

# 活性污泥和生物膜中紧密结合型胞外聚合物提取方法研究

曾 妮, 陈猷鹏, 刘嘉靖, 王一璐, 赵尚燊

(重庆大学城市建设与环境工程学院, 重庆 400045)

**摘要:** 用4种物理方法[阳离子交换树脂(cationic exchange resin, CER)法、热提取法、蒸汽法和超声法]提取来自基于亚硝酸盐的全自养生物脱氮(completely autotrophic nitrogen removal over nitrite, CANON)工艺活性污泥和生物膜以及厌氧-缺氧-好氧(anaerobic-anoxic-oxic, A/A/O)工艺中反硝化污泥中的紧密结合型胞外聚合物(tightly bound extracellular polymeric substances, TB-EPS)。用拉曼光谱表征TB-EPS的官能团生化信息,通过测定TB-EPS中蛋白质、多糖、腐殖酸及DNA的含量以研究TB-EPS的组成,并比较4种提取方法优劣。结果表明,不同提取方法和微生物聚集方式得到的TB-EPS具有不同的拉曼光谱特征。蛋白质和多糖是CANON系统中TB-EPS的主要成分,而反硝化活性污泥的TB-EPS主要成分为蛋白质和腐殖酸。TB-EPS提取产量强烈依赖于采用的提取方法和微生物的集聚方式,CANON系统中悬浮污泥和生物膜最优提取TB-EPS方法为CER法,A/A/O系统反硝化活性污泥较优提取TB-EPS方法为热提取法与蒸汽法。

**关键词:** 环境生物学; 紧密结合型胞外聚合物; 活性污泥; 生物膜; 拉曼光谱法; 提取方法

**中图分类号:** X172      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1674-2850(2015)24-2539-07

## Study of the extraction methods of tightly bound extracellular polymeric substances extracted from activated sludge and biofilm

ZENG Ni, CHEN Youpeng, LIU Jiajing, WANG Yilu, ZHAO Shangyu

(College of Urban Construction and Environmental Engineering, Chongqing University, Chongqing 400045, China)

**Abstract:** In this study, the tightly bound extracellular polymeric substances (TB-EPS) of the activated sludge and biofilm from a completely autotrophic nitrogen removal over nitrite (CANON) system and the activated sludge from a denitrification process of a anaerobic-anoxic-oxic (A/A/O) system were extracted by four physical extraction methods [cationic exchange resin (CER), heating, steam and ultrasound]. The functional groups of the TB-EPS were analysed by Raman spectrometry. Constitutes of the TB-EPS were investigated by the determination of its protein, polysaccharide, humic acid and DNA contents to analyze the advantages and disadvantages of the four extraction methods. The results showed that the Raman spectra of TB-EPS differed with the different extraction methods. Proteins and polysaccharides were found to be the main components in the TB-EPS from the CANON system, however, the main components in the TB-EPS of denitrification activated sludge were protein and humic acid. The yields of the TB-EPS extracts were strongly dependent on the extraction methods adopted and the attached type of microbial aggregates. CER was the most effective method in extracting TB-EPS from both sludge and biofilm samples of CANON system, whereas the better extraction methods for the

**作者简介:** 曾妮 (1990—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 废水生物处理理论与技术

**通信联系人:** 陈猷鹏, 副研究员, 主要研究方向: 废水生物处理理论与技术. E-mail: ypchen@cqu.edu.cn

TB-EPS from denitrification activated sludge samples were heating and steam.

**Key words:** environmental biology; tightly bound extracellular polymeric substances; activated sludge; biofilm; Raman spectrometry; extraction methods

## 0 引言

CANON 工艺是指在单个反应器内控制溶解氧实现亚硝化和厌氧氨氧化,从而达到脱氮目的的污水处理工艺<sup>[1]</sup>。该工艺可达到 87%的脱氮效率,具有能耗低、污泥产量低和无需外加碳源等特点,相比传统除氮工艺可减少 63%的供氧量和 100%的药剂消耗<sup>[1~2]</sup>。CANON 系统中,活性污泥和生物膜是微生物的主要聚集形态。相比于悬浮的活性污泥,紧密粘附在载体上的生物膜具有更强的污染物降解能力、稳定性和抗冲击负荷能力。

胞外聚合物(extracellular polymeric substance, EPS)是微生物在其代谢过程中产生的高分子物质,如多糖、蛋白质、腐殖酸和核酸等多聚化合物。通常将 EPS 分为溶解性胞外聚合物(soluble EPS, SEPS)和结合型胞外聚合物(bound EPS, BEPS),而结合型胞外聚合物又可分为松散结合型胞外聚合物(loosely bound EPS, LB-EPS)和 TB-EPS<sup>[3]</sup>。EPS 不仅可以吸附和富集营养成分,还对系统内微生物群落结构的形成和维持起着重要作用<sup>[4]</sup>。相比 SEPS 和 LB-EPS, TB-EPS 在活性污泥和生物膜中起着更为重大的作用<sup>[5]</sup>。因此,对 CANON 工艺和传统硝化反硝化工艺中 TB-EPS 的对比研究显得尤为重要。

对 TB-EPS 的提取是进行分析的前提。EPS 的提取方法主要分为物理方法、化学方法及物理和化学相结合的方法。EPS 的提取效率很大程度上因提取方法而异,不同的提取方法对微生物细胞具有不同的影响,选择合适的提取方法非常重要。一般来说化学法提取所得 EPS 产量高于物理法,但是化学方法会造成污染或使微生物细胞裂解<sup>[6]</sup>。

拉曼光谱分析法是基于拉曼散射效应,对与入射光频率不同的散射光谱进行分析以得到分子振动、转动方面信息,并应用于分子结构研究的一种分析方法。由于其能提供快速、简单、可重复、无损伤的定性定量分析的特点<sup>[7]</sup>,近年来常被用于检测 EPS 的官能团<sup>[8]</sup>。

实验用 4 种物理方法对 CANON 工艺中的活性污泥、生物膜及反硝化污泥中的 TB-EPS 进行提取。用拉曼光谱对 TB-EPS 的官能团进行测定。通过测定 TB-EPS 中的蛋白、多糖、腐殖酸和 DNA 含量来分析其组成,进而比较 4 种提取方法的提取效率,得出不同 TB-EPS 的最优提取法。

## 1 材料与方法

### 1.1 生物膜和活性污泥

从 CANON 系统中采集悬浮污泥和生物膜,从 A/A/O 工艺缺氧池中采集悬浮污泥。

CANON 系统运行条件:反应器使用模拟废水,以碳酸氢铵和碳酸氢钠作为碳源,以碳酸氢铵作为唯一氮源。废水详细成分如下( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $1\ 975\ \text{NH}_4\text{HCO}_3$ ,  $328\ \text{NaHCO}_3$ ,  $70\ \text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $2\ \text{mL}$  微量元素溶液( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) [ $5.0\ \text{EDTA}$ ,  $1.6\ \text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $2.2\ \text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $5.1\ \text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $1.6\ \text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $1.1\ (\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $5.5\ \text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $5.0\ \text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ]。反应器运行温度控制在  $30\sim 34^\circ\text{C}$ , pH 值控制在  $8.0\pm 0.2$ , 溶解氧(dissolved oxygen, DO)维持在  $1.8\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  左右,水力停留时间为 2 d。

反硝化污泥取自重庆市鸡冠石污水处理厂 A/A/O 工艺的缺氧池。

### 1.2 提取方法

将大约 20 mL 新鲜样品置于 50 mL 离心管中,使用去离子水配制成 45 mL 的悬浮液,然后在 20 kHz

和 40 W 下超声 30 s. 随后悬浮液在 2 000g 和 4℃ 下离心 15 min. 所得上清液为 SEPS. 然后用去离子水将离心管底部的沉渣再悬浮到原体积。悬浮液在恒温振荡器中水平振荡 1 h, 再在 5 000g 和 4℃ 下离心 15 min. 所得上清液为 LB-EPS. 提取完 SEPS 和 LB-EPS 后, 使用磷酸盐缓冲液将离心管中的残留沉渣再悬浮到原体积, 用 4 种物理方法提取 TB-EPS. 对悬浮液分别做以下处理。

超声波法: 在 20 kHz, 120 W 的条件下超声 3 min 后在 20~30 r/min 的恒温振荡箱中震荡 10 min, 接着重复超声一次。

热提取法: 在 80℃ 温度下, 水浴加热 1 h.

蒸汽法: 在 120℃, 100 kPa 的条件下高压灭菌锅加热 10 min.

CER 法: 按 70 g/可挥发性悬浮物 (volatile suspended solid, VSS) 的比例加入 CER 后, 在 600 r/min 和 4℃ 下搅拌 1 h.

上述方法处理后的悬浮液均在 1 000g, 4℃ 下离心 15 min. 所得上清液均使用 0.45 μm 的滤膜过滤。样品分析测试前贮存在 -20℃ 暗室中。提取实验重复 2 次。

### 1.3 化学分析

实验用 TB-EPS 的多糖、蛋白质、腐殖酸和 DNA 含量的总和来表征 TB-EPS 的提取量, 用 DNA 的相对含量表征提取方法对微生物细胞的破坏程度。其中, 悬浮物 (suspended solid, SS) 和 VSS 的测定采用标准总量法。使用蒽酮比色法<sup>[9]</sup>测定多糖含量, 使用考马斯亮蓝蛋白质试剂盒测定蛋白质含量, 采用福林酚法<sup>[10]</sup>测定腐殖酸含量, DNA 的含量由二苯胺比色法<sup>[11]</sup>测定。

### 1.4 拉曼光谱

将 TB-EPS 提取物在 -50℃ 下冷冻干燥。将冻干的 TB-EPS 粉末用一台傅里叶变换拉曼光谱仪 (RFS.100, Bruker, 德国) 进行分析。使用波长为 1 064 nm 的 Nd: YAG 激光器, 激光强度为 50 mW, 固体样品扫描 100 次。光谱分辨率为 4 cm<sup>-1</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 提取产物

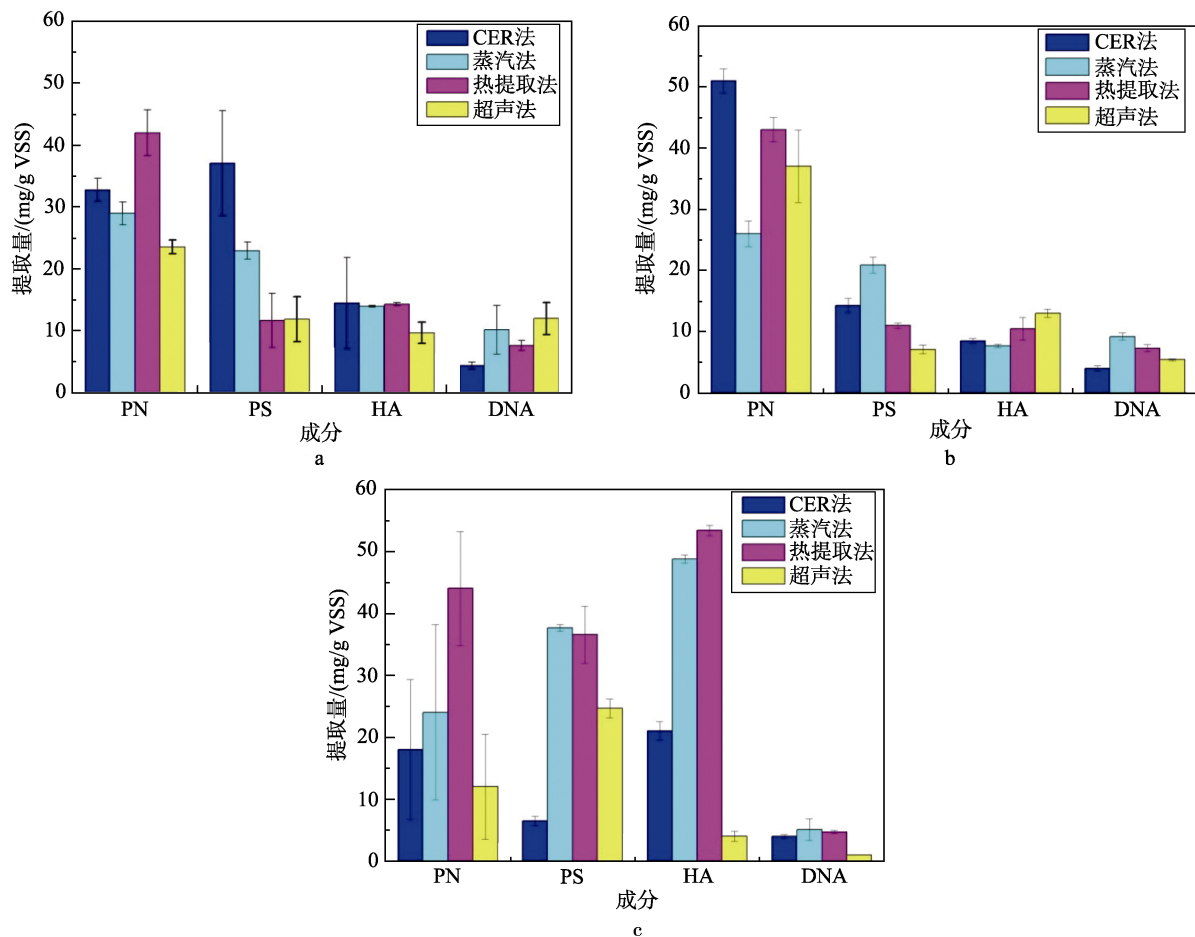
图 1 所示为 4 种方法提取 CANON 系统中活性污泥和生物膜, 以及 A/A/O 系统中反硝化污泥样品中 TB-EPS 的含量。对于 CANON 系统中的悬浮污泥样品, CER、蒸汽、热提取和超声提取的 TB-EPS 总量 (多糖、蛋白质、腐殖酸和 DNA 的总量) 分别为 88.6, 80.2, 78.3, 57.2 mg/g VSS. 如图 1a 所示, 不同方法所得 TB-EPS 提取量由高到低为 CER>蒸汽>热提取>超声。获得最高多糖产量 ( $P=0.021$ ) 的提取方法是 CER 法, 而获得最高 DNA 产量 ( $P<0.010$ ) 的是超声法。获得最高蛋白质产量 ( $P<0.010$ ) 的是热提取法。CER、蒸汽、热提取、超声 4 种方法得到的 DNA 含量占 TB-EPS 总量的比重分别为 5.0%, 13.4%, 10.1%, 21.0%。

对于 CANON 系统中的生物膜样品, CER、蒸汽、热提取和超声提取的 TB-EPS 总量分别为 77.8, 63.8, 71.8, 70.3 mg/g VSS. 相应地, 这 4 种方法得到的 DNA 含量占 TB-EPS 总量的比重分别为 5.1%, 14.4%, 10.2% 和 8.6%。如图 1b 所示, 不同方法得到提取 TB-EPS 总量由高到低为 CER>热提取>超声>蒸汽。不同方法提取蛋白质、多糖、腐殖酸和 DNA 的产量之间均存在显著性差异。获得最高蛋白质产量 ( $P=0.021$ ) 的提取方法是 CER 法, 而获得最高多糖产量 ( $P<0.010$ ) 的是蒸汽法。蒸汽法同时获得了最高的 DNA 产量 ( $P<0.01$ )。超声法获得最高的腐殖酸产量 ( $P<0.050$ )。

对于 A/A/O 系统中反硝化活性污泥样品, CER、蒸汽、热提取和超声提取的 TB-EPS 总量分别为 75.7,

109.6, 106.8, 53.7 mg/g VSS. 如图 1c 所示, 不同方法所得提取量由高到低为蒸汽>热提取>CER>超声。其中, 热提取获得了最高的腐殖酸含量( $P<0.050$ ), 蒸汽法和热提取法分别得到最高的多糖产量( $P<0.010$ )和最高 DNA 产量 ( $P<0.050$ )。而超声方法得到的 DNA 含量较低。

以上结果均表明, TB-EPS 提取物各成分和总量都强烈依赖于所使用的提取方法。



注: PN 为蛋白质; PS 为多糖; HA 为腐殖酸

图 1 CANON 工艺活性污泥 (a)、生物膜 (b) 和反硝化污泥 (c) 中 TB-EPS 的含量

Fig. 1 TB-EPS contents of the activated sludge (a) and biofilm samples (b) from CANON system and the activated sludge sample (c) from denitrification

## 2.2 TB-EPS 的拉曼光谱

图 2 所示为不同方法提取所得 CANON 系统中活性污泥和生物膜样品, 以及反硝化污泥样品中 TB-EPS 的拉曼光谱。根据文献, 可得到不同峰值对应的各种官能团信息<sup>[8, 12~14]</sup>。

如图 2a 所示, 对于 CANON 系统中悬浮污泥样品, 使用 CER 法得到样品的拉曼光谱, 谱峰中主要是蛋白质和多糖的官能团。属于蛋白质 C—C 骨架的伸缩振动和属于酰胺 I 的无规卷曲分别位于  $903\text{ cm}^{-1}$  和  $1661\text{ cm}^{-1}$ 。CER 法得到的核酸峰强度较弱, 表明该方法提取过程中产生的 DNA 含量很低。超声法拉曼光谱的  $988\text{ cm}^{-1}$  处和蒸汽法的  $993\text{ cm}^{-1}$  处均显示了一个较强的脱氧核糖峰, 表明使用超声法和蒸汽法提取的 TB-EPS 中 DNA 的含量均较高。由此可以看出, 拉曼光谱表征 DNA 的结果与 DNA 化学定量分析的结果是一致的。

对于采用 CER 法提取的生物膜中 TB-EPS 来说, C—C 骨架伸缩振动的强峰出现在  $909\text{ cm}^{-1}$ 。相比活性污泥样品中 TB-EPS 的拉曼光谱, 生物膜样品中 TB-EPS 出现了位于  $1\,462\text{ cm}^{-1}$  的  $\text{CH}_2$  变形振动和位于  $1\,356\text{ cm}^{-1}$  的色氨酸振动, 但是位于  $1\,661\text{ cm}^{-1}$  的酰胺 I 的振动消失。相比活性污泥样品中 TB-EPS, 超声、蒸汽和热提取得到的生物膜样品里的 TB-EPS 中都含有硫酸基。超声法、蒸汽法和热提取法得到了相似的 TB-EPS 拉曼光谱。如图 2b 所示, 位于  $928\text{ cm}^{-1}$  处的脱氧核糖峰和  $1\,583\text{ cm}^{-1}$  处 A (腺嘌呤) 和 G (鸟嘌呤) 的拉曼峰为蒸汽法所得。并且相比活性污泥中 TB-EPS, 由该方法得到的生物膜 TB-EPS 中还存在位于  $1\,049\text{ cm}^{-1}$  的 C—C, C—O 或 C—N 的伸缩振动, 位于  $1\,072\text{ cm}^{-1}$  的 C—N 的伸缩振动和位于  $1\,664\text{ cm}^{-1}$  的酰胺 I 的振动。在热处理下, 位于  $384\sim 405\text{ cm}^{-1}$  处的碳水化合物的振动、位于  $1\,055\text{ cm}^{-1}$  的 C—C, C—O 或 C—N 处的伸缩振动和位于  $1\,072\text{ cm}^{-1}$  的 C—N 的伸缩振动存在于生物膜 TB-EPS 中, 而未出现在活性污泥 TB-EPS 中。因此, 拉曼光谱表明, 不同的提取方法得到了不同的提取物成分。

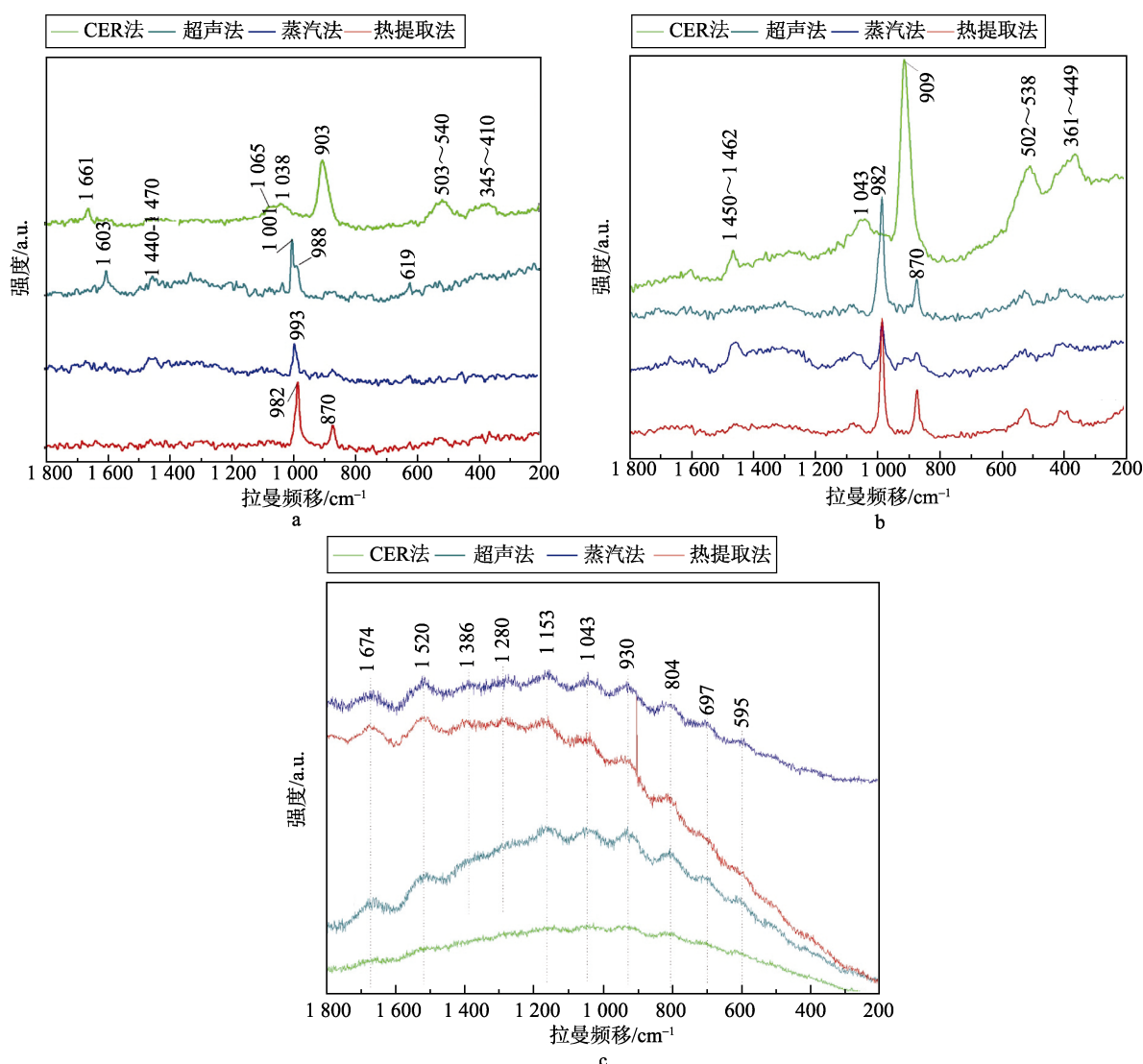


图2 CANON 工艺活性污泥 (a)、生物膜 (b) 和反硝化污泥 (c) 中 TB-EPS 的拉曼光谱

Fig. 2 Raman spectra of TB-EPS extracted from the activated sludge (a), biofilm samples in (b) CANON system and activated sludge samples (c) from denitrification

对于 A/A/O 系统的悬浮污泥,加热和蒸汽两种提取方法得到的光谱部分相似。如图 2c 所示,在  $595\text{ cm}^{-1}$  处的伸缩振动,表示了蛋白质的苯丙氨酸官能团的存在。2 种方法得到的光谱,峰值均出现在  $697\text{ cm}^{-1}$  和  $804\text{ cm}^{-1}$ ,  $930\text{ cm}^{-1}$ ,  $1\,520\text{ cm}^{-1}$  附近,可能是 A, C—C 伸缩,脱氧核糖, C—N/C—C/C—O, C=C 等官能团。超声方法的光谱中存在 S—S 伸缩和 C—H 官能团,这在热提取法光谱中没有观察到。热提取法拉曼光谱中出现 C—C 伸缩官能团。蒸汽法得到的拉曼光谱,同样出现了脱氧核糖与 C—N/C—C/C—O 官能团,同时也存在位于  $1\,280\text{ cm}^{-1}$  附近的酰胺 III 官能团,  $697\text{ cm}^{-1}$  的 G 和  $595\text{ cm}^{-1}$  附近的 C—C=O 变形官能团。CER 方法得到的光谱峰值较其他 3 种方法少,主要出现了在  $1\,520\text{ cm}^{-1}$  附近振动的 G, A 和  $1\,043\text{ cm}^{-1}$  附近振动的 C—N 伸缩。CER 法同样地出现了蛋白质 S—S 伸缩官能团的峰。

### 2.3 提取方法分析

根据样品的各物质含量以及相对 DNA 含量分析比较,结合拉曼光谱,得到不同样品最佳提取方法。

对于 CANON 系统中的活性污泥和生物膜样品,CER 法不仅得到了较多的 TB-EPS 含量,同时 DNA 含量也相对于其他 3 种方法少,故对于 CANON 系统中的样品,CER 法为最优的提取方法。

对于 A/A/O 系统中的反硝化活性污泥,超声法得到的 TB-EPS 总量太低,而蒸汽与热提取 2 种方法得到的 TB-EPS 总量和 DNA 含量相近,相比于其他方法,这 2 种方法在取得 TB-EPS 同时,对细胞的破坏程度均较小,故对于反硝化污泥,蒸汽法与热提取法是较好的提取方法。

### 2.4 不同污泥中 TB-EPS 最优法特征比较

CER 法(最优方法)得到的 CANON 系统中悬浮污泥和生物膜 TB-EPS 提取物的主成分为多糖和蛋白质,且其拉曼峰也主要是蛋白质和多糖的官能团。悬浮污泥中 TB-EPS 含量最高的多糖,而在生物膜中蛋白质含量最高。并且,活性污泥得到的 TB-EPS 总量比生物膜得到的总量多。悬浮污泥属于蛋白质  $C_{\alpha}$ —C 骨架的伸缩振动和属于酰胺 I 的无规卷曲分别位于  $903\text{ cm}^{-1}$  和  $1\,661\text{ cm}^{-1}$ ,而生物膜的 C—C 骨架伸缩振动的强峰出现在  $909\text{ cm}^{-1}$ 。相比活性污泥样品中 TB-EPS 的拉曼光谱,生物膜样品中 TB-EPS 出现了位于  $1\,462\text{ cm}^{-1}$  的  $\text{CH}_2$  变形振动和位于  $1\,356\text{ cm}^{-1}$  的色氨酸的振动。

热提取法和蒸汽法(最优方法)得到的 A/A/O 系统反硝化活性污泥 TB-EPS 提取物中的主要成分为腐殖酸和多糖。并且,反硝化污泥中的 TB-EPS 总量高于 CANON 系统中的 TB-EPS。这表明自养脱氮微生物和异养反硝化微生物的 TB-EPS 成分不同,这可能与 TB-EPS 提取方法、2 个系统的进水水质和运行方式以及微生物种类有关。热提取法和蒸汽法得到的蛋白质含量较低,分别占总量的 11.26%和 16.45%。并且,这 2 种方法得到的拉曼光谱相似。与 CANON 系统中 TB-EPS 拉曼光谱相比,反硝化污泥 TB-EPS 拉曼光谱未显示蛋白质的 S—S 伸缩振动,但在  $927$ ,  $1\,157$ ,  $1\,510\text{ cm}^{-1}$  的峰分别指定为 DNA 的脱氧核糖、蛋白质或腐殖酸的 C—N 和蛋白质的酰胺 II。

## 3 结论

研究使用 4 种物理方法提取和使用拉曼光谱表征了 CANON 系统中活性污泥和生物膜中的 TB-EPS 以及反硝化污泥中的 TB-EPS。

1) TB-EPS 提取物的含量强烈依赖于采用的提取方法和微生物聚集体的集聚方式。CANON 系统中悬浮污泥和生物膜最优提取 TB-EPS 方法为 CER 法,A/A/O 系统反硝化活性污泥较优提取 TB-EPS 方法为热提取法与蒸气法。

2) 对于 CANON 系统中 TB-EPS,蛋白质和多糖是主要成分,并且活性污泥 TB-EPS 中的蛋白质/多

糖 (PN/PS) 为 0.9~3.6, 而生物膜 TB-EPS 中的 PN/PS 为 1.2~3.9. 反硝化悬浮污泥中 TB-EPS, 腐殖酸和蛋白质是主要成分, 而蛋白质/多糖 (PN/PS) 为 0.5~6.8.

3) 不同提取方法所得到的 TB-EPS 具有不同的拉曼光谱特征. CANON 系统中微生物 TB-EPS 拉曼光谱中主要为蛋白质和多糖的峰, 而反硝化污泥样品中主要为蛋白质、多糖和腐殖酸的峰。

### [参考文献] (References)

- [1] THIRD K A, SLIEKERS A O, KUENEN J G, et al. The CANON system (completely autotrophic nitrogen-removal over nitrite) under ammonium limitation: interaction and competition between three groups of bacteria[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2001, 24(4): 588-596.
- [2] THIRD K A, PAXMAN J, SCHMID M, et al. Enrichment of anammox from activated sludge and its application in the CANON process[J]. *Microbial Ecology*, 2005, 49(2): 236-244.
- [3] ZHU P T, LONG G Y, NI J R, et al. Deposition kinetics of extracellular polymeric substances (EPS) on silica in monovalent and divalent salts[J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(15): 5699-5704.
- [4] FLEMMING H C, WINGENDER J. The biofilm matrix[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010(8): 623-633.
- [5] LIANG Z W, LI W H, YANG S Y, et al. Extraction and structural characteristics of extracellular polymeric substances (EPS), pellets in autotrophic nitrifying biofilm and activated sludge[J]. *Chemosphere*, 2010, 81(5): 626-632.
- [6] COMTE S, GUIBAUD G, BAUDU M. Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties: part I. comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods[J]. *Enzyme Microbial Technology*, 2006, 38(1-2): 237-245.
- [7] PATZOLD R, KEUNTJE M, von AHLFTEN A A. A new approach to non-destructive analysis of biofilms by confocal Raman microscopy[J]. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, 386(2): 286-292.
- [8] WAGNER M, IVLEVA N P, HAISCH C, et al. Combined use of confocal laser scanning microscopy (CLSM) and Raman microscopy (RM): investigations on EPS-Matrix[J]. *Water Res.*, 2009, 43(1): 63-76.
- [9] RAUNKJAER K, HVITVED-JACOBSEN T, NIELSEN P H. Measurement of pools of protein, carbohydrate and lipid in domestic waste-water[J]. *Water Res.*, 1994, 28(2): 251-262.
- [10] FROLUND B, GRIEBE T, NIELSEN P H. Enzymatic-activity in the activated-sludge floc matrix[J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1995, 43(4): 755-761.
- [11] SUN Y D, CLINKENBEARD K D, CLARKE C, et al. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin induced apoptosis of bovine lymphocytes involves DNA fragmentation[J]. *Vet. Microbiol.*, 1999, 65(2): 153-166.
- [12] MAQUELIN K, KIRSCHNER C, CHOO-SMITH L P, et al. Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2002, 51(3): 255-271.
- [13] CHEN M C, LORD R C. Laser-excited Raman-spectroscopy of biomolecules. 9. laser Raman spectroscopic studies of thermal unfolding of ribonuclease A[J]. *Biochemistry*, 1976, 15(9): 1889-1897.
- [14] PUPPELS G J, GARRITSEN H S, SEGERS-NOLTEN G M, et al. Raman microspectroscopic approach to the study of human granulocytes[J]. *Biophysical Journal*, 1991, 60(5): 1046-1056.