

## 研究报告

一株吡啶降解菌 *Pseudomonas* sp. ZX08 的生物膜形成特性及影响因素熊富忠<sup>1</sup> 赵小希<sup>1</sup> 温东辉<sup>\*1</sup> 李琪琳<sup>2</sup><sup>1</sup> 北京大学环境科学与工程学院 北京 100871<sup>2</sup> Department of Civil and Environmental Engineering, Rice University, Houston, TX 77005, USA

**摘要:**【背景】煤化工企业排放的废水中含有大量难降解、高毒性的有机污染物,采用以高效降解菌为基础的生物强化技术对其进行处理,是一种经济可行的策略;而促进高效降解菌在载体材料表面的生物膜形成,有助于提升生物膜法废水处理系统的效能。【目的】探究一株吡啶高效降解菌 *Pseudomonas* sp. ZX08 的生物膜形成过程和特性,识别不同的环境因子如温度、pH、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>等对其生物膜形成的影响规律,为实现人工调控其在实际废水处理系统中的成膜过程提供理论依据。【方法】采用改良的微孔板生物膜培养与定量方法,以单因子影响实验测定不同条件下菌株在 12 孔板内的生物膜形成量和浮游态细菌量;采用激光共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)观察和分析生物膜的结构特征。【结果】*Pseudomonas* sp. ZX08 菌株具有良好的吡啶降解性能,且生物膜形成能力较强,CLSM 观察到其在载体表面形成的生物膜可达 40–50 μm;生物膜外层的活细胞比例更高,分泌的胞外蛋白也更多。ZX08 菌株的生物膜形成量具有明显的周期性变化特征,12 h、48 h 的生物膜量是相对峰值。ZX08 生物膜形成的最适温度是 25 °C,最适 pH 范围是 7.0–9.0;较高浓度的 NaCl (>0.6 mol/L)和 KCl (>0.4 mol/L)均对 ZX08 的生物膜形成有显著的抑制作用;一定范围内(0–16 mmol/L) Ca<sup>2+</sup>浓度的提高可以促进 ZX08 在 12 孔板底部固-液界面生物膜的形成,浓度更高时则显著抑制生物膜的形成;一定范围内(0–16 mmol/L) Mg<sup>2+</sup>浓度的提高对 ZX08 生物膜形成有促进作用,但促进幅度不大。【结论】吡啶降解菌 *Pseudomonas* sp. ZX08 的生物膜形成能力较强,未来在实际废水处理系统中应用时需要综合考虑各种环境因子对其生物膜形成的影响。

**关键词:** 吡啶, 高效降解菌, 生物膜, 环境因子

Characteristics and influencing factors of biofilm formation by a pyridine-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. ZX08XIONG Fu-Zhong<sup>1</sup> ZHAO Xiao-Xi<sup>1</sup> WEN Dong-Hui<sup>\*1</sup> LI Qi-Lin<sup>2</sup><sup>1</sup> College of Environmental Sciences and Engineering, Peking University, Beijing 100871, China<sup>2</sup> Department of Civil and Environmental Engineering, Rice University, Houston, TX 77005, USA

**Abstract:** [Background] The wastewater discharged by coal chemical industries contains a large number

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (51378019, 51529801)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-10-62751923; E-mail: dhwen@pku.edu.cn

**Received:** 29-08-2019; **Accepted:** 22-11-2019; **Published online:** 02-12-2019

**基金项目:** 国家自然科学基金(51378019, 51529801)

**\*通信作者:** Tel: 010-62751923; E-mail: dhwen@pku.edu.cn

**收稿日期:** 2019-08-29; **接受日期:** 2019-11-22; **网络首发日期:** 2019-12-02

of refractory and highly toxic organic pollutants. It is an economically feasible strategy to treat the wastewater with bioaugmentation technology based on efficient degrading bacteria. Promoting the biofilm formation of degrading bacteria is proved to be beneficial to the performance of the biofilm wastewater treatment system. **[Objective]** To investigate the biofilm formation process and characteristics of a pyridine-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. ZX08, and to identify the influence of different environmental factors such as temperature, pH,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  on biofilm formation, and finally to provide references for regulating biofilm formation in wastewater treatment systems. **[Methods]** A modified microtiter dish biofilm formation assay was used to determine the biofilm formation and the planktonic bacteria growth in the 12-well plate under different conditions; the structural characteristics of biofilm was observed and analyzed by a confocal laser scanning microscope (CLSM). **[Results]** *Pseudomonas* sp. ZX08 showed good pyridine-degrading performance and biofilm-forming abilities. According to the CLSM analysis, the thickness of its biofilms formed at the surface reached 40–50  $\mu\text{m}$ , and the proportion of live cells and protein/cell ratio were higher in the outer layer of the biofilms. A periodic variation was observed in the biofilm formation process in 72 h, and the biofilm biomass at 12 h and 48 h were relative peaks. The optimum temperature for ZX08 biofilm formation was 25  $^{\circ}\text{C}$ , and the optimum pH range was 7.0–9.0. Higher concentrations of NaCl (>0.6 mol/L) and KCl (>0.4 mol/L) significantly inhibited the biofilm formation of ZX08. Within a certain range (0–16 mmol/L), the increase of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration could promote the biofilm formation at the solid-liquid interface of the 12-well plate bottom. Adding  $\text{Mg}^{2+}$  ranged from 0–16 mmol/L also resulted in a slight increase in the biofilm formation of ZX08. **[Conclusion]** The pyridine-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. ZX08 can form thick and stable biofilms, and it needs to comprehensively consider the influence of various environmental factors on its biofilm formation in future applications.

**Keywords:** Pyridine, Effective degrading bacteria, Biofilm, Environmental factors

随着各类合成工业的迅速发展,大量的难降解有机污染物排放到废水中,它们往往具有高稳定性的结构,对微生物具有毒害作用,难以被微生物所分解转化,给传统的废水生物处理法带来很大挑战<sup>[1]</sup>。例如,煤化工企业产生的焦化废水因含有酚类、多环芳烃及含氧、硫、氮杂环物质等多种难降解有机物污染物<sup>[2]</sup>,极难被处理。为此,以高效降解菌筛选和应用为基础的生物强化技术(bioaugmentation)受到广泛关注,其通过向生物处理系统中引入具有特定物质降解功能的微生物,提高有效微生物(effective microorganisms)的浓度,从而提升系统的废水处理效果<sup>[3]</sup>。

吡啶是焦化废水中一种典型的含氮杂环化合物,“缺 $\pi$ 电子结构”使其难以被普通微生物利用<sup>[4]</sup>。诸多研究通过筛选分离高效降解菌,如 *Pseudomonas putida*<sup>[5]</sup>、*Paracoccus* sp.<sup>[6]</sup>和 *Shinella zoogloeoides*<sup>[7-8]</sup>等种属的菌株,来实现对吡啶的生物处理。然而,直接向生物处理系统中投加高效降解菌,使

其以活性污泥的形式发挥作用,则往往会逐渐流失<sup>[9-10]</sup>。生物膜反应器(biofilm reactor)由于在保留微生物、维持菌群稳定方面具有一定优势<sup>[11]</sup>,因此有研究将高效降解菌用于曝气生物滤池(biological aerated filters, BAF)<sup>[12]</sup>、序批式生物膜反应器(sequencing batch biofilm reactors, SBBR)<sup>[13]</sup>等生物膜法处理系统中。对于生物膜反应器来说,缩短“挂膜”过程、快速启动降解反应十分重要<sup>[14-15]</sup>,所以需要格外关注在载体材料表面的生物膜形成能力和形成速率,但目前针对高效降解菌生物膜形成过程的研究还比较少。

生物膜是细菌等微生物最常见的一种群体生长形式,成熟分化的生物膜结构可为内部微生物个体提供抵御外界不利条件的保护机制<sup>[16]</sup>,并更好地发挥生态功能。生物膜的形成过程除了受微生物自身的一些内在机制调控,如群体感应效应(quorum sensing, QS)<sup>[17]</sup>、细胞第二信使环鸟苷二磷酸(c-di-GMP)<sup>[18]</sup>和胞外聚合物(extracellular

polymeric substances, EPS)等<sup>[19]</sup>, 还受外界的温度、pH、金属离子、营养物质、水力条件和材料表面性质等环境因子的影响<sup>[20-21]</sup>。这些结论绝大部分是医学、农业、水产等领域长期以来为了防治细菌感染、抑制生物膜形成, 以一些致病菌为研究对象所获得的; 而在废水处理领域, 专门针对高效降解菌生物膜开展的研究仍然比较匮乏、不够系统。因此, 在借鉴其他领域研究的基础上, 深入探究降解菌生物膜的形成特性及其影响因素具有重要的理论和实际意义。

本研究以一株从焦化废水处理系统中分离的吡啶高效降解菌为对象, 探究了其生物膜形成的过程和特征, 考察了环境因子(如温度、pH、渗透压、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>等)对其生物膜形成的影响规律, 为在实际废水处理反应器中调控降解菌生物膜的形成提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

胰蛋白胨和酵母提取物购自 Oxoid 公司; 琼脂购自 Sigma-Aldrich 公司; 1%结晶紫染液和 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)荧光染料购自北京索莱宝科技有限公司; 荧光染料 LIVE/DEAD<sup>TM</sup> BacLight<sup>TM</sup> Bacterial Viability Kit 和 Fluorescein (FITC) 购自 Invitrogen 公司。实验所用化学试剂均为分析纯及以上级别。

聚苯乙烯 12 孔培养板购自 Corning 公司;  $\mu$ -Slide 4 孔腔室载玻片购自 ibidi 公司。全温振荡培养箱, 苏州培英实验设备有限公司; 冷场发射扫描电子显微镜, Hitachi 公司; 激光共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscopy, CLSM), Leica 公司; IMARIS 软件, Bitplane 公司。

### 1.2 培养基

无机盐培养基(mineral salt medium, MSM)用于吡啶降解菌的驯化、分离以及菌体的离心清洗<sup>[22]</sup>; LB 培养基<sup>[23]</sup>用于纯菌的活化富集和生物膜培养。相应的固体培养基则需加入质量体积比为 1.5%–2.0%的琼脂。所有培养基和盛装器皿均

在 102.9 kPa 下高温高压蒸汽灭菌 20 min 以上。

### 1.3 菌株来源及基本生理生化特性鉴定

实验所用菌株是从位于河北曹妃甸的首钢焦化厂废水处理系统的好氧单元活性污泥中, 以吡啶为唯一碳、氮源, 经驯化、分离和纯化而来, 具体步骤参考赵翠等<sup>[24]</sup>报道的筛选和分离方法, 由此获得的一株具有潜在吡啶降解能力的菌株被命名为 ZX08; 同时将其 16S rRNA 基因序列上传至 NCBI 网站的 GenBank 数据库中, 登录号为 MG760366。对菌株的基本生理生化特性进行鉴定: (1) 使用冷场发射扫描电子显微镜观察对数生长期的菌体形态; (2) 参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[25]</sup>, 对菌株的常见理化特性进行鉴定; (3) 对菌株的运动能力进行测定<sup>[26]</sup>; (4) 对菌株降解吡啶的能力进行测定<sup>[24]</sup>。

### 1.4 CLSM 观察和表征生物膜结构

为实现在原位对生物膜结构的显微观察, 使用  $\mu$ -Slide 4 孔腔室载玻片培养生物膜, 每孔接种 700  $\mu$ L 的菌液, 置于 30  $^{\circ}$ C、90 r/min 的培养箱中培养一定时间。培养完成后, 长有生物膜的腔室载玻片用无菌 PBS 润洗 3 次, 除去游离的细菌。采用两套荧光染料对生物膜结构进行染色: 使用 LIVE/DEAD 染料对生物膜中的活细胞和死细胞分别进行绿色和红色的荧光标记; 使用蓝色的 DAPI 与绿色的 FITC 两种染料对生物膜中的细胞和胞外蛋白分别进行荧光标记。其中, LIVE/DEAD 染料按照使用说明书配制工作液; DAPI 用 PBS 溶液稀释至工作浓度 10  $\mu$ g/mL, FITC 用 DMSO 稀释至工作浓度 1 mg/mL。向生物膜样品滴加适量染色工作液, 避光 30 min 进行染色。之后用 PBS 将样品上残留的染料洗掉。腔室载玻片置于 CLSM 下进行观察。对不同培养条件的生物膜样品, 每个样本随机选取 3 个区域, 从基底表面向上(生物膜游离的一面)进行 Z 轴扫描(逐层扫描, 每 0.5  $\mu$ m 扫描 1 张), 得到系列图像。使用 IMARIS 软件对 CLSM 图像进行 3D 重建, 并对图像中的荧光信息进行定量分析。

### 1.5 微孔板生物膜培养与定量方法

微孔板生物膜培养与结晶紫染色定量法因具有精确性、重复性及可批处理的优势, 在生物膜研究中被广泛采用, 本实验对其进行一定改良<sup>[27]</sup>。具体的操作步骤如下: 首先将各菌株从 4 °C 保藏的 LB 平板上转移接种到装有 LB 液体培养基的锥形瓶中, 置于 37 °C、180 r/min 条件下培养 16–18 h。活化富集后的菌液, 通过 5 000 r/min 离心 7 min, 弃去上清液, 用 MSM 液体培养基振荡清洗 2 遍。清洗、离心后的菌体用 LB 液体培养基稀释至 600 nm 下的吸光度( $OD_{600}$ )约为 0.5。稀释后的菌液接种到 12 孔板中, 每孔接种 1 mL, 另设一 12 孔板以同样方式接种液体培养基作为空白对照, 每个条件用 3 块孔板作为平行。接种后, 将 12 孔板用封口膜封好, 放在摇床培养箱中进行特定温度、转速和时间条件下的培养。

培养完成后, 先从每孔中吸取 125  $\mu$ L 菌悬液置于 96 孔板中, 用酶标仪测定  $OD_{600}$ , 表征浮游态细菌的生长量。再将 12 孔板缓慢浸没于去离子水液面以下, 轻轻地来回晃动 3 次, 以充分洗去未附着的细胞和培养基; 然后置于 60 °C 烘箱中干燥 1 h, 以固定细胞。取出 12 孔板, 每孔加入 2 mL 0.1% 结晶紫染料充分染色 25 min; 再以前述洗涤方式洗去染料, 倒扣于 35 °C 烘箱干燥 2 h 左右去除残余水分。向干燥后的 12 孔板每孔中加入 4 mL 95% 乙醇, 置于 85 r/min 摇床中 45 min, 以充分溶解附着在细胞上的结晶紫。最后从每孔中吸取 125  $\mu$ L 溶液转移到 96 孔板中, 用酶标仪测定  $OD_{595}$ , 表征生物膜的形成量。

### 1.6 不同影响因素实验设置

考察不同培养条件对吡啶降解菌生物膜形成的影响, 具体的实验设置为: (1) 不同培养时间下的生物膜形成: 生物膜分别培养至 12、24、36、48、60、72 h, 再用 1.5 中所述方法进行测定; (2) 温度对生物膜形成的影响: 分别在 5 个温度水平下培养生物膜, 即 20、25、30、35、40 °C; (3) pH 对生物膜形成的影响: 以

NaOH 和 HCl 分别调整培养基初始 pH 至 5 个水平, 即 3.0、5.0、7.0、9.0、11.0; (4) 渗透压对生物膜形成的影响: 向培养基中额外添加不同浓度的 NaCl 和 KCl, 设置 6 个水平分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mol/L; (5)  $Ca^{2+}$  对生物膜形成的影响: 向培养基中添加不同浓度的  $CaCl_2$ , 设置 9 个水平分别为 0、0.5、1、2、4、8、16、32、64 mmol/L; (6)  $Mg^{2+}$  对生物膜形成的影响: 向培养基中添加不同浓度的  $MgCl_2$ , 设置 8 个水平分别为 0、1、2、4、8、16、32、64 mmol/L。以上每组实验均为单因子影响实验, 默认培养条件为 30 °C、pH 7.0、初始菌密度  $OD_{600}$  为 0.5、转速 150 r/min。

### 1.7 统计学分析

实验结果以平均值 $\pm$ 标准偏差的形式表示, 同时使用 SPSS 19.0 软件对不同培养条件下的生物膜形成量和浮游态细菌量进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 并根据方差是否齐性选择 LSD 或者 Tamhane's T2 等多重比较方法, 以  $P < 0.05$  作为具有显著性差异的标准。

## 2 结果与分析

### 2.1 ZX08 的生理生化特性

菌株 ZX08 在对数生长期的菌体在扫描电镜下的照片如图 1 所示, 其呈长杆状, 长度约为 2  $\mu$ m, 直径约为 0.4  $\mu$ m, 具有类似鞭毛的结构。对该菌株常见的生理生化特征进行鉴定, 结果显示: 革

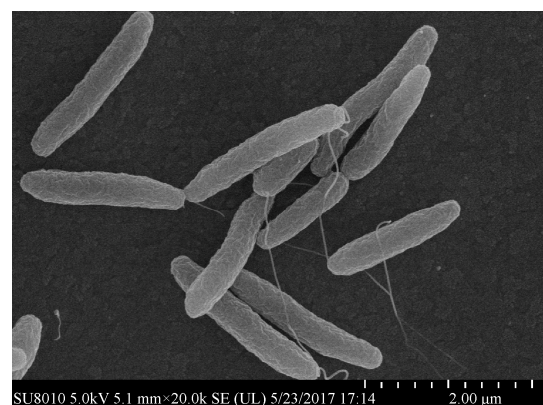


图 1 ZX08 菌体在对数生长期的扫描电镜照片

Figure 1 Scanning electron microscope image of ZX08 cells in the logarithmic phase



兰氏染色为阴性,糖发酵试验阴性,甲基红试验阴性,V-P试验、油脂水解、淀粉水解、氧化酶、过氧化氢酶、硝酸盐还原均为阳性;同时,该菌株具有较强的运动能力,可能与其鞭毛结构有关。将菌株的16S rRNA基因在NCBI数据库进行序列比对,发现其与*Pseudomonas*属的多株细菌具有99%以上的相似性;结合生理生化鉴定的结果,可以判断ZX08是*Pseudomonas*属的细菌。此外,还考察了ZX08对吡啶的降解能力,在初始投菌量为 $OD_{600}$ 为0.1、初始吡啶浓度为500 mg/L、培养温度为30 °C、摇床转速180 r/min的条件下,其对吡啶的降解过程及菌密度变化如图2所示。ZX08在降解体系中先经历一段较长的适应或抑制期(140 h以上);之后开启快速降解阶段,菌密度迅速以指数形式增长,相应地,吡啶浓度也迅速下降;培养至168 h,吡啶基本被完全降解,降解率达到100%。对快速降解阶段进行反应动力学拟合,发现其符合零级反应,拟合方程为 $y=-17.53x+2\ 931$  ( $R^2=0.981\ 0$ ),反应速率常数为17.53 mg/(L·h)。

## 2.2 ZX08生物膜的形态结构

菌株ZX08在 $\mu$ -Slide 4孔腔室载玻片上经过24 h培养形成的生物膜,原位进行荧光染色后,采用CLSM观察获得的三维结构图像如图3A、B所示。在观察视野范围内,细菌细胞及其分泌的胞外蛋白堆积在一起形成了厚实的生物膜结

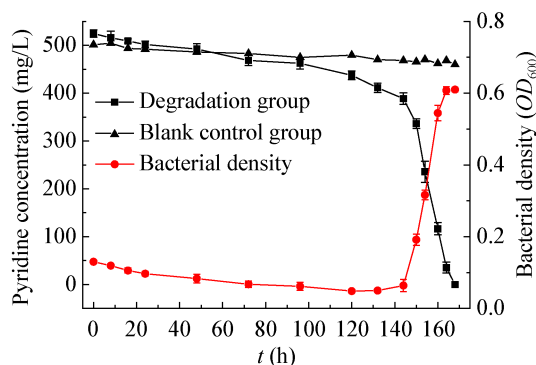


图2 ZX08对吡啶降解过程中的吡啶浓度和菌密度变化曲线

Figure 2 Variation curves of pyridine concentration and bacterial density during the pyridine degradation by ZX08

构,其厚度可达40–50  $\mu\text{m}$ 。由图3A可知,ZX08生物膜结构中分布有活细胞(绿色荧光)和死细胞(红色荧光);以各图层中绿色荧光信号占总荧光信号的比例表示活细胞比例(图3C),发现靠近载玻片表面的生物膜层(内层)的活细胞比例显著低于远离载玻片表面的生物膜层(外层)的活细胞比例,0–10  $\mu\text{m}$ 生物膜层的活细胞比例只有30%左右,而15–45  $\mu\text{m}$ 生物膜层的活细胞比例则达到40%左右。由图3D可知,胞外蛋白(绿色荧光)与细胞(蓝色荧光)在不同生物膜层的分布也不一样,随着距载玻片表面的距离增大(由内层到外层),蛋白/细胞的值从0.8左右升高到3.0以上,这表明外层生物膜中的胞外蛋白相对含量更高,即单位细胞分泌的胞外蛋白更多。

## 2.3 不同因子对ZX08生物膜形成的影响

### 2.3.1 培养时间

由于细菌生物膜的形成是一个动态的过程,因此通过测定细菌在不同时期的生物膜量可以识别其相应的形成和发展规律。如图4所示,在实验设置的培养时间内,菌株ZX08生物膜形成量 $OD_{595}$ 呈现一定的变化规律。培养开始后,生物膜形成量迅速在12 h达到峰值,相应的 $OD_{595}$ 为0.8;24 h和36 h的生物膜形成量逐渐下降;48 h的生物膜形成量又显著升高, $OD_{595}$ 恢复到0.6左右;继续培养,60 h的生物膜形成量显著降低,此时的 $OD_{595}$ 达到最低值0.2;到72 h生物膜量又略微增加。浮游态细菌的密度则表现出不一样的变化规律:12–36 h内细菌密度 $OD_{600}$ 快速升高,36–72 h内细菌密度虽然继续升高,但增长速率明显下降,逐渐趋于稳定。

### 2.3.2 温度

温度一般通过影响酶活性和生化反应速率来影响细菌的生长,在实际的废水处理系统中,降解菌生长所面临的环境温度也会随着气候、运行参数等变化而有明显差异。不同培养温度下,菌株ZX08的生物膜形成量和浮游态细菌生长量如

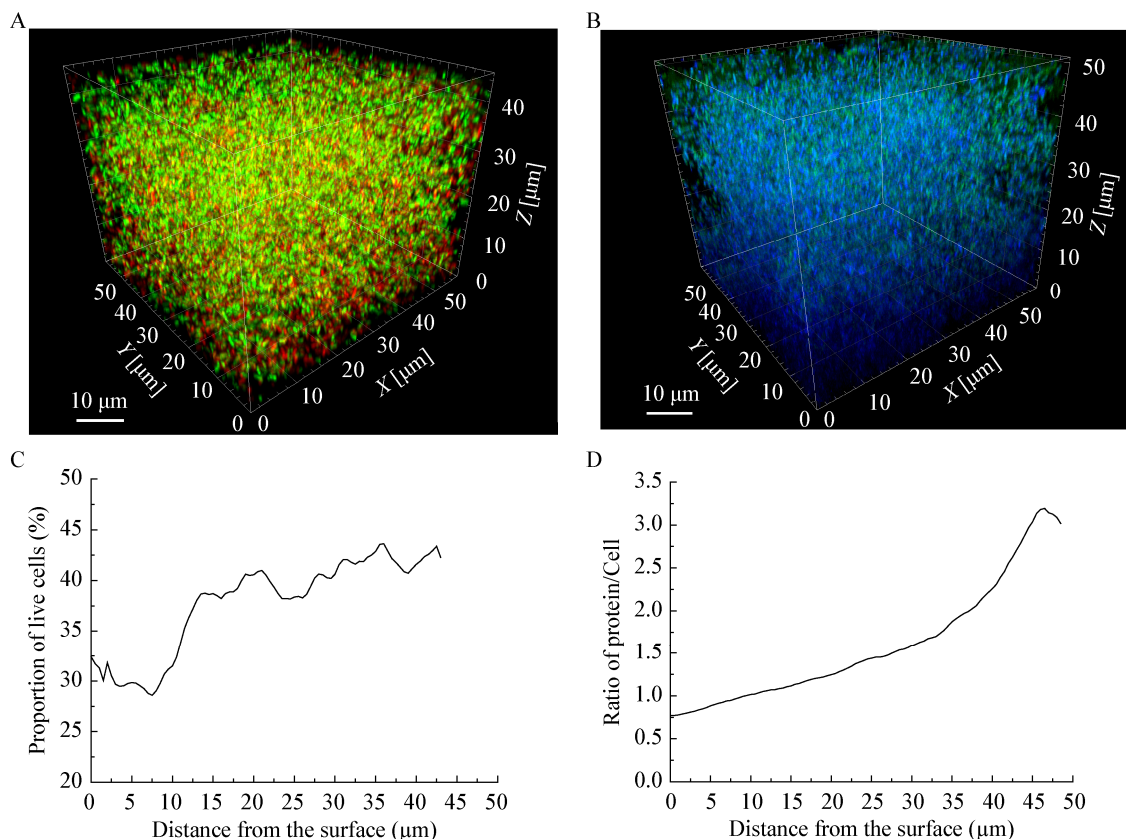


图 3 ZX08 生物膜三维结构的 CLSM 图像及荧光信号定量分析

**Figure 3** CLSM images of 3D structure of biofilm formed by ZX08 and quantitative analysis of the fluorescent signals

注: A: 使用 LIVE/DEAD 染料染色, 绿色荧光为活细胞, 红色荧光为死细胞; B: 使用 DAPI 和 FITC 染色, 蓝色荧光为细胞, 绿色荧光为蛋白质; C: 各层生物膜中活细胞的比例; D: 各层生物膜中蛋白与细胞的比值。

Note: A: Stained with LIVE/DEAD dye, live cells were green and dead cells were red; B: Bacterial cells were stained blue with DAPI, and proteins were stained green with FITC; C: Live cells ratio of different biofilm layers; D: Protein/Cell ratio of different biofilm layers.

图 5 所示。结果显示, 温度对生物膜形成量有显著的影响: 25 °C 时的生物膜量最高,  $OD_{595}$  达到 2.0 左右, 比其他温度下的生物膜量高出 1 倍多; 20、30、40 °C 时的生物膜量没有显著差异, 35 °C 的生物膜量最低; 这说明相对更低的温度或者更高的温度都不利于生物膜的形成。浮游态的细菌生长对温度变化的响应规律不同: 从 25–35 °C, 浮游态细菌生长量随着温度升高而明显增加, 35 °C 是最适生长温度; 温度继续升高至 40 °C 时, 浮游态细菌量又显著下降。

### 2.3.3 pH

不同 pH 条件下, 菌株 ZX08 的生物膜形成量和浮游态细菌量的变化趋势如图 6 所示。在 pH

从 3.0 到 9.0 的范围内, 随着 pH 升高, 生物膜形成量也逐渐升高, pH 9.0 时的生物膜量最高 ( $OD_{595}$  达到 1.1 左右), pH 7.0 时的生物膜量次之, pH 3.0 或 5.0 时的生物膜量非常低 ( $OD_{595}$  在 0.2 以下); pH 继续增加到 11.0, 则生物膜形成量显著下降。这说明中性偏碱的环境更有利于 ZX08 的生物膜形成, 酸性及过碱的环境不利于其形成生物膜。浮游态细菌量的变化规律与此不同, 随着 pH 升高, 浮游态细菌量先增加, 在 pH 5.0 时达到峰值 ( $OD_{600}$  达到 1.2 左右), pH 7.0 时下降到 0.9, 之后大幅下降。这表明中性偏酸的环境有利于浮游态细菌的生长, 过酸及碱性环境不利于其生长。

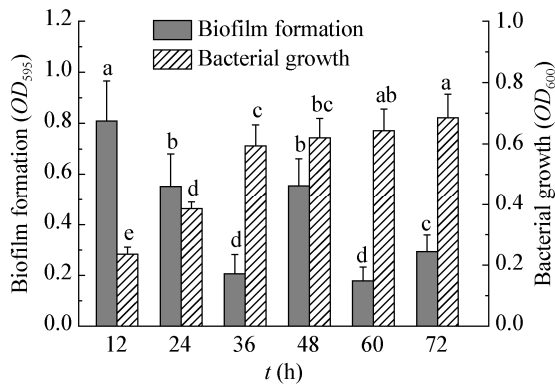


图4 不同培养时间 ZX08 的生物膜形成量及浮游态细菌量

Figure 4 Biofilm formation and bacterial growth of ZX08 at different incubation times

注：图中标注的不同小写字母表示经过单因素方差分析和多重比较后，数据之间具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

Note: Different lowercase letters labeled on the bars represented the significant difference ( $P < 0.05$ ) according to the one-way ANOVA and multiple comparisons.

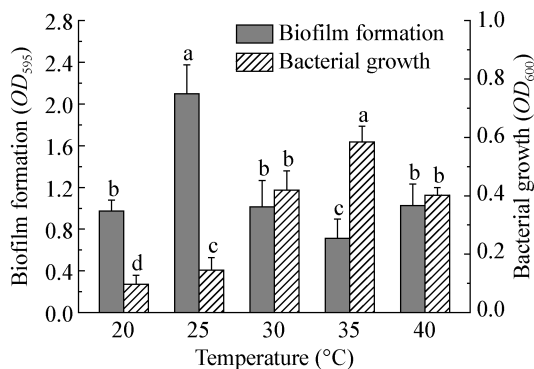


图5 不同培养温度下 ZX08 的生物膜形成量及浮游态细菌量

Figure 5 Biofilm formation and bacterial growth of ZX08 under different temperatures

注：图中标注的不同小写字母表示经过单因素方差分析和多重比较后，数据之间具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

Note: Different lowercase letters labeled on the bars represented the significant difference ( $P < 0.05$ ) according to the one-way ANOVA and multiple comparisons.

### 2.3.4 渗透压

焦化废水成分复杂、污染物浓度高，一般都含有较高的盐度，如  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Cl}^-$  等，过高的盐度通过改变细菌细胞的渗透压，从而影响其代谢功能和生理行为。不同浓度的 NaCl 和 KCl 对菌株 ZX08 生物膜形成量和浮游态细菌量的影响，

分别如图 7 和图 8 所示。在 NaCl 的添加浓度为 0–0.4 mol/L 的范围内，生物膜形成量保持不变 ( $\text{OD}_{595}$  约为 0.6)，NaCl 浓度继续升高，则生物膜形成量显著下降；浮游态细菌量在 NaCl 浓度为 0–0.8 mol/L 的范围内保持升高趋势，NaCl 浓度为 1.0 mol/L 时则又下降。在 KCl 的添加浓度为 0–0.2 mol/L 之间时，生物膜形成量保持不变

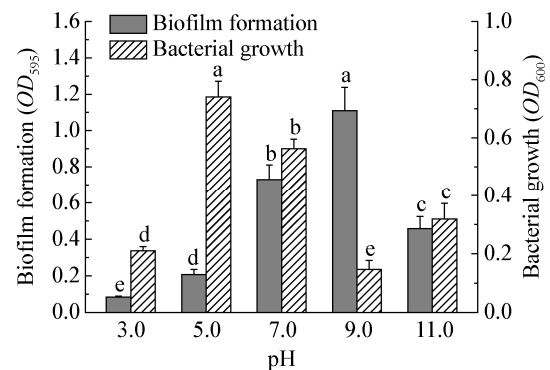


图6 不同 pH 下 ZX08 的生物膜形成量及浮游态细菌量  
Figure 6 Biofilm formation and bacterial growth of ZX08 under different pH values

注：图中标注的不同小写字母表示经过单因素方差分析和多重比较后，数据之间具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

Note: Different lowercase letters labeled on the bars represented the significant difference ( $P < 0.05$ ) according to the one-way ANOVA and multiple comparisons.

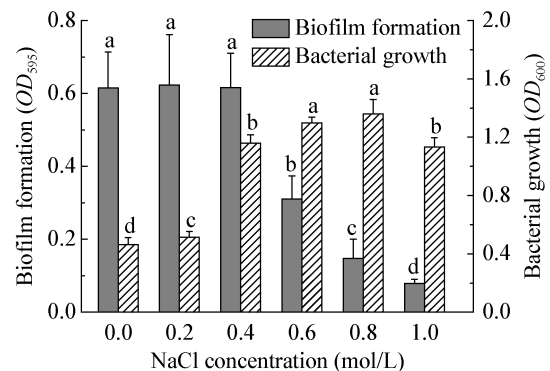


图7 不同 NaCl 浓度添加下 ZX08 的生物膜形成量及浮游态细菌量

Figure 7 Biofilm formation and bacterial growth of ZX08 under different NaCl concentration

注：图中标注的不同小写字母表示经过单因素方差分析和多重比较后，数据之间具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

Note: Different lowercase letters labeled on the bars represented the significant difference ( $P < 0.05$ ) according to the one-way ANOVA and multiple comparisons.

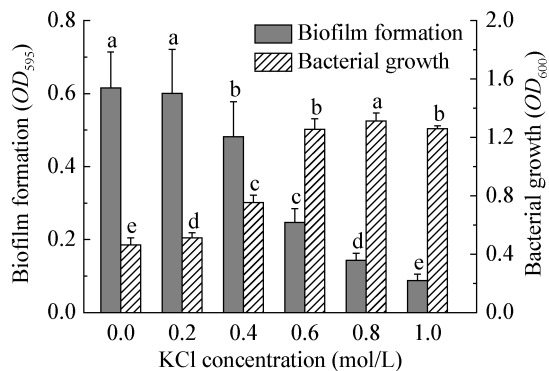


图8 不同 KCl 浓度添加下 ZX08 的生物膜形成量及浮游态细菌量

Figure 8 Biofilm formation and bacterial growth of ZX08 under different KCl concentration

注: 图中标注的不同小写字母表示经过单因素方差分析和多重比较后, 数据之间具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ).

Note: Different lowercase letters labeled on the bars represented the significant difference ( $P < 0.05$ ) according to the one-way ANOVA and multiple comparisons.

( $OD_{595}$  约为 0.6), 在 0.4–1.0 mol/L 之间时, 生物膜形成量随着浓度升高显著下降; 浮游态细菌量的变化趋势与 NaCl 添加组基本一致。以上结果说明, 较高浓度的 NaCl 和 KCl 均对 ZX08 的生物膜形成有抑制作用, 且 KCl 产生抑制作用时的浓度更低; 相反, 较高浓度的 NaCl 和 KCl 则有利于浮游态细菌的生长。

### 2.3.5 $Ca^{2+}$ 浓度

如图 9 所示, 不同添加浓度的  $CaCl_2$  对于菌株 ZX08 的生物膜形成量和浮游态细菌量有明显的影。响。 $CaCl_2$  添加浓度在 0–1 mmol/L 之间, 生物膜形成量基本保持不变, 在添加浓度为 2–8 mmol/L

时, 生物膜形成量逐渐下降, 16 mmol/L 时有所回升, 32–64 mmol/L 时继续降低。ZX08 生物膜形成的位置也与  $CaCl_2$  的添加浓度有关, 如图 10 所示。在  $CaCl_2$  添加浓度为 1 mmol/L 时(图 10A), 生物膜主要形成于 12 孔板的孔壁(即气-液-固界面), 随着添加浓度升高, 生物膜的形成位置逐渐转变为孔板底部的液-固界面(图 10D), 当添加浓度为 32 mmol/L 时(图 10E), 孔壁和孔底都无法形成明显的生物膜。

### 2.3.6 $Mg^{2+}$ 浓度

不同添加浓度的  $MgCl_2$  对于菌株 ZX08 的生物膜形成量和浮游态细菌量的影响, 如图 11 所示。

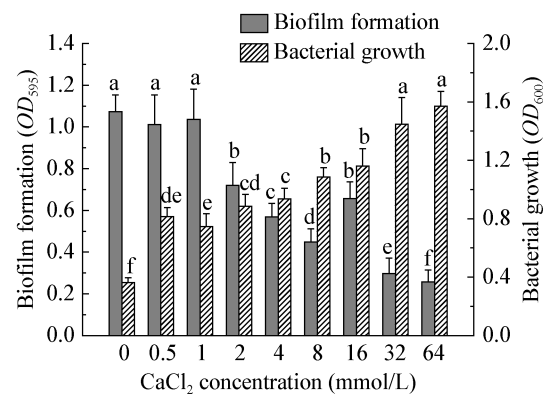


图9 不同  $CaCl_2$  浓度添加下 ZX08 的生物膜形成量及浮游态细菌量

Figure 9 Biofilm formation and bacterial growth of ZX08 under different  $CaCl_2$  concentration

注: 图中标注的不同小写字母表示经过单因素方差分析和多重比较后, 数据之间具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ).

Note: Different lowercase letters labeled on the bars represented the significant difference ( $P < 0.05$ ) according to the one-way ANOVA and multiple comparisons.

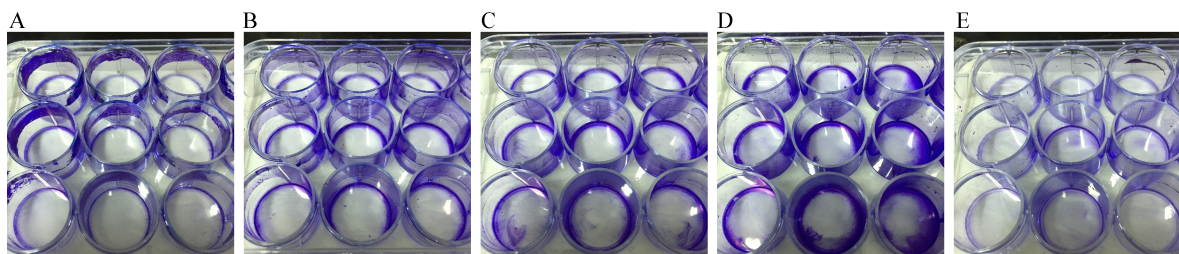


图10 不同  $CaCl_2$  浓度添加下 ZX08 的生物膜形成照片

Figure 10 The photos of biofilm formation of ZX08 under different  $CaCl_2$  concentration

注:  $CaCl_2$  添加浓度分别为: A: 1 mmol/L; B: 4 mmol/L; C: 8 mmol/L; D: 16 mmol/L; E: 32 mmol/L.

Note: The concentrations of added  $CaCl_2$  were: A: 1 mmol/L; B: 4 mmol/L; C: 8 mmol/L; D: 16 mmol/L; E: 32 mmol/L.



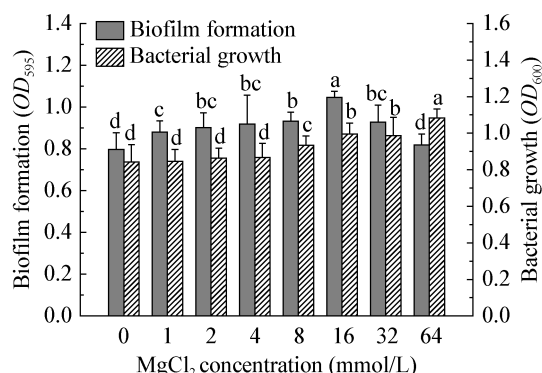


图 11 不同  $\text{MgCl}_2$  浓度添加下 ZX08 的生物膜形成量及浮游态细菌量

Figure 11 Biofilm formation and bacterial growth of ZX08 under different  $\text{MgCl}_2$  concentration

注：图中标注的不同小写字母表示经过单因素方差分析和多重比较后，数据之间具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

Note: Different lowercase letters labeled on the bars represented the significant difference ( $P < 0.05$ ) according to the one-way ANOVA and multiple comparisons.

$\text{MgCl}_2$  添加浓度在 0–16 mmol/L 之间时，生物膜形成量逐渐升高 ( $\text{OD}_{595}$  从 0.8 升高到 1.1)，添加浓度为 32、64 mmol/L 时，生物膜形成量又略微下降，总的来说变化幅度不大。浮游态细菌量在添加浓度为 0–4 mmol/L 没有发生显著变化，在 8–64 mmol/L 时逐渐增长，但增长幅度也不大。这表明在一定浓度范围内， $\text{MgCl}_2$  的添加有利于 ZX08 生物膜的形成。

### 3 讨论与结论

从焦化废水处理系统中分离纯化得到的菌株 *Pseudomonas* sp. ZX08，对于初始浓度为 500 mg/L 的吡啶，在经过一定时间的适应期后，能以 17.53 mg/(L·h) 的速率将其降解完全，展现了良好的吡啶降解性能，具有作为高效降解菌进行实际应用的潜力。扫描电镜照片和运动能力测试的结果显示，ZX08 可能具有鞭毛结构，且由鞭毛介导的运动能力较强。一般认为，鞭毛是细菌接触材料表面的传感器，同时更强的运动能力有助于细菌细胞在材料表面的初始黏附，进而发展形成生物膜<sup>[28]</sup>。相应地，本研究也发现 ZX08 的生物膜

形成能力较强，CLSM 观察到其在材料表面可形成 40–50  $\mu\text{m}$  厚的完整生物膜结构。细胞凋亡在生物膜发展和结构分化过程起了重要作用，*P. aeruginosa* 成熟生物膜中的细胞凋亡是在内部先发生的<sup>[29]</sup>，这印证了 ZX08 生物膜内层的活细胞比例低于外层的活细胞比例，表明经过 24 h 培养的 ZX08 生物膜已经出现细胞凋亡现象。同时，ZX08 生物膜外层细胞分泌的胞外蛋白更多，说明外层细胞的代谢活动更加旺盛，这可能是因为营养物质传输在生物膜结构中存在纵向的递减梯度，这种不均一性也导致了生物膜内部存在多样化的功能区<sup>[16]</sup>。

细菌生物膜的形成和发展过程一般可以划分为以下几个阶段：(1) 初始黏附阶段：细菌细胞通过鞭毛等附属结构感知材料表面，并发生初始黏附；(2) 强化黏附阶段：通过分泌 EPS 实现不可逆黏附；(3) 微菌落形成阶段：已黏附的细胞不断增殖，在材料表面形成微菌落和简单的生物膜结构；(4) 成熟稳定阶段：生物膜结构逐渐成熟分化；(5) 老化裂解阶段：细胞从老化的生物膜结构上脱落逸散，到新的环境中重新形成生物膜<sup>[30]</sup>。本研究也发现，ZX08 的生物膜形成呈现出周期性变化的规律：0–12 h 内，生物膜量快速增长，属于从初始黏附到成熟稳定的阶段；12–36 h，生物膜量逐渐下降，是由于进入老化裂解阶段细胞逐渐脱落逸散，相应的浮游态细菌量也显著上升；36–48 h，生物膜量又回升，说明已脱落的细菌可能重新回到材料表面，开启了新的生物膜周期；48–60 h，生物膜又进入老化裂解阶段；到 72 h，又有新的生物膜形成，但生物膜量已经相对较低，可能是由于营养物质已经耗尽。

温度和 pH 是废水处理系统中细菌所面临的重要环境因子，主要通过影响酶的活性来影响细菌的生长和代谢活动。本研究发现，ZX08 生物膜形成的最适温度为 25  $^{\circ}\text{C}$ ，最适 pH 范围是 7.0–9.0；浮游态细菌生长的最适温度是 35  $^{\circ}\text{C}$ ，最适 pH 范



围是 5.0–7.0。ZX08 生物膜形成量和浮游态细菌量对温度和 pH 的响应规律不同, 表明菌株在不同条件下面临着对这两种生长形式的选择偏好, 环境温度相对较低或者偏碱性会促进细菌由浮游态向生物膜形式的转变。生物膜一般被认为是浮游态的细菌细胞在受到某种环境因子的刺激或诱导后, 发展出的一种具有“应急”特征的集体生长形态<sup>[31-32]</sup>。就温度和 pH 而言, 不同种类细菌的生物膜形成对它们的刺激有不同的响应, 但过于极端的温度或者酸碱条件一般都不利于生物膜形成和浮游态生长<sup>[33-34]</sup>。因此, 在生物膜反应器的挂膜启动阶段, 需要注意调整废水温度和 pH 至合适的范围。

细菌生物膜主要是由细胞、EPS 及溶液(水)组成的复杂且不均匀的动力学生物组织, 各种成分由 EPS 包裹在一起构成聚合的网状结构<sup>[35]</sup>。环境溶液中的  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  及  $\text{Mg}^{2+}$  等离子可能通过影响渗透压、细胞间作用及细胞自身代谢, 进而影响细菌生物膜的形成。本研究发现, 高浓度的 NaCl 和 KCl 对 ZX08 的生物膜形成有抑制作用, 而浮游态细菌对盐度的耐受程度更高。Qurashi 等在几株中度嗜盐菌中也发现相似的结果<sup>[36]</sup>; 此外, 高盐度还会抑制 EPS 的合成分泌, 导致生物膜结构的碎裂化<sup>[34,37]</sup>。但也有研究认为, 当培养基中  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  等离子浓度升高时, 生物膜内外渗透压升高, 有助于外部营养物质向内部的渗透和输送, 从而促进生物膜的形成和发展<sup>[38]</sup>。Janjaroen 等发现离子强度更高时, *E. coli* 细胞在 PVC 材料表面和成熟生物膜表面的黏附能力都有提升<sup>[39]</sup>。由此可以推测, 在一定范围内, 渗透压的提高有利于促进细菌细胞的初始黏附和生物膜内外的营养输送, 而过高的渗透压则会抑制 EPS 的合成、破坏生物膜的结构, 从而抑制生物膜形成。

$\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  等二价阳离子一般可以作为交联剂, 起到联结 EPS 中蛋白、多糖、eDNA 等大分子的作用, 从而维持生物膜结构的稳定<sup>[33]</sup>。本研究发现, 一定范围内(0–16 mmol/L),  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的

提高可以促进 ZX08 在 12 孔板底部固-液界面生物膜的形成, 而不利孔壁气-液-固界面生物膜的形成; 更高的浓度则显著抑制生物膜形成。 $\text{Ca}^{2+}$  除了可以通过非特异性的电荷作用, 以架桥的形式将带负电的胞外多糖等分子连接起来<sup>[40]</sup>; 还可以特异性地与一些细菌细胞表面的蛋白结合, 参与细胞与材料表面的初始黏附<sup>[41]</sup>; 还能作为一种信号调控物质, 影响 EPS 的合成分泌<sup>[42]</sup>。He 等发现 10 mmol/L 的  $\text{Ca}^{2+}$  可以显著促进 *Bacillus* sp. 的细胞黏附和 EPS 分泌, 使生物膜形成量提高 99.1%<sup>[43]</sup>; Rinaudi 等也发现在 0–28 mmol/L 范围内,  $\text{Ca}^{2+}$  可以促进 *Sinorhizobium meliloti* 的生物膜形成<sup>[33]</sup>。但也有研究得出不同的结果,  $\text{Ca}^{2+}$  的添加显著抑制了 *Staphylococcus aureus* 的生物膜形成, 并使生物膜的结构变得更薄且产生很多空洞<sup>[41]</sup>。这说明  $\text{Ca}^{2+}$  对细菌生物膜的影响是比较复杂的, 对不同种类细菌的影响可能具有特异性。具体到本研究中,  $\text{Ca}^{2+}$  对 ZX08 在不同位置的生物膜形成有不同影响, 推测可能与孔板中的水力剪切力有关<sup>[44]</sup>, 但这背后的作用机制还需要进一步研究和分析。对于  $\text{Mg}^{2+}$  而言, 本研究发现其在 0–16 mmol/L 的范围内也对 ZX08 生物膜形成有促进作用, 但提升幅度不大, 小于其他研究中报道的提升幅度<sup>[43,45]</sup>。

总之, 本研究所关注的这株吡啶降解菌 *Pseudomonas* sp. ZX08 具有较强的生物膜形成能力, 环境因子如温度、pH、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  及  $\text{Mg}^{2+}$  等对其生物膜形成都有不同程度的影响。未来若将其应用于含吡啶废水的生物膜法处理系统, 应该综合考虑这些环境因子的影响, 通过人工调控实现快速稳定的挂膜过程。

## REFERENCES

- [1] Herrero M, Stuckey DC. Bioaugmentation and its application in wastewater treatment: a review[J]. Chemosphere, 2015, 140: 119-128
- [2] Xie RS, Wu MM, Qu GF, et al. Treatment of coking wastewater by a novel electric assisted micro-electrolysis filter[J]. Journal of Environmental Sciences, 2018, 66: 165-172
- [3] Safwat SM. Performance of moving bed biofilm reactor

- using effective microorganisms[J]. Journal of Cleaner Production, 2018, 185: 723-731
- [4] He M, Zhang XJ, Qu FP, et al. Study on relativity between aerobic biodegradability and chemical structure of heterocyclic compounds[J]. China Environmental Science, 1997, 17(3): 199-202 (in Chinese)  
何苗, 张晓健, 瞿福平, 等. 杂环化合物好氧生物降解性能与其化学结构相关性的研究[J]. 中国环境科学, 1997, 17(3): 199-202
- [5] Kim MK, Singleton I, Yin CR, et al. Influence of phenol on the biodegradation of pyridine by freely suspended and immobilized *Pseudomonas putida* MK1[J]. Letters in Applied Microbiology, 2006, 42(5): 495-500
- [6] Bai YH, Sun QH, Zhao C, et al. Microbial degradation and metabolic pathway of pyridine by a *Paracoccus* sp. strain BW001[J]. Biodegradation, 2008, 19(6): 915-926
- [7] Sun QH, Bai YH, Zhao C, et al. Biodegradation of pyridine by *Shinella zoogloeoides* BC026[J]. Environmental Science, 2008, 29(10): 2938-2943 (in Chinese)  
孙庆华, 柏耀辉, 赵翠, 等. *Shinella zoogloeoides* BC026 对吡啶的降解特性研究[J]. 环境科学, 2008, 29(10): 2938-2943
- [8] Jin TT, Ren JH, Zhang H, et al. Identification and characterization of a pyridine degrading bacterium[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2016, 25(7): 1217-1224 (in Chinese)  
晋婷婷, 任嘉红, 张晖, 等. 一株吡啶高效降解菌的鉴定及其降解特性[J]. 生态环境学报, 2016, 25(7): 1217-1224
- [9] Chen Q, Ni JR, Ma T, et al. Bioaugmentation treatment of municipal wastewater with heterotrophic-aerobic nitrogen removal bacteria in a pilot-scale SBR[J]. Bioresource Technology, 2015, 183: 25-32
- [10] Zhang J, Wen DH, Zhao C, et al. Bioaugmentation accelerates the shift of bacterial community structure against shock load: a case study of coking wastewater treatment by zeolite-sequencing batch reactor[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(2): 863-873
- [11] Zhao B, Ran XC, Tian M, et al. Assessing the performance of a sequencing batch biofilm reactor bioaugmented with *P. stutzeri* strain XL-2 treating ammonium-rich wastewater[J]. Bioresource Technology, 2018, 270: 70-79
- [12] Bai YH, Sun QH, Sun RH, et al. Bioaugmentation and adsorption treatment of coking wastewater containing pyridine and quinoline using zeolite-biological aerated filters[J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45(5): 1940-1948
- [13] Yue WL, Chen M, Cheng ZQ, et al. Bioaugmentation of strain *Methylobacterium* sp. C1 towards *p*-nitrophenol removal with broad spectrum coaggregating bacteria in sequencing batch biofilm reactors[J]. Journal of Hazardous Materials, 2018, 344: 431-440
- [14] Yang GF, Feng LJ, Yang Q, et al. Startup pattern and performance enhancement of pilot-scale biofilm process for raw water pretreatment[J]. Bioresource Technology, 2014, 172: 22-31
- [15] Mao YJ, Quan X, Zhao HM, et al. Accelerated startup of moving bed biofilm process with novel electrophilic suspended biofilm carriers[J]. Chemical Engineering Journal, 2017, 315: 364-372
- [16] Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life[J]. Nature Reviews Microbiology, 2016, 14(9): 563-575
- [17] Atkinson S, Williams P. Quorum sensing and social networking in the microbial world[J]. Journal of the Royal Society Interface, 2009, 6(40): 959-978
- [18] Wu YC, Ding YZ, Cohen Y, et al. Elevated level of the second messenger c-di-GMP in *Comamonas testosteroni* enhances biofilm formation and biofilm-based biodegradation of 3-chloroaniline[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(4): 1967-1976
- [19] Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. The EPS matrix: the "House of Biofilm cells"[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(22): 7945-7947
- [20] Zhang N, Xiong FZ, Wen DH, et al. Effects of environmental factors on degrading bacterial biofilm formation[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis, 2016, 52(2): 345-353 (in Chinese)  
张楠, 熊富忠, 温东辉, 等. 环境因素对降解型生物膜形成的影响[J]. 北京大学学报: 自然科学版, 2016, 52(2): 345-353
- [21] Xiong FZ, Zhao XX, Liao YH, et al. Effects of surface properties on biofilm formation and the related applications[J]. Microbiology China, 2018, 45(1): 155-165 (in Chinese)  
熊富忠, 赵小希, 廖胤皓, 等. 材料表面特征对生物膜形成的影响及其应用[J]. 微生物学通报, 2018, 45(1): 155-165
- [22] Zhao C, Wen DH, 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
- [23] Sezonov G, Joseleau-Petit D, D'Ari R. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(23): 8746-8749
- [24] Zhao C, Sun QH, Bai YH, et al. Physiological characteristics and application of pyridine degrading bacterial strain *Paracoccus* sp. BW001[J]. Environmental Pollution and Control, 2008, 30(11): 17-22, 26 (in Chinese)  
赵翠, 孙庆华, 柏耀辉, 等. 副球菌 BW001 的生理特性及其对吡啶的降解[J]. 环境污染与防治, 2008, 30(11): 17-22, 26

- [25] Dong XZ, Cai MY. Identification System Manual of Common Bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)  
东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [26] Rashid MH, Kornberg A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(9): 4885-4890
- [27] O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay[J]. Journal of Visualized Experiments, 2011(47): e2437
- [28] Guttenplan SB, Kearns DB. Regulation of flagellar motility during biofilm formation[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2013, 37(6): 849-871
- [29] Webb JS, Thompson LS, James S, et al. Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(15): 4585-4592
- [30] Stoodley P, Sauer K, Davies DG, et al. Biofilms as complex differentiated communities[J]. Annual Review of Microbiology, 2002, 56: 187-209
- [31] Stanley NR, Lazazzera BA. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation[J]. Molecular Microbiology, 2004, 52(4): 917-924
- [32] Flemming HC, Wuertz S. Bacteria and archaea on earth and their abundance in biofilms[J]. Nature Reviews Microbiology, 2019, 17(4): 247-260
- [33] Rinaudi L, Fujishige NA, Hirsch AM, et al. Effects of nutritional and environmental conditions on *Sinorhizobium meliloti* biofilm formation[J]. Research in Microbiology, 2006, 157(9): 867-875
- [34] Zhou G, Li LJ, Shi QS, et al. Effects of nutritional and environmental conditions on planktonic growth and biofilm formation of *Citrobacter werkmanii* BF-6[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013, 23(12): 1673-1682
- [35] Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix[J]. Nature Reviews Microbiology, 2010, 8(9): 623-633
- [36] Qurashi AW, Sabri AN. Biofilm formation in moderately halophilic bacteria is influenced by varying salinity levels[J]. Journal of Basic Microbiology, 2012, 52(5): 566-572
- [37] van der Waal SV, van der Sluis LWM, Özok AR, et al. The effects of hyperosmosis or high pH on a dual-species biofilm of *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa*: an *in vitro* study[J]. International Endodontic Journal, 2011, 44(12): 1110-1117
- [38] Cogan NG, Keener JP. The role of the biofilm matrix in structural development[J]. Mathematical Medicine and Biology: A Journal of the IMA, 2004, 21(2): 147-166
- [39] Janjaroen D, Ling FQ, Monroy G, et al. Roles of ionic strength and biofilm roughness on adhesion kinetics of *Escherichia coli* onto groundwater biofilm grown on PVC surfaces[J]. Water Research, 2013, 47(7): 2531-2542
- [40] Geesey GG, Wigglesworth-Cooksey B, Cooksey KE. Influence of calcium and other cations on surface adhesion of bacteria and diatoms: a review[J]. Biofouling, 2000, 15(1/3): 195-205
- [41] Shukla SK, Rao TS. Effect of calcium on *Staphylococcus aureus* biofilm architecture: a confocal laser scanning microscopic study[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2013, 103: 448-454
- [42] Patrauchan MA, Sarkisova S, Sauer K, et al. Calcium influences cellular and extracellular product formation during biofilm-associated growth of a marine *Pseudoalteromonas* sp.[J]. Microbiology, 2005, 151(9): 2885-2897
- [43] He XY, Wang JP, Abdoli L, et al.  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$  promotes the adhesion of marine bacteria and algae and enhances following biofilm formation in artificial seawater[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2016, 146: 289-295
- [44] Gomes LC, Moreira JMR, Teodósio JS, et al. 96-well microtiter plates for biofouling simulation in biomedical settings[J]. Biofouling, 2014, 30(5): 535-546
- [45] Ye YW, Ling N, Jiao R, et al. Effects of  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  on the biofilm formation of *Cronobacter sakazakii* strains from powdered infant formula[J]. Journal of Food Safety, 2015, 35(3): 416-421