

文章编号:1000-582X(2009)08-0915-05

光照波长影响光合细菌生物膜生长特性实验

朱 恂, 党 楠, 田 鑫, 廖 强, 王永忠, 李 俊, 石 泳, 丁玉栋

(重庆大学 工程热物理研究所, 重庆 400030)

摘 要:在平板式生物膜反应器内,研究波长范围为 420~590 nm 的 3 种不同单色光源对高效光合产氢细菌生物膜生长特性的影响进行实验,讨论了不同光照波长对沼泽红假单胞菌生物膜表面覆盖率、膜厚、干重和密度的影响。实验结果表明,不同的光照波长对生物膜生长速率及结构具有重要影响,在相同的时间间隔内,生物膜表面覆盖率随着光照波长的增加而增加,而光照波长对生物膜干重影响很小,在实验运行 4 d 后,生物膜厚度随着波长的增加而减小;光照波长越长,生物膜密度越高,这是由于较短的光照波长抑制了细菌的分裂及胞外高聚物的生成。

关键词:光合细菌;生物膜;可视化;膜厚;膜干重

中图分类号:Q935

文献标志码:A

Characteristics of the effect of light wavelength on the growth of photosynthetic bacterial biofilm

ZHU Xun, DANG Nan, TIAN Xin, LIAO Qiang, WANG Yong-zhong,

LI Jun, SHI Yong, DING Yu-dong

(Institute of Engineering Thermophysics, Chongqing University, Chongqing 400030, P. R. China)

Abstract: In a plate-type bioreactor for biofilm development, the experiments for the growth characteristic of high-efficiency hydrogen-production photosynthetic bacterial biofilm was undertaken under three different monochromatic light source with light wavelengths varied from 420 nm to 590 nm. The effect of light wavelength on the parameters of *Rhodoseudomonas palustris* biofilm is discussed, such as the surface coverage rate, thickness, dry weight, and density. The light wavelength has significant influences on the growth rate and structure of biofilm. Increased wavelength results in a higher surface coverage rate. While the dry weight of biofilm keeps almost constant at the same period. After 4 days, the thickness of biofilm decreases with the increase in light wavelength while longer light wavelength leads to higher density of biofilm, which results from the cell division and production of EPS by short light wave.

Key words: photosynthetic bacteria; biofilm; visualization; biofilm thickness; biofilm dry weight

细菌生物膜与人类生活关系密切。由于生物膜抗逆性较强,并且难以控制,往往导致一些致病细菌

在医疗设备及食品加工设备上形成生物膜^[1-2],造成污染;此外,生物膜细菌还可污染与人类生活相关的

收稿日期:2009-03-29

基金项目:国家自然科学基金资助项目(90510020,50576107);教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-04-0845);重庆市自然科学基金资助项目(CSTC, 2006BB7225);重庆大学高层次人才科研启动基金

作者简介:朱恂(1968-),女,重庆大学教授,博士生导师,主要研究方向为环境与能源生物技术中的热物理问题。(E-mail)lqzx@cqu.edu.cn。

设施,如空调系统、供水系统等,从而降低这些设备的使用效率和寿命。但是,生物膜同样可以被人们加以利用,比如,由于固定化生物膜反应器操作稳定性高,生物量密度大,细菌停留时间长^[4],相比悬浮生长反应器具有更大的优势,所以细菌生物膜大量应用在废水处理系统中;除此之外,生物膜也经常用于对污染土壤的生物修复系统当中^[5]。因此,对细菌生物膜的研究一直是微生物学、医学、环境科学等领域中的热点问题。目前,利用光合产氢细菌生物膜反应器生产氢气已被认为是最有前途的氢气生产方式之一^[6]。

生物膜的形成过程包括细菌的吸附、生物膜的发展和成熟 3 个阶段,成熟的生物膜是不可逆吸附到载体表面、包含细菌胞外聚合物并且表现出特殊的表形特性的微生物群体^[7-8],在自然界中,微生物 90% 以上是以生物膜的形式存在的。研究表明,细菌在固体基质表面上的生长代谢行为与悬浮细菌具有较大差异,受水力条件、营养条件等外部环境因素的影响非常大^[9],而这些外部制约因素对光合细菌生物膜在固体基质表面生长的影响仍未见报道。

在固定化光合细菌生物膜反应器制取氢气过程中,光合细菌首先在反应器内部的载体表面形成生物膜,挂膜成功是利用产氢细菌生物膜反应器制取氢气的前提和关键性一步,研究光合细菌在固体基质表面的生长特性及机理具有重要意义。文中采用在线观察和离线分析相结合的方法,研究了不同的光照波长对光合细菌生物膜在固体基质表面上生长特性的影响,揭示了光合细菌在固体基质表面上的吸附及生长机理,同时为光合细菌生物膜制氢反应器的挂膜启动提供实验依据,并且为光生物制氢技术的发展提供基础性材料。

1 材料与方 法

1.1 实验装置

1.1.1 光合细菌生物膜平板反应器

可视化光合细菌生物膜平板反应器如图 1 所示,该反应器主要由透明的有机玻璃材料及盖玻片(24 mm×60 mm×0.17 mm)组成,尺寸为 180 mm×134 mm×18 mm,以盖玻片作为可视化窗口及光合细菌生物膜生长的载体。反应器主体包括 5 个流道,流道尺寸为 18 mm×50 mm×4 mm,每个流道的下侧由盖玻片通过有机玻璃盖板以螺栓联接的方式密封,以便对盖玻片作进一步的离线分析。在反应器的入口处设置了由均流板及玻璃珠组成的均流装置,以保证每个流道的流速相同。

1.1.2 实验循环系统

实验循环系统如图 2 所示。实验系统主要由生

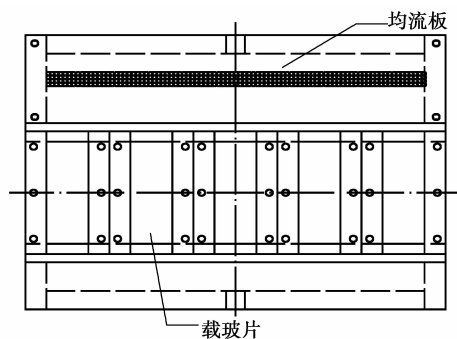


图 1 可视化生物膜平板反应器

物膜反应器、过滤瓶(250 mL)、蠕动泵、数码光学显微镜和计算机构成,其中生物膜反应器和过滤瓶由硅胶管连接构成封闭式循环系统,可视化装置由 OPTEC 光学显微镜、CCD 摄像机及计算机构成。细菌菌落生长图像经显微镜放大之后,由 CCD 摄像机感光生成数字图像输入计算机,通过 OPTEC 图象分析软件在显示器上实时显示,并将数据存储在计算机的硬盘当中。

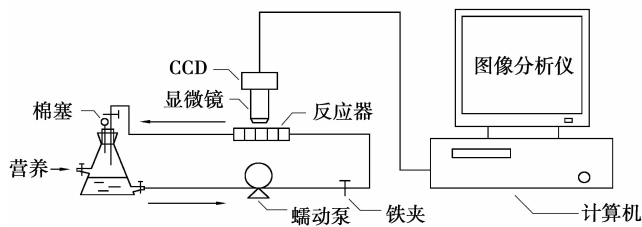


图 2 实验循环系统

1.2 方法和步骤

1.2.1 细菌菌种和培养基配方

实验采用的光合细菌菌种为沼泽红假单胞菌(*Rhodospirillum rubrum*)。为实现光合细菌生物膜生长采用了矿物盐培养基,配方如下:葡萄糖:9.9 g/L, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$: 1.006 g/L, KH_2PO_4 : 0.544 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.4 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.001 8 g/L, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$: 0.0010 g/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.0024 g/L, NaCl: 1.0 g/L, $CaCl_2$: 0.020 g/L, $CO(NH_2)_2$: 0.8 g/L, 酵母膏: 0.4 g/L。该培养基以葡萄糖为唯一碳源。

1.2.2 实验步骤

按 1:10 的体积比将光合细菌接种到灭菌后的液体培养基中,用无菌的 NaOH 溶液将其 pH 值调至 7.0,在光照培养箱内培养菌悬液至对数生长期,培养温度为 30 ℃。将菌悬液通入实验系统,调整蠕动泵,使菌悬液在反应器内部循环的流量为 228 mL/h,底物溶液葡萄糖浓度为 10 g/L,再将过

滤瓶内充入氩气使系统内部达到厌氧条件。实验菌种吸收可见光波长范围为 400~780 nm,光源采用主波长为 420 nm、520 nm 和 590 nm 的 LED 单色光源,光照强度为 5 000 lx。

每次实验之前用 Sartorius BP114 型电子分析天平(德国)称量每块盖玻片的重量,并用福尔马林溶液和高压灭菌锅分别对反应器及硅胶管和过滤瓶进行灭菌处理。从实验开始起,每隔 2~3 h 拍摄 1 次菌落生长图像,并从实验开始的第 2 d 起,每天更换 1 片经福尔马林消毒的盖玻片和 200 mL 灭菌后的矿物盐培养基。实验操作在室温 25 ℃ 环境下进行。

1.3 测量参数及分析方法

1) 菌落覆盖率:在每一时刻点随机拍摄 5 张细菌菌落生长的显微照片,利用 OPTEC 图像分析软件计算该时刻下的平均菌落面积大小及相应的菌落覆盖率^[10]。

2) 生物膜干重:将从反应器中更换下来的附着有生物膜的盖玻片用蒸馏水轻轻冲洗,除去未固定的生物量,然后放置于温控为 105 ℃ 的烘干箱内进行烘干,烘干时间为 30 min,等生物膜烘至恒重后对其称重,此时盖玻片的重量与实验前盖玻片的重量之差即为生物膜干重^[11]。

3) 生物膜膜厚:利用相差显微镜,采用直接显微法进行测量^[12];将附着生物膜的盖玻片放到载物台上并固定,用 10 倍物镜对生物膜表面进行对焦,直到生物膜处于焦点位置,记下此时显微镜微调刻度数,然后继续通过微调钮调节物镜对盖玻片表面进

行对焦直到其处于焦点位置,记下此时微调钮读数。两次成像的微调刻度数之差,经校正后,即为所测生物膜厚。最终膜厚值为测量 10 次之后所取的平均值。

4) 生物膜密度:由于生物膜为多孔状不规则结构,生物膜内孔隙应视为生物膜的一部分,生物膜密度根据单位面积的生物膜干重除以相应生物膜膜厚计算得到。

1.4 测量误差

生物膜膜厚的测量误差为 $\pm 2 \mu\text{m}$;生物膜干重的测量误差为 $\pm 0.01 \text{ mg}$;生物膜覆盖率的测量相对误差为 $\pm 0.1\%$ 。

2 结果与分析

2.1 不同光照波长条件下光合细菌生物膜的形成及生长

在波长为 590 nm 的光照条件下,不同时刻光合细菌菌落的生长情况如图 3 所示。从图中可以看出:在实验开始后的 2 h 之内,细菌菌落已经形成,但分布并不均匀。到第 10 h,细菌菌落在长大的同时彼此连接到了一起,形成了比较致密的结构。到第 14 h,细菌菌落厚度明显增加,并且菌落之间由一些空白区域相分隔。到第 22 h,生物膜已经趋于成熟,图 3(d)表明:光合细菌生物膜是一种多孔状结构,在菌落簇周围围绕着液体流动通道,这种通道可以将营养物质运送到生物膜内部,以供细菌生长代谢,这种不均匀性生物膜结构较为常见^[13-14]。

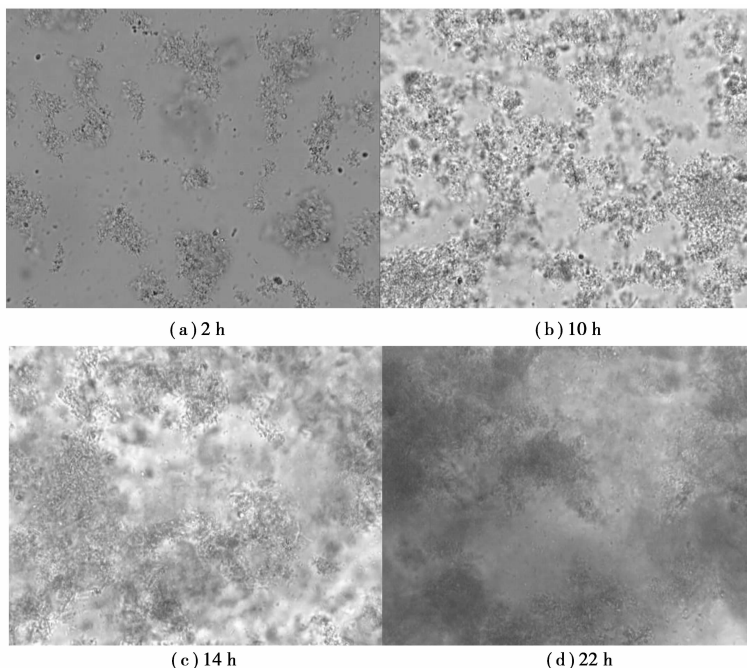


图 3 光照波长为 590 nm 细菌菌落生长过程(400×)
欢迎访问重庆大学期刊社 <http://qks.cqu.edu.cn>

图4所示为波长为420 nm的光照条件下,第14 h细菌个体及菌落形态。对比图3(c)可以看出,细菌及菌落形态在波长为420 nm和590 nm的光照条件下具有显著不同。在光照波长为420 nm条件下,个体细菌呈长条形杆状结构,菌落结构疏松;而在波长为590 nm条件下,个体细菌较小,呈椭球状结构,且菌落形态致密。由于在实验中循环液底物浓度控制在10 g/L,营养供给充分,所以在波长为420 nm条件下的长杆形细菌形态是由于细菌分裂受到光照抑制作用所致。研究表明,菌落生长与细菌胞外高聚物(EPS)的分泌有关^[15],在波长为420 nm条件下的菌落普遍较为稀疏,说明在该条件下光合产氢细菌的代谢作用同样受到波长较短的光照抑制。

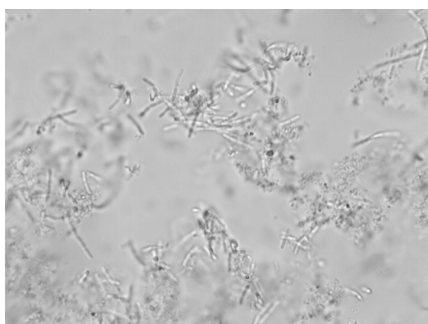


图4 光照波长为420 nm实验运行第14 h细菌个体及菌落形态(400×)

2.2 不同光照波长条件下的光合细菌菌落覆盖率变化规律

不同光照波长条件下菌落覆盖率的变化规律实验结果如图5所示。从图中可以看出,光照波长对光合细菌菌落的生长速度有很大影响,光合细菌菌落的生长速度会随光照波长的增加而增加。在相同的生长时间,波长为590 nm的光照条件下光合细菌生物膜覆盖率最高,细菌菌落生长最快;然而,在波长为420 nm的光照条件下,由于光合细菌受到光照波长的抑制,细菌菌落生长最缓慢,生物膜覆盖率最低;在波长为520 nm条件下的细菌菌落的生长速度则介于前2种波长条件之间。

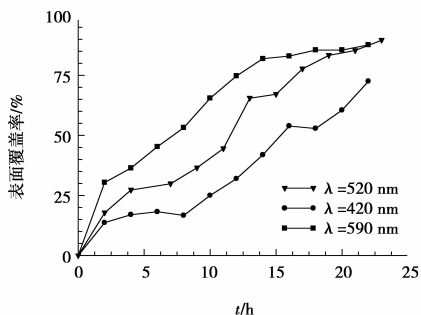


图5 不同波长条件下菌落覆盖率的变化规律

2.3 不同光照波长条件下光合细菌生物膜干重及膜厚变化规律

不同光照波长条件下生物膜干重及膜厚随时间的变化规律分别如图6和图7所示。从图6和图7可以看出:在不同光照波长条件下,光合细菌生物膜干重和生物膜厚度均随着反应器运行时间的增加而增大。从图6可以看出,在整个生物膜生长期,不同的光照波长对生物膜干重的影响较小;图7实验结果显示,在整个生物膜生长期,在波长为520 nm及590 nm光照条件下的光合细菌生物膜厚度相差不大;当光照波长为420 nm,实验前4 d的生物膜厚度与前2种波长条件下生物膜厚度基本相同,然而第4 d之后,该条件下的生物膜厚度迅速增加,且生物膜厚度明显大于前2种波长条件下相应的生物膜厚度。图8显示了不同光照条件下生物膜密度变化规律的实验结果。

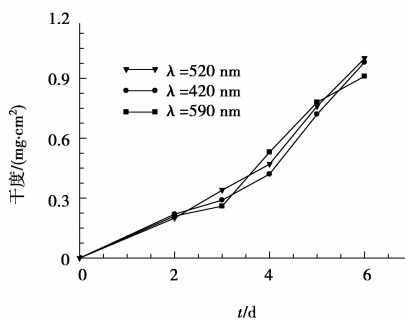


图6 不同波长条件下生物膜干重的变化规律

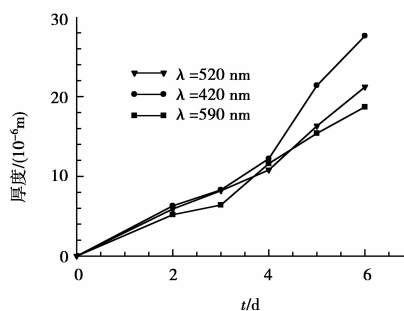


图7 不同波长条件下生物膜厚度的变化规律

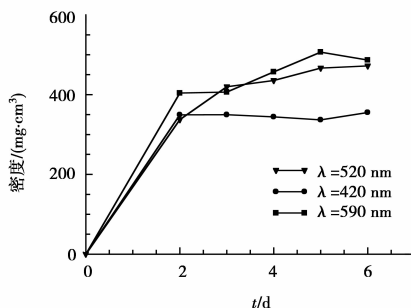


图8 不同波长条件下生物膜密度的变化规律

从图中可以看出,在波长为 420 nm 条件下,光合细菌生物膜密度在第 2 d 后基本趋于稳定;而在波长为 520 nm 和 590 nm 条件下,光合细菌生物膜密度在第 2 d 起随生物膜生长时间的增加而缓慢增大,这是由于这 2 种光照条件适合光合细菌的生长,生物膜中光合细菌不断分裂增殖同时吸附在 EPS 上的光合细菌数量大于受流体剪切力影响而脱落的细菌数量所致。另外,从图中还可以看出,这 2 种波长条件下的生物膜密度明显大于 420 nm 条件下的生物膜密度,说明短波长条件下生物膜结构较波长较长条件下更为疏松,且不均匀。这也说明由于波长为 420 nm 的光照条件抑制生物膜生长,使形成的生物膜中液体流动通道的数量和体积大于波长为 520 nm 和 590 nm 条件下液体通道的数量和体积。

3 结 论

1) 光合细菌生物膜为多孔状不规则结构。在不同的光照条件下,光合细菌生物膜结构有所不同,在光照波长为 520 nm 和 590 nm 条件下,生物膜结构较为致密,而在波长最短的 420 nm 条件下,生物膜结构疏松,细菌菌落呈絮状结构。

2) 光合细菌菌落的生长速度受到光照波长的影响较大,在相同时刻,光合细菌菌落覆盖率随着光照波长的增加而增加。

3) 波长较短的光照条件抑制了光合细菌的分裂增殖及生长代谢功能。致使波长为 420 nm 的光照条件由于抑制了光合细菌分裂及胞外高聚物(EPS)的分泌,从而影响到个体细菌形态和生物膜结构。

4) 光合细菌生物膜适于在波长较长的条件下生长,光合细菌生物膜密度随着光照波长的增加而增加。

参考文献:

- [1] HOOD S K, ZOTTOLA E A. Biofilms in food processing [J]. *Food Control*, 1995, 6(1): 9-18.
- [2] GRISTINA A G. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration [J]. *Science*, 1987, 237(4822): 1588.
- [3] EBRAHIMI S, PICIOREANU C, XAVIER J B. Biofilm growth pattern in honeycomb monolith packings: Effect of shear rate and substrate transport limitations [J]. *Catalysis Today*, 2005, 105(3/4): 448-454.
- [4] TOMMASO G, VARESCHE M B. Morphological observation and microbial population dynamics in anaerobic polyurethane foam biofilm degrading gelatin [J]. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2002,

19(3): 287-292.

- [5] 朱恂,刘磊. 污染土壤原位生物修复理论模型[J]. *工程热物理学报*, 2004, 25(6): 135-138.
ZHU XUN, LIU LEI. Theoretical model for in-situ bioremediation of contaminative soil [J]. *Journal of engineering thermophysics*, 2004, 25(6): 135-138.
- [6] LEITE J A C, FERNANDES B S, POZZI E, et al. Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2008, 33(2): 579-586.
- [7] KUMAMTO C A. Candida biofilms [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2002(5): 608-611.
- [8] 唐娴,刘国生,谢志雄. 细菌生物膜的结构及形成机制研究进展[J]. *氨基酸和生物资源*, 2006, 28(3): 30-33.
TANG HUA, LIU GUO-SHENG, XIE ZHI-XIONG. Progress of investigation on the structure and formation of bacterial biofilm [J]. *Amino Acids & Biotic Resources*, 2006, 28(3): 30-33.
- [9] RINAUDI L, FUJISHIGE N A, HIRSCH A M, et al. Effects of nutritional and environmental conditions on *Sinorhizobium meliloti* biofilm formation [J]. *Research in Microbiology*, 2006, 157(9): 867-875.
- [10] HALL-STOODLEY L, LAPPIN-SCOTT H. Biofilm formation by the rapidly growing mycobacterial species *Mycobacterium fortuitum* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 168(1): 77-84.
- [11] PEREIRA M O, MORIN P, VIERA M J. A versatile reactor for continuous monitoring of biofilm properties in laboratory and industrial conditions [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2002, 34(1): 22-26.
- [12] LIU Y. Estimating minimum fixed biomass concentration and active thickness of nitrifying biofilm [J]. *Journal of Environmental Engineering*, 1997, 123(2): 198-202.
- [13] CRUNDWELL F. The formation of biofilms of iron-oxidising bacteria on pyrite [J]. *Minerals Engineering*, 1996, 9(10): 1081-1089.
- [14] MARINA THORN, ANN MATTSSON, FRED SORENSSON. Biofilm development in a nitrifying trickling filter [J]. *Water Science and Technology*, 1996, 34(1/2): 83-89.
- [15] HELLE H, VUORIRANTA P, LEKKALA J, et al. Monitoring of biofilm growth with thickness-shear mode quartz resonators in different flow and nutrition conditions [J]. *Sensors and Actuators B*, 2000, 71(1/2): 47-54.

(编辑 陈移峰)