epithet)	<i>unknown</i>	<i>gibsonii/ murimartini</i>	<i>licheniformis</i>	<i>mojavensis/ subtilis</i>

(二) 菌株生物膜能力測試

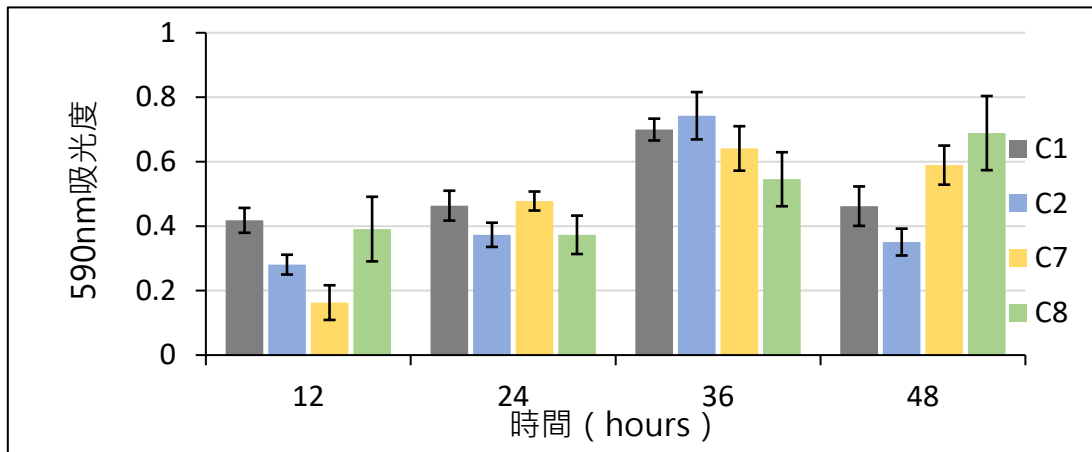
我們透過結晶紫法發現，C1、C7、C8 菌株的吸光度顯著高於 TSB 對照組。(t-test 檢定結果：C1: $p=0.013$ ，C7: $p=0.00016$ ，C8: $p=0.0000019$ 。皆為單尾。Mann-Whitney U test 檢定結果：C1: $p=0.0379$ ，C7: $p=0.007152939$ ，C8: $p=0.007152939$ 。皆為單尾)。另外，C2 菌株以 t-test 進行檢定 $p=0.073$ (單尾)，接近顯著差異水準，因此予以保留。最終，C1、C2、C7、C8 被選入進行下一步實驗 (圖五)。



圖五、(A) 結晶紫濃度與吸光度檢量線。(B) 八株菌株生物膜所吸收的結晶紫在 590nm 處吸光度 (Mean \pm SE, $n=5$)。(*表示以 t-test 檢定實驗組顯著高於對照組 ($p<0.05$, 單尾))。*表示以 Mann-Whitney U test 檢定實驗組顯著高於對照組 ($p<0.05$, 單尾))。

(三) 生物膜分泌量高峰時間實驗

C1、C2、C7、C8 菌株以 t-test 檢定在 36 小時的吸光度顯著高於 24 小時；除此之外 48 小時的吸光度無論以何種檢定方法皆未顯著高於 36 小時。由此可知，這四株菌株在 36 小時全都已達到生物膜分泌高峰，因此將爾後實驗的菌液培養時間訂在 36 小時（圖六）。



圖六、C1，C2，C7，C8 四株菌株培養在 12、24、36、48 小時時，以結晶紫法測量在 590nm 處的吸光度 (Mean \pm SE, n=8)。

二、絹雲母促進生物膜發育和提升菌液黏度

(一) 絹雲母提升生物膜重量實驗

C1, C2, C3, C8 菌株加入絹雲母組 (以 S 表示), 例如 C1 菌株加入絹雲母就是 C1S。生物膜濕重分別是個別純菌株的 3.1 倍, 1.9 倍, 1.3 倍, 2 倍。所有組別的生物膜濕重, 不論使用何種檢定方式進行檢定均顯示出: 加入絹雲母後的組別顯著高於個別純菌株組 (t-test 檢定結果: C1: $p=5.3*10^{-8}$, C2: $p=2.75*10^{-8}$, C7: $p=0.0008$, C8: $p=0.0005$ 。皆為單尾。Mann-Whitney U Test 檢定結果: C1: $p=0.004325771$, C2: $p=0.004325771$, C7: $p=0.033040958$, C8: $p=0.007857175$ 。皆為單尾) (圖七 A)。另外, TSB 組 (B) 和添加滅菌絹雲母之 TSB 組別 (BS) 皆無生物膜生成。

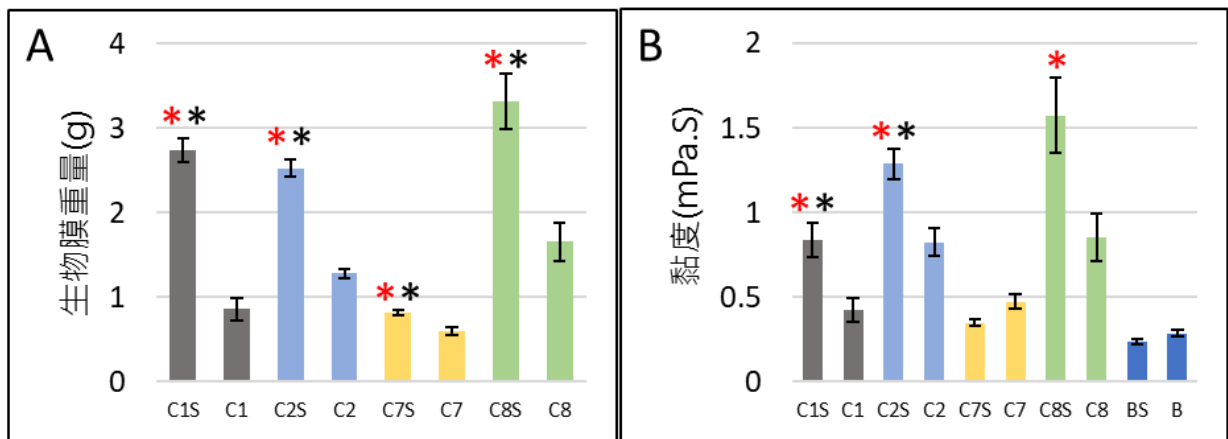
除此之外, 比較加入絹雲母與否的生物膜形態, 發現加入絹雲母者有較明顯的皺褶 (wrinkle) (圖八), 此結果也支持加入絹雲母確實可以促進生物膜的發育, 因為皺褶是生物膜成熟的特徵 (Ma, W. et al., 2017)。

(二) 絹雲母提升菌液黏度實驗

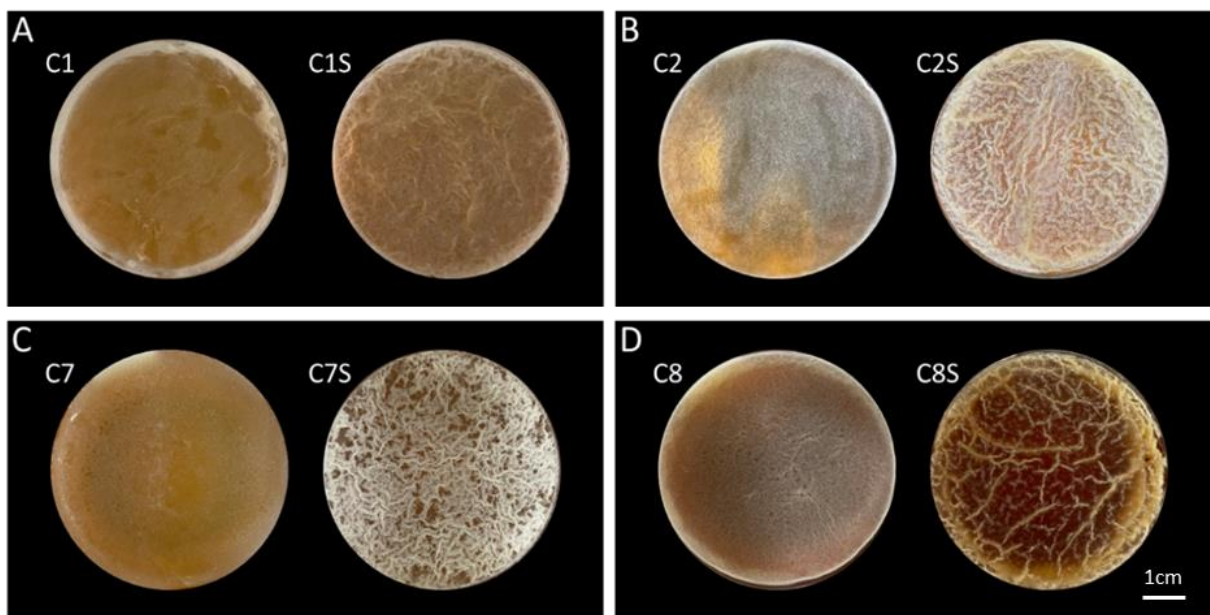
我們的實驗結果顯示: 以 t-test 進行檢定, C1、C2 和 C8 菌株添加絹雲母菌液黏度都顯著高於未添加絹雲母組別, 分別是 1.9、1.5 和 1.85 倍。然而, C7 菌株卻表現出相反的趨勢, 未加入絹雲母的組別黏度顯著高於加入絹雲母的組別。(C1: $p=0.0028$, C2: $p=0.001$, C7: $p=0.012$, C8: $p=0.0077$ 。皆為單尾) (圖七 B)。

若以 Mann-Whitney U Test 進行檢定, C1、C2 菌株添加絹雲母菌液黏度顯著高於未添加絹雲母組別, C7、C8 菌株則沒有表現出這樣的趨勢 (C1: $p=0.01784595$, C2: $p=0.033040958$, C7: $p=0.103789221$, C8: $p=0.078126979$ 。皆為單尾) (圖七 B)。

加入絹雲母後的純 TSB (B) 和未加入絹雲母的純 TSB (BS) 黏度不論以何種方式進行檢定皆不具顯著差異, 此結果支持絹雲母本身的物理性質對純 TSB 的黏度沒有影響 (圖七 B)。



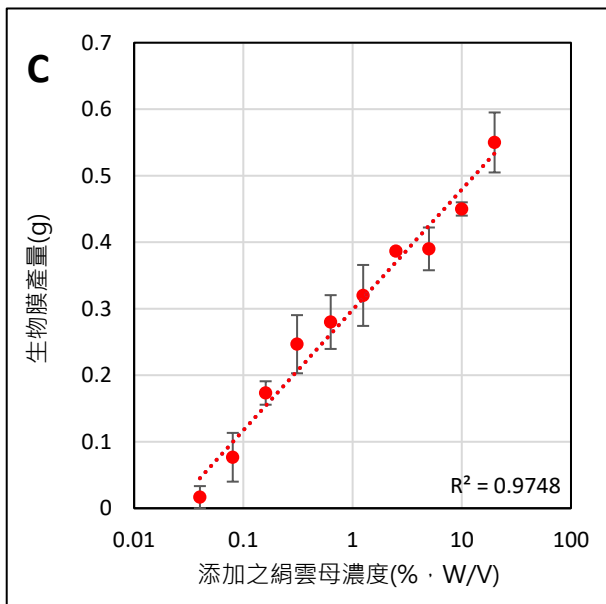
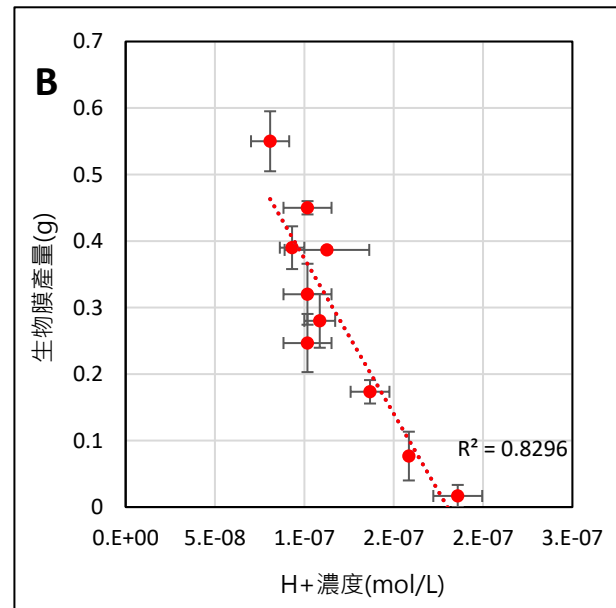
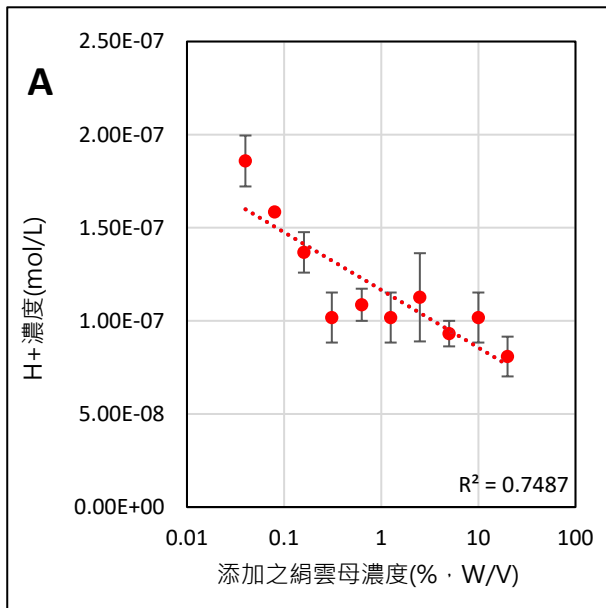
圖七、(A) C1, C2, C7, C8 四株菌株以及其加入絹雲母 (S) 後培養 36 小時的生物膜濕重 (Mean \pm SE, n=8)。(B) C1, C2, C7, C8 四株菌株以及其加入絹雲母 (S) 後培養 36 小時的黏度 (Mean \pm SE, n=8)。對照組 (TSB) 以 B 表示。(*表示以 t-test 檢定實驗組顯著高於對照組 ($p < 0.05$, 單尾)。*表示以 Mann-Whitney U test 檢定實驗組顯著高於對照組 ($p < 0.05$, 單尾))。



圖八、不同菌株加入絹雲母以及未加入絹雲母之生物膜形態對照圖。(A) C1 菌株以及加入雲母 (C1S) 之生物型態對照。(B) C2 菌株以及加入雲母 (C2S) 之生物型態對照。(C) C7 菌株以及加入雲母 (C7S) 之生物型態對照。(D) C8 菌株以及加入雲母 (C8S) 之生物型態對照。

三、絹雲母濃度和生物膜產量和 pH 值關係

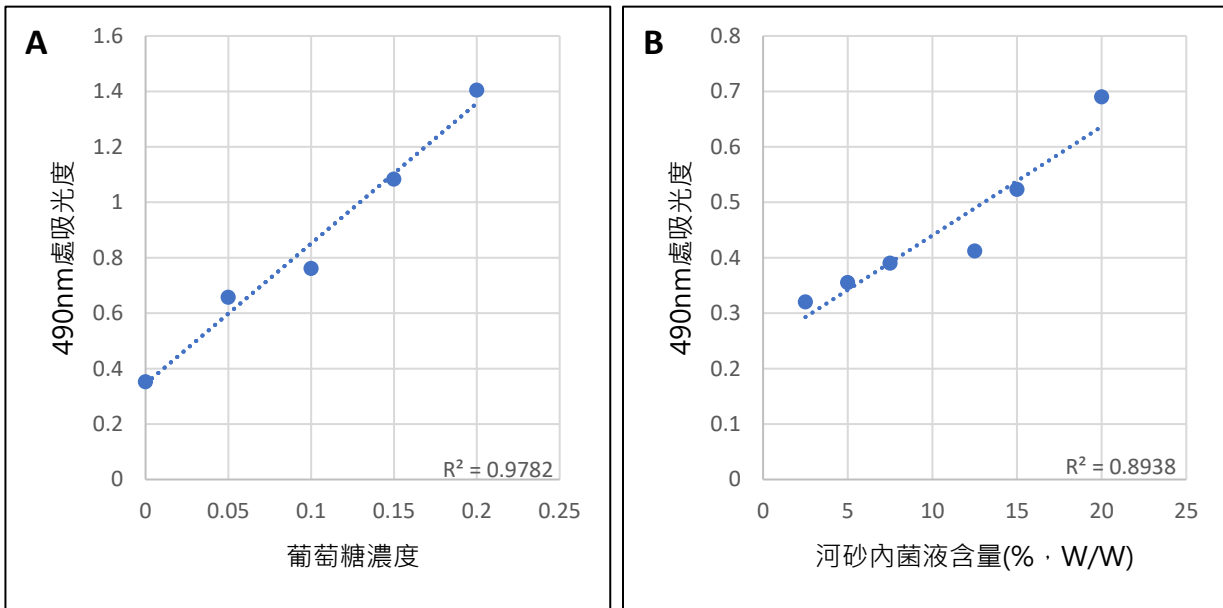
以 C8 菌株作為代表實驗結果顯示：添加之絹雲母濃度取自然對數值和氫離子濃度成高度負相關 ($R^2=0.7487$) (圖九 A)，氫離子濃度和生物膜產量之間呈現高度負相關 ($R^2=0.8296$) (圖九 B)，絹雲母濃度的自然對數值和生物膜產量也呈現高度正相關 ($R^2=0.9748$) (圖九 C)。



圖九、絹雲母濃度和生物膜產量及氫離子濃度關係。(A) 添加之絹雲母濃度取自然對數值後和氫離子濃度 (Mean \pm SE, n=3) 散佈圖。(B) 培養液中氫離子濃度 (Mean \pm SE, n=3) 和生物膜重量 (Mean \pm SE, n=3) 散佈圖。(C) 添加之絹雲母濃度取自然對數值後和生物膜重量 (Mean \pm SE, n=3) 散佈圖。

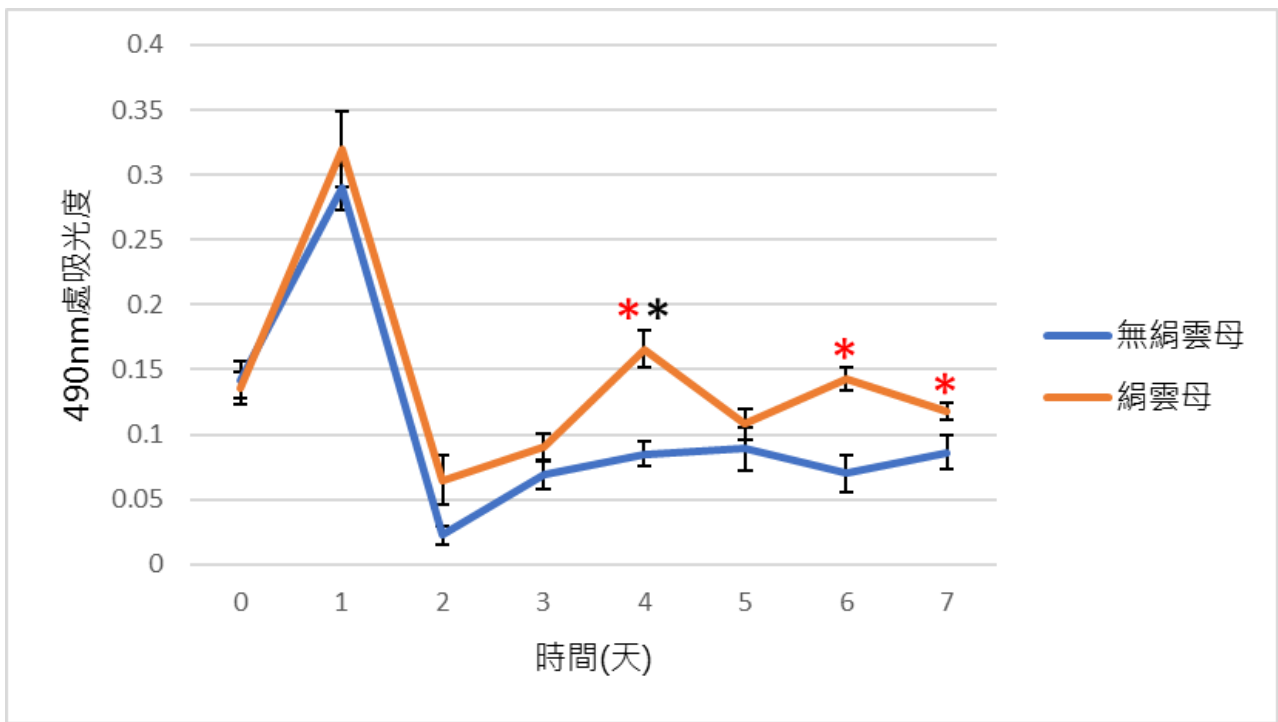
四、模擬土壤實驗

我們首先確認了使用「苯酚硫酸法」定量葡萄糖具有高可信度，如（圖十 A）所示，葡萄糖檢量線的 $R^2=0.9782$ ，具有高度正相關。另一方面，我們也確定了含不同比例菌液的河砂（也就是含有不同比例的多醣），經 CER 法萃取後，最終在 490nm 處吸光度和初始的菌液含量有高度正相關（ $R^2=0.8938$ ）（圖十 B），亦即：以此方法檢測河砂內的多醣含量具有很高的參考價值。



圖十：(A) 不同葡萄糖濃度經苯酚硫酸法呈色後與 490nm 吸光度散佈圖。(B) 不同菌液濃度的河砂經 CER 法和苯酚硫酸法呈色後測量之 490nm 吸光度散佈圖。

在此實驗結果中，我們發現加入絹雲母培養的菌液在七天的過程中，第 0 天和第 1 天的多醣含量變動幅度最大，且實驗組（絹雲母組）與對照組（無絹雲母組）的多醣含量沒有顯著差異。但是在第 2-7 天，實驗組與對照組出現比較明顯的差異，尤其在 4-7 天，若以 t-test 進行檢定則第 4、6、7 天實驗組和對照組間具有顯著差異（ $p=0.00034$ 、 $p=0.00122$ 、 $p=0.0222$ 。皆為單尾）。而以 Mann-Whitney U test 進行檢定，第 4 天具顯著差異（ $p=0.02733$ ，單尾），而第 6 天則接近顯著差異水準（ $p=0.05017$ ，單尾）（圖十一）。

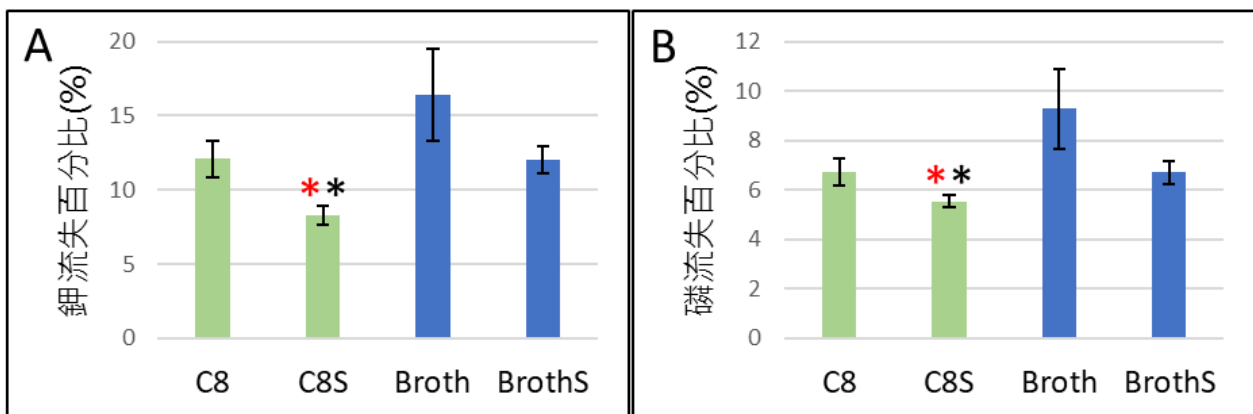


圖十一、比較菌液有無加入絹雲母之河砂的多醣隨時間變化量 (Mean ± SE, n=3。* 表示當天數據以 t-test 檢定實驗組顯著高於對照組 ($p < 0.05$, 單尾)。* 表示當天數據以 Mann-Whitney U test 檢定實驗組顯著高於對照組 ($p < 0.05$, 單尾))。

五、保肥實驗

保肥實驗的結果如（圖十二）所示。實驗結果顯示：C8 菌株加入絹雲母的組別（C8S 組），在磷或鉀的保肥能力，均顯著高於未加入絹雲母組（C8 組）（以 t-test 檢定：鉀： $p=0.012$ ，磷： $p=0.038$ 。皆為單尾）（以 Mann-Whitney U test 檢定：鉀： $p=0.01414$ ，磷： $p=0.01414$ ，皆為單尾）（圖十二，數值越低表示保肥能力越好。）。根據實驗結果計算：C8S 組比起 C8 組，減少 31%的鉀肥流失以及 17%的磷肥流失。

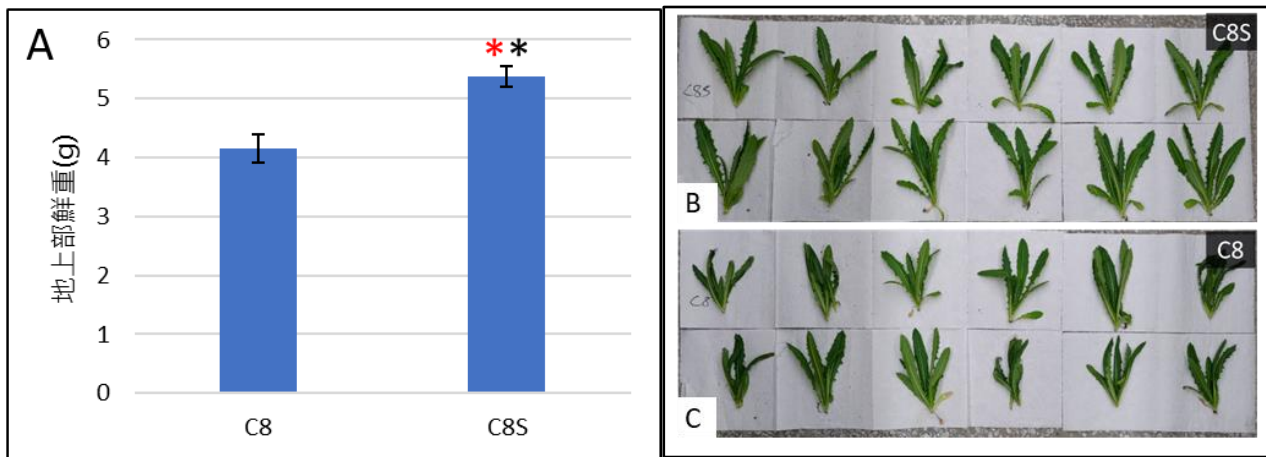
純 TSB（B 組）以及加入絹雲母的組別（BrothS 組）保肥效果卻無顯著差異（以 t-test 檢定：鉀： $p=0.214$ ；磷： $p=0.168$ ，雙尾）（以 Mann-Whitney U test 檢定：鉀： $p=0.4648$ ；磷： $p=0.3472$ ，雙尾）（圖十二，數值越低表示保肥能力越好）。因此我們推測：加入絹雲母後促成的保肥效果與絹雲母本身的物理化學性質（CEC 等）相關性較低，和促進生物膜的形成有較高的相關性。



圖十二、C8 和 TSB 在加入絹雲母（S）後的肥份流失百分比（Mean \pm SE, n=5）。（A）C8 和 TSB 在加入絹雲母（S）後的鉀肥流失百分比（Mean \pm SE, n=5）。（B）C8 和 TSB 在加入絹雲母（S）後的磷肥流失百分比（Mean \pm SE, n=5）。數值越低表示保肥能力越好。（* 表示以 t-test 檢定實驗組顯著高於對照組（ $p<0.05$ ，單尾）。* 表示以 Mann-Whitney U test 檢定實驗組顯著高於對照組（ $p<0.05$ ，單尾））。

六、種植實驗

在種植實驗中，我們以加入絹雲母培養的菌液（C8S 組）和未加入絹雲母培養的菌液（C8 組）來種植尖葉 A 菜，並比較收成之地上部鮮重是否有所差異。結果顯示，C8S 組之鮮重顯著高於 C8 組（以 t-test 檢定： $p=0.000216$ ，單尾。以 Mann-Whitney U test 檢定： $p=0.000911$ ，單尾）（圖十三），根據實驗結果計算：C8S 組地上部鮮重比起 C8 組增加 30%。



圖十三、(A) 加入絹雲母與否之菌液施用於尖葉 A 菜之地上部鮮重比較 (Mean \pm SE, n=12)。(B) 絹雲母組 (C8S) 植株照。(C) 未加絹雲母組 (C8) 植株照。(* 表示以 t-test 檢定實驗組顯著高於對照組 ($p<0.05$ ，單尾)。* 表示以 Mann-Whitney U test 檢定實驗組顯著高於對照組 ($p<0.05$ ，單尾))。

伍、 討論

絹雲母是土壤分離出的天然礦物，故會有細菌附著。

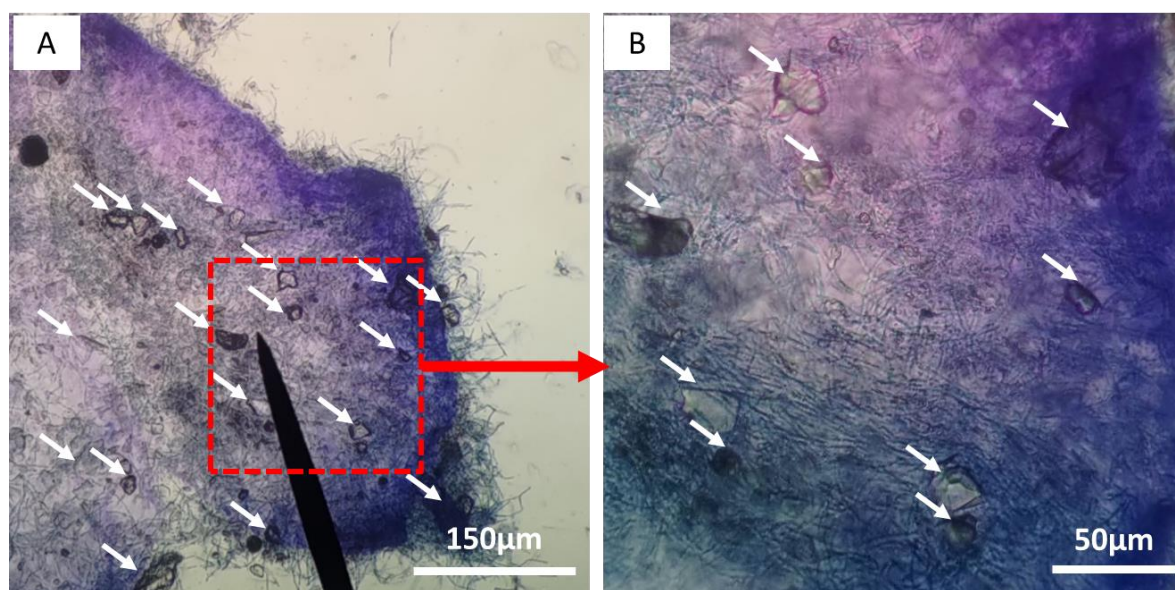
平均每克的土壤中含有上百萬種微生物（鄭傑憶，民 108），只有少數幾種細菌被發現附著在絹雲母上。環境中的細菌可能分泌胞外聚合（EPS）以黏附於礦物（Gadd, 2010），所以從絹雲母上分離出之菌株可能和絹雲母有交互作用。

本實驗的七株菌株經 MicroLog 鑑定皆為芽孢桿菌屬，而 C5 則未鑑定出結果。受限於 MicroLog 以代謝特徵鑑定細菌，僅能確認至屬的分類位階。根據前人文獻：芽孢桿菌屬的細菌可以形成內孢子，幫助細菌抵抗環境壓力（Nicholson, 2002）。在本實驗中，我們也發現附著在絹雲母上的 C8 菌株具有一定的抗高溫能力（121°C 高溫高壓滅菌 30 分鐘後仍存活），與前人發現相符（Kurdish & Antonyuk, 1999）。前人混合黏土礦和菌液可以讓細菌的存活率變高（К а м е н е в а, 2010），我們認為未來若以絹雲母作為菌劑載體，有潛力能夠提高菌種製成粉劑過程的存活率。

過去許多研究討論黏土礦物如何促進細菌生長，但以生物膜作為指標量化細菌生長效果者卻占少數。關於黏土礦促進細菌生長的相關機制，部分文獻認為是因具有高陽離子交換力（CEC），所以可以減緩菌液變酸，改善不適合細菌生長的環境（Vieira et al., 1995）（Garmasheva, 2016），而本實驗結果也顯示絹雲母具有類似效果（圖九 A）。因為從實驗結果得知：絹雲母的濃度與氫離子的濃度呈負相關，（ $R^2=0.7487$ ）。雖然絹雲母屬於大粒徑的礦物，表面積體積比不如小粒徑礦物，但本實驗結果仍支持絹雲母透過降低菌液氫離子濃度促進生物膜發育。然而，若比較實驗結果，「絹雲母和氫離子濃度」、「氫離子濃度和生物膜產量」之相關係數，都低於「絹雲母濃度和生物膜產量」的相關係數。因此，我們認為穩定 pH 值只能解釋一部分絹雲母濃度和生物膜產量之間的關係，其他因子尚待釐清。

另外一個有趣的發現是：縱然我們在菌液中加入高濃度的絹雲母，使菌液的絹雲母濃度達到 3%（W/V），其促進生物膜的生產的功能仍沒有下降的趨勢，前人研究使用 1% 的小粒徑黏土礦就會抑制細菌生長，原因可能是太多小粒徑黏土礦包覆在細菌表面阻礙物質交換

(Fomina & Skorochod, 2020)，或者是小粒徑黏土礦導致培養液黏度提升，不易交換氧氣 (Kurdish & Bega, 2006)。而本實驗中使用的絹雲母粒徑較大 ($13\ \mu\text{m}$)，細菌和其形成的複合體應該是細菌把絹雲母包圍在中間，而非絹雲母將細菌包圍，如 (圖十四) 所示。另外我們的實驗結果也顯示加入絹雲母沒有影響 TSB 的黏度。可能因得益於以上兩點，加入高濃度的絹雲母沒有抑制細菌生長的趨勢。



圖十四、(A) 加入絹雲母培養之菌液生成的生物膜，以亞甲基藍染色，白色箭頭標示處為絹雲母顆粒。(B) A 圖紅色部分放大圖。

黏度實驗和生物膜實驗的結果可以互相應證，對多數菌株而言 (除了 C7)，加入絹雲母可以提升菌液黏度，此結果很可能與生物膜有關。C8 菌株以 Mann-Whitney U Test 進行檢定，雖加入絹雲母的黏度沒有顯著高於對照組，但是有鑒於 p 值相當接近顯著差異水準 ($p=0.078$)，而 t -test 檢定的結果又顯示兩者具有顯著差異 ($p=0.0077$) (圖七 B)，我們認為加入絹雲母應可以提升 C8 菌液黏度。生物膜的主要組成包括細菌細胞本體和大量胞外聚合物 (EPS)，而胞外聚合物有高黏性的特性 (Kaci, Heyraud, Barakat, & Heulin, 2005)，可以合理推測：黏度的提升可能肇因於胞外聚合物的分泌量增加。而胞外聚合物是生物膜中影響土壤保肥等性質的關鍵因素 (Costa et al., 2018)，可以解釋為何加入菌株與絹雲母可以提升保肥效果。

模擬土壤實驗結果顯示：相較於未加入絹雲母培養的組別，加入絹雲母培養的組別可以使模擬土壤（河砂）含有較多的多醣，亦即 EPS 的主要組成成分。本實驗結果清楚表明加入絹雲母可以提升生物膜中相當重要的成分：多醣。雖然實驗結果在第 0 天和第 1 天的多醣含量最高，但這並不影響後續 2-7 天加入絹雲母組別有較多多醣產量的結果。雖然以 t-test 和 Mann-Whitney U test 得出的結果不盡相同，然而綜觀實驗期間，實驗組多醣含量有數次顯著高於對照組，但對照組數據卻從未高於實驗組。因此，我們認為絹雲母有助於使土壤中維持較高的多醣含量。

在保肥實驗結果中，我們發現加入絹雲母可以提高介質保肥能力，證實了我們的推測：保肥能力的提升應和絹雲母本身的高 CEC 特性相關性較低，因為加入絹雲母的 TSB 和未加入絹雲母的 TSB 兩者間保肥能力無顯著差異。

從種植實驗結果中，我們發現：以加入絹雲母培養的細菌菌液施用於土壤中，比起未加入絹雲母的組別更可以促進尖葉 A 菜生長，收成量提高了 30%。我們認為此結果得益於前述機制：絹雲母培養的菌液做為保肥製劑，提供土壤更穩定的多醣含量，進而提升保肥能力，幫助植物生長。

總結上述各項實驗結果，我們的研究為「如何應用雲母類礦物與菌肥於農業」提供一條不同以往的嶄新途徑。前人研究雲母類礦物於農業上的價值時多著墨於「緩釋鉀肥」，透過溶鉀菌將雲母內的鉀肥釋出，提供植物鉀元素促進生長（Meena, Maurya, & Meena, 2013）。然而我們發現雲母類黏土礦物另一種可能價值：透過恆定菌液 pH 值，促進生物膜發育，提供土壤穩定的高多醣含量，進而促進土壤保肥幫助作物生長。相較於小粒徑黏土礦，絹雲母不僅成本較低廉，且加入更高比例時，也不會有小粒徑黏土礦抑制細菌生長的問題。例如：加入更高的比例不會抑制細菌生長。我們未來可以探討更多的問題，例如：與何種菌株混用、何種混合方式會有最佳效果？以發揮絹雲母的農業潛力，對台灣農業貢獻一份心力。

陸、 結論

本研究從絹雲母上分離，並確認四種具分泌生物膜能力的菌株：C1，C2，C7，C8。

研究結果顯示：

- 一、絹雲母可以提升生物膜產量。
- 二、絹雲母可以提升部分菌株菌液黏度。
- 三、絹雲母有助於穩定菌液 pH 值。
- 四、加入絹雲母培養的菌液可以使模擬土壤（河砂）中的多醣含量顯著高於對照組。
- 五、加入絹雲母培養的菌液可以減少模擬土壤（珍珠石）中的肥份流失。
- 六、加入絹雲母培養的菌液比起未加入絹雲母培養的組別，尖葉 A 菜收成量顯著提升 30%。

柒、 參考文獻資料

江佩津（2018 年 6 月 28 日）。找到植物吸收養分的關鍵 — 專訪蔡宜芳。**研之有物**。

亞曼達·利特（2021 年 8 月 15 日）。綠色革命至今 我們必須重新提問：明天吃什麼？。**農傳媒**。

陳家齊、方建能、陳惠芬、林怡君（民 103）。開採向陽之寶—絹雲母礦。**臺灣博物季刊**，33（3），123。

許博凱（2007 年 5 月 10 日）。如何為植物調配五星級的營養特餐：談植物對於硝酸鹽（Nitrate）的吸收。**中研院訊**。

楊秋忠。（2011 年 12 月 12 日）。多元功能及高質化生物膜微生物肥料之開發及新種篩選平台之建立（II）研究成果報告（精簡版）（NSC 99-2324-B-005-014-）。**行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告**。

鄭傑憶（2019 年 6 月 25 日）。聯合國：錯誤的施肥讓土壤變瘦，全球 1/3 土壤退化，繪製世界土壤地圖，台灣可參加。**上下游**。

潘子祁（2016 年 7 月 13 日）。為何化肥用越多土壤越瘦？中研院士楊秋忠這麼說。**上下游**。

Basak, B. B., Pal, S., & Datta, S. C.（2012）. Use of modified clays for retention and supply of water

and nutrients. *Current Science*, 1272-1278.

- Costa, O. Y., Raaijmakers, J. M., & Kuramae, E. E. (2018). Microbial extracellular polymeric substances: ecological function and impact on soil aggregation. *Frontiers in microbiology*, 9, 1636.
- Flemming, H., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: An Emergent Form of Bacterial Life. *Nature Reviews Microbiology*, 14, 563 – 575. doi: 10.1038/nrmicro.2016.94
- Fomina, M., & Skorochod, I. (2020). Microbial interaction with clay minerals and its environmental and biotechnological implications. *Minerals*, 10 (10), 861. doi:10.3390/min10100861
- Gadd, G. M. (2010). Metals, Minerals and Microbes: Geomicrobiology and Bioremediation. *Microbiology*, 156 (3), 609 – 643. doi: 10.1099/mic.0.037143-0
- Garmasheva, L. L., Kovalenko, N. K., Pidgorskyi, V. S., Livinska, O. P., Voychuk, S. L., Oleschenko, L. T., ... & Lobunets, T. E. (2016). INTERACTION OF LACTOBACILLUS PLANTARUM 337D UKM B-2627 STRAIN CELLS WITH CLAY MINERALS IN VITRO. *Mikrobiolohichnyi Zhurnal (Kiev, Ukraine: 1993)*, 78 (4), 11-24.
- Hettiarachchi, R. P., Dharmakeerthi, R. S., Seneviratne, G., Jayakody, A. N., De Silva, E., Gunathilake, T., ... & Maheepala, C. K. (2014). Availability and leaching of nutrients after biofilm biofertilizer applications into a Red Yellow Podsollic soil. *Journal of the Rubber Research Institute of Sri Lanka*, 94, 43 – 53.
- Han, C., Song, J., Hu, J., Fu, H., Feng, Y., Mu, R., ... & Dong, L. (2021). Smectite promotes probiotic biofilm formation in the gut for cancer immunotherapy. *Cell Reports*, 34 (6), 108706. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108706
- Kaci, Y., Heyraud, A., Barakat, M., & Heulin, T. (2005). Isolation and Identification of an EPS-Producing Rhizobium Strain from Arid Soil (Algeria) : Characterization of Its EPS and the Effect of Inoculation on Wheat Rhizosphere Soil Structure. *Research in Microbiology*, 156, 522 – 531. doi: 10.1016/j.resmic.2005.01.012
- Kurdish, I. K., & Antonyuk, T. S. (1999). Effect of clayey minerals on viability of some bacteria at

high temperatures. *Mikrobiologichnyi Zhurnal*, 61 (3) , 3-8.

Kurdish, I. K., & Bega, Z. T. (2006) . Effect of argillaceous minerals on the growth of phosphate-mobilizing bacteria *Bacillus subtilis*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42 (4) , 388-391. doi: 10.1134/S0003683806040089

Lünsdorf, H., Erb, R. W., Abraham, W. R., & Timmis, K. N. (2000) . 'Clay hutches': a novel interaction between bacteria and clay minerals. *Environmental Microbiology*, 2 (2) , 161-168. DOI: 10.1046/j.1462-2920.2000.00086.x

Ma, W., Peng, D., Walker, S. L., Cao, B., Gao, C. H., Huang, Q., & Cai, P. (2017) . *Bacillus subtilis* biofilm development in the presence of soil clay minerals and iron oxides. *npj Biofilms and Microbiomes*, 3 (1) , 1-9.

Meena, O. P., Maurya, B. R., & Meena, V. S. (2013) . Influence of K-solubilizing bacteria on release of potassium from waste mica. *Agric Sust Dev*, 1, 53-56.

Nicholson, W. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 59, 410 – 416 (2002) . doi: 10.1007/s00018-002-8433-7

Rabat, N. E., Hashim, S., & Majid, R. A. (2016) . Effect of different monomers on water retention properties of slow release fertilizer hydrogel. *Procedia engineering*, 148, 201-207. doi: 10.1016/j.proeng.2016.06.573

Redmile-Gordon, M. A., Brookes, P. C., Evershed, R. P., Goulding, K. W. T., & Hirsch, P. R. (2014) . Measuring the soil-microbial interface: extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from soil biofilms. *Soil Biology and Biochemistry*, 72, 163-171. doi: 10.1016/j.soilbio.2014.01.025

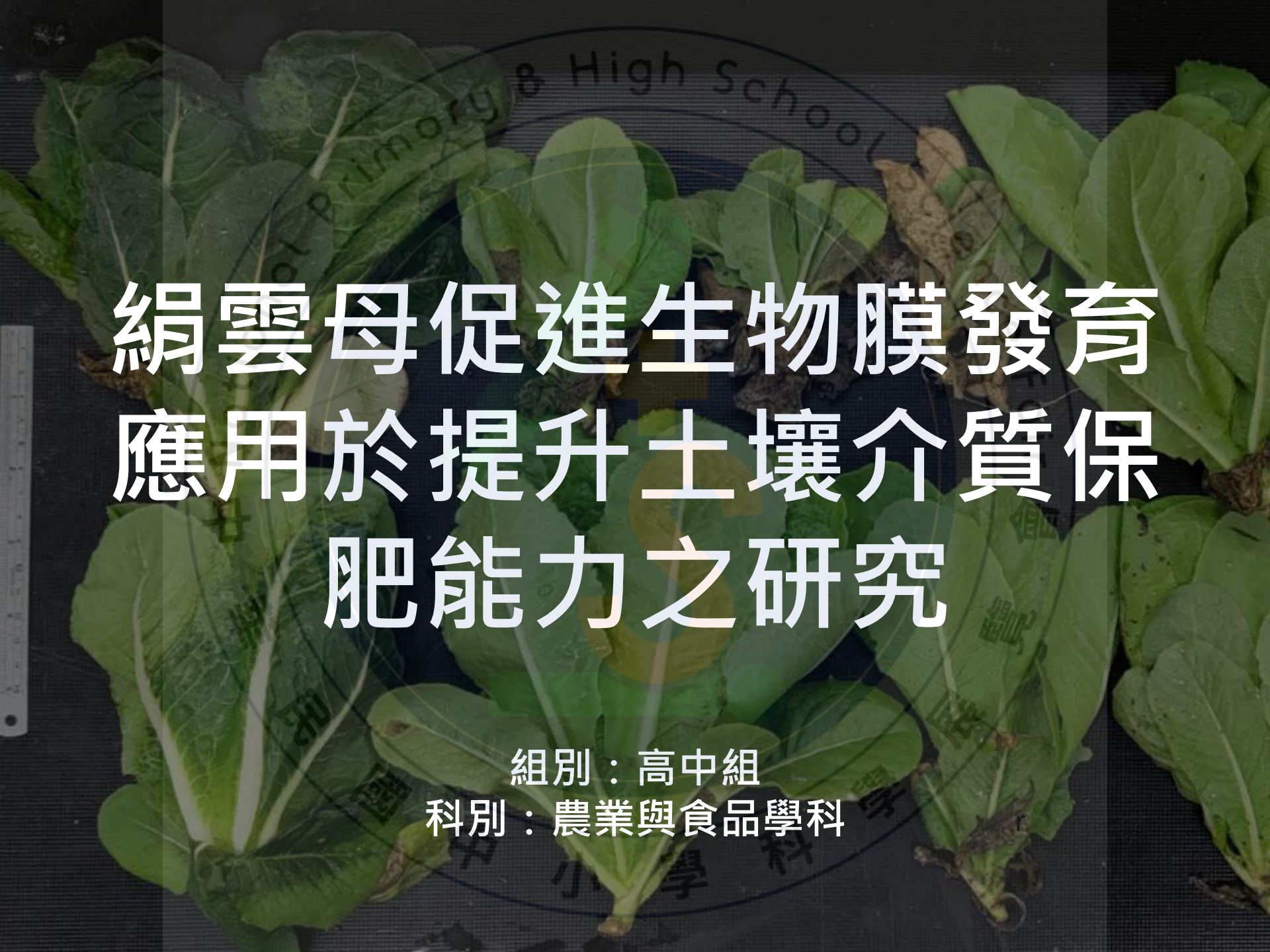
Vieira, M. J., & Melo, L. F. (1995) . Effect of clay particles on the behaviour of biofilms formed by *Pseudomonas fluorescens*. *Water Science and Technology*, 32 (8) , 45-52. doi: 10.1016/0273-1223 (96) 00006-6

К а м е н ь в а , І . О . (2010) . Vermiculite influence on growth and storage of *Mesorhizobium ciceri* H-12 in heterophase preparation. *С і л ь с ь к о г о с п о д а р с ь к а м і к р о б і о л о г і я*, 10, 91-96. doi: 10.35868/1997-3004.10.91-96

【評語】 052201

1. 本作品從台東絹雲母中分離 4 菌株，並發現菌液中加入絹雲母可提升這些菌株之生物膜產量與多醣含量，並於尖葉 A 菜的栽培實驗中，證實菌株配合絹雲母的添加，可提高尖葉 A 菜的收成量。
2. 作品說明書中，研究之目的、重要性、圖表數據等宜再詳細說明，較能突顯研究內容與結果的顯著性。
3. 部分實驗方法與原理背景之依據宜再加強說明，例如生物膜黏度高低之生物意義為何？生物膜中的多醣可能是什麼類型？對植物之種植有何重要性？

作品簡報

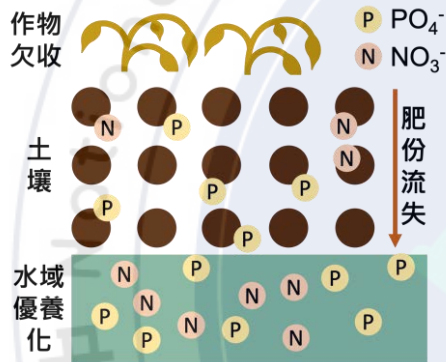


絹雲母促進生物膜發育 應用於提升土壤介質保 肥能力之研究

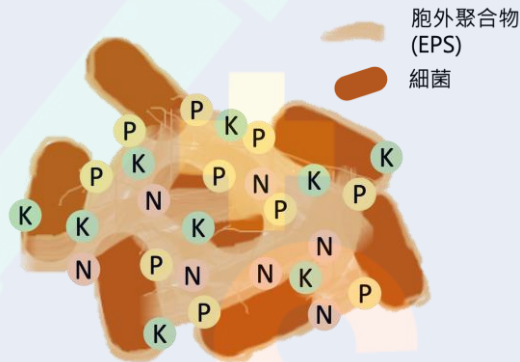
組別：高中組
科別：農業與食品學科

前言

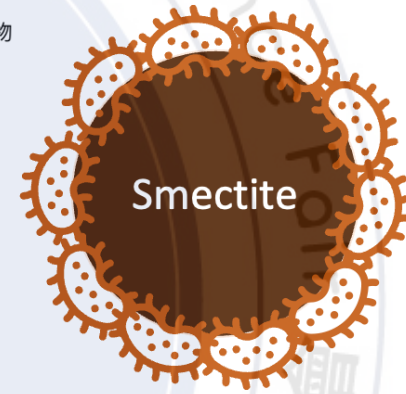
肥份施用效率低導致
優養化和作物成本提高



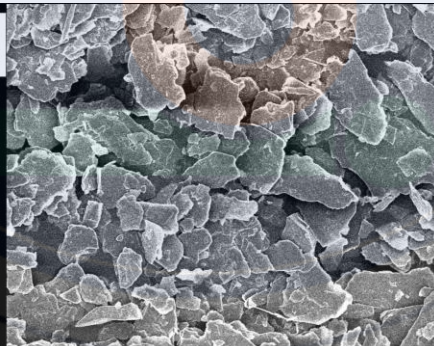
現有解決方式
以生物膜保肥



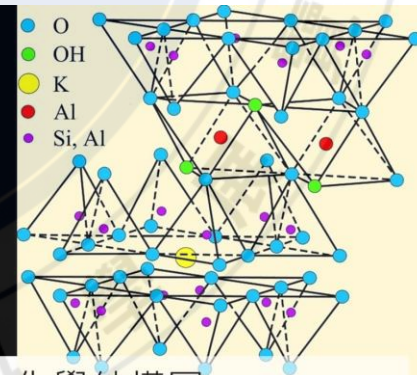
黏土礦可以
促進生物膜發育



矽力勇絹雲母礦粉實體照

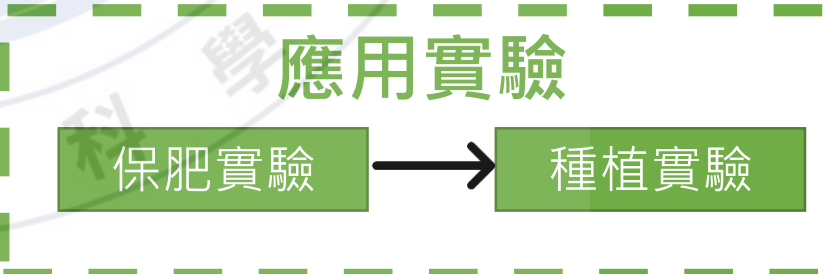
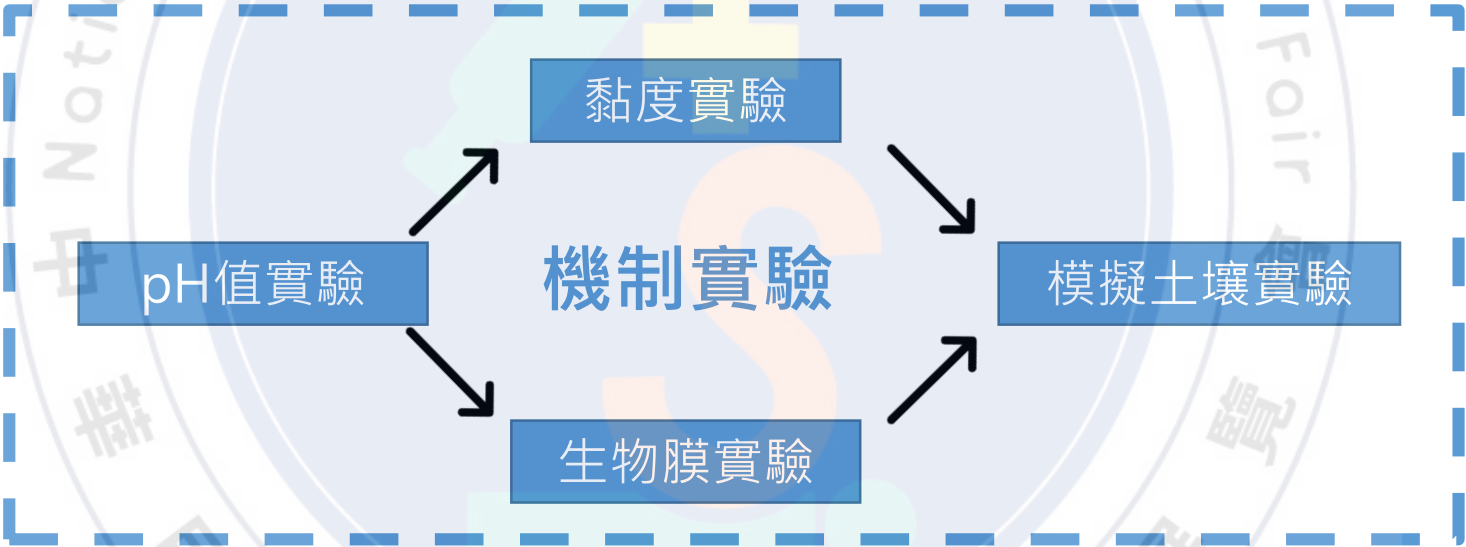
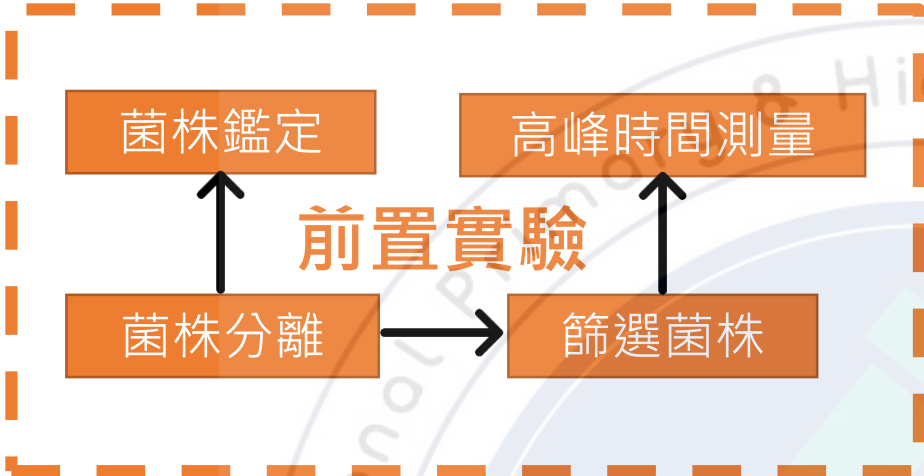


掃描式電子顯微鏡照



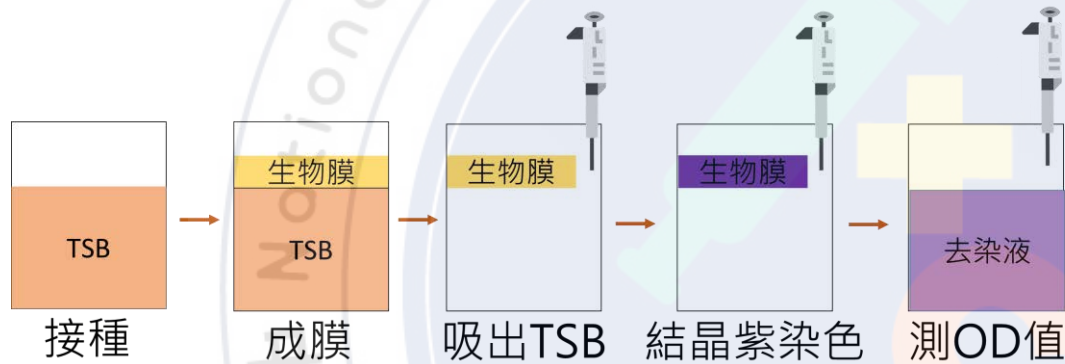
化學結構圖

實驗過程

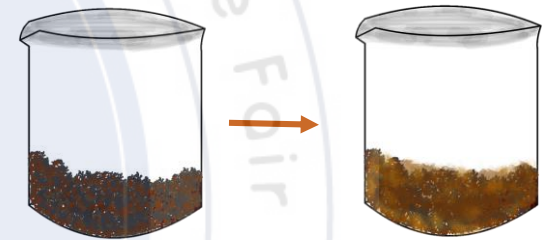


實驗方法

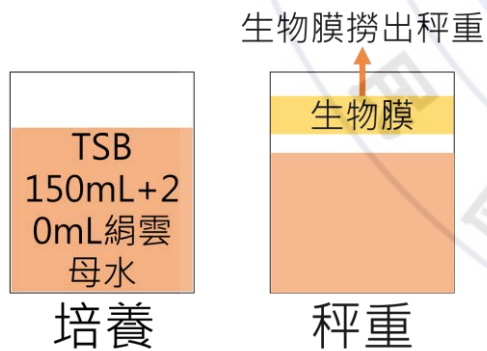
菌株篩選



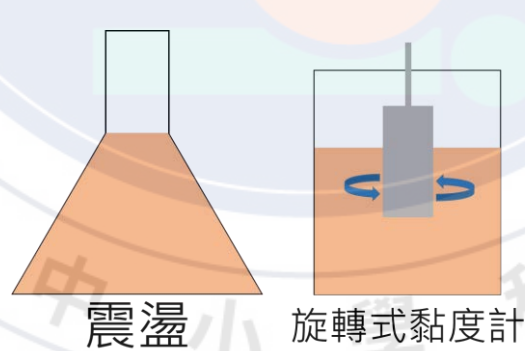
河砂實驗



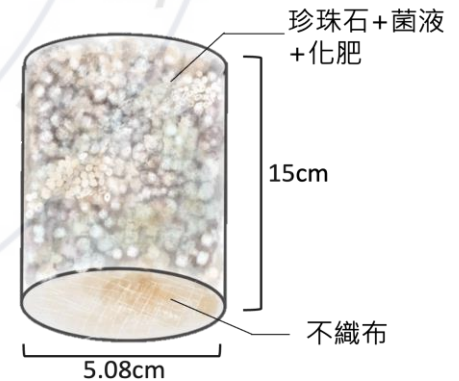
黏度實驗



生物膜實驗



保肥實驗



菌株分離&鑑定實驗

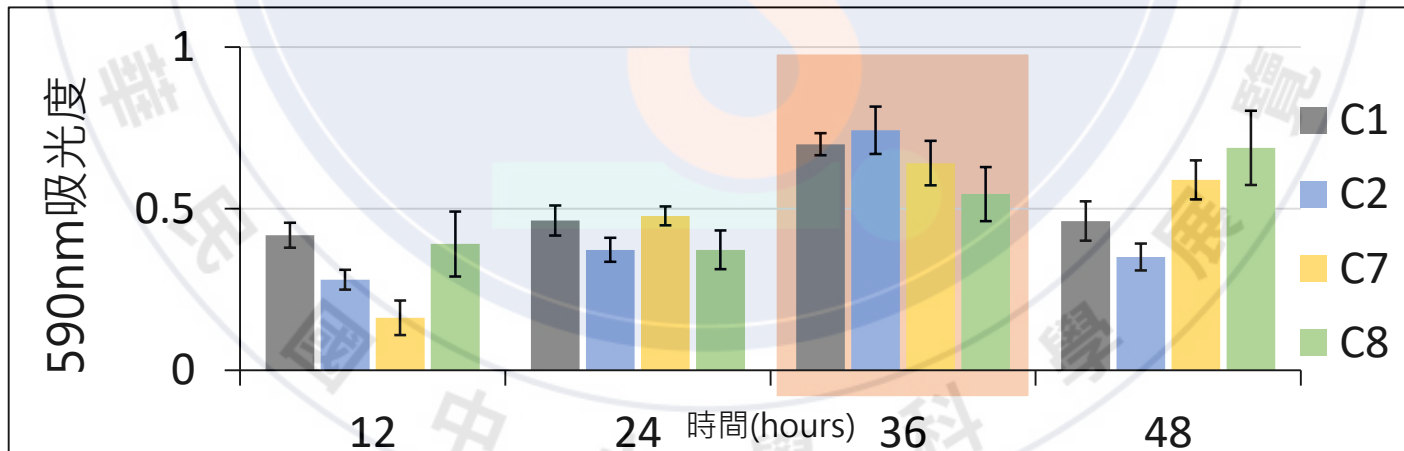
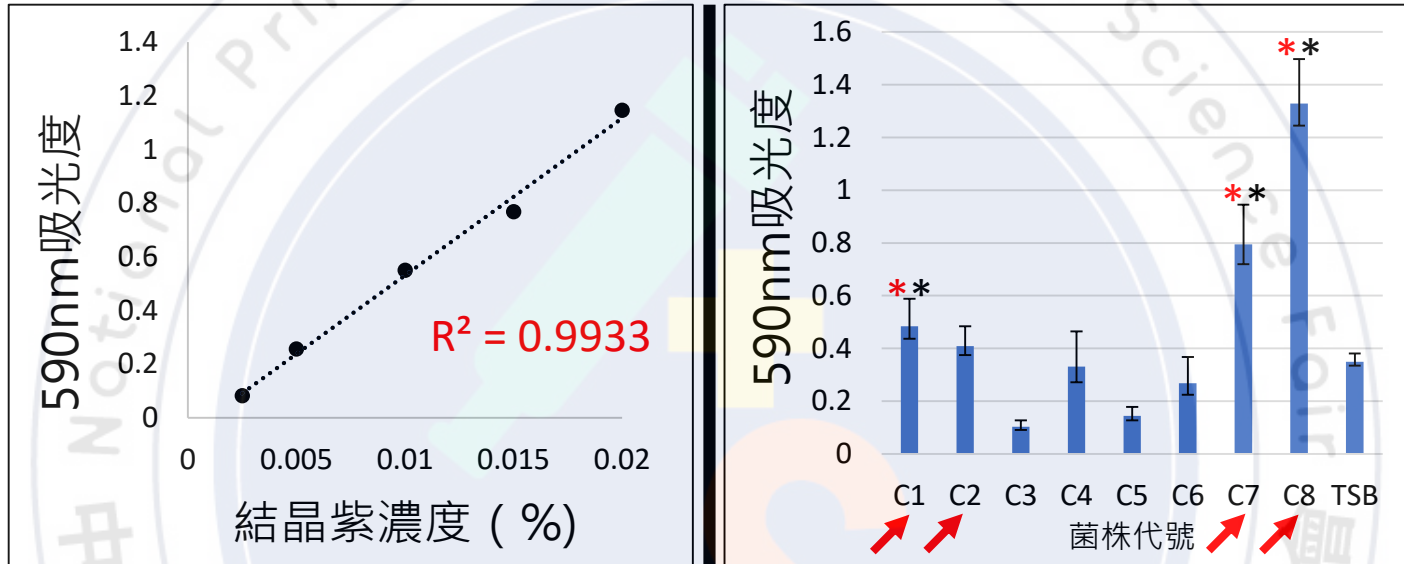
04

代號	顏色	表面	邊緣	黏液	大小	生長速度	其他
C1	乳白	光滑	規則	黏稠	大	快	
C2	乳白	凹凸不平	不規則	黏稠	大	快	
C8	乳白	光滑	不規則	黏稠	大	快	
C3	乳白	光滑	不規則	黏稠	大	快	swarming growth
C4	皮膚色	光滑	規則	較少	小	慢	
C5	黃色	光滑	規則	較少	小	慢	
C6	乳白色	光滑	規則	較少	小	慢	
C7	乳白色			乾燥	小		菌落型態較特殊

菌株代號	C1	C2	C3	C4
屬名(generic name)	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>
種小名(specific epithet)	<i>mojavensis/ subtilis/ atrophaeus/ amyloliquefaciens</i>	<i>mojavensis/ subtilis</i>	<i>amyloliquefaciens/ atrophaeus</i>	<i>vietnamensis</i>
菌株代號	C5	C6	C7	C8
屬名(generic name)	<i>unknown</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>
種小名(specific epithet)	<i>unknown</i>	<i>gibsonii/ murimartini</i>	<i>licheniformis</i>	<i>mojavensis/ subtilis</i>

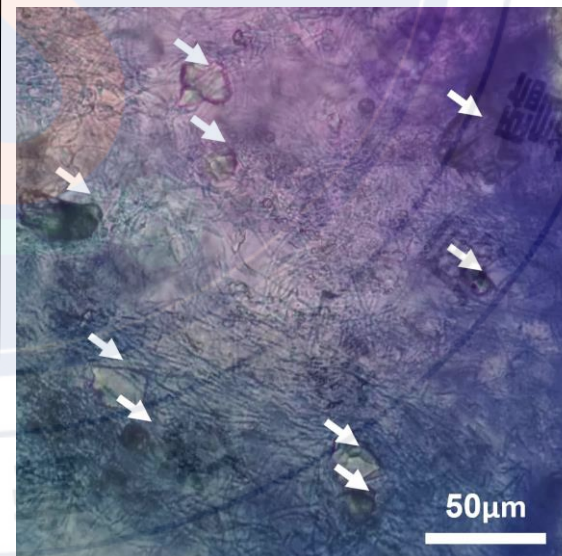
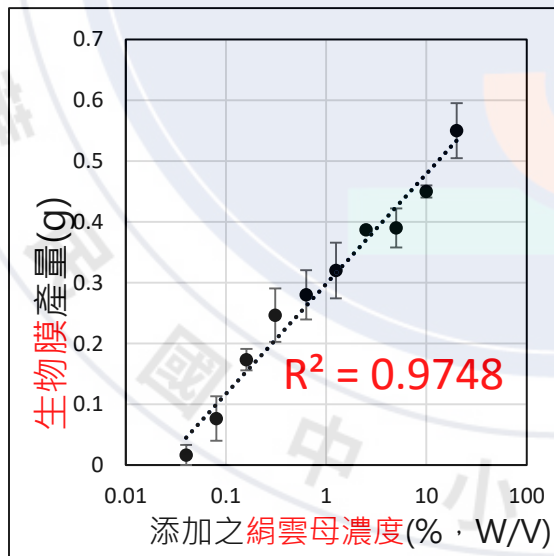
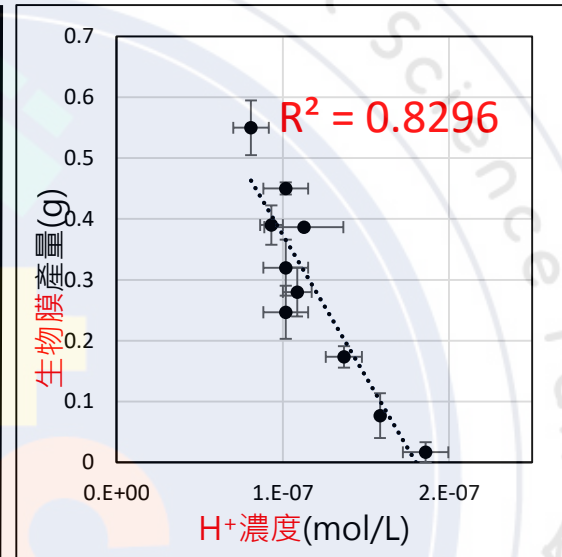
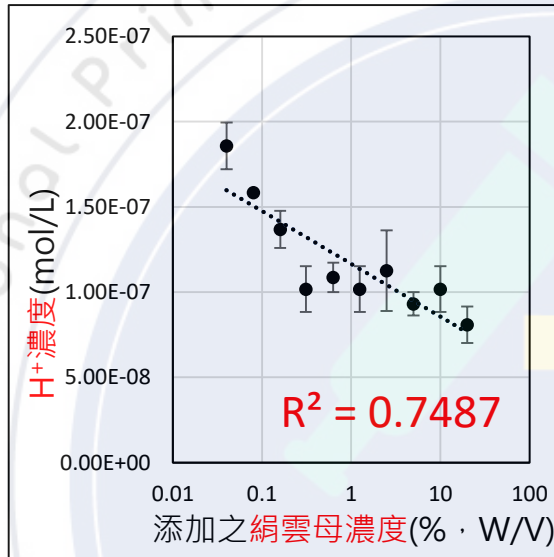
篩選菌株&培養時間實驗

*表示t-test檢定具顯著差異 *表示Mann-Whitney U test檢定具顯著差異



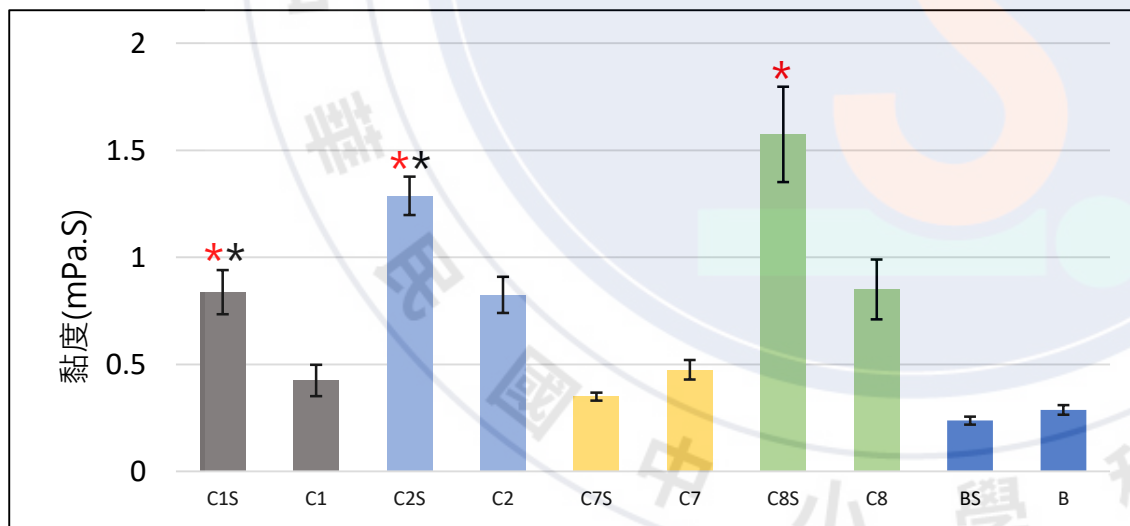
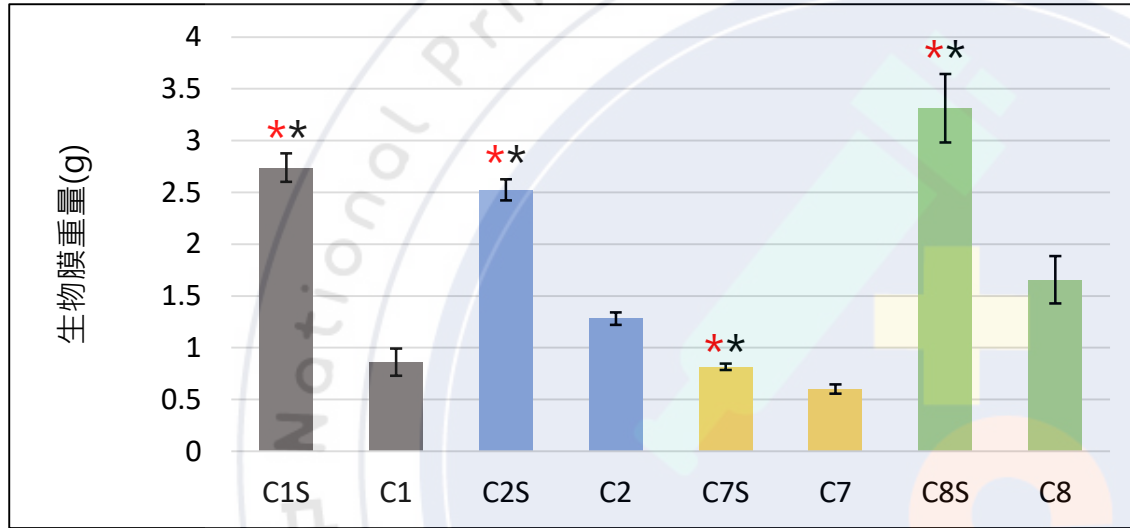
pH值實驗

*表示t-test檢定具顯著差異 *表示Mann-Whitney U test檢定具顯著差異



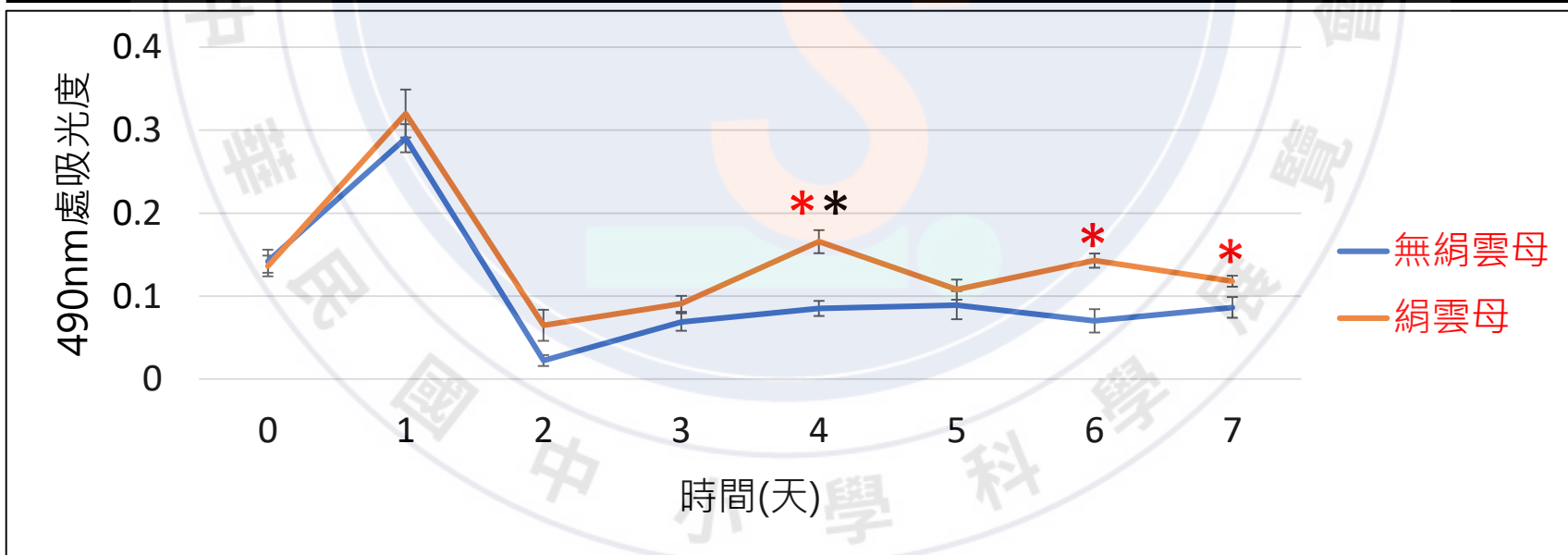
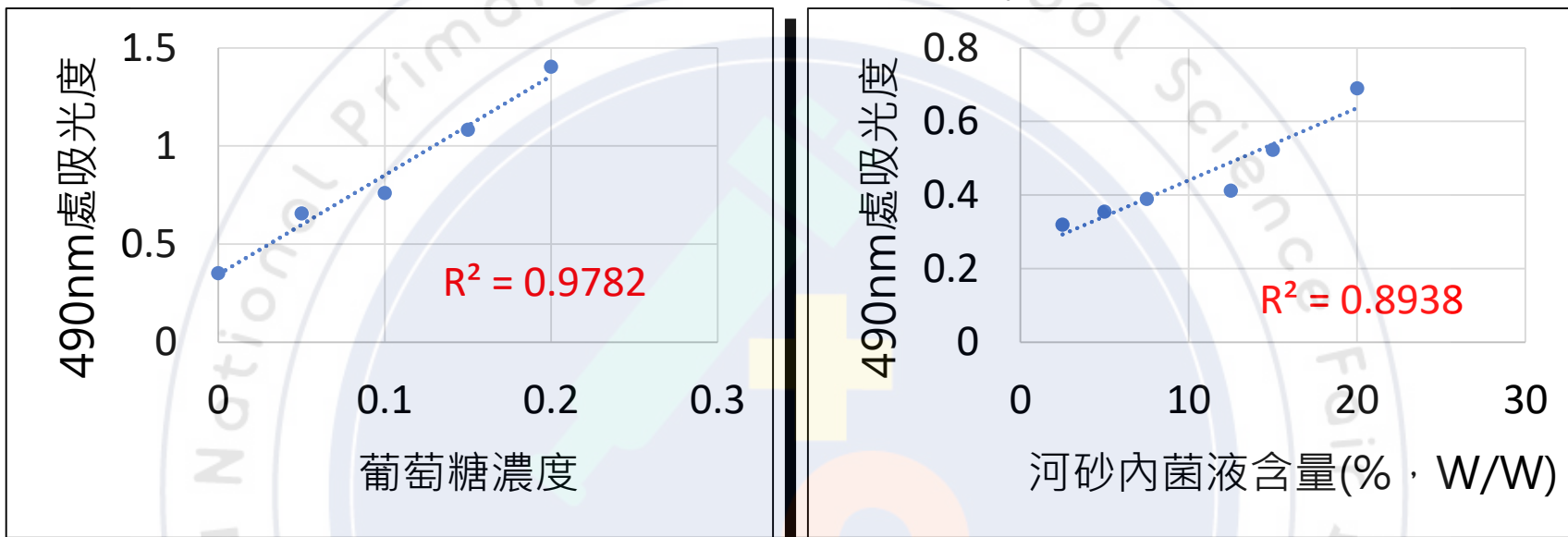
生物膜重量實驗&黏度實驗

*表示t-test檢定具顯著差異 *表示Mann-Whitney U test檢定具顯著差異



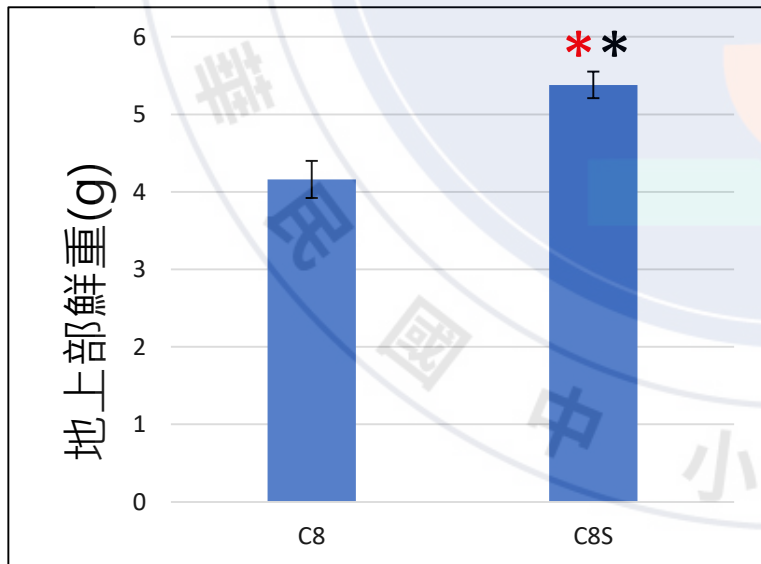
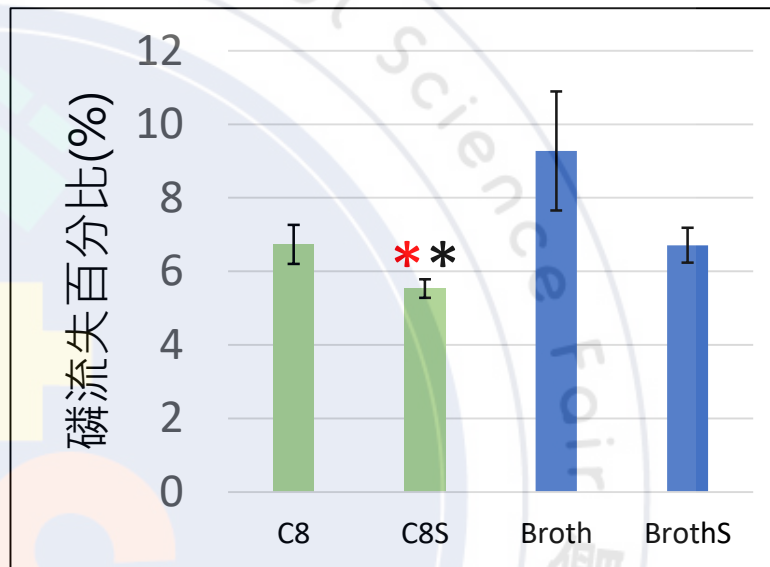
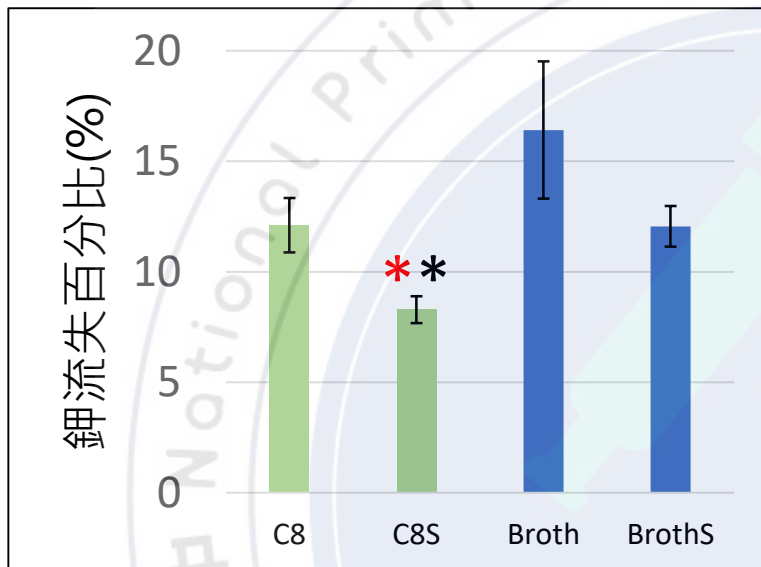
模擬土壤實驗

*表示t-test檢定具顯著差異 *表示Mann-Whitney U test檢定具顯著差異



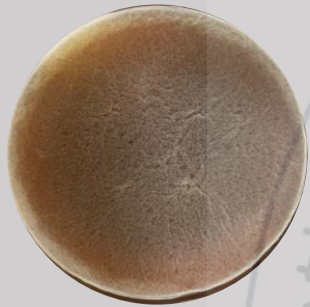
保肥&種植實驗

*表示t-test檢定具顯著差異 *表示Mann-Whitney U test檢定具顯著差異



結論

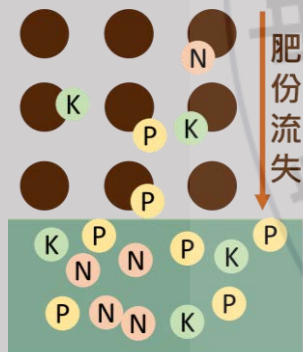
未加絹雲母(C8)



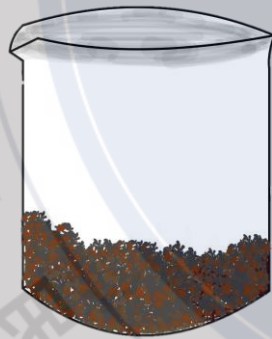
生物膜皺褶不明顯
產量較低



黏度較低可能代表
多醣較少



肥份流失率較高
保肥能力較差

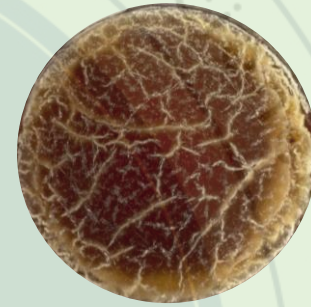


模擬土壤中的
多醣含量較低
不利植物生長

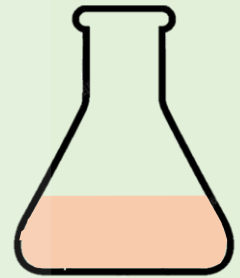
收成量提升30%



加絹雲母(C8S)



生物膜皺褶明
顯產量提升2倍



黏度提升1.85倍代
表多醣產量提升



減少 31%的鉀肥和
17%的磷肥流失



提供模擬土壤穩定
的高多醣含量

- 陳家齊、方建能、陳惠芬、林怡君 (民103) 。開採向陽之寶—絹雲母礦。臺灣博物季刊, 33 (3) , 123。
- 楊秋忠。(2011年12月12日)。多元功能及高質化生物膜微生物肥料之開發及新種篩選平台之建立 (II) 研究成果報告 (精簡版) (NSC 99-2324-B-005-014-)。行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告。
- Costa, O. Y., Raaijmakers, J. M., & Kuramae, E. E. (2018) . Microbial extracellular polymeric substances: ecological function and impact on soil aggregation. *Frontiers in microbiology*, 9, 1636.
- Garmasheva, L. L., Kovalenko, N. K., Pidgorskyi, V. S., Livinska, O. P., Voychuk, S. L., Oleschenko, L. T., ... & Lobunets, T. E. (2016) . INTERACTION OF LACTOBACILLUS PLANTARUM 337D UKM B-2627 STRAIN CELLS WITH CLAY MINERALS IN VITRO. *Mikrobiolohichniy Zhurnal (Kiev, Ukraine: 1993)*, 78 (4) , 11-24.
- Han, C., Song, J., Hu, J., Fu, H., Feng, Y., Mu, R., ... & Dong, L. (2021) . Smectite promotes probiotic biofilm formation in the gut for cancer immunotherapy. *Cell Reports*, 34 (6) , 108706. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108706
- Ma, W., Peng, D., Walker, S. L., Cao, B., Gao, C. H., Huang, Q., & Cai, P. (2017) . *Bacillus subtilis* biofilm development in the presence of soil clay minerals and iron oxides. *npj Biofilms and Microbiomes*, 3 (1) , 1-9.
- Redmile-Gordon, M. A., Brookes, P. C., Evershed, R. P., Goulding, K. W. T., & Hirsch, P. R. (2014) . Measuring the soil-microbial interface: extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from soil biofilms. *Soil Biology and Biochemistry*, 72, 163-171. doi: 10.1016/j.soilbio.2014.01.025
- Vieira, M. J., & Melo, L. F. (1995) . Effect of clay particles on the behaviour of biofilms formed by *Pseudomonas fluorescens*. *Water Science and Technology*, 32 (8) , 45-52. doi: 10.1016/0273-1223 (96) 00006-6