

高通量筛选挂膜功能菌及胞外聚合物与生物膜相关性探究

陈茜蓓, 李琳, 张海峰, 张国智, 施雪卿*

(青岛理工大学 环境与市政工程学院, 青岛 266525)

摘要: 生物膜技术在高盐废水处理领域得到了广泛应用, 目前研究焦点大多集中在高效降解污染物的菌种筛选上, 对于筛选专门用于有效负载固定的挂膜功能菌相对缺乏关注。采用潮间带沉积物作为菌种来源, 构建了一种快速筛选挂膜功能菌的方法。通过对初筛细菌进行 16S rDNA 鉴定, 共鉴定出 13 种不同的菌株, 涵盖了 6 个不同属。通过优化测定成膜量的结晶紫染色法, 确定了酶标仪震荡时间为 60 s, 并采用甲醛对生物膜进行固定, 提高了准确度和测定效率。最终筛选出 3 株成膜量高、成膜速率快的菌株 *Vibrio*、*Shewanella*、*Marinobacterium* 作为复筛出的挂膜功能菌用于实际应用中。此外, 成膜量与胞外聚合物 (EPS) 产量之间的线性拟合分析显示了它们之间存在显著的正相关性 ($R^2=0.91$), 这表明成膜量可作为反映 EPS 产量的指示参数, 用于快速筛选 EPS 高产菌。

关键词: 生物膜; 挂膜功能菌; 高通量筛选; 胞外聚合物 (EPS)

中图分类号: X703.5 文献标志码: A 文章编号: 1673-4602(2025)04-0101-08

High-throughput screening of high-producing biofilm bacteria and study on the correlation between extracellular polymeric substances and biofilm

CHEN Xibei, LI Lin, ZHANG Haifeng, ZHANG Guozhi, SHI Xueqing*

(School of Environmental and Municipal Engineering, Qingdao University of Technology, Qingdao 266525, China)

Abstract: Biofilm technology has been widely used in the field of high-salinity wastewater treatment. Recent studies have been focused on the screening of strains for efficient degradation of pollutants, but relatively little attention has been paid to the screening of high-producing biofilm bacteria specifically used for effective payload immobilization. A rapid screening method of high-producing biofilm bacteria was constructed by using intertidal wetland sediment (IWS) as a strain source. A total of 13 different strains covering 6 different genera were identified through 16S rDNA identification of primarily screened bacteria. By optimizing the crystal violet staining method for the determination of biofilm-forming ability, an enzyme marker with a shaking time of 60 s was determined, and formaldehyde was used to fix the biofilm, which improved the accuracy and efficiency of the assay. Three strains, *Vibrio*, *Shewanella* and *Marinobacterium* with strong biofilm-forming ability and fast biofilm formation rates were finally screened as the high-producing biofilm bacteria and put into practical applications. In addition, the linear fitting analysis between biofilm-forming ability

收稿日期: 2024-02-02

基金项目: 山东省自然科学基金青年项目 (ZR2020QE236)

作者简介: 陈茜蓓 (1999—), 女, 山东潍坊人。硕士, 研究方向为污水处理与资源化。E-mail: 347607008@qq.com。

* 通信作者: 施雪卿 (1985—), 男, 山东青岛人。博士, 教授, 主要从事污水高值生物炼化方面的研究。E-mail: shixq85@163.com。

and extracellular polymers substances (EPS) production showed a significant positive correlation between them ($R^2=0.91$), which suggests that biofilm-forming ability can be used as an indicative parameter reflecting the EPS production for the rapid screening of high-producing biofilm bacteria.

Key words: biofilm; high-producing biofilm bacteria; high-throughput screening; extracellular polymers substances

随着社会的不断发展,工业活动产生了大量的高盐废水(盐度 $>1.0\%$)^[1]。在高盐废水处理领域,物理化学技术(如蒸发、反渗透、离子交换、高级氧化过程和电化学技术等)因其存在较高的成本和二次污染等问题,不及生物法经济高效^[2-3]。生物膜法作为一种典型的、成熟的污水处理技术,通过使功能菌在填料表面大量富集,实现了对优势降解菌属的有效固定,使其能够更好地发挥对污染物的降解能力^[4]。目前,生物膜技术研究的主要聚焦点在于如何实现功能菌株有效负载以及如何解决生物膜系统启动周期长等问题^[5],尤其在面临高盐、高毒性、高浓度有机废水处理时,仍然无法避免系统生物量流失、生物膜脱落等问题。因此,从高效挂膜、固定化的角度出发,建立一种专门用于筛选具有负载固定生物膜能力的挂膜功能菌的方法对解决生物膜处理技术瓶颈问题至关重要。

胞外聚合物(Extracellular Polymeric Substances, EPS)是一种由多糖、蛋白、腐殖酸等组成的聚集体。研究表明, EPS 不仅能够增强生物膜的机械稳定性,还助力于颗粒的形成和稳定,确保污水处理过程中污泥的结构完整性和功能持久性^[6-7]。此外,在“碳中和、碳达峰”的大背景下^[8-9], EPS 被视为一种极具商业价值的生物聚合物,从而引起了众多学者的广泛关注, EPS 的有效富集和回收是实现污水资源化和污水处理绿色发展的重要助力。目前, EPS 主要通过物理(如高速离心、热提取等)或化学手段(如加入 NaOH、EDTA 等)进行提取,并通过量化提取物来评定其产量^[10]。然而,这些提取方法通常耗时较长且处理能力有限,从而制约了评估效率。鉴于生物膜与 EPS 之间的紧密联系,研究成膜量与 EPS 产量之间的相关性变得尤为重要。通过判断成膜量是否能够作为一种指标参数来间接反映 EPS 产量,能够有效简化 EPS 的测定流程。

潮间带沉积物(Intertidal Wetland Sediment, IWS)中微生物大多具有良好的耐盐能力和高效降解污染物的潜力,并且湿润的环境、丰富的有机质以及黏稠的性质,更利于筛选用于高盐废水中的挂膜功能菌^[11]。本研究以 IWS 为菌源构建一种高通量筛选挂膜功能菌的方法,并通过定量拟合,验证生物膜与 EPS 之间是否存在相关性,由此推断微生物 EPS 的表达能力,从而为挂膜功能菌的特性提供更为准确的描述,对未来快速筛选挂膜功能菌和 EPS 高产菌提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验样品

样本取自青岛市黄岛区的海岸潮间带(东经 $120^{\circ}7'$, 北纬 $35^{\circ}55'$), 在低潮期时, 于潮间带表层下大约 5 cm 处采集。

1.1.2 培养基

高盐 R2A 培养基: 胰蛋白胨 0.25 g, 酸水解酪蛋白 0.5 g, 酵母浸粉 0.5 g, 可溶性淀粉 0.5 g, K_2HPO_4 0.3 g, $MgSO_4$ 0.1 g, $C_3H_3NaO_3$ 0.3 g, 蛋白胨 0.25 g, $C_6H_{12}O_6$ 0.5 g, NaCl 30 g, 加超纯水定容至 1 L, 调节 pH 至 7.2, 固体培养基额外加入 2% 的琼脂粉;

高盐 LB 培养基: 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 30 g, 超纯水定容至 1 L, 调节 pH 至 7.2, 固体培养基额外加入 2% 的琼脂粉;

发酵培养基: $C_6H_{12}O_6$ 6 g, NH_4Cl 2 g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 5 g, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 2.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g, 微量元素 0.1 mL, 加超纯水定容至 1 L。

以上培养基均在灭菌锅中以 $121^{\circ}C$ 高温、高压为条件灭菌 15~20 min。

1.1.3 主要试剂

0.1%的结晶紫水溶液来源于北京索莱宝生物科技有限公司;MgSO₄·7H₂O来源于上海麦克林生化科技有限公司;除上述两种试剂外,其他化学试剂均为分析纯,来源于国药集团化学试剂有限公司。

1.1.4 仪器与设备

N4S 紫外-可见分光光度计;SW-CJ-1FD 洁净工作台;ZOLY-180Ve 恒温振荡培养箱;GI54DS 立式自动压力蒸汽灭菌锅;INFINITE 200 PRO 酶标仪;H1750R 高速冷冻离心机等。

1.2 实验方法

1.2.1 挂膜功能菌的初筛

将取回的 IWS 样品进行过筛,过筛后加入盐度为 0.85%的生理盐水中,制成悬液,接种到 R2A 液体培养基中,置于 30 °C、200 r/min 的恒温培养箱中避光培养 2~3 d。随后从锥形瓶中取 1 mL 培养基再次接入 R2A 培养基中,相同条件下再次富集,仔细观察菌的富集情况。转接 3 次后,按 10⁻¹~10⁻⁶ 浓度梯度稀释涂布于高盐 R2A 固体培养基,涂布完成后倒置于 30 °C 培养箱中培养 2~3 d。

待长出菌落后,挑取大小、形态、颜色不同的细菌作为初筛出的细菌,在高盐 R2A 培养基上划线纯化,重复 3 次,直到培养基上长出的菌落为单一形态的菌落。将所得菌株通过甘油保存于-80 °C 冰箱中。

1.2.2 菌种的鉴定

将初筛出的细菌划线接种于 R2A 固体培养基上,30 °C 暗培养,观察菌落形态,主要包括菌落颜色、透明度、边缘特征等。

根据 AHMED 等^[12]提供的煮沸法提取 DNA,将提取的 DNA 送至第三方平台,进行 PCR 扩增及 16S rDNA 基因序列的测定。最终,测定的结果利用 NCBI 的 Blast 数据库进行比对,确定物种的分类,绘制系统发育树。

1.2.3 高通量结晶紫染色法的优化

采用 CPFPEY 等^[13]所介绍的高通量结晶紫染色法,对生物膜形成量进行评价。将细菌接种至 96 孔培养板中培养,培养一段时间后放置于酶标仪下,测定 600 nm 处的吸光度(OD₆₀₀),后用无菌水小心冲洗生物膜表面几次,至无干扰物质。去除水分烘干后加入 0.1%结晶紫溶液 200 μL,静置 10 min,吸出染色液后用无菌水洗涤至流水无色,再倒置到 45 °C 烘箱中干燥。干燥后,观察孔底和孔壁有无生物膜形成。最后,将 200 μL 95%的乙醇溶液加入到干燥后的 96 孔板中,溶解于与生物膜相结合的结晶紫染料。在溶解过程中,保持 30 min,直到完全脱色。然后,将 96 孔板再次置于酶标仪下测定 570 nm 处的吸光度(OD₅₇₀),以此作为评估标准来衡量成膜量。

选取初筛中鉴定出的细菌辅助优化,优化分为两方面:

1) 培养一段时间后,取出 96 孔培养板置于酶标仪下通过调整酶标仪的震荡时间 0~120 s,测定 OD₆₀₀,选出合适的震荡时间以将附着在生物膜上的悬浮细菌完全震荡下来;

2) 测定完悬浮细菌数后,轻轻吸掉培养液,通过比较使用与不使用甲醛溶液固定后的成膜量,进而决定是否采用甲醛溶液进行生物膜固定。

1.2.4 挂膜功能菌的复筛

根据鉴定结果选取不同属的细菌活化后接种到高盐 LB 培养基中富集,恒温过夜培养,随后将菌液离心,取沉淀,用盐度为 0.85%生理盐水进行重悬清洗,重悬 3 次后,用发酵培养基配制菌悬液至 OD₆₀₀ 为 0.05,分别向 96 孔培养板各孔中加入 150 μL 菌液,设置多组平行,置于培养箱继续培养,通过优化后的高通量结晶紫染色法对每隔 12 h 下各菌属的 OD₅₇₀ 进行测定,以评估生物膜形成能力,快速复筛出优质的挂膜功能菌。

1.2.5 成膜量与 EPS 产量之间的相关性评估

将参与复筛的不同属的细菌接种至 LB 培养基中富集,过夜培养,离心重悬 3 次后,分别转接于装有发酵培养基的 96 孔板和锥形瓶中,测定同一时段的 EPS 产量与成膜量,多次重复取平均。通过 Origin^[14]绘出散点图或点线图后进行线性拟合,观察相关性。

1.2.6 EPS的提取

参考 SIMON 等^[15]提出 EPS 的提取方法,具体步骤如下:

- 1) 热碱处理,将接种于发酵培养基中培养的细菌进行离心重悬,收集菌泥,放入烧杯,每 3 g 菌泥中加入 50 mL 超纯水用于打散搅匀,随后向混合液中加入无水 Na_2CO_3 至浓度为 0.5% (w/v),在 400 r/min、80 °C 水浴中加热 35 min 后将混合液转移至 50 mL 离心管中。
- 2) 离心,使用离心机在 6140 r/min、4 °C 下离心 20 min,收集上清液,去除沉淀。
- 3) 透析,用截留分子量为 3500 Da 的透析袋对上清液进行 24 h 透析,以有效去除小分子杂质,透析采用超纯水,每 12 h 更换一次透析用水以增强透析效果。
- 4) 冷冻干燥,将透析后的溶液放于 -80 °C 冰箱凝固 24 h,随后放置于冷冻干燥器中 24 h,获得干燥的 EPS。

2 结果与讨论

2.1 挂膜功能菌的初筛与鉴定

挑取形态、大小及颜色各异的菌落进行纯化,共筛选出 13 株细菌(编号 IWS-1—IWS-13)。通过对这 13 株细菌的 16S rDNA 序列在 NCBI 网站的 Blast 数据库中进行同源性比对,获得潮间带沉积物中分离所得到的 13 株细菌的具体鉴定结果如表 1 所示。

共鉴定出的初筛细菌包括 6 个种属,其中弧菌属(*Vibrio*) 7 株,福氏志贺菌属(*Shigella*) 1 株,希瓦氏菌属(*Shewanella*) 2 株,海杆菌属(*Marinobacterium*) 1 株,栖海面菌属(*Aequorivita*) 1 株,海环杆菌属(*Cyclobacterium*) 1 株。

研究表明,弧菌属、希瓦氏菌属和福氏志贺菌属是已有报道涉及生物膜研究的菌属。例如, SUN 等^[16]从腹泻患者的粪便样本中分离出的副溶血性弧菌显示出强大的生物膜形成能力;安辉等^[17]在研究 *Shewanella putrefaciens* CN32 时发现,该细菌在非饱和环境中形成的生物膜中,胞内外大分子物质的

组成和产生会随着环境条件的变化而变化。然而,针对从潮间带沉积物分离出的海杆菌属、栖海面菌属和海环杆菌属的研究报道则相对较少。

在污水处理领域,初筛出的 13 株菌株各尽其用,通过不同机制有效降解污染物。弧菌属擅长在盐水或海水环境中形成生物膜和进行脱氮反硝化,付雨潼等^[18]研究表明固定化的 *Vibrio alginolyticus* YT-3 对氨氮、硝态氮及总氮的去除效率分别能达到 100.0%、85.0% 与 92.5%。希瓦氏菌属耐盐性强,能适应在 0~15% 盐度范围内生存,对高盐废水有良好的除磷能力^[19]。海杆菌属能够通过代谢脂肪酸形成具有回收价值的聚羟基脂肪酸酯(PHA),还具有降解芳香族化合物的能力^[20],栖海面菌属和海环杆菌属则展现出在极端条件下的适应性和代谢多样性,仍需深入研究。这一系列菌属彰显了微生物在环境治理及污水处理中的潜力。

本研究从不同菌属各选择一株参与复筛,分别选择 IWS-1、IWS-4、IWS-6、IWS-9、IWS-12 和 IWS-13,根据菌属分别命名为菌株 Vib-1、Shi-4、She-6、Mar-9、Aeq-12 和 Cyc-13。

表 1 初筛细菌的种属鉴定

菌株编号	最相似菌株	相似度/%
IWS-1	<i>Vibrio alginolyticus</i> strain NBRC 15630	99.68
IWS-2	<i>Vibrio</i> sp.	99.50
IWS-3	<i>Vibrio neocaledonicus</i>	99.80
IWS-4	<i>Shigella flexneri</i>	100.00
IWS-5	<i>Shewanella marisflavi</i>	98.79
IWS-6	<i>Shewanella marisflavi</i> strain SW-117	97.97
IWS-7	<i>Vibrio</i> sp. MM03	99.90
IWS-8	<i>Vibrio natriegens</i>	97.87
IWS-9	<i>Marinobacterium iners</i> strain NBRC 102606	98.27
IWS-10	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	99.90
IWS-11	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	100.00
IWS-12	<i>Aequorivita</i> sp.	99.50
IWS-13	<i>Cyclobacterium</i> sp.	99.70

2.2 高通量结晶紫染色法的优化

通过 Vib-1 菌株辅助优化高通量结晶紫染色法。如图 1(a)所示,将菌株在 96 孔板中培养至稳定期后置于酶标仪下,震荡不同时间测定 OD_{600} 。结果显示,在 0~60 s 内细菌的吸光度持续上升,最终稳定在 0.13 左右,后延长震荡时间对悬浮细菌数的影响微乎其微。因此,确定震荡时间为 60 s,以确保将附着在生物膜上的悬浮细菌完全震荡脱落,减少其对生物膜形成量测定的影响。

如图 1(b)所示,培养时间为 24 h 时,未经甲醛固定的成膜量约为 0.10,而经过固定后成膜量提升了 18.45%。延长培养时间至 48 h,甲醛固定的成膜量进一步增加到 0.145,相比之下未固定的维持在 0.11 左右,提升了 31.82%。这一趋势表明,无论在哪个测定时间,甲醛固定都能显著降低洗脱过程中的损失,增强染色剂的着色效果,并有效减少生物膜的损失,提高测量的准确性和可靠性。

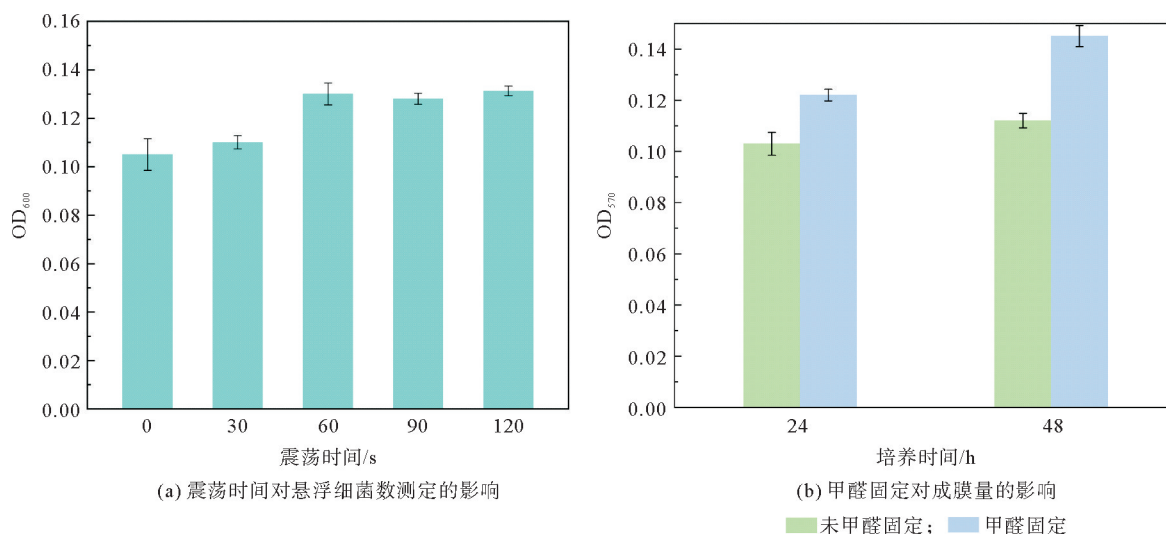


图1 高通量结晶紫染色法的优化

2.3 挂膜功能菌的复筛

初步筛选的 6 株不同属细菌的成膜量每隔 12 h 的变化情况如图 2 所示。观察结果表明,Mar-9 菌株在生物膜形成速度上相较于其他菌株为最快,其在 36 h 的成膜量约为 0.40,成膜量也居于最高水平;Vib-1 和 She-6 这 2 株菌株的成膜量在 60 h 达到最高,分别约为 0.35 和 0.30;Shi-4 的成膜速度较慢,72 h 时成膜量接近 0.28 的峰值;而 Aeq-12 和 Cyc-13 这 2 株细菌虽然成膜速度较快,但其成膜量相对较低,峰值仅约为 0.17。

根据上述比较,筛选出了具有高产生物膜能力的挂膜功能菌。在此过程中,Vib-1、Shi-4、She-6 和 Mar-9 这 4 株细菌的成膜量

显著优于其他菌株,综合考虑这些菌株的成膜速率后,Vib-1、She-6 和 Mar-9 被选定为高效生物膜生产者,可用于后续的高盐废水处理中,作为生物膜工艺中的关键挂膜功能菌。

2.4 Vib-1、She-6、Mar-9 形态学鉴定及其系统发育树

从菌落外观形状、颜色、表面是否光滑等特征对优选的 3 株挂膜功能菌进行观察,得到的结果如表 2 所示。

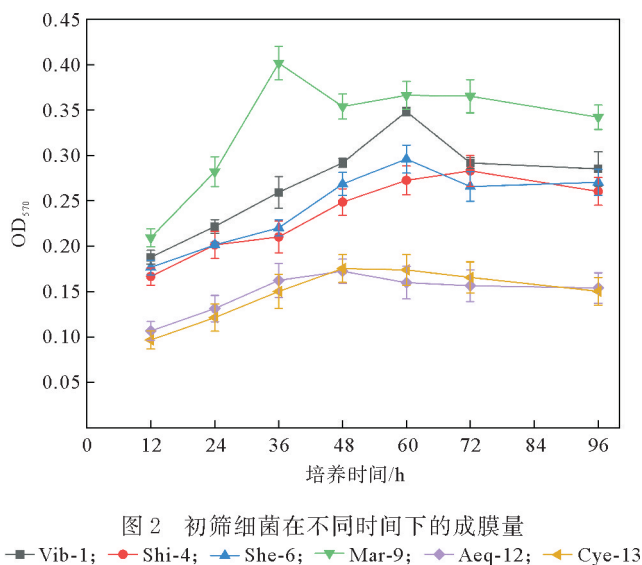


图2 初筛细菌在不同时间下的成膜量

■ Vib-1; ● Shi-4; ▲ She-6; ▼ Mar-9; ◆ Aeq-12; ◆ Cyc-13

通过 MEGA 11.0 软件,构建经过复筛后所筛选出的 3 株不同细菌及其属内其他菌株的系统发育树,采取邻接法(Neighbor-joining)的构建方法,并调整步长值为 100。如图 3 所示。

表 2 Vib-1、She-6、Mar-9 细菌菌落特征

菌株编号	菌落特征		
	颜色	透明度	边缘
Vib-1	乳白色	不透明	整齐
She-6	棕褐色	半透明	整齐
Mar-9	淡黄色	透明	整齐

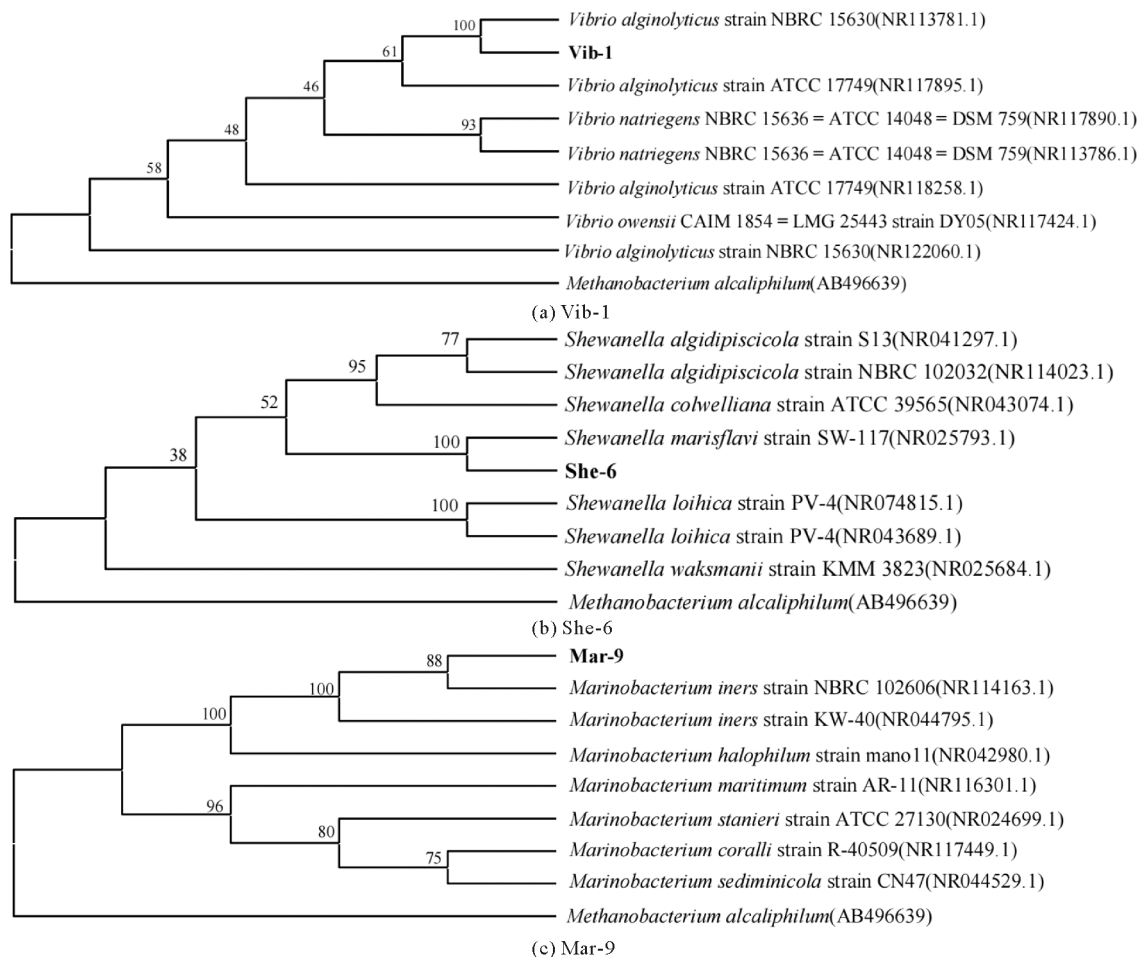


图 3 挂膜功能菌的系统发育树

2.5 生物膜与 EPS 之间的相关性

如图 4(a)所示,测定了参与复筛的 6 株不同属菌株在同一培养时间的 EPS 产量和成膜量,结果表明 Vib-1 和 Mar-9 显示出较高的 EPS 产量(约 390 mg/g,以 VSS 计,下同)和成膜量(约 0.35),而 Aeq-12 和 Cyc-13 两个值均相对较低(EPS 产量约 250 mg/g,成膜量约 0.18),成膜量与 EPS 产量之间存在相似的趋势。进一步的线性拟合分析,如图 4(b)所示,结果显示,线性拟合公式为 $Y=a+bX$,其中 $b=609.47$, $a=160.28$, a 代表拟合直线的起点值, X 代表自变量成膜量, b 代表斜率,正值表明成膜量的增加伴随着 EPS 产量的提高,拟合度 $R^2=0.91$,表明 EPS 产量与成膜量之间存在较强的正相关性。

将成膜量作为评估 EPS 产量的有效指示参数,是一种创新且高效的策略,采用高通量结晶紫染色法,通过简单的吸光度测定即可迅速评估菌株 EPS 的具体产量。传统提取 EPS 的方法往往耗时且劳动强度高,这种方法有效地避免了这些问题。在 2.3 节的复筛中得到的 3 株菌株,不仅适合作为挂膜功能菌,也是 EPS 的高效生产者,显示出卓越的附着力和聚合能力。在实际污水处理中,引入挂膜功能菌对于生物膜和好氧颗粒污泥的稳定性都至关重要。这些菌株通过积极分泌 EPS,不仅能够加强生物膜的结构完整

性,促进高效降解菌的负载固定,减少流失,而且还能有效对抗外来的剪切力,确保颗粒污泥的稳定性,从而提高了污水处理系统的效率和稳定性。

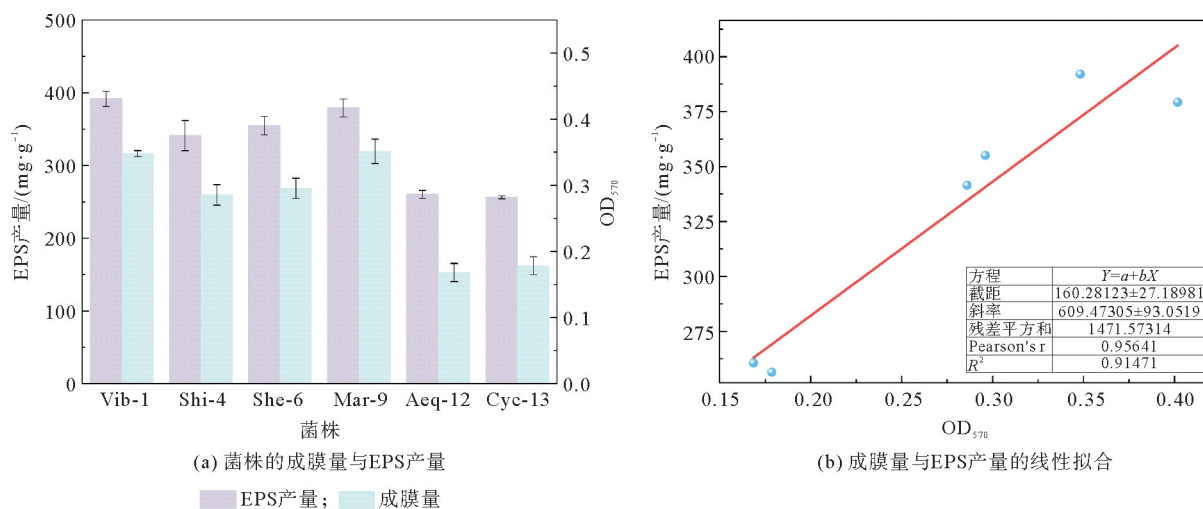


图4 EPS与生物膜的相关性

3 结论

本研究以潮间带沉积物为菌源,在3%的盐度下成功培养筛选并分离出了13株耐盐菌,通过16S rDNA鉴定分别属于6个不同菌属。通过确定酶标仪的震荡时间为60s和采用甲醛固定生物膜进而优化结晶紫染色法,增加了测定过程中的准确度,减少了生物膜的损失。通过优化后的方法筛选出成膜量最高、成膜速率最快的3株菌,分别属于弧菌属(*Vibrio*)、希瓦氏菌属(*Shewanella*)、海杆菌属(*Marinobacterium*),作为耐盐的挂膜功能菌应用于后续高盐废水处理中起到负载固定的作用。

成膜量与EPS产量通过线性拟合表现出较好的正相关性($R^2=0.91$),揭示了挂膜功能菌在形成大量生物膜的同时也表现出高产EPS的特征,具有广泛的环境应用潜力。成膜量可作为EPS的指示参数,构建一种EPS高产菌的高通量筛选方法,可同时快速测定多个样品,节约实验时间和成本,提高筛选速率,为后续研究环境因素影响调控EPS资源回收提供了方法。

参考文献(References):

- [1] ZHAO Y Y, ZHUANG X M, AHMAD S, et al. Biotreatment of high-salinity wastewater current methods and future directions[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2020, 36(3): 37.
- [2] HOU M, LI W, LI H, et al. Performance and bacterial characteristics of aerobic granular sludge in response to alternating salinity[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2019, 142: 211-217.
- [3] MOGHADDAM A, KHAYATAN D, ESMAEILI B P, et al. Biodegradation of pharmaceutical compounds in industrial wastewater using biological treatment: A comprehensive overview[J]. International Journal of Environmental Science and Technology, 2023, 20(5): 5659-5696.
- [4] ZHAO B, CHUAN R X, 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.
- [5] LI J, ZHOU Q, WANG X, et al. Isolation of highly efficient phenol degradation strain and characterization of degradation of phenol[J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2017, 94(1): 012077.
- [6] KARIN S, PAUL S, M D G, et al. The biofilm life cycle: Expanding the conceptual model of biofilm formation[J]. Nature Reviews Microbiology, 2022, 20(10): 608-620.
- [7] KARIN S. The genomics and proteomics of biofilm formation[J]. Genome Biology, 2003, 4(6): 219.
- [8] ZHANG X. Building China's national carbon market that serves carbon peaking and carbon neutrality goals[J]. Chinese Journal of Urban and Environmental Studies, 2022, 10(2): 70-84.
- [9] 杨华磊, 杨敏. 碳达峰碳中和: 中国式现代化的能源转型之路[J]. 经济问题, 2024(3): 1-7.

- YANG Hualei, YANG Min. Peak carbon emission and carbon neutrality: China's path to energy transition in modernization[J]. *On Economic Problems*, 2024(3): 1-7.
- [10] LI S, CHENG J J, WANG J J, et al. Comparison of extraction methods for extracellular polymeric substances (EPS) and dynamic characterization of EPS from sessile microorganisms during pyrite bioleaching[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2022, 10(3): 107922.
- [11] SHI X Q, KWANG K N, LI X R, et al. Investigation of intertidal wetland sediment as a novel inoculation source for anaerobic saline wastewater treatment[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(10): 6231-6239.
- [12] AHMED O B, DABLOOL A S. Quality improvement of the DNA extracted by boiling method in Gram negative bacteria[J]. *International Journal of Bioassays*, 2017, 6(4): 5347-5349.
- [13] CPFPEY B M, ANDERSON G G. Biofilm formation in the 96-well microtiter plate[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2014, 1149: 631-641.
- [14] 王环江, 吴怡逸, 肖寒, 等. Origin8.0 用于物理化学实验数据拟合处理[J]. *山东化工*, 2020, 49(9): 218-221.
WANG Huanjiang, WU Yiyi, XIAO Han, et al. Origin8.0 for processing and analysis tools for physical chemistry experiments data[J]. *Shandong Chemical Industry*, 2020, 49(9): 218-221.
- [15] SIMON F, SALAH A, ANDAERS O A, et al. Extraction of structural extracellular polymeric substances from aerobic granular sludge[J]. *Journal of Visualized Experiments Jove*, 2016(115): 54534.
- [16] SUN J F, LI X, HU Z M, et al. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from stool specimens of diarrhea patients in Nantong, Jiangsu, China during 2018—2020[J]. *Plos One*, 2022, 17(8): e0273700.
- [17] 安辉, 王梓婷, 金若菲, 等. *Shewanella putrefaciens* CN32 非饱和生物膜对环境压力的响应以及与铬的作用[J]. *环境化学*, 2022, 41(6): 1880-1889.
AN Hui, WANG Ziting, JIN Ruofei, et al. Responses of *shewanella putrefaciens* CN32 unsaturated biofilms to environmental stress and interaction with chromium[J]. *Environmental Chemistry*, 2022, 41(6): 1880-1889.
- [18] 付雨潼, 王帅杰, 叶菲, 等. 耐盐好氧反硝化菌 *Vibrio alginolyticus* YT-3 的固定化及对海水养殖废水的脱氮处理[J]. *水处理技术*, 2023, 49(9): 64-70.
FU Yutong, WANG Shuaijie, YE Fei, et al. Immobilization of a halotolerant aerobic denitrifier *Vibrio Alginolyticus* YT-3 and its application in denitrification of mariculture wastewater[J]. *Technology of Water Treatment*, 2023, 49(9): 64-70.
- [19] 刘芳洁. 海洋高效除磷菌株 *Shewanella* sp. 对高盐含磷废水的除磷效能及机理研究[D]. 济南: 山东大学, 2016.
LIU Fangjie. Phosphorus removal efficiency and mechanism for saline wastewater by an aerobic marine strain *Shewanella* sp[D]. Jinan: Shandong University, 2016.
- [20] WANG M R, LI H F, YI J J, et al. Production of polyhydroxyalkanoates by three novel species of *Marinobacterium*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 195: 255-263.

(责任编辑 张晓靖; 英文校审 程文华)