

文章编号: 0253-2239(2010)s100503

# 耐冷菌生物活性的荧光光谱特性评价

常冠钦 宋存义 汪 莉

(北京科技大学土木与环境工程学院, 北京 100083)

**摘要** 生活污水处理系统在温度较低情况下对污水的处理效果较差。针对这一问题,在实验室自行培育了四株耐冷菌,利用生物共聚焦荧光层析光谱技术测定了耐冷菌的生物活性,并用扫描电镜研究了耐冷菌的生物形态。结果表明四株耐冷菌均属杆菌,有较强的环境适应能力,且生物活性较高。生物荧光层析光谱结果表明在环境温度低于 15 ℃时,耐冷菌的生物活性高于中温菌的生物活性,此时的中温菌已经不能很好地发挥其降解功效,为了减少温度降低对污水降解率下降的影响,环境温度低于 15 ℃时,在污水中加入耐冷菌非常必要。实验测试了几种菌对污染物的降解作用,结果表明 15 ℃时在污水中加入耐冷菌混合菌,污水的总磷去除率提高了 80%;总氮去除率提高了 53.5%。

**关键词** 光谱学;生物荧光层析光谱;荧光强度;耐冷菌;生活污水

**中图分类号** O461; X703.1 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/AOS201030.s100503

## Evaluation of Biological Activity of Psychrophilic Bacteria with Fluorescence Spectroscopy

Chang Guanqin Song Cunyi Wang Li

(College of Civil and Environmental Engineering, University of Science and Technology, Beijing 100083, China)

**Abstract** Four psychrophilic bacteria are cultured in the laboratory to resolve the low domestic sewage treatment load at low temperature. Scanning electron microscope is used for observing the morphological feature and biological fluorescence spectroscopy is employed to measure the bioactivity of the four psychrophilic bacteria. The results show that the four bacteria are all from bacillus and have high bioactivity and strong adaptability. The bioactivities of psychrophilic bacteria are higher than those of mesophilic bacteria when the temperature is below 15 ℃. Therefore, it is necessary to add psychrophilic bacteria into domestic sewage to increase the degradation rates since the mesophilic bacteria almost lose their bioactivities when the temperature drops below 15 ℃. The value of the degradation rate is measured and the result shows that the removal ratio of total nitrogen increase 53.5% and the removal ratio of total phosphorus increases 80% in our experiment by using the mixed psychrophilic bacteria.

**Key words** spectroscopy; biological fluorescence; fluorescence intensity; psychrophilic bacteria; domestic sewage

**OCIS codes** 170.6280; 300.6280

## 1 引 言

我国北方地区冬季气温较低,生活污水的温度一般在 4~15 ℃。温度降低会导致污水处理系统处理效果大幅下降,归根结底是由于温度降低影响了微生物的生长及代谢并使污水处理系统中的微生物群系发生了变化<sup>[1~4]</sup>。在温度下降的过程中,占优势地位的中温菌的活性逐渐降低,到了一定的温度

后失去活性,不再成为优势菌群<sup>[5]</sup>。而适合于低温条件下生长的耐冷菌,由于自身生理特性及各种生态因子的限制,在数量上无法自动上升到一定的程度,从而导致了低温条件下污水处理系统中优势菌群数量极少,处理效果极差<sup>[6]</sup>。目前已有污水处理系统中耐冷菌的研究报道<sup>[7]</sup>,但对耐冷菌的作用机理研究甚少,尤其是在表述耐冷菌的生物活性上,常

收稿日期: 2010-03-18; 收到修改稿日期: 2010-06-11

作者简介: 常冠钦(1976—),女,博士,主要从事废水处理及烟气脱硫方面的研究。E-mail: guanqinchang@yahoo.com

导师简介: 宋存义(1951—),男,教授,博士生导师,主要从事烟气脱硫、废水及污泥的处理等方的面研究。

E-mail: hj@hj.ustb.edu.cn

用比生长速率及生长曲线来表示,但比生长速率和生长曲线只是从侧面来反应菌体的活性对于直接测定细菌的生物活性<sup>[8]</sup>,并无有效的方法。Leblanca等<sup>[9]</sup>采用紫外激发和光谱探测的方法,利用芳香氨基酸、核酸、色氨酸和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)在不同菌种间的差别,成功地将25种不同菌种的悬浊液进行了区分。在对癌症的早期诊断研究中,Wu等<sup>[10]</sup>发现,通过测量细胞线粒体的光谱,可有效反映生物组织新陈代谢的变化,提高早期癌症诊断率。本文将这一方法应用到了对耐冷菌生物活性的评价上,培养并选育出一批效果理想的耐冷菌,利用生物荧光光谱法定量对比了耐冷菌和正常菌的生物活性。并将选育出的耐冷菌用于污水处理,取得了良好的效果。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验菌种

将冬季从北京市清河污水处理厂采集来的污泥置于0℃的冰浴中保存,并从该活性污泥中分离、纯化出四株耐冷菌,分别为H-01,H-02,H-03和H-04。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 用 Quanta200 扫描电子显微镜观察耐冷菌的表面形态

微生物的表面形态也是基因表达的重要特征,

三维扫描电镜可以更清晰、真实的反映微生物表面形态及微生物的生长状况。实验采用 Quanta200 扫描电镜对耐冷菌的表面形貌进行观察。Quanta200 扫描电镜的图像分辨率高、放大倍数大、富于立体感。本实验中扫描电镜的放大倍数为8000倍。

#### 2.2.2 用生物荧光层析光谱测定耐冷菌的生物活性

细菌细胞内的还原态烟酰胺腺苷二核苷酸(NADH)的含量表征了细菌新陈代谢的强度<sup>[11~13]</sup>,即生物活性强度。

实验利用单光子共聚焦生物荧光层析光谱仪对 H-01、H-02、H-03、H-04 及一株在 15℃ 下分离所得的中温菌在不同温度下的荧光信号进行了采集,通过对其荧光光谱的测量,探测细菌中 NADH 的相对浓度。细菌样品置于显微系统恒温装置内,实验设备的详细介绍见文献[14]。实验装置如图1所示,实验中,激光器采用的是美国 CrystaLasers 公司的 QUV-355-050,光谱仪采用 Oriel MS125,600 lp/mm 光栅,实现光谱分辨率为 0.43 nm 的光谱测量。光谱采集使用了美国 Princeton Instruments PIXIS3-80℃ 深制冷 CCD。系统采用共聚焦层析光谱技术,利用 20× 显微物镜对细菌样本进行三维扫描探测。

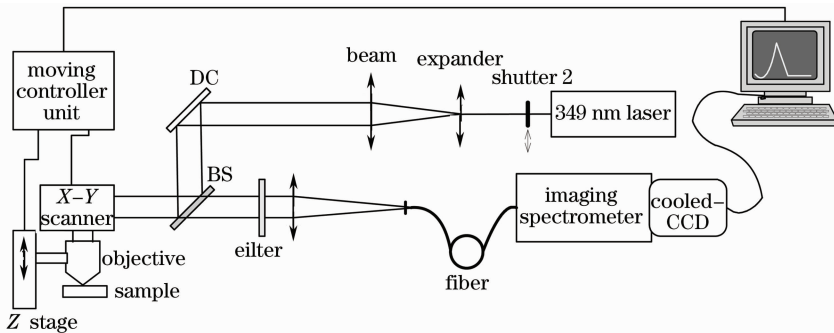


图1 层析荧光光谱测量系统示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the depth-resolved fluorescence spectroscopy system

#### 2.2.3 污染物降解实验

将四种耐冷菌、一种中温菌以及耐冷菌的混合菌接种于装有100 ml的LB培养液的锥形瓶中,在15℃条件下,以120 r/min振荡培养72 h。取出已经培养好的菌液离心沉淀,将沉淀物稀释至离心前的吸光值,以10%的接种量接种于1000 ml生活污水中。然后置于15℃下恒温摇床中振荡培养1个月,每隔1天取样,测定污水中的总氮、总磷含量。

## 3 结果和讨论

### 3.1 用 Quanta200 扫描电子显微镜观察耐冷菌的形态

扫描电镜下各种耐冷菌的外貌形态如图2所示。从图中可以看出四种菌株均为杆状菌。H-01菌体周围分泌有大量的黏液,致使其菌体周围有许多突出的触角与基质相连,黏液会增强细菌菌体自身的免疫性能,保护其免受环境因素突变带来的损伤,因此H-01菌体的黏液分布有很重要的意义,可

以很好地帮助其适应不同的环境,进而在不同的环境下都有较强的代谢功能。H-02 的部分菌体被一个囊状物包围,这种囊状物同样也可以提高菌体对环境的适应能力,让菌体在外来环境有变化的情况下,不至于失去活性而死亡,也就是说 H-02 的这些囊状物可以帮助 H-02 在环境温度降低的情况下还

能保持较高活性,从而降低对污染物去除率的影响。H-03 除了有大量的变形长杆菌外,还有一些短杆菌,不同的菌体分布有利于污水处理效果的提高。H-04 有少量细胞处于分裂状态,因此说明 H-04 的代谢能力比较强,也就是说此时的 H-04 活性还比较高,能很好的降解污染物。

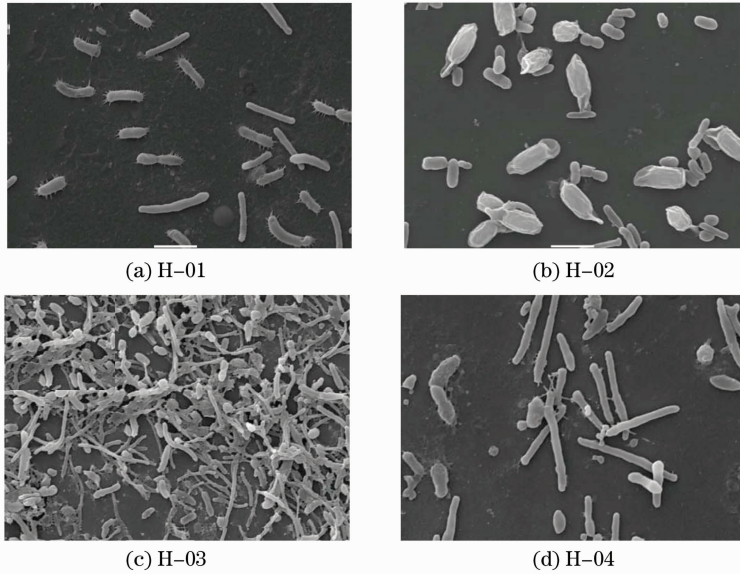


图 2 四株耐冷菌的外貌形态

Fig. 2 Morphological features of the four bacteria

### 3.2 用生物荧光层析光谱测定耐冷菌的生物活性

检测结果如图 3 所示。在活性有机体中,NADH 的激发峰在 350 nm,相应的荧光峰在 450 nm<sup>[15]</sup>。

H-01,H-02,H-03,H-04 及中温菌的生物活性强度

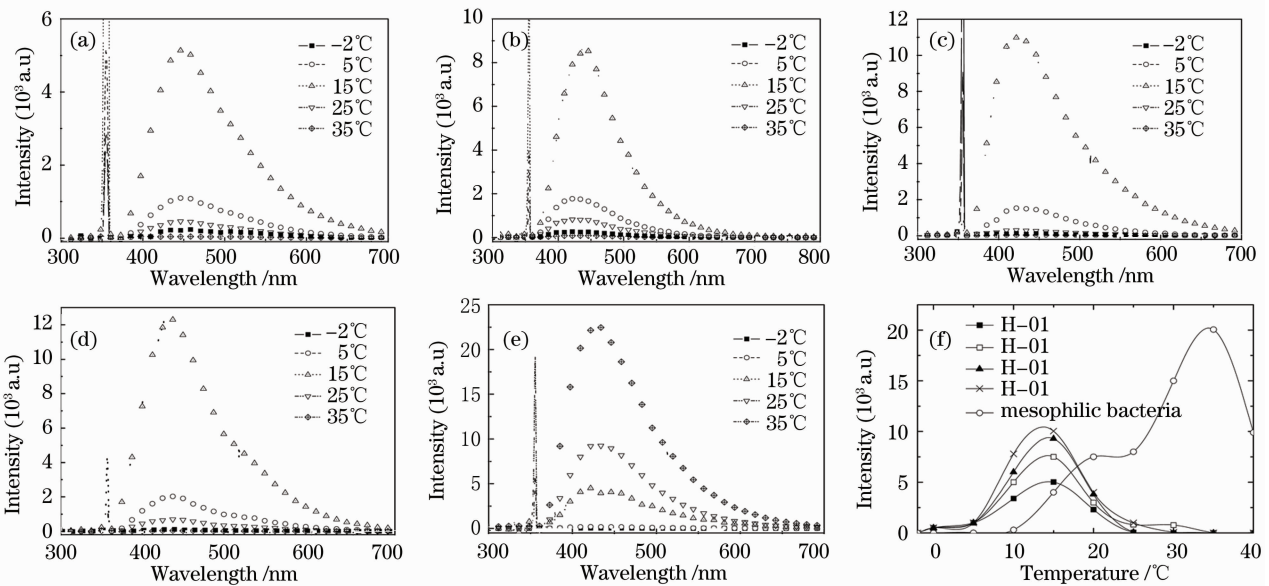


图 3 (a)~(e): 不同温度下 H-01, H-02, H-03, H-04 及中温菌的生物荧光层析光谱;

(f) 不同菌种不同温度下的荧光强度对比

Fig. 3 (a)~(e): Autofluorescence spectrum for H-01, H-02, H-03,

H-04 and mesophilic bacteria at different temperature respectively;

(f) comparison of fluorescence intensity for different bacteria at different temperature

图 3(a)~(e) 是不同菌种不同温度下的生物荧光层析光谱, 图 3(f) 是不同菌种在不同温度下的荧光强度比较曲线。从图中可以看出: 不同的菌种荧光光谱虽然不同, 但它们均显示相同的规律, 即耐冷菌和中温菌的荧光强度随温度的升高, 均呈现先上升而后下降的规律。当温度低于 15 °C 时, 耐冷菌的荧光强度明显大于中温菌; 当温度高于 15 °C 时, 中温菌的荧光强度迅速上升, 且远远大于耐冷菌。中温菌在温度达到 35 °C 时荧光强度达到最高水平, 当温度高于 35 °C 时, 中温菌的荧光强度开始下降, 而耐冷菌则在温度为 15 °C 时荧光强度达到最高水平。

从以上分析可以看出: 在周围环境温度低于 15 °C 时, 中温菌已经不能很好地发挥其降解功效, 为了减少温度降低对污水降解率下降的影响, 此时

在生活污水处理系统中加入耐冷菌非常必要。

### 3.3 污染物降解实验

由图 4 可知, 在 15 °C 的污水中加入耐冷菌混合菌后, 污水中总磷的脱除率提高了 80%, 总氮的脱除率提高了 53.5%。从图中还可以看出, 这四种耐冷菌及耐冷菌混合菌在 15 °C 时均具有较强的代谢外源有机物的能力, 而此时中温菌的外源代谢能力非常低。此外, 混合菌的降解能力高于单一菌株, 这说明保持生境中菌株多样性对于低温条件下污水的降解非常有利。混合菌株可以创造有利的生态条件, 提高系统中存在底物的利用率, 并增强系统对不良条件的抵抗力。另外从图 4 可以看出, 四种耐冷菌的降解污染物能力由小到大依次为: H-01, H-02, H-03, H-04, 与生物荧光光谱分析结果一致。

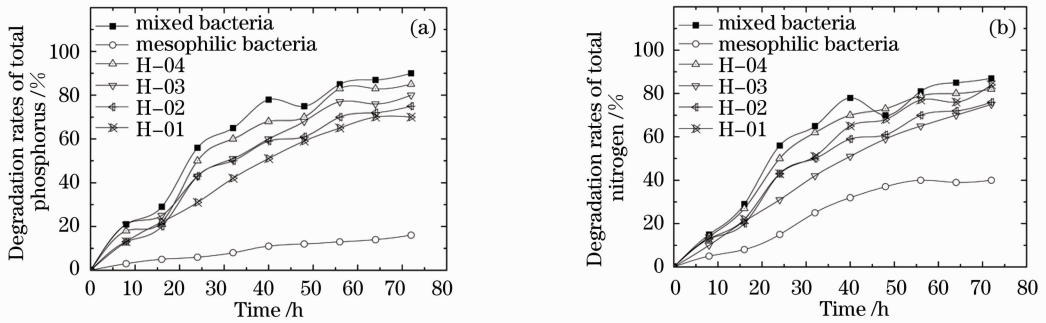


图 4 15 °C 下 (a) 总磷和 (b) 总氮的降解率

Fig. 4 Degradation rates of (a) total phosphorus and (b) total nitrogen at 15 °C

## 4 结 论

针对低温环境下生活污水处理系统处理效果大幅下降的问题, 培育出四株耐冷菌 H-01, H-02, H-03 和 H-04。经扫描电镜观察, 四株耐冷菌均属于杆菌属, 且四株耐冷菌的外貌形态各有优势, 即 H-01 分泌黏液; H-02 有部分菌体被囊状物包裹; H-03 由部分变性长杆菌及部分短杆菌组合而成; H-04 的部分菌体正处于分裂期。所有以上特征都表明, 耐冷菌对抗低温环境的能力很强, 并且 H-04 的活性比较高。并通过单光子共焦生物荧光层析光谱分析得出: 在 15 °C 以下, 耐冷菌的新陈代谢能力强于中温菌; 在 15 °C 左右, 耐冷菌的生物活性达到最高。因此, 当环境温度低于 15 °C 时, 投加耐冷菌可以提高污染物的降解率, 从而降低温度对污水处理系统的不利影响。在实验室条件下加入耐冷菌后, 总氮脱除率提高了 53.5%, 总磷脱除率提高了 80%。

## 参 考 文 献

- 1 Qian Cheng, Ren Libo, Yao Yao. The effect of wastewater treatment plant in low temperature north [J]. *Environmental Science and Management*, 2008, **23**(5): 84~86  
钱程, 任丽波, 姚瑶. 寒冷地区冬季低温对污水处理厂运行效率的影响研究[J]. *环境科学与管理*, 2008, **23**(5): 84~86
- 2 Tian Xiaoyan, Li Liping. Isolation and identification of microbial composition in the hydrophyte-artificial wetland system [J]. *Journal of Jilin Architectural and Civil Engineering Institute*, 2008, **25**(4): 14~17  
田晓燕, 李丽萍. 人工湿地污泥处理系统微生物组成的分离与鉴定[J]. *吉林建筑工程学院学报*, 2008, **25**(4): 14~17
- 3 Wu Ronghua, Xu Yongpeng, Sun Dexing *et al.*. Effect of the sewage as a cool and heat source on wastewater biological treatment in cold Area [J]. *Journal of Harbin institute of Technology*, 2007, **39**(12): 1882~1885  
吴荣华, 徐勇鹏, 孙德兴等. 寒区城市污水冷热源对污水生化处理影响[J]. *哈尔滨工业大学学报*, 2007, **39**(12): 1882~1885
- 4 Bai Fengqing, Li Chong, Zhu Wenmin *et al.*. Purification effect of sewage by composite constructed wetland system in autumn and winter [J]. *Journal of Hebei University of Engineering*, 2009, **2**: 45~47  
白峰青, 李冲, 朱文敏等. 秋冬季节复合人工湿地系统对污水净化效果研究[J]. *河北工程大学学报*, 2009, **2**: 45~47
- 5 Chang Guanqin, Song Cunyi, Wang Li. Study on psychrophilic bacteria in ecological beds for sludge [J]. *Journal of University of Science and Technology Beijing*, 2006, **28**(1): 22~24

- 常冠钦, 宋存义, 汪莉. 污泥生态床耐冷菌的研究[J]. 北京科技大学学报, 2006, **28**(1): 22~24
- 6 S. Knoop, S. Kunst. Influence of temperature and sludge loading on activated sludge setting, especially on microthrix parvicella[J]. *Wat. Sci. Tech.*, 1998, **37**(4~5): 27~31
- 7 Zhang Cuiying. Preliminary study on organic pollutants removal from low temperature sewage by sychrotrophic strain [J]. *Industry Water and Wastewater*, 2009, **40**(3): 41~43  
张翠英. 耐冷菌去除低温污水中有机污染物的初步研究[J]. 工业用水与废水, 2009, **40**(3): 41~43
- 8 Zhang Jinglai, Wang Jianbo, Chang Guanqin *et al.*. *Environmental Biological Technology and Applications* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2002  
张景来, 王剑波, 常冠钦等. 环境生物技术及应用. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- 9 L. Leblanc, E. Dufour. Monitoring the identity of bacteria using their intrinsic fuorescence [J]. *FEMS Microbiol Lett.*, 2002, **211**: 147~154
- 10 Y. Wu, P. Xi, J. Qu, *et al.*, Depth-resolved fluorescence spectroscopy of normal and dysplastic cervical tissue[J]. *Optics Express*, 2005, **13**(2): 382~388
- 11 H. K. Dannelly, S. Roseman. NAD<sup>+</sup> and NADH regulate an ATP-dependent kinase that phosphorylates enzyme-I of the escherichia-coli phosphotransferase system [J]. *PNAS*, 1992, **89**(23): 11274~11382
- 12 H. D. Vishwasrao, A. A. Heikal, K. A. Kasischke *et al.*. Associated anisotropy of intrinsic tissue fluorescence reveals conformation of NADH as a function of metabolic state [J]. *Biophys. J.*, 2004, **86**(1): 609A~618A
- 13 N. Ramanujam. Fluorescence Spectroscopy In Vivo, in *Encyclopedia of Analytical Chemistry* [M]. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, Chichester: 2000, 20~28
- 14 Y. Wu, P. Xi, J. Y. Qu *et al.*. Depth-resolved fluorescence spectroscopy reveals layered structure of tissue [J]. *Opt. Express*, 2004, **12**(14): 3218~3223
- 15 B. R. Masters, B. Chance. Redox confocal imaging: intrinsic fluorescent probes of cellular metabolism [J]. *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity*, 1999, 36~51