

环境中生物膜的菌群结构与污染物降解特性

温东辉^{1*} 张楠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. Department of Civil and Environmental Engineering, Rice University, Houston, TX 77005, USA)

摘要: 生物膜是细菌最常见的生长方式。结构有序、功能分化的生物膜群落为内部细菌提供在不利环境中生存的庇护,其环境功效也日益受到关注。本文综述了多种环境中微生物与不同材料表面相互作用、进而发展为生物膜的机制;介绍了环境工程领域中生物膜的先锋菌种和菌群结构动态变化;介绍了生物膜在污染环境中的抗逆与降解特性。

关键词: 生物膜, 菌群结构, 降解基因, 群体感应, 生物修复

Community structure and contaminant degradation function of biofilm in environmental engineering systems

WEN Dong-Hui^{1*} ZHANG Nan¹ YU Cong² LI Qi-Lin²

(1. College of Environmental Sciences and Engineering, Peking University, Beijing 100871, China)

(2. Department of Civil and Environmental Engineering, Rice University, Houston, TX 77005, USA)

Abstract: Biofilm is the predominant form of life for bacteria in environments. The highly structured, matrix-enclosed, and functionally coordinated community protects bacterial cells from inhospitable environment. Biofilm-mediated pollution control has become an attractive approach in environmental engineering. In this review, the mechanisms through which bacteria interact with material surfaces and develop into biofilms in various environments are summarized; focuses are on the roles of pioneer bacteria in biofilm development, the dynamic changes in bacterial community composition, and the resistance to stresses as well as pollutant degradation characteristics of biofilms in unfavorable environments.

Keywords: Biofilm, Bacterial community structure, Degradation genes, Quorum sensing, Bioremediation

生物膜是细菌最常见的生长方式。自然界和人工环境中的生物膜是细菌及其它微生物细胞的聚集体,黏附于非生物材料或生物机体表面,并被自身合成的胞外聚合物(Extracellular polymeric substance, EPS)基质所包裹^[1]。微生物学和医学研

究表明:结构有序、功能分化的生物膜群落为其内部细胞的生长、繁殖提供保护,使细菌能够抵抗来自噬菌体、抗生素、毒素、免疫活性物质等的冲击,在“恶劣环境”中生存^[2-4]。

有目的地控制微生物附着和生物膜进程,对于

基金项目: 国家自然科学基金海外合作项目(No. 51228802); 国家自然科学基金面上项目(No. 51378019)

*通讯作者: Tel: 86-10-62751923; ✉: dhwen@pku.edu.cn

收稿日期: 2013-08-28; 接受日期: 2013-10-10; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-29

许多环境工程实践至关重要。在城镇给排水管网系统、水和污水处理系统中,有大量工程材料长期浸没于富含微生物的水中,因此材料表面易被微生物黏附并逐渐形成生物膜。为了防止污垢、菌致腐蚀和水质恶化,管壁、器壁和滤膜等必需排斥微生物附着和生物膜形成,但滤膜材料和微生物处理工艺往往限制杀菌剂和消毒剂的使用,因此,通过控制材料表面物化特征以抑制细菌黏附^[5-6],或利用对环境友好的生物抑菌方法来抑制生物膜的产生与发展^[7],具有广阔的应用前景。在另一方面,生物膜在污水处理、原位污染治理与生态修复中的重要作用日益受到关注^[8-9]。为了快速启动和稳定微生物处理工艺中生物转化和降解反应,生物膜法、生态修复等系统必需促进微生物在填料表面的附着,并快速形成动态稳定的生物膜。

1 生物膜的发生与发展机制

以铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)为生物膜研究的模式细菌,生物膜的总体发展过程可总结为5个阶段:(1)最初的细胞附着于某非生物材料或生物机体的表面;(2)细胞分泌EPS从而牢固且不可逆地黏附于该表面;(3)生物膜结构初步形成;(4)生物膜结构成熟分化;(5)细胞从生物膜脱离逸散^[10]。脱离生物膜的细菌将继续寻找适宜的表面,重复上述5个阶段,使生物膜在更广泛的区域发生和发展。

在微观机理上,浮游细菌随机运动靠近材料,及在其表面构筑生物膜群落是一个异常复杂的过程,其中流场条件、材料表面物化特性、细胞基因型是密切相关的3个要素^[11]。早期流态观察和研究表明,水动力条件决定了粒子碰撞频率和表面剪切力水平,由此影响细菌在表面的附着^[12]。早期界面研究认为,由材料物理、化学性质决定的表面粗糙度影响细菌附着和生物膜形成^[13],且存在一个最佳粗糙度,引起最少或最多的附着^[14-15];此外,表面的微观结构也可以改变细菌附着的数量和分布^[6,16]。自20世纪80年代起,细菌附着与生物膜

形成即成为生物学研究的一个热点,除了*P. aeruginosa*,大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)等也是常用的模式菌种。

Daltont H. M.和 March P. E.^[17]总结前十多年的研究认为,鞭毛、菌毛及蛋白受体是细菌附着于表面的重要“抓手”。O'Toole G. A.和 Kolter R.^[18]利用“表面附着缺陷型”突变体*P. aeruginosa*,证明IV型菌毛(Type IV pili)和抽搐运动(Twitching motility)是其在非生物表面形成生物膜的必要条件。Prigent-Combaret C.等^[19]对一株过量合成卷曲菌毛(Curli)的*E. coli*进行研究,发现在最初的细菌附着和生物膜形成中,鞭毛并不重要,菌毛合成才是关键,菌毛直接与材料基底发生作用,再形成菌间维束使细胞群联聚稳固,最后菌体分泌的胞外黏液多糖辅助构筑起厚实的生物膜。而Vallet I.等^[20]对*P. aeruginosa*的进一步研究表明,除了IV型菌毛,鞭毛和伞毛结构在细胞附于表面的过程中发挥重要的协同作用。利用最新的显微摄影技术,Gibiansky M. L.等^[21]记录了野生型*P. aeruginosa*凭借IV型菌毛的抽搐运动“走近”和“脱离”表面的全过程,并采用粒子跟踪算法(Particle-tracking algorithms)量化了细菌行为轨迹。

尽管上述细胞器或生理行为均受到特定基因或基因簇的调控,但是Klausen M.等^[22]认为细菌并不具备规划生物膜进程的模式化遗传程序,而是为适应微环境条件(如营养水平)而演化出多种“攻城掠地”的最优机制,其中一个机制是细菌自身能分泌自诱导剂(Autoinducer, AI),作为信号来调节种群附着和迁移,即所谓的“群体感应(Quorum sensing, QS)”。

QS的概念最早由Fuqua W. C.等学者^[23]提出,这是一种细菌群体行为的调控机制。不同类型的细菌具有不同的QS系统,有的细菌可分泌多种AI,如*P. aeruginosa*有3套QS系统,LasI-LasR和RhlI-RhlR感应系统产生N-酰基高丝氨酸内酯(N-acyl-homoserine lactone, AHL)信号分子^[24],假

单胞菌喹诺酮信号(*Pseudomonas* quinolone signal, PQS)系统产生 2-庚基-3-羟基-4(1H)喹诺酮信号分子^[25];不同细菌还可分泌相同 AI,如许多 G⁻细菌均可产生 AHL 信号分子^[26]。由此可见, QS 调控既在 AI 与受体之间存在专一性,又在基因表达和信号传递中展现出多样性和复杂性。有关 QS 调控生物膜形成和发展的研究持续升温,通过抑制 QS 而干扰生物膜形成的专利也获授权^[27]。然而,学术界对 QS 的作用依然存在一定争议,如 Davies D. G 等^[28]、De Kievit T. R. 等^[29]、Flickinger S. T. 等^[30]判断 QS 对 *P. aeruginosa* 生物膜形成、成熟、分化和裂解起主导作用,而 Heydorn A. 等^[31]、Hentzer M. 等^[32]认为 QS 的调控作用甚微或没有作用;此外,对于 QS 系统与影响生物膜形成的其它因素(如营养条件、流场条件、表面形貌、材料吸附、EPS 种类和浓度等)的关系,也存在较多分歧。

2 生物膜的先锋细菌

由单种细菌形成生物膜尚且如此复杂,由 2 种及以上细菌参与的生物膜形成过程必然更加繁复。Hansen S. K. 等^[33]选择 2 株土壤细菌——不动杆菌(*Acinetobacter* sp. C6)和假单胞菌(*P. putida* KT2440),将其接种于生物膜流动培养室(Biofilm flow chamber),对生物膜进行共聚焦激光扫描显微镜(Confocal laser scanning microscopy, CLSM)观察和功能基因检测,发现假单胞菌在与不动杆菌的竞争中发生基因组突变,使自身适应这一共存关系,衍生群落比始祖群落更加稳定和高产。

更进一步的自然情况是:生物膜通常是一个在表面生长的、由多种细菌及其它微生物(如放线菌、真菌、微型藻类等)构成的微生态系统。最先在“荒芜”的材料表面“栖息定居”的先锋细菌,可通过改变栖息地或周围环境的条件,自我调控细胞方向和菌密度,使之更适合其它微生物的黏附生长^[34-35]。在表面形成生物膜雏形后,后继物种不断参与生物膜的构建,在界面物化特性和水相环境因子影响下,生物膜种群结构在时间和空间上不断演替^[36],产生生物共生、材料腐蚀、膜污染(Membrane

biofouling)、污染物降解等现象。

构成生物膜生态时,先锋细菌的先导作用不容轻视,但是目前相关报道还很少。代表性的研究有三方面。

(1) 在海水环境中, Dang H. Y. 和 Lovell C. R.^[37] 根据扩增 rDNA 限制性酶切片段分析(Amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA),在喷涂聚氨酯的塑料表面,最初 24 h 检测到 γ -变形菌纲的交替单胞菌(*Alteromonas*), 24–72 h 培养期间发现细菌种类丰富起来,以 α -变形菌纲的玫瑰杆菌(*Roseobacter*)为优势细菌。Lee J. W. 等^[38]通过末端限制性酶切片段长度多态性分析(Terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)和 16S rRNA 克隆文库分析,在浸于海水的丙烯塑料、玻璃和钢铁表面,发现假单胞菌、不动杆菌(*Acinetobacter*)、交替单胞菌等 γ -变形菌纲是成膜初期(0–9 h)的优势细菌,而产红色素海洋细菌(*Loktanella*)、甲基营养菌(*Methylobacterium*)、远洋杆菌(*Pelagibacter*)等 α -变形菌纲在后期(24–36 h)占主导地位。

(2) 在淡水环境中, Manz W. 等^[39]采用荧光原位杂交(Fluorescent *in situ* hybridization, FISH)技术和 CLSM 观察,研究了环形旋转反应器内浸于天然河水中的聚碳酸酯表面的生物膜种群结构,发现 β -变形菌纲是生物膜初期(7 d)的优势细菌;其后 α -、 β -变形菌纲及噬纤维菌属-黄杆菌(*Cytophaga-Flavobacteria*)交替在生物膜中取得优势;最后(49 d 后) α -变形菌纲成为生物膜中保持长久优势的菌群。Pohlon E. 等^[40]对浸于德国境内一条山溪中的玻璃表面生物膜的形成过程开展研究,在暴露于溪水 1 h 后即有每平方厘米约 4×10^4 个细菌细胞和 10 个绿藻黏附于玻璃表面, FISH 检测发现噬纤维菌属-黄杆菌是最初 12 h 内的先锋细菌,其后 γ -、 β -变形菌纲开始富集。

(3) 在输水和水处理的人工系统中, Lee D. G. 等^[41]采用变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)结合回收 DNA 测序,

分析了首尔给水系统末端镀锌铁管表面的菌种变化, 在实验第 1 天出现了好氧的鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas*)和厌氧的红细菌(*Rhodobacter*)等, 在其后 70 d 的运行中, 由于给水系统受到潜在的粪便污染而检测到更加复杂的条带分布。Zhang K. 等^[42]采用 ARDRA 和 16S rRNA 基因测序技术, 分析了处理造纸废水的分置式膜生物反应器(Membrane bioreactor, MBR)内浮游态和引起膜污染的生物膜态的微生物群落, 发现二者结构非常不同, 系统发育分析表明短波单菌(*Brevundimonas*)、不粘柄菌(*Asticcacaulis*)、不动杆菌等可能是聚偏二氟乙烯(PVDF)平板微滤膜上的先锋菌种。Miura Y. 等^[43]对处理城市污水的一体式 MBR 内的菌群结构进行了研究, 同样发现在聚乙烯(PE)中空纤维微滤膜表面形成的生物膜具有与反应器内活性污泥非常不同的菌群构成, 根据 FISH 和 16S rRNA 基因测序结果, 推测 β -变形菌纲是成熟生物膜中的优势菌, 并最终导致不可逆的膜污染。

在上述报道中, 环境、水质和材料的不同, 造成了细菌黏附难易程度和生物膜发展速度的不同, 值得关注的是 γ -、 β -、 α -变形菌在生物膜形成过程中的作用。变形菌门中许多细菌(包括模式细菌 *P. aeruginosa* 和 *E. coli*)具有依靠纤毛、鞭毛运动的特性, 这可能是其成为先锋细菌的原因之一。今后尚需深入开展各种情况下的先锋菌属和菌种的分析, 为生物膜的早期控制(有目的地减缓或加速)奠定基础。

3 生物膜的菌群结构

在生物膜的生态研究中, 目前报道最多的是成熟生物膜的菌群结构, 但是有关环境工程领域的生物膜菌群的报道较少。代表性的研究有两方面。

(1) 针对输水系统, Martiny A. C. 等^[44]对一套供水管网模型的管壁生物膜群落结构进行了为期 3 年的跟踪研究, T-RFLP 结果显示群落结构呈现时间尺度上的异质, 而空间差别不大; 在 500 d 后生物膜群落进入稳定状态, 菌种丰富, 优势细菌包括有硝化螺旋菌(*Nitrospira* sp.)、浮霉状菌

(*Planctomyces* sp.)、酸杆菌(*Acidobacterium* sp.)和假单胞菌。Henne K. 等^[45]对德国不伦瑞克市供水管网系统中的主要菌群进行考察, 基于 16S rRNA 单链构象多态性(Single-strand confirmation polymorphism, SSCP)分析, 发现管网水体中细菌主要群落的结构和组成高度相似; 而生物膜具有与之截然不同的群系, 其构成为 α -变形菌、 γ -变形菌、TM6 候选区(Candidate division TM6)、衣原体(*Chlamydiales*)和 β -变形菌。Zhang M. 等^[46]联合采用克隆文库、T-RFLP 和焦磷酸测序(454 pyrosequencing)技术, 对北京市供水管网中生物膜群落结构进行了考察, 在管网不同位点的生物膜结构呈现出高度相似, 与德国城市供水管网相同的是 α -变形菌门占有优势, 其中抗氯消毒剂的鞘氨醇单胞菌是优势属。

(2) 针对污水处理系统, Satoh H. 等^[47]联合使用克隆文库、FISH 和微电极技术, 对工艺为“初级反硝化池(PD)—硝化池(N)—二级反硝化池(SD)—曝气池(A)”的工业废水处理系统, 考察了各池内生物膜的菌群结构、硝化菌和反硝化菌的空间分布和活性, 受到各池功能的影响, 硝化菌主要出现于 N 池和 PD 池上半区的生物膜中, β -变形菌纲中的 2 种亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas europaea* 和 *Nitrosomonas marina*)为氨氧化细菌; SD 池的生物膜细菌具有反硝化能力, α -变形菌纲中的生丝微菌(*Hyphomicrobium* spp.)、沼泽红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*)和红细菌为优势反硝化菌; 此外, β -变形菌纲中的嗜甲基菌(*Methylophilus leisingeri*)只有在投加了甲醇的 SD 池内被检测到。Biswas K. 和 Turner S. J. ^[48]联合采用克隆文库、FISH 和自动核糖体基因间隔分析(Automated ribosomal intergenic spacer analysis, ARISA), 对处理新西兰惠灵顿城市污水的 2 座移动床生物膜反应器(Moving bed biofilm reactor, MBBR)进行微生物群落分析, 发现梭菌(*Clostridia*)和 δ -变形菌门中的硫酸盐还原菌是生物膜的优势菌, 且硫酸盐还原菌与进水中含有一定比例的工业

废水有关。

微生物在构筑生物膜的过程中,在界面发生的各种相互作用必然影响着共存菌种、群落结构和整体功能,但是长期以来却缺乏评价和分析这些相互作用的实验证据。Burke C.等^[49]通过宏基因组序列分析(Metagenomic sequence analysis),探讨了绿色巨大海藻(*Ulva australis*)表面菌膜结构和功能之间的关系,基于同源基因簇(Clusters of orthologous groups, COG)和基因组注释(Genome annotation),样本序列被用于生成功能群落图,发现虽然不同藻种表面所寄居的菌种的亲缘关系很远,但功能构成的相似度高达 70%;换言之,虽然这个“核心功能”广泛地分布于不同类群或谱系,但均与“藻表面-宿主菌”的生态相吻合,这一研究很可能揭示了有关生物膜的一个重要规律:细菌群落的构建取决于功能基因,而不是物种。

4 生物膜的降解特性

有关生物膜形成与发展的生物学研究,为其应用于污染治理与生态修复奠定了理论基础。污染生境对于土著微生物是一种选择压力,细菌倾向于聚集为生物膜群落而在此生境中生存和繁殖,对于细菌个体而言,增强降解功能无疑是其生存之道;而对于生物膜而言,其群落结构的变化可能正如 Burke C.等^[49]所言,也是降解功能导向性的。在生物膜的生命周期里,DNA 释放和转移,即水平基因转移(Horizontal gene transfer)调控着新生物膜的形成^[50];而污染生境中,生物膜中与降解功能相关的基因或质粒的释放、扩散,继而被新宿主菌捕获而发生基因重组或质粒接合,则可同时增加受体菌和群落整体的降解能力^[51]。

基于这种认识,可以针对具体污染物,通过定向培养或强化培养,得到高降解活性的生物膜,应用于实际的污染治理。然而,虽然生物膜法废水处理技术的发明与应用早于活性污泥法(微生物悬浮生长处理法),但是受其处理负荷有限、传质效率较低、卫生条件差等影响,使得活性污泥法长期成

为全球各类废水处理的主流技术,生物强化、基因调控等人工措施主要针对活性污泥系统开展^[52]。直到近年,生物膜在营养失衡、有毒有害的极端污染环境中的抗逆功能和降解机制,才重新引起科研人员的研究兴趣,现代微生物学、分子生物学、分析仪器的也为环境科学与工程领域探索生物膜的复杂形成过程和内部结构提供了全新的研究手段。

在以纯降解菌培养生物膜方面,Lin Q.等^[53]和 Zhu L.等^[54]曾分别将一株吡啶降解菌(*Paracoccus* sp. KT-5)和一株喹啉降解菌(*Pseudomonas* sp. BC027)附着生长于活性竹炭表面,形成生物(膜)活性炭,分别对水中吡啶和喹啉实现快速、彻底的降解,但未对降解菌形成生物膜的机理做探讨。Shimada K.等^[55]将一株萘降解菌——施氏假单胞菌(*P. stutzeri* T10)制成游离菌剂和生物膜,发现生物膜在实验初期不能降解水溶液中的萘,但其后由于高活性的 *P. stutzeri* 脱离生物膜,萘被稳定降解,其降解速率远高于游离菌剂的降解速率;在受到石油污染的土壤中,生物膜可存活 10 周,且其中的降解菌降解了土壤中的萘,而接种的游离菌几乎全部灭绝。

在强化已有生物膜的降解特性方面,Bathe S.等^[56]向实验室规模的序批式生物膜反应器(Sequencing batch biofilm reactor, SBBR)中投加 *P. putida* SM1443,该菌携带有降解除草剂 2,4-二氯苯氧基醋酸(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)的转移质粒 pJP4,当进水不含 2,4-D 时,含有质粒的菌量减少;而当进水为 2,4-D 配水时,未投菌的对照组经过 90 h 降解 40%的 2,4-D,而投菌强化组含有质粒的菌量增加,40 h 后降解 90%的 2,4-D,且在生物膜上发现了转化接合子,证明了由质粒 pJP4 水平转移介导的 2,4-D 强化降解效应。Iasur-Kruh L.等^[57]将由人工湿地废水处理系统中分离的雌二醇降解菌(EDB-LI1)接种于另外两个湿地系统(分别代表早期和成熟期的水塘)的生物膜中,qPCR 检测到 EDB-LI1 存在于强化生物膜中,

且源自成熟期水塘的生物膜经强化后,对雌二醇降解能力更强。另外,Verhagen P.等^[58]向活性污泥添加受到除草剂污染的土壤颗粒,通过富集培养,获得可降解氨基甲酸酯类除草剂的游离状态和生物膜状态的混合菌,且两者具有不同的降解活性;生物膜对氨基甲酸酯降解较慢,同时产生较少的毒性中间产物3-氯苯胺;但生物膜分裂后,即转入游离状态时的高降解活性,表明由生物膜介导的强化技术有助于使那些易于生存于生物膜中、而不易独立悬浮生长的降解菌被选择和富集,从而对环境中除草剂类物质能保持长久的降解能力。

为了辅助挂膜困难的降解菌,Li M.等^[59]探讨了3,5-二硝基苯甲酸(3,5-DNBA)降解菌(睾丸酮丛毛单胞菌,*Comamonas testosteroni* A3)能否与易成膜细菌共存,在玻璃表面构成稳定且保持降解活性的生物膜,研究表明A3菌与*P. putida* M9或嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila* M22)形成的“二元生物膜”,在24 h内显示出最强的抗3,5-DNBA冲击负荷性能,以*gfp*基因标记M22菌并辅以CLSM观察,进一步证实降解菌被易成膜菌包裹,从而使生物膜整体具有稳定的特异降解性。

上述应用型研究启示我们:原已具有抗冲击负荷、低运行费用、易管理维护等优势的生物膜法,通过人工优化其菌群结构、强化其降解活性,将在一些特殊的废水处理,以及废气处理和土壤修复中发挥重要作用。

参 考 文 献

- [1] Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2(2): 95-108.
- [2] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections[J]. *Science*, 1999, 284(5418): 1318-1322.
- [3] Branda SS, Vik A, Friedman L, et al. Biofilms: the matrix revisited[J]. *Trends in Microbiology*, 2005, 13(1): 20-26.
- [4] McDougald D, Rice SA, Barraud N, et al. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal[J]. *Nature Reviews Microbiology*,

2011, 10(1): 39-50.

- [5] Contreras AE, Steiner Z, Miao J, et al. Studying the role of common membrane surface functionalities on adsorption and cleaning of organic foulants using QCM-D[J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(15): 6309-6315.
- [6] Ma J, Sun Y, Gleichauf K, et al. Nanostructure on taro leaves resists fouling by colloids and bacteria under submerged conditions[J]. *Langmuir*, 2011, 27(16): 10035-10040.
- [7] Yu C, Wu J, Contreras AE, et al. Control of nanofiltration membrane biofouling by *Pseudomonas aeruginosa* using D-tyrosine[J]. *Journal of Membrane Science*, 2012, 423/424: 487-494.
- [8] Singh R, Paul D, Jain RK. Biofilms: implications in bioremediation[J]. *Trends in Microbiology*, 2006, 14(9): 389-397.
- [9] Abbasnezhad H, Gray M, Foght JM. Influence of adhesion on aerobic biodegradation and bioremediation of liquid hydrocarbons[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 92(4): 653-675.
- [10] Stoodley P, Sauer K, Davies D, et al. Biofilms as complex differentiated communities[J]. *Annual Reviews in Microbiology*, 2002, 56(1): 187-209.
- [11] Geesey GG. Bacterial behavior at surfaces[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2001, 4(3): 296-300.
- [12] Gjaltema A, Vandermarel N, Vanloosdrecht MCM, et al. Adhesion and biofilm development on suspended carriers in airlift reactors: hydrodynamic conditions versus surface characteristics[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1997, 55(6): 880-889.
- [13] Scheuerman TR, Camper AK, Hamilton MA. Effects of substratum topography on bacterial adhesion[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1998, 208(1): 23-33.
- [14] Medilanski E, Kaufmann K, Wick LY, et al. Influence of the surface topography of stainless steel on bacterial adhesion[J]. *Biofouling*, 2002, 18(3): 193-203.
- [15] Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, et al. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development[J]. *Clinical Oral Implants Research*, 2006, 17(S2): 68-81.
- [16] Hou S, Gu H, Smith C, et al. Microtopographic patterns affect *Escherichia coli* biofilm formation on poly(dimethylsiloxane) surfaces[J]. *Langmuir*, 2011, 27(6): 2686-2691.
- [17] Dalton HM, March PE. Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1998, 9(3): 252-255.
- [18] O'toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development[J]. *Molecular Microbiology*, 1998, 30(2):

- 295-304.
- [19] Prigent-Combaret C, Prensier G, Le Thi TT, et al. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid[J]. Environmental Microbiology, 2000, 2(4): 450-464.
- [20] Vallet I, Olson JW, Lory S, et al. The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, 98(12): 6911-6916.
- [21] Gibiansky ML, Conrad JC, Jin F, et al. Bacteria use type IV pili to walk upright and detach from surfaces[J]. Science, 2010, 330(6001): 197.
- [22] Klausen M, Gjermansen M, Kreft JU, et al. Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilms[J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 261(1): 1-11.
- [23] Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(2): 269-275.
- [24] Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria[J]. Annual Reviews in Microbiology, 2001, 55(1): 165-199.
- [25] Wade DS, Calfee MW, Rocha ER, et al. Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(13): 4372-4380.
- [26] Galloway WRJD, Hodgkinson JT, Bowden SD, et al. Quorum sensing in gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways[J]. Chemical Reviews, 2011, 111(1): 28-67.
- [27] Pan J, Ren D. Quorum sensing inhibitors: a patent overview[J]. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2009, 19(11): 1581-1601.
- [28] Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, et al. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm[J]. Science, 1998, 280(5361): 295-298.
- [29] De Kievit TR, Gillis R, Marx S, et al. Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(4): 1865-1873.
- [30] Flickinger ST, Copeland MF, Downes EM, et al. Quorum sensing between *Pseudomonas aeruginosa* biofilms accelerates cell growth[J]. Journal of the American Chemical Society, 2011, 133(15): 5966-5975.
- [31] Heydorn A, Ersboll B, Kato J, et al. Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(4): 2008-2017.
- [32] Hentzer M, Riedel K, Rasmussen TB, et al. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound[J]. Microbiology-Sgm, 2002, 148: 87-102.
- [33] Hansen SK, Rainey PB, Haagensen JA, et al. Evolution of species interactions in a biofilm community[J]. Nature, 2007, 445(7127): 533-536.
- [34] Allison DG, Gilbert P, Lappin-Scott HM, et al. Community structure and co-operation in biofilms[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2000: 27-29.
- [35] Cho H, Jonsson H, Campbell K, et al. Self-organization in high-density bacterial colonies: efficient crowd control[J]. PLoS Biology, 2007, 5(11): 2614-2623.
- [36] Wimpenny J, Manz W, Szwedzik U. Heterogeneity in biofilms[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2000, 24(5): 661-671.
- [37] Dang HY, Lovell CR. Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(2): 467-475.
- [38] Lee JW, Nam JH, Kim YH, et al. Bacterial communities in the initial stage of marine biofilm formation on artificial surfaces[J]. Journal of Microbiology, 2008, 46(2): 174-182.
- [39] Manz W, Wendt-Potthoff K, Neu T, et al. Phylogenetic composition, spatial structure, and dynamics of lotic bacterial biofilms investigated by fluorescent *in situ* hybridization and confocal laser scanning microscopy[J]. Microbial Ecology, 1999, 37(4): 225-237.
- [40] Pohlen E, Marxsen J, Küsel K. Pioneering bacterial and algal communities and potential extracellular enzyme activities of stream biofilms[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2010, 71(3): 364-373.
- [41] Lee DG, Lee JH, Kim SJ. Diversity and dynamics of bacterial species in a biofilm at the end of the Seoul water distribution system[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005, 21(2): 155-162.
- [42] Zhang K, Choi H, Dionysiou DD, et al. Identifying pioneer bacterial species responsible for biofouling membrane bioreactors[J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(3): 433-440.
- [43] Miura Y, Watanabe Y, Okabe S. Membrane biofouling in pilot-scale membrane bioreactors (MBRs) treating municipal wastewater: impact of biofilm formation[J]. Environmental Science & Technology, 2007, 41(2): 632-638.
- [44] Martiny AC, Jørgensen TM, Albrechtsen HJ, et al. Long-term succession of structure and diversity of a

- biofilm formed in a model drinking water distribution system[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(11): 6899-6907.
- [45] Henne K, Kahlisch L, Brettar I, et al. Analysis of structure and composition of bacterial core communities in mature drinking water biofilms and bulk water of a citywide network in germany[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(10): 3530-3538.
- [46] Zhang M, Liu W, Nie X, et al. Molecular analysis of bacterial communities in biofilms of a drinking water clearwell[J]. *Microbes and Environments*, 2012, 27(4): 443-448.
- [47] Satoh H, Yamakawa T, Kindaichi T, et al. Community structures and activities of nitrifying and denitrifying bacteria in industrial wastewater-treating biofilms[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 94(4): 762-772.
- [48] Biswas K, Turner SJ. Microbial community composition and dynamics of moving bed biofilm reactor systems treating municipal sewage[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(3): 855-864.
- [49] Burke C, Steinberg P, Rusch D, et al. Bacterial community assembly based on functional genes rather than species[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(34): 14288-14293.
- [50] Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, et al. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation[J]. *Science*, 2002, 295(5559): 1487-1487.
- [51] Molin S, Tolker-Nielsen T. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, 14(3): 255-261.
- [52] Zhao C, Wen D, Zhang Y, et al. Experimental and mathematical methodology on the optimization of bacterial consortium for the simultaneous degradation of three nitrogen heterocyclic compounds[J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(11): 6205-6213.
- [53] Lin Q, Donghui W, Jianlong W. Biodegradation of pyridine by *Paracoccus* sp. Kt-5 immobilized on bamboo-based activated carbon[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(14): 5229.
- [54] Zhu L, Huang ZH, Wen D, et al. Preparation and performance of biologically activated bamboo charcoal for removing quinoline[J]. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 2010, 71(4): 704-707.
- [55] Shimada K, Itoh Y, Washio K, et al. Efficacy of forming biofilms by naphthalene degrading *Pseudomonas stutzeri* T102 toward bioremediation technology and its molecular mechanisms[J]. *Chemosphere*, 2012, 87(3): 226-233.
- [56] Bathe S, Mohan T, Wuertz S, et al. Bioaugmentation of a sequencing batch biofilm reactor by horizontal gene transfer[J]. *Water Science & Technology*, 2004, 49(11/12): 337-344.
- [57] Iasur-Kruh L, Hadar Y, Minz D. Isolation and bioaugmentation of an estradiol-degrading bacterium and its integration into a mature biofilm[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(11): 3734-3740.
- [58] Verhagen P, De Gelder L, Hoefman S, et al. Planktonic versus biofilm catabolic communities: importance of the biofilm for species selection and pesticide degradation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(14): 4728-4735.
- [59] Li M, Peng L, Ji Z, et al. Establishment and characterization of dual-species biofilms formed from a 3, 5-dinitrobenzoic-degrading strain and bacteria with high biofilm-forming capabilities[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 278(1): 15-21.