

环境因素对降解型生物膜形成的影响

张楠¹ 熊富忠¹ 温东辉^{1,†} 于聪² 李琪琳²

1. 北京大学环境科学与工程学院, 北京 100871; 2. College of Civil and Environmental Engineering, Rice University, Texas 77005; † 通信作者, E-mail: dhwen@pku.edu.cn

摘要 采用改良微孔板法, 考察 pH、温度、培养时间和目标污染物浓度 4 个环境因子对 3 株氮杂环芳烃降解菌成膜的影响。结果表明, pH、温度、培养时间对生物膜的形成影响显著, 且各降解菌的最佳成膜条件分别为: BC026 成膜的最适 pH 为 7, 最适温度为 35℃, 培养时间为 36 小时; BW001 成膜的最适 pH 为 8, 最适温度为 35℃, 培养时间为 48 小时; BW004 成膜的最适 pH 为 7~9, 最适温度为 40℃, 培养时间为 36 小时。在 0~1600 mg/L 的目标污染物浓度内, 目标污染物对生物膜形成的影响不显著。

关键词 NHCs 降解菌; 生物膜; 环境因子

中图分类号 X172

Effects of Environmental Factors on Degrading Bacterial Biofilm Formation

ZHANG Nan¹, XIONG Fuzhong¹, WEN Donghui^{1,†}, YU Cong², LI Qilin²

1. College of Environmental Sciences and Engineering, Peking University, Beijing 100871; 2. College of Civil and Environmental Engineering, Rice University, Texas 77005; † Corresponding author, E-mail: dhwen@pku.edu.cn

Abstract The authors investigated how environmental factors (pH, temperature, incubation time and concentration of pollutants) effected three NHCs degrading strains' biofilm forming. The results show significant effects of pH, temperature and incubation time on biofilm formation. The optimum environmental conditions for forming the maximum amount of biofilm is: pH=7, temperature 35°C, and incubation time 36 hours for BC026; pH=8, temperature 35°C, and incubation time 48 hours for BW001; and pH=7-9, temperature 40°C, and incubation time 36 hours for BW004. There is no significant impact on biofilm formation of any degrading bacterium exposed to 0-1600 mg/L of pollutant concentration.

Key words NHCs degrading bacterium; biofilm; environmental factors

吡啶和喹啉是典型的高毒性、难降解氮杂环芳烃化合物。吡啶可看做苯环中的—CH=被—NH=取代的化合物, 能与水互溶; 喹啉可看做杂环吡啶和纯碳苯环并连而成, 微溶于水, 具有碱性。吡啶和喹啉作为化工原料和溶剂, 广泛应用于医药合成、染料和农药等生产。因此, 吡啶和喹啉及其衍生物常见于工业废水中。吡啶具有强烈刺激性, 能麻醉中枢神经系统。喹啉具有致突变、致癌性, 对生态环境和人类健康产生危害, 其排放前的处理具有重要意义。生物强化是去除吡啶和喹啉的有效途径。目前已有

株高效降解菌被分离, 并形成复合菌剂, 如本实验室分离的吡啶降解菌 *Shinella zoogloeoides* BC026^[1]、*Paracoccus* sp. BW001^[2]和喹啉降解菌 *Pseudomonas* sp. BW003^[3]、*Pseudomonas* sp. BW004^[4], 对这些降解菌在悬浮态生长条件下的降解特性已有较充分的研究。

在实际水环境中, 与悬浮态相比, 生物膜群落是大多数细菌既定的生长模式^[5]。结构有序、功能分化的生物膜群落能够为其内部生长并繁殖的细胞提供保护, 为细菌提供抵御外部环境(包括噬菌

体、抗生素、毒素、免疫活性物质等)冲击的“居所”^[6-8]。因此,探究水处理过程中降解菌生物膜形成的影响因素,对保持降解菌的生物活性及保证系统处理效率具有重要意义。

生物膜的形成是一个极为复杂、受多重因素影响的过程。无论是细菌的生物学特性(如表面附属结构^[9-11])、胞外聚合物(EPS, extracellular polymeric substances)^[12-14]、群体感应效应(QS, quorum sensing)^[15-17]、细菌运动能力^[18],还是环境因子(如 pH^[19-20]、营养物质^[21-24]、水力剪切力^[25]、材料表面特性^[26-27]等),都可能对其成膜产生影响。目前的研究多以医学常见致病菌(如大肠杆菌和铜绿假单胞菌)为模式细菌,对环境工程中应用较多的、由降解菌形成的降解型生物膜的研究却较为匮乏。尤其对高毒、高污染环境生物膜形成的影响因素,尚存在诸多认识空白。

本研究考察环境因子(包括 pH、温度、培养时间、目标污染物浓度)对吡啶和喹啉降解型生物膜形成的影响,初步确定降解型生物膜形成的最佳条件,为进一步考察降解型生物膜的降解效率及实际处理中生物膜形成的人工调控提供参考。

1 材料与方法

1.1 受试菌株

研究采用从首钢焦化活性污泥中分离纯化的 4 株降解菌,菌株特性见表 1^[28]。

1.2 培养基

细菌的活化与富集及微孔板成膜实验培养使用 LB 培养基,含 10 g/L 胰蛋白胨、5g/L 酵母膏和 10 g/L NaCl。若无特殊说明,需另加入 200 mg/L 目标污染物,以保持降解菌的降解特性。细菌的分离清洗以及微孔板的清洗使用无机盐培养基(MSM,

mineral salt medium)^[29]。所有培养基使用前均于 121℃, 1.05 kg/cm² 下灭菌 20 分钟。

1.3 主要试剂

胰蛋白胨及酵母提取物购自 Oxoid (英国); 琼脂糖购自 Amresco (美国), 琼脂购自国药集团化学试剂有限公司(中国), 吡啶标准溶液购自 Chem Service (美国), 喹啉标准溶液购自 AccuStandard (美国), 1% 结晶紫染液购自北京索莱宝科技有限公司(中国), 牛血清蛋白购自 Sigma-Aldrich (西班牙), 考马斯亮蓝染液购自南京建成生物工程研究所(中国), SYBR Green 购自北京拜尔迪生物技术有限公司 (中国)。无特殊说明的化学试剂均为分析纯及以上级别。

1.4 改良微孔板法对生物膜的半定量测定

微孔板法是生物膜研究中应用较广的一种对生物膜进行半定量的方法。本研究在 George^[30]和 Merritt 等^[31]微孔板生物膜实验的基础上,有所改进,采用组织培养处理的聚苯乙烯 12 孔板(Corning, 美国)进行实验,具体操作如下。

将过夜培养(16~18 小时)的菌体用 MSM 清洗两遍,用含有目标污染物的 LB 液体培养基稀释至 OD₅₉₅=0.5。将 1 mL 菌液接种到 12 孔板的 A 和 C 两行微孔中,中间 B 行加 LB 作为空白,每个条件做 2 块孔板平行实验。接种后,封口膜密封,于不同环境条件下培养。

培养 24 小时后,先将 125 μL 菌悬液转移至 96 孔板,酶标仪(BioTek Instruments, 美国)测定 OD₅₉₅, 表征浮游态细菌的生长量。用去离子水小心洗去孔板中的悬浮细胞和培养基,于 60℃ 烘干 1 小时固定。每孔加入 2 mL 0.1% 结晶紫(CV, Crystal Violet)染色 25 分钟,小心洗去多余染料,于 35℃ 烘干。每孔加入 4 mL 95%乙醇,置于 95 rpm 摇床

表 1 受试菌株及其特性^[28]
Table 1 Characteristic of four degradation bacteria^[28]

目标污染物	菌名	菌属	革兰氏染色	好氧性	形态	保藏号
吡啶	BC026	生枝动胶菌(<i>Shinella zoogloeoides</i>)	G ⁻	好氧	杆菌,有鞭毛	CGMCC2224
	BW001	脱氮副球菌(<i>Paracoccus</i>)	G ⁻	好氧	球菌或短杆菌,无鞭毛	CGMCC2225
喹啉	BW003	假单胞菌(<i>Pseudomonas</i>)	G ⁻	好氧	杆菌,有鞭毛	CGMCC3008
	BW004	假单胞菌(<i>Pseudomonas</i>)	G ⁻	好氧	杆菌,有鞭毛	CGMCC4221

说明:保藏号为在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的号码。

45 分钟,充分溶解结晶紫。最后每孔移取 125 μL 至 96 孔板,以除去空白的 OD₅₉₅,表征生物膜的形成量。

1.5 单一环境因子实验设置

本研究考察温度、pH 值、培养时间和污染物浓度对生物膜形成的影响。pH 考察 6 个水平,分别为 4, 7, 8, 9, 10 和 11; 温度考察 5 个水平,分别为 20, 25, 30, 35 和 40 $^{\circ}\text{C}$; 培养时间考察 5 个水平,分别为 12, 24, 36, 48 和 60 小时; 污染物浓度考察 5 个水平,分别为 0, 400, 800, 1200 和 1600 mg/L。

每批实验只改变单一因子条件,若无特殊说明,温度为 35 $^{\circ}\text{C}$, pH=7, 污染物浓度为 200 mg/L, 静置培养 24 小时。

1.6 统计学分析

实验结果以均值 $\pm\text{SD}$ 表示。采用 SPSS 20.0 软件,对不同细菌的相同生物学特性进行 t 检验,对同一受试细菌在不同环境条件下生物膜成膜量指标

进行单因素方差分析及 LSD 多重比较。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 4 株降解菌生物学特性

4 株降解菌形态如图 1 所示。此前曾对 4 株降解菌的初始黏附能力(30 分钟内)^[32]、细胞疏水性^[33]、胞外蛋白与胞外多糖(培养 24 小时)测定^[34-36], 游动能力 (swimming motility)、群游能力 (swarming motility) 和抽动运动能力 (twitching motility)^[18,37], 发现 BW001 的初始黏附能力、疏水性、EPS 分泌能力以及运动能力均显著低于其他菌株; BC026 的初始黏附细胞数量和胞外多糖分泌能力显著高于其他三株菌株; BW003 和 BW004 的初始黏附能力、疏水性、胞外多糖分泌及运动能力较为接近, 未呈现显著差异。因此在后续实验中, 只选择 BW004 作为代表考察环境因子对成膜的影响。

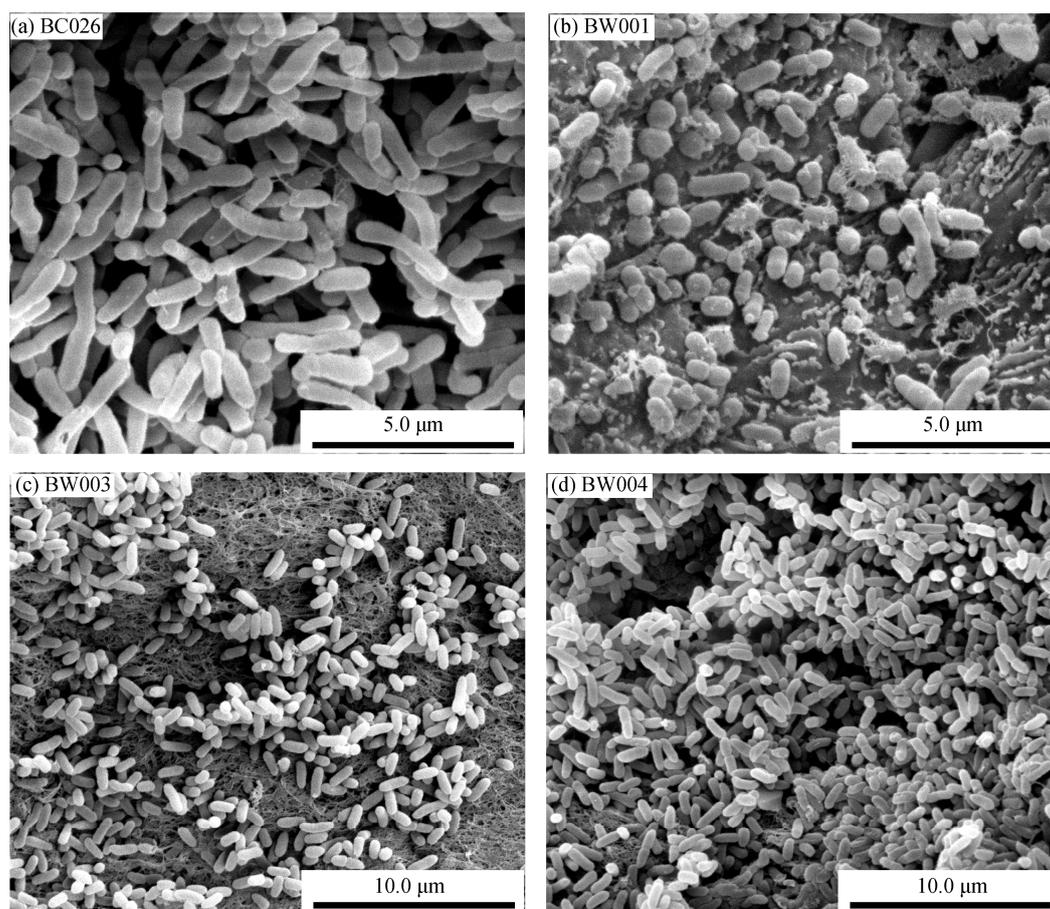


图 1 4 株 NHCs 降解菌成熟期的电子显微镜照片
Fig. 1 Photographs of the NHCs degrading bacteria by SEM

2.2 环境因子对生物膜形成的影响

2.2.1 pH 值

在实际废水处理过程中, 鉴于焦化废水的复杂性, 其 pH 常常有一定波动, pH 可能对水处理系统中的降解菌产生冲击, 影响生物膜的形成。

前人研究表明, 焦化废水多呈碱性, 如首钢集团焦化二厂焦化废水原水 pH 在 8.47~9.48 之间^[38], 广东韶钢焦化厂原水 pH 在 9.1~11.0 之间^[39]。因而本实验着重考察碱性条件对生物膜的影响。

图 2 和 3 表明, BC026 生物膜生长的最适 pH 为 7, BW001 为 8, BW004 为 7~9。在此最适 pH 条件下, 生物膜量与其他水平相比呈现显著差异, 同时生物膜量/浮游态生物量比值最大。由此推断, 3 株降解菌都不适合在酸性条件下生存, 而在焦化废水的弱碱性环境中依然具有一定成膜能力。另外, 虽然 BC026 在 pH 为 7~9 范围内成膜量较多, 但它对碱性环境较为敏感, 随着 pH 升高, 生物膜量下降速度远远高于浮游态。相比之下, BW001 和 BW004 生物膜对碱性环境的变化具有一定抵御能力。

2.2.2 温度

无论是焦化废水原水还是处理过程中, 水温会随着处理流程与反应过程变化, 而温度是影响细胞生长与内酶系发挥作用的重要因素, 因此, 考察最佳成膜温度对废水实际处理过程温度的控制具有一定参考价值。

从图 4(a)可以看出, BC026 成膜量最多的温度为 35℃, 而浮游态生长量最多的温度为 25~30℃。

两者相比(图 4(d)), 30~40℃范围内, 随着温度升高, 生物膜态明显占据优势。BW001 成膜量最多的温度为 35℃, 而浮游态生长量最多的温度为 30~40℃(图 4(b))。两者相比(图 4(d)), 20~40℃范围内, 生物膜态与浮游态较为均衡。BW004 成膜量最多的温度为 40℃, 而浮游态生长量最多的温度为 25℃(图 4(c))。两者相比(图 4(d)), 40℃条件下生物膜态占据明显优势, 成膜量是其他条件下的两倍左右。

综上所述, BC026 和 BW004 在较高温度(30~40℃)下, 生物膜态都有逐渐占据优势的趋势, 而 BW001 响应不显著, 说明该菌对温度因子响应不敏感。

基于 pH 和温度对降解菌生物膜形成的影响研究, 得出 BC026 成膜的最适 pH 为 7, 最适温度为 35℃; BW001 成膜的最适 pH 为 8, 最适温度为 35℃; BW004 成膜的最适 pH 为 7~9, 最适温度为 40℃。因此, 后续实验选择在 pH=7, 35℃条件下进行。相比本课题组之前确定的降解菌浮游态的最佳降解条件^[28](BC026 pH 为 6.5~7.9, 温度为 23.9℃~34.3℃; BW001 pH 为 6.5~7.5, 温度为 26.2℃~36.1℃; BW004 pH 为 6.4~7.5, 温度为 26.8℃~34.7℃), 可以看出: 生物膜形成的最佳条件与生物降解的最佳 pH 较为相似, 而成膜所需温度更高, 在实际处理过程中不易达到。而不同降解菌最佳成膜与最佳降解条件各不相同, 如何在实际反应器中协调各个菌株, 成为实际处理过程需要解决的问题。因此, 需要进一步结合实际情况, 确定能够同时保障成膜与降解的最优条件。

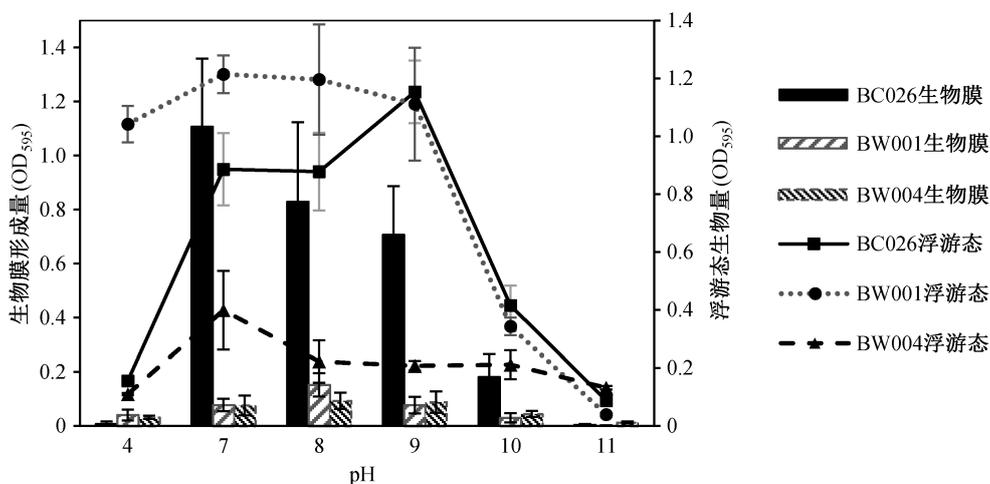


图 2 pH 值对 NHCs 降解菌浮游态与生物膜态生长的影响

Fig. 2 Amount of planktonic cells and biofilm of the degrading bacteria in response to different pH

2.2.3 培养时间

生物膜的形成包括最初黏附、分泌 EPS 从而不可逆黏附、早期结构形成、结构成熟分化以及最后膜内单细胞的裂解散播 5 个步骤^[40]。不同降解菌在相同条件下, 经历各个阶段所需的时间也有差异。

3 株降解菌的浮游态与生物膜态都呈现出阶梯式生长规律(图 5 和 6): 在一定时间内, 先增长, 然

后小幅下降, 继而在原有基础上增长。其中, BC026 和 BW004 生物膜的生长明显比悬浮态的生长滞后。BC026 在 12~24 小时期间, 细菌迅速适应环境, 进入到对数期, 生物量迅速增加, 发生黏附继而成膜的细胞也快速增加, 因此浮游态与生物膜态呈现一致的增长趋势; 24~36 小时期间, 浮游态减少, 生物膜增加, 说明浮游态细菌可能已经过稳定期进入衰亡期, 而生物膜细胞依然处于成熟分化阶段, 稳定增长; 36~48 小时期间, 生物膜可能进入裂解期, 细胞散播而转为浮游态, 因此浮游态细胞增多; 48~60 小时期间, 浮游态再次进入稳定期甚至衰亡期, 而生物膜继续增长。

不同培养时间浮游态与生物膜态细胞数量的变化, 在一定程度上反映生物膜由黏附到裂解的成膜过程。可由此推断, 3 株降解菌生物膜形成的最佳培养时间分别为 36 小时(BC026 和 BW004)和 48 小时(BW001)(图 6 中比值最高点)。另外, 对于多孔板培养法, 过长的培养时间会造成营养基质匮乏、培养基体积减少, 影响成膜的因素增加, 增大实验误差(图 5)。因此, 考察生物膜的形成过程培养时间不宜超过 60 小时。

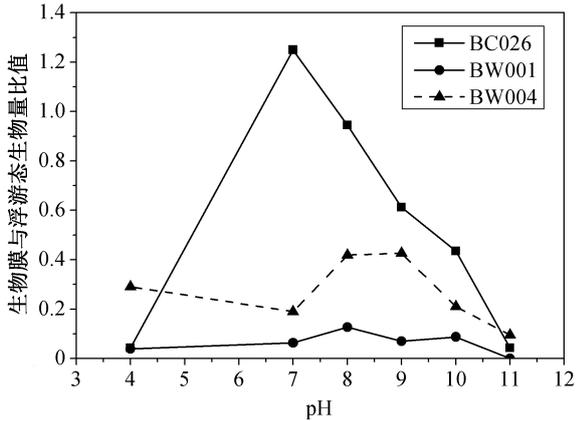


图 3 pH 值对 NHCs 降解菌生物膜与浮游态生物量比的影响
Fig. 3 Ratio of biofilm/planktonic cells of the degrading bacteria in response to different pH

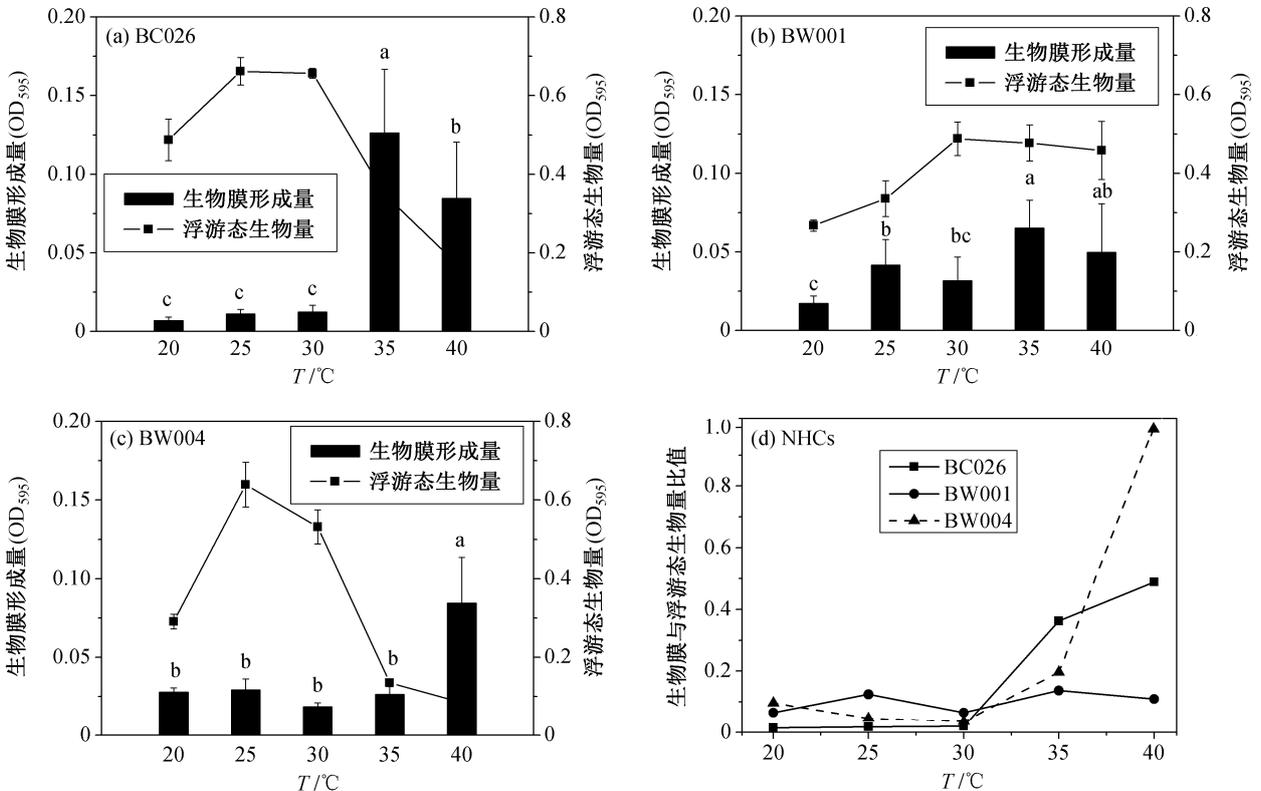


图 4 温度对 NHCs 降解菌生物膜形成的影响
Fig. 4 Effects of temperature on degrading bacteria biofilm formation

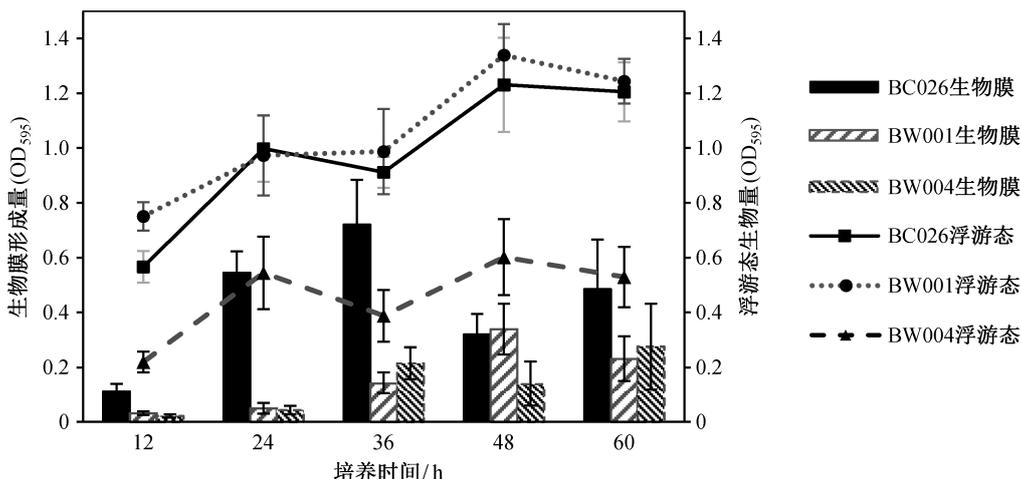


图 5 培养时间对 NHCs 降解菌浮游态与生物膜态生长的影响

Fig. 5 Amount of biofilm and planktonic cells of the different degrading bacteria in response to incubation time

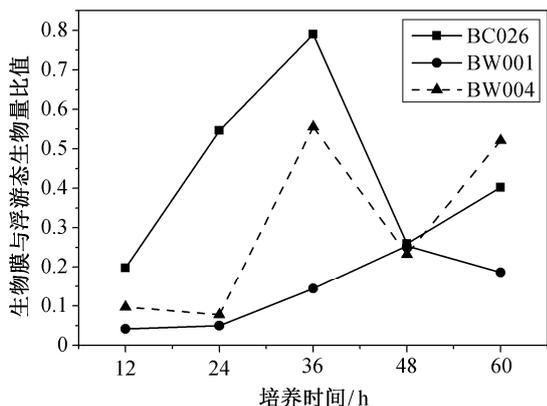


图 6 培养时间对 NHCs 降解菌生物膜与浮游态生物量比值的影响

Fig. 6 Ratio of biofilm/planktonic cells of the different degrading bacteria in response to incubation time

2.2.4 目标污染物浓度

以 24 小时为培养时间(图 7), BC026 在污染物为 0~1600 mg/L 的不同水平下, 浮游态生长不存在显著差异, 而生物膜生长也没有明显规律; BW001 的浮游态生长于 0 mg/L 浓度下明显高于其他水平, 生物膜生长在 400~1200 mg/L 范围较好; BW004 的浮游态生长于 400~1200 mg/L 较好, 生物膜生长明显在 1600 mg/L 最好。

本文还考察延长培养时间, 不同菌株对目标污染物的响应。结果表明, BW004 的响应较为特别(图 8): 与 24 小时培养不同, BW004 在各污染物浓度下的成膜量多有所增加, 但在极高污染物浓度下,

生物膜量反而大幅减少; 与之相反, 在 800~1600 mg/L, 24 小时培养时, 浮游态生物量为逐渐上升趋势, 48 小时培养后却转为下降趋势。

结合培养时间对生物膜影响的考察结果, 可推测 BW004 在培养 36 小时后, 已经形成稳定的生物膜, 在 36~48 小时培养的过程中, 生物膜部分裂解, 细胞散播到液体中, 继而重新进入新的成膜过程, 因此在 0~1200 mg/L 浓度下, 成膜量多有所增加。随着污染物浓度(800~1600 mg/L)的升高, BW004 生物膜的形成速度可能受到高浓度刺激而加速, 尤其是 1600 mg/L 条件下, 在培养 24 h 时成膜量最高, 而培养 48 h 时刚好进入裂解散播期, 导致浮游态生物量迅速增加, 生物膜量反而因老化脱落而减少。

细菌由浮游状态向生物膜状态的转变, 是自身应对外界环境的一种保护机制^[41-42]。随着污染物浓度升高, BW004 成膜量增多, 说明 BW004 可能具有较为敏感的保护机制, 能够在接收到环境污染物刺激时, 较快形成生物膜, 以抵御外界环境的变化。

另一方面, 吡啶和喹啉对降解菌来说, 不仅是高毒性冲击负荷物质, 也可以作为生长所需的碳源。研究表明, 碳源会影响细菌的群集运动能力和群体感应效应, 从而影响生物膜的形成^[24]。还有研究发现一种 CsrA 蛋白可以通过调控中央碳通量和细胞内的糖原合成与代谢作用来抑制生物膜的形成, 刺激裂解散播的发生^[43-44]。因此, 基质污染物也可能是通过类似的途径对成膜造成影响。

另外, 生物膜的形成可能受到包括群体感应调

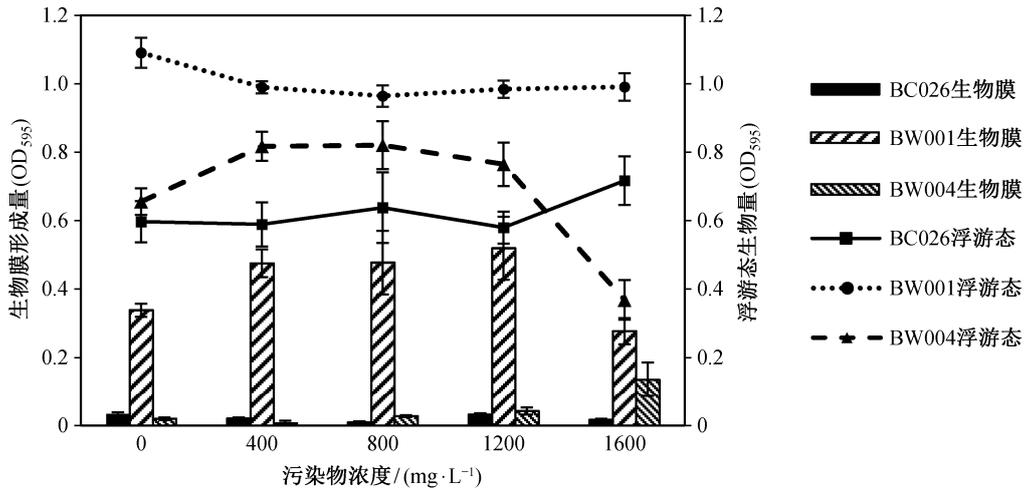


图 7 目标污染物浓度对 NHCs 降解菌浮游态与生物膜态生长的影响(24 小时)

Fig. 7 Amount of biofilm and planktonic cells of degrading bacteria in response to the pollutant concentration (24 hours)

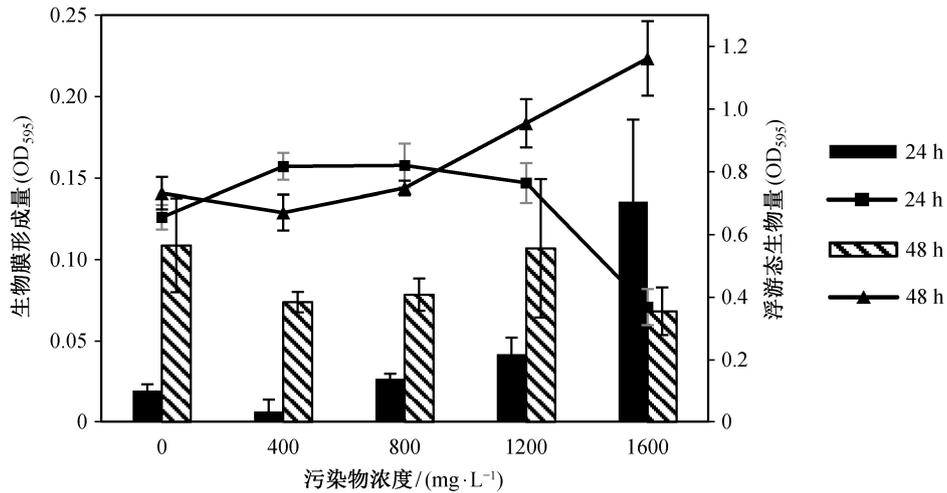


图 8 目标污染物浓度对 BW004 浮游态与生物膜态生长的影响

Fig. 8 Amount of biofilm and planktonic cells of BW004 in response to the pollutant concentration

控系统^[17]、代谢产物阻遏与应激反应^[45]等多种、甚至其他未知的调控机制与途径的影响,有待进一步探究。

3 结论

1) 降解型生物膜的形成受 pH、温度和培养时间的影响显著,各降解菌的最佳成膜条件为: BC026 成膜的最适 pH 为 7, 最适温度为 35℃, 培养时间为 36 小时; BW001 成膜的最适 pH 为 8, 最适温度为 35℃, 培养时间为 48 小时; BW004 成膜的最适

pH 为 7~9, 最适温度为 40℃, 培养时间为 36 小时。

2) BC026 对 pH 的变化较为敏感, 随着 pH 升高, 生物膜量减少速度远远高于浮游态; BC026 和 BW004 对温度的变化较为敏感, 在较高温度 (30~40℃) 条件下, 生物膜态都有逐渐占据优势的趋势; BW001 形成的生物膜对 pH 和温度的响应都不敏感。

3) 降解型生物膜的形成受目标污染物浓度 (在 0~1600 mg/L 范围内) 影响不显著, 不存在明显适合成膜的浓度范围。

参考文献

- [1] Bai Y, Sun Q, Zhao C, et al. Aerobic degradation of pyridine by a new bacterial strain, *Shinella zoogloeoides* BC026. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2009, 36(11): 1391–1400
- [2] Bai Y, Sun Q, Zhao C, et al. Microbial degradation and metabolic pathway of pyridine by a *Paracoccus* sp. strain BW001. *Biodegradation*, 2008, 19(6): 915–926
- [3] 柏耀辉, 赵翠, 肖亚娜, 等. 降解喹啉的假单胞菌 BW003 菌株的分离, 鉴定和降解特性. *环境科学*, 2009, 29(12): 3546–3553
- [4] 郑中原, 赵翠, 温东辉, 等. 喹啉降解菌 BW004 的分离, 鉴定及降解特性. *北京大学学报: 自然科学版*, 2013, 49(4): 683–688
- [5] Jefferson K K. What drives bacteria to produce a biofilm?. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 236(2): 163–173
- [6] Costerton J W, Stewart P S, Greenberg E P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 1999, 284: 1318–1322
- [7] Branda S S, Vik Å, Friedman L, et al. Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 2005, 13(1): 20–26
- [8] Flemming H C, Neu T R, Wozniak D J. The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(22): 7945–7947
- [9] O’Toole G A, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 1998, 30(2): 295–304
- [10] Klausen M, Heydorn A, Ragas P, et al. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology*, 2003, 48(6): 1511–1524
- [11] Conrad J C. Physics of bacterial near-surface motility using flagella and type IV pili: implications for biofilm formation. *Research in Microbiology*, 2012, 163(9): 619–629
- [12] Ma L, Jackson K D, Landry R M, et al. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional *psl* variants reveals roles for the *psl* polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(23): 8213–8221
- [13] Ryder C, Byrd M, Wozniak D J. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Current Opinion in Microbiology*, 2007, 10(6): 644–648
- [14] Yang L, Hu Y, Liu Y, et al. Distinct roles of extracellular polymeric substances in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(7): 1705–1717
- [15] Davies D G, Parsek M R, Pearson J P, et al. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 1998, 280: 295–298
- [16] Purevdorj B, Costerton J W, Stoodley P. Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(9): 4457–4464
- [17] O’Loughlin C T, Miller L C, Siryaporn A, et al. A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110(44): 17981–17986
- [18] Rashid M H, Kornberg A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97(9): 4885–4890
- [19] Patil S A, Harnisch F, Koch C, et al. Electroactive mixed culture derived biofilms in microbial bioelectrochemical systems: the role of pH on biofilm formation, performance and composition. *Bioresource Technology*, 2011, 102(20): 9683–9690
- [20] Nostro A, Cellini L, Di Giulio M, et al. Effect of alkaline pH on staphylococcal biofilm formation. *APMIS*, 2012, 120(9): 733–742
- [21] Zhou G, Shi Q S, Chen Y B. Effects of nutritional and environmental conditions on planktonic growth and biofilm formation of *Citrobacter werkmanii* BF-6. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, 23(12): 1673–1682
- [22] Hunt S M, Werner E M, Huang B, et al. Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(12): 7418–7425
- [23] Shroff J D, Chopp D L, Just C L, et al. The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Molecular Microbiology*, 2006, 62(5): 1264–1277

- [24] Gjermansen M, Nilsson M, Yang L, et al. Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms: genetic elements and molecular mechanisms. *Molecular Microbiology*, 2010, 75(4): 815–826
- [25] Stoodley P, Cargo R, Rupp C J, et al. Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2002, 29(6): 361–367
- [26] Carlen A, Nikdel K, Wennerberg A, et al. Surface characteristics and in vitro biofilm formation on glass ionomer and composite resin. *Biomaterials*, 2001, 22(5): 481–487
- [27] Loo C Y, Young P M, Cavaliere R, et al. Silver nanoparticles enhance *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm detachment. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2014, 40(6): 719–729
- [28] 赵翠.含氮杂环芳烃废水的生物强化处理技术及机理研究[D]. 北京: 北京大学, 2012
- [29] Jianlong W, Xiangchun Q, Liping H, et al. Microbial degradation of quinoline by immobilized cells of *Burkholderia pickettii*. *Water Research*, 2002, 36(9): 2288–2296
- [30] George A. Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments*, 2011(47): e2437
- [31] Merritt J H, Kadouri D E, O'Toole G A. Growing and analyzing static biofilms. *Current protocols in Microbiology*, 2005: 1B.1.1–1B.1.18
- [32] Andersson S, Kuttuva Rajarao G, Land C J, et al. Biofilm formation and interactions of bacterial strains found in wastewater treatment systems. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 283(1): 83–90
- [33] Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, 1980, 9(1): 29–33
- [34] Tielen P, Strathmann M, Jaeger K E, et al. Alginate acetylation influences initial surface colonization by mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological Research*, 2005, 160(2): 165–176
- [35] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 1956, 28(3): 350–356
- [36] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1): 248–254
- [37] Kearns D B. A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(9): 634–644
- [38] 郑中原. SBBR-多相臭氧催化氧化组合工艺处理焦化废水的试验研究[D]. 北京: 北京大学, 2014
- [39] 任源, 韦朝海, 吴超飞, 等. 焦化废水水质组成及其环境学与生物学特性分析. *环境科学学报*, 2007, 27(7): 1094–1100
- [40] Stoodley P, Sauer K, Davies D G, et al. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews in Microbiology*, 2002, 56(1): 187–209
- [41] Fujishige N A, Kapadia N N, De Hoff P L, et al. Investigations of *Rhizobium* Biofilm Formation. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 56(2): 195–206
- [42] Rinaudi L, Fujishige N A, Hirsch A M, et al. Effects of nutritional and environmental conditions on *Sinorhizobium meliloti* biofilm formation. *Research in Microbiology*, 2006, 157(9): 867–875
- [43] Jackson D W, Simecka J W, Romeo T. Catabolite repression of *Escherichia coli* biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(12): 3406–3410
- [44] Jackson D W, Suzuki K, Oakford L, et al. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(1): 290–301
- [45] Domka J, Lee J, Wood T K. YliH (BssR) and YceP (BssS) regulate *Escherichia coli* K-12 biofilm formation by influencing cell signaling. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(4): 2449–2459