

白腐真菌菌丝球形成的物化条件及其对铅的吸附*

李清彪 吴涓 杨宏泉 邓旭 卢英华

洪丽玉 蔡立哲

(厦门大学化工系, 厦门 361005 E-mail: kelqb@jingxian.xmu.edu.cn) (厦门大学环境科学研究中心, 厦门 361005)

摘要 为了探讨影响微生物菌丝球生长的物理化学因素和控制菌丝球大小的规律以及微生物吸附重金属的效果, 对黄孢展齿革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)呈球状体生长和用此菌丝球吸附水溶液中的 Pb^{2+} 进行了研究。实验结果表明, 在培养液pH值为4.5, 孢子悬液浓度为 10^6 个/ml, 表面活性剂吐温80的浓度为0.1%, 高碳氮和摇床转速为150r/min的条件下, 于39℃下培养3d, 形成直径在1.5—1.7mm范围内的菌丝球, 光滑均匀, 具有一定机械强度, 对 Pb^{2+} 的吸附能力最强。用0.2mol/L的NaOH溶液处理该菌丝球, 对25mg/L的铅溶液的吸附率达到了95%以上, 表明用该菌丝球吸附水溶液中的 Pb^{2+} 是可行的。

关键词 白腐真菌, 菌丝球, 生物吸附, Pb^{2+} , 碳氮比, 生长量, 孢子悬液, 表面活性剂

The Effects of Physical and Chemical Conditions on Forming Mycelial Pellet of *Phanerochaete chrysosporium* and Biosorption of Lead

Li Qingbiao Wu Juan Yang Hongquan Deng Xu Lu Yinghua

(Department of Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005 E-mail: kelqb@jingxian.xmu.edu.cn)

Hong Liyu Cai Lizhe

(Research Center of Environment and Science, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract The research on the growth of *Phanerochaete chrysosporium* in the form of pellet was made in this paper to examine the effects of physical and chemical conditions on the formation of mycelial pellets. The experimental results showed that the microorganism pellets of smooth surface, even size (diameter) and good mechanical properties could be obtained at the following culture conditions: pH 4.5, 10^6 spores/ml in inoculum, 0.1% Tween 80 in medium, high C/N and on the shaker of 150r/min for 3d. Using *P. chrysosporium* mycelial pellets in the biosorption of Pb^{2+} from aqueous solution, the uptake reached the maximum when the diameter of pellet was in the range of 1.5—1.7mm. When the pellets were pretreated by boiling in 0.2mol/L NaOH for 40min, the Pb^{2+} uptake was far higher than the pellets without pretreatment, and the removal efficiency could reach above 95%. The research results showed that the removal of Pb^{2+} from aqueous solution by *P. chrysosporium* mycelial pellets was practical.

Keywords *Phanerochaete chrysosporium*, mycelial pellet, biosorption, Pb^{2+} , C/N, biomass, spore suspension, surface-active agent

微生物菌丝球的培养和应用国内外已有报道^[1-3]。在工业上, 菌丝球大多被用于发酵生产, 如生产柠檬酸、伞菌、酶和抗生素^[4]等, 取得了理想的效果。但在废水处理方面的应用尚不多见。Shama等^[1]研究了影响寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*)呈菌丝球生长的各种

因素。Linko^[2]通过控制黄孢展齿革菌(*P. chrysosporium*)菌丝球的培养条件来生产木质素过氧化物酶, 产量显著。Knapp等^[5]利用

* 国家教委留学回国人员科研启动基金资助项目
李清彪, 男, 35岁, 博士, 教授
收稿日期: 1998-04-06

白腐真菌菌丝球对含有二号橙(Orange II)的染料废水进行脱色,脱色率达 98%。真菌如黄色曲霉(*Aspergillus flavus*)^[6],酵母菌如啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)^[7],以及细菌如生枝动胶菌(*Zoogloea ramigera*)^[8]等都能不同程度地吸附重金属离子。Engl 等^[7]发现培养条件对啤酒酵母的生物吸附能力有很大影响。目前对微生物吸附重金属的研究多是利用粉末状或固定化细胞,本文通过对黄孢展齿革菌成球条件的控制,可自动形成具有一定机械强度和大小菌丝球,无需任何载体,既可应用于固定床或流化床连续处理含重金属的废水,又降低了成本。

1 材料与方 法

1.1 材 料

(1) 菌种及培养基 菌种为黄孢展齿革菌(*Phanerochaete chrysosporium*),由香港科学技术大学提供。培养基成分为(1L): Basal III medium 100ml, 葡萄糖 10g, 丁二酸钠(0.1mol/L) 100ml, 硫酸素 0.001g, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.25g, 吐温 80 (0.1%) 50ml, 痕量元素溶液 60ml, 孢子悬液 100ml Basal III medium 成分为(1L): KH_2PO_4 2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5g, CaCl_2 1g, 痕量元素溶液 100ml

(2) 铅溶液的配制 准确称取铅粉 0.2500g, 置于 100ml 烧杯中, 加入 1+1 硝酸 20ml, 加热溶解, 冷却后加水稀释并移入 1L 容量瓶中定容至标线, 浓度为 250mg/L。用于吸附实验的铅溶液由上述贮备液稀释而成。

1.2 实验方 法

(1) 菌丝球的培养方 法 将配好的培养基, 用 pHS-3C 型酸度计调节 pH 值至所需值, 然后于 121℃ 下灭菌 20min。接种时, 用无菌的生理盐水冲洗黄孢展齿革菌的固体斜面, 用接种环轻刮斜面, 直至菌体被完全冲洗下来。然后将此孢子悬液按 10% 的比例接种到上述培养基中, 于摇床上恒温、恒转速下培养 3d。过滤收集菌丝球, 取出一部分于 GQ 70E-型红外线快速干燥器中烘干至恒重, 测定干湿比; 其余的可用

生理盐水浸泡, 置于冰箱保存待用。

(2) 吸附方 法 为消除玻璃器壁对吸附的干扰, 所用玻璃仪器于吸附前均用 1:1 的硝酸浸泡 24h, 洗净烘干待用。取初始浓度为 50mg/L 的铅溶液 100ml, 用 0.2mol/L 硝酸和 0.5mol/L 氨水调节至所需 pH 值(本实验取 4.5), 加入 0.2g (干重) 菌丝球(按干湿比计算干重), 在 26℃ 下于摇床上吸附 16h。然后过滤, 用 PE3030 型原子吸收分光光度计(美国 Perkin-Elmer 公司)分析滤液中剩余 Pb^{2+} 的浓度。

(3) 碱处理 将一定量菌丝球在 0.2mol/L 的 NaOH 溶液中煮沸 40min, 然后过滤, 用去离子水冲洗至滤液呈中性, 将此菌丝球用于吸附实验。

本文中的吸附量是指单位细胞干重上吸附的金属离子重量(mg/g)。以下实验除非有特殊说明, 所用生物吸附剂均指未经任何预处理(本文中定义为天然生物量)。

2 结果和讨论

2.1 培养时间的影 响

将配好的培养液(C/N = 131, pH 4.5) 灭菌后, 按 10% 的比例接入浓度为 9×10^5 个/ml 的孢子悬液, 放入摇床进行培养, 培养条件为 150r/min, 39℃。微生物生长情况见表 1。

表 1 微生物的生长状况

培养时间/h	生长状况	球径/mm
11	颗粒非常小	
19	颗粒较小	0.80—0.95
26	颗粒增多, 大小不均匀	0.90—1.10
36	颗粒较均匀, 较小	1.30—1.40
48	颗粒变大, 色白, 不太光滑	1.40—1.50
60	颗粒继续增大, 大小均匀	1.60—1.65
72	颗粒大小基本不变, 色白, 光滑, 均匀	1.60—1.70
80	生长基本停止	1.60—1.70

由表 1 的实验结果可知, 随着培养时间的延长, 黄孢展齿革菌发生了外观形态的变化, 形成了球状颗粒。其成球过程是: 孢子互相凝聚形成晶核, 由孢子生成的菌丝不断地缠绕在晶核上, 进而形成较大的菌丝球。因黄孢展齿革菌在成球

生长的过程中其生物性能和外观形态都发生了变化,故不同生长阶段的菌丝球的生物吸附能力也应有所不同。为考察其中的变化规律,对不同生长阶段菌丝球吸附铅的能力进行了测试,实验结果见图 1。

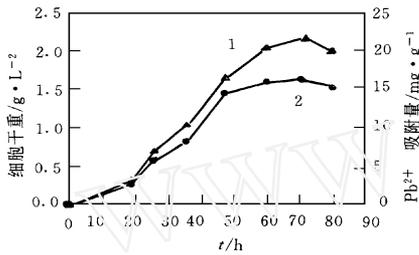


图 1 培养时间对生长量和吸附的影响

1. 细胞干重 2. Pb^{2+} 吸附量

从图 1 可以看出,随着培养时间的延长,黄孢展齿革菌的生长量不断增多,在 19~60h 之间生长很快,72h 以后停止生长。从吸附能力来看,培养时间超过 48h 后,所得菌丝球的吸附能力变化已不大,以生长 72h 的菌丝球对 Pb^{2+} 的吸附量最大,达 16.07 mg/g ,此时菌丝球的球

径在 1.6—1.7mm 之间。所以综合考虑,培养 72h 最佳。2.2 pH 的影响 固定培养过程的其它条件,改变培养液 pH 值,实验结果如表 2 所示。pH 2 时微生物的生长量很少,在 pH 4.5—6.5 之间生长量最大 ($1.7—1.9 \text{ g/L}$ 培养液),pH 大于 7 以后生长量逐渐减少。在实验过程中还观察到,在 pH 2 时不能形成菌丝球,在 pH 4.5—6.5 之间球径变化不明显,且菌丝球光滑、均匀,只在 pH 大于 7 以后,球径才明显减小,且菌丝球大小不很均匀。由此可见,强酸和碱性条件对菌丝球的生长都有一定的抑制作用。从球径和干湿比的关系中不难发现,菌丝球越小,干湿比越大,说明球中所含水分越少,强度越好。由此可见 pH 值是影响微生物成球生长的一个重要因素。因为 pH 影响微生物原生质膜所带电荷以及某些营养物质的分解和电离程度,从而影响微生物对养分的吸收;其次,pH 也影响细胞内的代谢作用和孢子表面性能^[9]。所以 pH 对菌丝球的质量和形态都有较大影响。

从吸附结果来看,在 pH 4.5—6.5 范围内

表 2 培养基 pH 值对成球和 Pb^{2+} 吸附的影响¹⁾

培养液 pH	干湿比	球径/mm	细胞干重/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	表面特征	Pb^{2+} 吸附量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
2.0	0.0663		0.342	不形成菌丝球	5.78
3.5	0.0323	1.8—1.9	1.572	均匀,色白	9.10
4.5	0.0370	1.6—1.7	1.837	均匀,色白	16.34
5.5	0.0375	1.6—1.7	1.797	均匀,色白	16.01
6.5	0.0380	1.6—1.7	1.668	均匀,色白	15.85
7.5	0.0386	1.4—1.5	1.581	不太均匀	13.82
8.5	0.0396	1.2—1.3	1.494	不太均匀	12.58
9.5	0.0444	0.9—1.0	1.224	颜色微黄	11.81
10.5	0.0671	0.8—0.9	0.978	颜色微黑	9.61

1) 培养条件: 孢子悬液浓度 = 9×10^5 个/ml, C/N = 131, 39, 150r/min, 3d

生长的菌丝球对 Pb^{2+} 的吸附能力较好,吸附量最大值为 16.34 mg/g , 吸附率为 66.64%, 此时球径在 1.6—1.7mm 之间。球太大时比表面积小,导致吸附量较小。球太小则虽然比表面积较大,但含水量少,菌丝缠绕紧密,造成传质阻力增大,所以吸附量也会降低。因此对于吸附过程来说,应有一最佳球径范围。选择 pH 4.5 作为

培养液 pH 值对于成球和吸附都有利。

2.3 碳氮比的影响

在培养基成分中,碳源和氮源是构成细胞和代谢产物的主要元素,又是提供微生物生命活动所需能源的原料。培养基的碳氮比是关系到细胞能否生长、菌丝生长量多少以及菌丝球形态的关键因素。

表 3 不同培养基 C/N 对成球和 Pb²⁺ 吸附的影响¹⁾

C/N	葡萄糖 /g · L ⁻¹	NH ₄ H ₂ PO ₄ /g · L ⁻¹	细胞干重 /g · L ⁻¹	球径 /mm	表面特征	Pb ²⁺ 吸附量 /mg · g ⁻¹
4.10	10.00	8.00	3.148	2.0—2.1	不光滑, 很软	15.06
25.26	10.0	1.30	2.847	1.9—2.0	不光滑, 很软	15.47
65.68	5.00	0.25	1.717	1.8—1.9	光滑, 较软	16.38
98.63	7.50	0.25	1.810	1.8—1.9	光滑, 稍硬	16.95
131.35	10.00	0.25	1.927	1.6—1.7	光滑, 较硬	17.18

1) 培养条件: pH4.5, 孢子悬液浓度= 2.1 × 10⁶ 个/ml, 39 °C, 150r/min, 3d

表 3 结果表明, 在含氮量相同的条件下, 随着含碳量的增大生长量增多, 球径变小, 机械性能有所改善, 且以 C/N 为 131 时的球径最小 (1.6—1.7mm), 质地最硬。在含碳量相同的情况下, 随着含氮量的增大, 生长量和球径也随之增大, 但材料的机械性能急剧变差。综合考虑, 选择高碳低氮的培养基对提高菌丝球的综合性能最为有利。另一方面, 从吸附性能来看, 随着

碳氮比的提高, 菌丝球的吸附能力逐渐增大, 只在碳氮比大于 100 以后, 上升趋势才减缓。所以可以认为在高碳氮比下培养得到的菌丝球对 Pb²⁺ 的吸附能力最强, 机械强度也较好。

2.4 表面活性剂的影响

为改善微生物菌丝球的均匀程度, 在培养基中引入一种表面活性剂吐温 80, 考察了不同浓度的表面活性剂对成球和吸附能力的影响

表 4 表面活性剂浓度对成球和 Pb²⁺ 吸附的影响¹⁾

Tween80 浓度/%	0	0.05	0.1	0.2	0.3	0.5	1.0	1.5	2.0
球径/mm	1.2-1.5	1.6-1.7	1.6-1.7	1.8-1.9	1.7-1.8	1.7-1.8	1.5-1.6	1.4-1.5	1.4-1.5
细胞干重/g · L ⁻¹	1.656	2.133	2.269	2.282	2.303	2.389	2.412	2.436	2.501
吸附率/%	57.22	65.00	65.65	58.57	59.79	60.57	65.47	57.65	56.19
吸附量/mg · g ⁻¹	14.31	16.25	16.41	14.64	14.95	15.14	16.37	14.41	14.05

1) 培养条件: pH4.5, 孢子悬液浓度= 8.1 × 10⁵ 个/ml, C/N = 131, 39 °C, 150r/min, 3d

实验结果表明(表 4), 吐温 80 浓度在 0—2% 范围内, 生长量是逐渐增大的, 而球径则表现出先增大后减小的趋势。若培养液中不含吐温 80, 则菌丝球大小不均匀, 质地软; 而加入吐温 80 以后, 菌丝球不但大小均匀, 光滑而且弹性好, 质地较硬。

吐温 80 在培养过程中所起的作用与它的化学结构有很大关系。吐温是多醇类非离子型表面活性剂, 吐温 80 分子中含有聚乙氧基亲水链, 比吐温 20、吐温 60 的亲水链要多, 因而大大改善了吐温 80 的水溶性和乳化性能。并且由于亲水基团是聚乙氧基, 它具有较高的负电荷密度, 有利于孢子、菌丝的凝集。

分析表 4 中的吸附结果可以得出与表 2 相

同的结论, 即球径过大、过小都不利于吸附, 在 1.5—1.7mm 的球径范围内, 吸附量最大, 为 16.41mg/g, 吸附率达 65.65%。

2.5 孢子悬液浓度的影响

配制不同浓度的孢子悬液, 考察其对成球和吸附的影响

实验结果表明(表 5), 随着所接入的孢子悬液浓度的减小, 菌丝球变大而数量减少, 且球径越大, 干湿比越小, 表明球的机械强度越差。当孢子浓度低时, 孢子凝结成晶核的机会减少, 形成的晶核也就较少, 故最终生成的菌丝球数量比高孢子浓度下要少。另一方面, 由于培养液中孢子数量少, 生成的菌丝就少, 所以每个晶核上缠绕的菌丝也就少, 可观察到此时的菌丝球

大而松散 而在高浓度的孢子悬液情况下, 初始晶核和生成的菌丝较多, 每个晶核上缠绕的菌丝相对来说就比较多, 因而形成较小且质地较硬的菌丝球 经分析认为, 孢子悬液浓度控制在 10^6 个/ m^3 时, 菌丝球质量和机械性能以及吸附

性能都比较好

2.6 摇床转速对成球的影响

不同摇床转速下的培养结果见表 6 虽然只作了 3 种转速下的成球培养, 但仍能看出一个大概趋势

表 5 孢子悬液浓度对成球和 Pb^{2+} 吸附的影响¹⁾

孢子悬液浓度/个· m^{-3}	细胞干重/ $g \cdot L^{-1}$	干湿比	球径/mm	吸附率/%	表面特征
10^6	2.045	0.0391	1.6-1.7	65.89	光滑, 较硬
10^5	1.717	0.0326	2.4-2.5	33.86	光滑, 较软
10^4	1.197	0.0302	3.5-3.6	32.67	光滑, 很软
10^3	0.477	0.0284	4.5-5.0	28.61	光滑, 很软

1) 培养条件: pH4.5, C/N = 131, 39, 150r/min, 3d

表 6 摇床转速对成球的影响¹⁾

摇床转速/ $r \cdot min^{-1}$	细胞干重/ $g \cdot L^{-1}$	干湿比	球径/mm	表面特征
108	0.410	0.0276	5.0-6.0	光滑, 不太均匀, 很软
132	1.833	0.0354	1.9-2.0	光滑, 均匀, 较软
150	1.894	0.0385	1.7-1.8	光滑, 均匀, 较硬

1) 培养条件: pH4.5, 孢子悬液浓度 = 1.2×10^6 个/ m^3 , C/N = 131, 39, 3d

从表 6 来看, 摇床转速对成球的影响很大 生长量随着转速的提高而增多, 但在高转速下变化的趋势不大; 球径随转速的减小而迅速增大, 机械性能则变差 这是因为一方面, 在不同的振荡条件下, 培养液的溶氧状况不同 据研究, 在气态氧的传递过程中, 主要传质阻力是液膜阻力^[10]. 提高摇床转速可增大培养液的湍动程度, 降低传质阻力, 从而提高氧的转移速率 由于黄孢展齿革菌是好氧菌, 因而转速提高促进了菌丝的生长 而在较低转速下, 由于培养液中溶氧量较少以及溶氧的不均匀, 处在颗粒中心的细胞会因缺氧而自溶, 表现为菌丝球的中空现象 另一方面, 转速的大小又决定了培养液中菌丝球所受机械力的大小 过分剧烈的机械搅拌产生的强剪切作用会使菌丝体受到损伤; 相反, 在低转速下菌丝体所受剪切力较小, 相互之间缠绕得不很紧密, 因而造成菌丝球松散、质地松、球径大 另外, 搅拌也可使培养液内的温度和营养物浓度均匀, 同时可尽快排出细胞代

谢产生的废物(如 CO_2), 有利于细胞的代谢活动 在本实验中采取较高转速(150r/min)培养黄孢展齿革菌的菌丝球较为适宜

2.7 培养液中 Ca^{2+} 浓度的影响

为改善菌丝球的机械性能, 在培养液中加入不同浓度的 Ca^{2+} . 从实验结果(表 7)可看出, 随着 $CaCl_2$ 浓度的逐渐增大, 生物量有很明显的增长, 在 $CaCl_2$ 浓度为 0.04% 时达到了最大值; 而在此之后呈现急剧下降的趋势, 当 $CaCl_2$ 浓度大于 0.05% 时, 下降趋势变缓 当 $CaCl_2$ 浓度从 0.01% 增大到 0.1% 时, 菌丝球大小差不多, 但其干湿比却有较大差别 随着 Ca^{2+} 浓度的增大, 菌丝球的干湿比也增大, 表明其机械性能也在不断地增强

将该菌丝球投放到初始浓度为 25mg/L 的铅溶液中, 实验结果表明 Ca^{2+} 浓度的变化对 Pb^{2+} 的吸附能力影响不大(生物量于吸附前经碱处理), 但与天然生物量相比, 碱处理后的生物量对 Pb^{2+} 的吸附能力大大提高, 从 65% 左右

表 7 培养基中 CaCl_2 浓度对成球和吸附的影响²⁾

CaCl_2 浓度/%	0.01	0.02	0.04	0.05	0.10
球径/mm	1.5-1.6	1.6-1.7	1.7-1.8	1.6-1.7	1.7-1.8
细胞干重/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	1.811	1.888	2.319	1.781	1.762
干湿比	0.0323	0.0331	0.0361	0.0423	0.0457
吸附量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	11.91	11.79	11.65	11.52	11.41
吸附率/%	95.25	94.29	93.19	92.14	91.22

1) 培养条件: pH 4.5, 孢子悬液浓度 = 1.4×10^6 个/mL, C/N = 131/39, 150r/min, 3d

提高到 90% 以上。碱处理改变了细胞壁的结构, 溶解了细胞上一些不利于吸附的杂质, 暴露出细胞壁上更多的活性结合点, 从而提高了吸附能力。综合考虑, 培养液中 CaCl_2 浓度取 0.04% 时, 生长量较多, 菌丝球的机械性能适中, 对 Pb^{2+} 的吸附量也较大。

3 结论

(1) 培养基成分、pH 值、孢子悬液浓度以及培养时间和摇床转速对成球都有影响, 其中以 pH 值、孢子悬液浓度和摇床转速的影响最大。当培养基的碳氮比为 131, pH 为 4.5, 吐温 80 浓度为 0.1%, 孢子悬液浓度为 10^6 个/mL, 于 150r/min 的摇床上培养 3d 时, 可得到颗粒大小适宜、机械强度和吸附性能较好的菌丝球。

(2) 菌丝球经碱处理后其吸附能力大大提高, 因而用改性后的微生物菌丝球去除水溶液中的铅离子是可行的。

(3) 本文仅从菌丝球的物化性能方面探讨了其对生物吸附铅的影响, 今后的工作将重点研究影响生物吸附过程的物化因素, 以及含重金属的废水在固定床和流化床上的吸附行为, 并进一步探讨生物吸附的机理。

参 考 文 献

1 Shama A, Padwal-Desai S R. On the relationship be-

tween pellet size and aflatoxin yield in *Aspergillus parasiticus*. *Biotechnol and Bioeng*, 1985, **27** (11): 1577—1580

2 Linko S. Production and characterization of extracellular lignin peroxidase from immobilized *Phanerochaete chrysosporium* in a 10L bioreactor. *Enzyme Microb Technol*, 1988, **10**(6): 410—417

3 林鹿, 王双飞, 陈嘉翔. 白腐菌对蔗渣浆 CEH 漂白废水的脱色. *工业水处理*, 1996, **16**(3): 25—26

4 Prosser J I, Tough A J. Growth mechanisms and growth kinetics of filamentous microorganism. *Biotechnology*, 1991, **10**(4): 253—274

5 Knapp J S, Furning Zhang, Tapley K N. Decolourisation of Orange II by a wood-rotting fungus. *J. Chem. Tech. Biotechnol*, 1997, **69**(3): 289—296

6 Hafez N, Abdel-Razek A S, Hafez M B. Accumulation of some heavy metals on *Aspergillus flavus*. *J. Chem. Tech. Biotechnol*, 1997, **68**(1): 19—22

7 Engl A, Kunz B. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: effects of nutrient conditions. *J. Chem. Tech. Biotechnol*, 1995, **63**(3): 257—261

8 Norberg A, Persson H. Accumulation of heavy metal ions by *Zoogloea ramigera*. *Biotechnol and Bioeng*, 1984, **26** (3): 239—246

9 Metz B, Kossen N W F. The growth of molds in the form of pellets—A literature review. *Biotechnol and Bioeng*, 1997, **110**(6): 781—799

10 熊宗贵. 发酵工业原理. 北京: 中国医药科技出版社, 1995. 114