

pH 值对白腐真菌液体培养基抑制杂菌效果的影响研究

高大文, 文湘华, 周晓燕, 曾永刚, 钱易

(清华大学环境科学与工程系环境模拟与污染控制国家重点实验室, 北京 100084)

摘要:应用摇瓶试验研究了不同初始 pH 值对白腐真菌 *Phanerochaete chrysosporium* 液体培养基在非灭菌环境抑制杂菌效果的影响。结果表明, 当采用 *Phanerochaete chrysosporium* 孢子作为种子在非灭菌环境进行培养时, 初始 pH 值为 3.6 和 4.4 的液体培养基在培养第 1 d 仅感染酵母菌, 而初始 pH 值为 5.6 的液体培养基不仅感染了酵母菌而且还感染了细菌; 正是由于非灭菌环境培养体系感染杂菌, 使得后续 *Phanerochaete chrysosporium* 对活性艳红 K-2BP 的脱色能力大大降低甚至丧失; 而采用灭菌环境培养 *Phanerochaete chrysosporium*, 非灭菌环境脱色活性艳红 K-2BP 的方法却获得了较好的脱色效果, 3 种初始 pH 值的氮限制液体培养基培养出的 *Phanerochaete chrysosporium* 对活性艳红 K-2BP 45 h 的脱色率均在 70 % 以上, 接近或超过灭菌环境的结果, 其中初始 pH 值为 4.4 的液体培养基培养的 *Phanerochaete chrysosporium* 在非灭菌环境对活性艳红 K-2BP 的脱色效果最好, 其 24 h 的脱色率达到 80 % 以上。尽管 3 种 pH 液体培养基在脱色过程中也同样感染了杂菌, 但与非灭菌环境培养体系相比含量很少, 没有影响脱色效果。因此, 可以得出低 pH 值 (pH = 3.6, pH = 4.4) 氮限制培养基虽然在一定程度上可以抑制细菌, 但是却不能抑制酵母菌; 当在非灭菌环境使用 *Phanerochaete chrysosporium* 脱色活性染料时, *Phanerochaete chrysosporium* 只有在灭菌环境培养至菌丝体形成并在整个系统占优势, 才能获得较高的脱色效果。

关键词:白腐真菌; *Phanerochaete chrysosporium*; pH; 脱色; 活性艳红 K-2BP; 非灭菌条件

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2005)06-0173-07

Effect of pH on Suppressing the Growth of Other Bacteria and Fungi in Culturing *Phanerochaete chrysosporium* in Liquid Medium

GAO Da-wen, WEN Xiang-hua, ZHOU Xiao-yan, ZENG Yong-gang, QIAN Yi

(ESPC State Key Joint Laboratory, Department of Environment Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Effect of different pH value on suppressing the growth of other bacteria and fungi in culturing *Phanerochaete chrysosporium* in liquid medium under non-sterile were investigated in agitated Erlenmeyer flasks. Results showed that nitrogen-limited liquid medium with pH 3.6 and pH 4.4 were contaminated only by yeast fungi when the *Phanerochaete chrysosporium* was incubated with spore inoculation under non-sterile condition for one day; however, nitrogen-limited liquid medium with pH 5.6 was contaminated not only by yeast, but also by bacteria. These contaminated yeast and bacteria reduced the dye decolorizing ability of *Phanerochaete chrysosporium*. If after the *Phanerochaete chrysosporium* was incubated under sterile condition for 5 days, it can decolorize over 70 % of the reactive brilliant red K-2BP within 45 hours under non-sterile condition, and this removal rate was close to or even higher than that under sterile condition. *Phanerochaete chrysosporium* cultured in the liquid medium with pH 4.4 have the best decolorizing effect under non-sterile condition, and can decolorize up to 80 % of the reactive brilliant red K-2BP in 24 hours. In additions, it was observed that by using the *Phanerochaete chrysosporium* incubated in above nitrogen-limited liquid medium with different pH under sterile condition for 5 days, the system were also contaminated by the other bacteria and yeast during decolorizing reactive brilliant red K-2BP under non-sterile condition, but the amount of these bacteria and yeast in liquid medium were too little to influence the *Phanerochaete chrysosporium* decolorizing reactive brilliant red K-2BP. So that, when *Phanerochaete chrysosporium* was used to decolorize reactive dyes under non-sterile condition, the incubation of *Phanerochaete chrysosporium* must be operated under sterile condition in order to achieve the higher decolorization.

Key words: white rot fungus; *Phanerochaete chrysosporium*; pH value; decolorization; reactive brilliant red K-2BP; non-sterile condition

尽管大多数研究的目的是评价白腐真菌氧化废水中污染物的能力^[1~3], 但是目前有关在非灭菌运行方式下使用白腐真菌的研究却很少见报道。虽然在灭菌环境中白腐真菌对染料有较高的脱色效

收稿日期: 2004-09-17; 修订日期: 2004-11-11

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2002 AA649100); 国家自然科学基金项目 (50478010); 中国博士后科学基金项目 (2004035035)

作者简介: 高大文 (1967~), 男, 博士, 副教授, 主要从事环境生物技术与水污染控制研究, E-mail: gdw@mail.tsinghua.edu.cn

果^[4-6],并且脱色效果不随时间而降低,但是细菌污染很容易发生,一旦发生将引起脱色效率的急剧下降^[7].因此,如果在实际含染料废水处理中应用白腐真菌,必须要解决的问题就是反应体系染菌.如果对实际工程中的反应器、培养液、载体以及废水都进行灭菌处理并保证处理过程不染菌,显然将大大增加处理工艺的运行成本,并且在实际工程中也是行不通的.因此,如何解决白腐真菌降解含染料废水过程中的染菌问题是该工艺能否应用到实际工程中的关键.

Leidig 等^[8]用聚乙烯醇包埋法保护白腐真菌 *Trametes versicolor* 和细胞外产生的过氧化物酶免受细菌攻击,达到对染料 Poly R-478 的连续生物氧化.经过 65 d 的试验,被细菌污染的聚乙烯醇小球仅在最外层到 50 μm 深度的区域存在污染,扫描电镜观察细菌并未深入聚乙烯醇小球内部. Libra 等^[9]应用白腐真菌 *Trametes versicolor* 研究了非灭菌环境降解活性染料的控制策略.试验结果显示,在悬浮培养试验中,培养液 pH 值降低到 3 以下都没有抑制细菌生长,相反白腐真菌在此 pH 值时已停止生长和产酶;单独使用粗酶液可以将白腐真菌生长和处理废水 2 个过程分开,从而间接减小细菌对白腐真菌的影响.但是,试验发现在非灭菌环境使用酶液时酶活急剧降低,最终影响处理废水的效果.另外,采用谷物作为白腐真菌生长的唯一底物同时又作为载体的试验也获得了较好的抑菌效果,并且对染料的脱色率依赖于接种带有白腐真菌的载体的量.非灭菌环境下氮限制液体培养基 ($\text{C/N} = 56 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} / 2.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 可以抑制细菌生长,该培养基中生长的白腐真菌在非灭菌环境条件下对活性艳红仍具有很高的脱色率;而碳限制液体培养基 ($\text{C/N} = 28 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} / 44 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 容易感染细菌,从而影响脱色效果^[10].因此,如果能够找到科学合理的抑菌方法,将有助于推动白腐真菌处理染料废水技术更快地应用到实际工程中.

白腐真菌同其他生物一样有一定的酸碱适应范围,已有研究表明,它在酸性 (pH 值为 4.3 ~ 4.5) 条件下,不仅能很好地生长,而且还具有很好地脱色效果.而大部分细菌在酸性环境中生长就会受到影响,严重的还会受到抑制.本研究结合前期工作,选择不同 pH 值氮限制液体培养基分别在灭菌和非灭菌环境培养 *Phanerochaete chrysosporium*,考察不同 pH 值氮限制液体培养基的染杂菌情况及其在不同环境培养出的 *Phanerochaete chrysosporium* 对活性艳红

K-2BP 的脱色效果,进而提出 *Phanerochaete chrysosporium* 生长和脱色的最佳 pH 值氮限制液体培养基和在非灭菌环境下应用 *Phanerochaete chrysosporium* 降解活性染料的控制策略.

1 材料与方法

1.1 菌种

采用的白腐真菌菌种是由本实验室保存的 *Phanerochaete chrysosporium* BKM F-1767.

1.2 培养基

1.2.1 固体培养基

(1) PDA 培养基 马铃薯浸出液 200 g/L,葡萄糖 20 g/L,琼脂 20 g/L.

(2) 牛肉膏蛋白胨培养基 牛肉膏 5.0 g/L,蛋白胨 10.0 g/L, NaCl 5.0 g/L,琼脂 15 g/L.

1.2.2 液体培养基

白腐真菌生长培养基参照 Tien 和 Kirk 的 *Phanerochaete chrysosporium* 基础培养基配制^[11].所不同的是为获得不同 pH 值的液体培养基,用醋酸和醋酸钠溶液将液体培养基的 pH 值调为 3.6 和 5.6,实验仍以葡萄糖为碳源,酒石酸氨为氮源,培养基碳氮比选取 $56 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} / 8.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

1.3 培养条件

将斜面上的菌种接种到 PDA 培养基平板上于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 3 ~ 4 d,用接种针剥取适量孢子入无菌水中制成孢子悬浊液,等量接入含 100 mL 液体培养基的一系列 250 mL 锥形瓶中,接种量 1×10^5 孢子/mL.然后放入温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温摇床中,在空气条件下培养,转速设为 160 r/min.培养过程中每天定时取样.对于所要考察的每一种情况同时进行 3 组平行实验,实验结果取其平均值.

1.4 染料

本实验采用的染料为活性艳红 K-2BP (reactive brilliant red K-2BP).其结构式为:

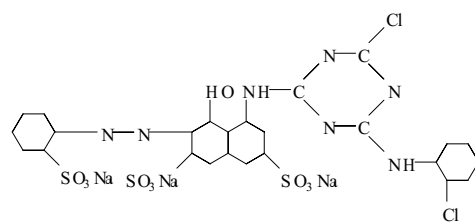


图 1 活性艳红结构式

Fig. 1 Chemical structure of reactive brilliant red K-2BP

1.5 试验方案

应用 pH 值为 3.6、4.4 和 5.6 的 3 种液体培养基分别在灭菌和非灭菌环境对 *Phanerochaete chrysosporium* 进行培养,考察 *Phanerochaete chrysosporium* 在培养过程中,不同 pH 环境培养基对 *Phanerochaete chrysosporium* 以外的微生物的抑制效果.每个 pH 值做 3 个平行样.结合表观观察和显微镜观察考察灭菌和不灭菌 2 种情况下不同 pH 环境培养基中 *Phanerochaete chrysosporium* 及其它菌群的生长情况.

培养 5 d 后,在液体培养基中添加染料(本试验采用活性艳红 K-2BP,终浓度 20 mg/L),1 种投加灭菌染料,另 1 种投加非灭菌染料,考察灭菌和非灭菌情况下 *Phanerochaete chrysosporium* 降解系统的脱色效果.

2 结果与讨论

2.1 灭菌和非灭菌环境下 *Phanerochaete chrysosporium* 的生长及体系的染菌情况

2.1.1 菌体生长

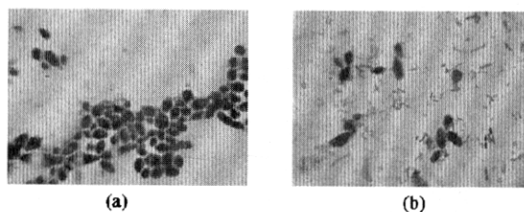
培养 1 d 后,3 种初始 pH 下灭菌发酵培养的锥形瓶中均出现少量表面光滑白色菌丝小球($d \approx 1$ mm),液体培养基澄清且略带酸性气味;非灭菌培养体系中也产生了少量表面光滑白色菌丝小球,但较灭菌条件下少($d \approx 0.5$ mm),且液体培养基呈现混浊.与前期非灭菌环境培养 2 d 后液体培养基才出现混浊不同的原因是,本次试验中培养基配制完毕后在空气中放置了 24 h 后才进行 *Phanerochaete chrysosporium* 接种试验.通过对在空气中放置 24 h 的液体培养基镜检,发现体系内有少量杂菌.正是由于这些杂菌使得非灭菌环境下培养 *Phanerochaete chrysosporium* 1 d 后体系即出现混浊.

培养第 2 d 时,3 种初始 pH 下非灭菌培养体系的培养基始终保持混浊,而且菌丝小球的数量和大小也增长得十分缓慢,即使培养至第 5 d,菌丝小球的直径仅 0.5 ~ 1.5 mm,且均无明显的毛刺产生.因此,从 *Phanerochaete chrysosporium* 生长以及液体培养基溶液变化情况,可以得出在非灭菌环境下液体培养基无论具有较低的 pH 值(pH = 3.6)还是较高的 pH 值(pH = 5.6)都容易感染杂菌.与非灭菌培养体系相比,灭菌培养的锥形瓶中培养基仍保持澄清,有些呈现微黄色,菌丝小球表面仍光滑平整,大小和数目均有显著增加,其中初始 pH 为 3.6 体系的菌丝小球较 pH 为 4.4 和 5.6 体系的直径稍小.培养第 3 d,pH 4.4 和 pH 5.6 的体系中均有部分菌丝

小球直径达 3 mm 左右,且有少量毛刺产生;pH 3.6 的体系中菌丝小球直径约 1.5 ~ 2 mm,毛刺呈绒状,不是十分明显.培养 5 d 后 pH 4.4 和 pH 5.6 的体系中已有大量毛刺生成(长度约为 0.5 ~ 1 mm),菌丝小球直径达 3 ~ 3.5 mm,而 pH 3.6 的体系中菌丝小球直径仍为 1.5 ~ 2 mm,少部分可达 3 mm,毛刺量较少,长度较短(0.5 mm 左右).

2.1.2 体系染杂菌情况

通过对非灭菌环境培养 *Phanerochaete chrysosporium* 4 d 后的液体培养基进行显微镜观察,发现不同初始 pH 值的液体培养基均感染了杂菌,而且根据液体培养基初始 pH 值不同,所染杂菌也不尽相同.为了便于观察,在对所染杂菌形态观察之前,首先应用结晶紫对细胞进行了染色.图 2 为 pH 为 3.6 和 5.6 的液体培养基在非灭菌环境培养 *Phanerochaete chrysosporium* 4 d 时的染菌情况.由于试验中 pH 为 4.4 的液体培养基所染杂菌与 pH 为 3.6 的体系完全相同,所以文中仅列出 pH 为 3.6 的液体培养基的染菌情况.



(a) pH = 3.6 体系(酵母菌, 100 × 10);

(b) pH = 5.6 体系(酵母菌/杆菌 100 × 10)

图 2 非灭菌环境培养 4 d 时的染菌情况

Fig. 2 Microscope photograph of liquid media incubated under non-sterile condition for 4 days

从图 2 可以看出,非灭菌环境下 pH 为 3.6 和 5.6 的液体培养基中都有边缘光滑的椭圆形菌体,结晶紫染色后呈紫色,酒精不能脱色.通过将非灭菌环境培养 *Phanerochaete chrysosporium* 4 d 的 pH 为 3.6 的液体培养基接种到牛肉膏蛋白胨培养基上,培养 1 d 后发现,平板上长出大量白色、细小、表面光滑、直径约 0.5 mm 的圆形菌落.经对从平板挑出的菌落镜检,发现大量椭圆形菌体.根据细胞形状并结合平板上长出菌落的形态可以确定体系所染椭圆形菌体为酵母菌.另外,从图 3 可以看出,pH 为 5.6 的液体培养基除感染了酵母菌外,还有许多球菌和杆菌.分析 3 种 pH 体系所染杂菌种类不同的原因是不同杂菌对体系 pH 值的要求不同.酵母菌对环境

pH 值的要求较宽,随着菌系或种的不同,可从 pH 2.2 到 8.0;而大多数细菌容易在中性 pH 值体系生长繁殖.因此,无论液体培养基的 pH 值为 3.6 还是 5.6,体系均很容易感染酵母菌,而在 pH 为 5.6 的弱酸性液体培养基中还容易感染球菌、杆菌等细菌.相反,在 pH 为 3.6 和 4.4 的酸性液体培养基中就不易感染细菌.以上结论均是在氮限制培养体系得出,在碳限制培养体系情况又有所不同^[10],有关研究另文详述.

2.1.3 体系 pH 变化

任何微生物生长繁殖对环境的酸碱性都是有一定要求的.如果环境本身 pH 值不是某种微生物生长的最适宜范围,那么这种微生物就会通过自身的生理功能分泌一些酸碱性质物质来调整环境的 pH 值至适于自己生长的范围.因此,如果白腐真菌培养体系感染杂菌,则培养体系的 pH 值将有所变化,除非所染杂菌生长的适宜 pH 值与白腐真菌培养体系的 pH 值相同.基于此,分别对灭菌环境和非灭菌环境培养黄孢原毛平革菌过程的 pH 值进行了检测,结果如图 3、图 4 所示.

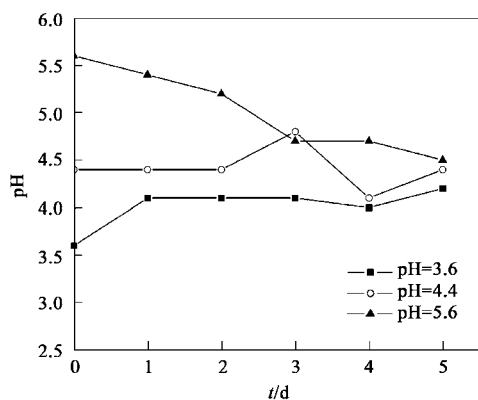


图 3 灭菌培养体系 pH 变化

Fig. 3 Variation of pH during incubating *Phanerochaete chrysosporium* under sterile condition

由图 3 可以看出,灭菌环境下初始 pH 值为 4.4 的液体培养基在培养黄孢原毛平革菌的过程中 pH 一直稳定在 4.4 附近,虽有波动,上下浮动不超过 0.5 个单位;而初始 pH 值为 3.6 的液体培养基在培养过程中体系的 pH 值缓慢上升,到培养第 5d 时 pH 已升至 4.2,接近黄孢原毛平革菌的最佳生长 pH 值(pH=4.4);更为明显的是,初始 pH 值为 5.6 的液体培养基在培养过程中体系的 pH 值迅速下降,培养第 5d 时 pH 已降至 4.5,下降了 1.1 个单

位.因此,从以上结果可以看出,尽管灭菌培养体系的初始 pH 值不同,但至培养第 5d 后培养体系的 pH 均基本稳定在 4.4 附近,因此,可以推测在没有杂菌侵入的条件下,黄孢原毛平革菌可以利用质膜上的氧化还原系统调节所处环境达到其所需要的低 pH 值.

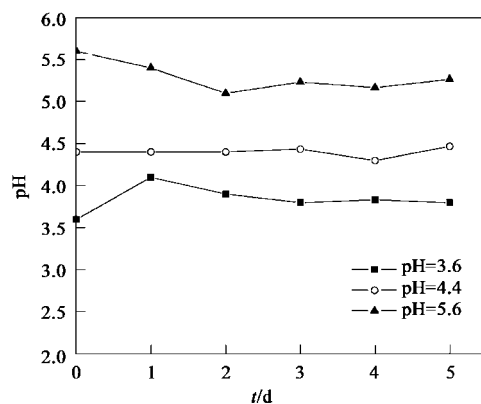


图 4 非灭菌培养体系 pH 变化

Fig. 4 Variation of pH during incubating *Phanerochaete chrysosporium* under non-sterile condition

非灭菌环境培养黄孢原毛平革菌过程中体系 pH 值的变化与灭菌环境略有不同(见图 4).从图 4 可以看出,初始 pH 值为 3.6 和 4.4 的液体培养基在培养黄孢原毛平革菌过程中体系 pH 值的变化与灭菌环境下培养相似,培养第 5d 时体系 pH 均在 3.8~4.4 之间;而初始 pH 值为 5.6 的液体培养基却与灭菌环境有较大不同,在培养最初 2d,体系 pH 变化还与灭菌环境一样,即 pH 值迅速下降,但到第 3d 时,体系 pH 值开始上升,至第 5d 时 pH 值已上升到 5.3.出现以上结果的原因是体系感染了不同杂菌,由于初始 pH 值为 3.6 和 4.4 的体系仅感染了酵母菌,又因为酵母菌在 pH 2.2~8.0 的环境中都容易生存,因此,体系 pH 值变化不大;而 pH 为 5.6 的体系除感染了酵母菌还感染了球菌和杆菌等细菌,又大多数细菌生长的 pH 环境都是偏中性的,因此,体系 pH 值逐渐升高.

2.2 灭菌和非灭菌环境下 *Phanerochaete chrysosporium* 对活性艳红 K-2BP 的脱色

2.2.1 灭菌环境培养下 *Phanerochaete chrysosporium* 在灭菌环境对染料的脱色效果

为了评价非灭菌环境 *Phanerochaete chrysosporium* 对活性染料的脱色效果,首先在灭菌环境培养 *Phanerochaete chrysosporium*,5d 后在灭菌环境加入已灭菌的活性艳红 K-2BP 染料,进行灭

菌环境脱色试验,试验结果如图 5 所示.

由图 5 可以看出,3 种初始 pH 值的液体培养基在灭菌环境培养的 *Phanerochaete chrysosporium* 在灭菌环境对活性艳红 K-2BP 均具有较好的脱色能力.由于体系没有感染杂菌,因此,3 种培养体系脱色率的差异反映了液体培养基初始 pH 值对脱色效果的影响.从图 5 可以看出,初始 pH 为 4.4 的液体培养基培养出的 *Phanerochaete chrysosporium* 对活性艳红 K-2BP 的脱色效果最好,24h 的脱色率达 80 %以上;而初始 pH 为 3.6 和 5.6 的液体培养基培养出的 *Phanerochaete chrysosporium* 的脱色效果就远不如初始 pH 为 4.4 的液体培养基,脱色 69h,脱色率分别为 71 %和 80 %.因此, *Phanerochaete chrysosporium* 的最佳脱色 pH 值为 4.4,与文献^[12]结果相吻合.pH 偏低(pH = 3.6)或偏高(pH = 5.6)都不利于 *Phanerochaete chrysosporium* 脱色,特别是 pH 为 3.6 的液体培养基脱色效果最差.结合不同初始 pH 值液体培养基中菌丝小球的生长情况,可以得出初始 pH 为 3.6 的液体培养基不仅对 *Phanerochaete chrysosporium* 的生长有抑制,而且还直接影响其次生代谢产酶.

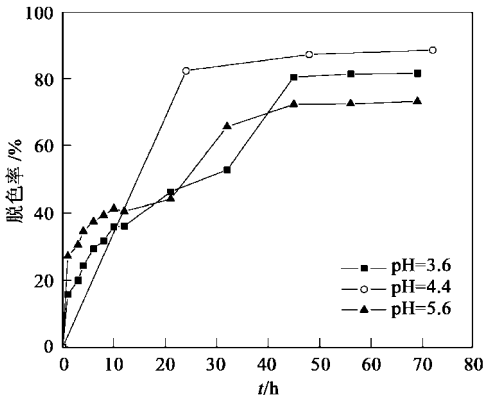


图 5 灭菌环境培养下 *P.chrysosporium* 在灭菌环境对染料的脱色效果

Fig.5 Decolorization of reactive dye under sterile condition after incubation of *P.chrysosporium* under sterile condition

2.2.2 非 灭 菌 环 境 培 养 下 *Phanerochaete chrysosporium* 在非灭菌环境对染料的脱色效果

本研究的目标就是寻找在非灭菌环境下使用白腐真菌脱色活性染料的方法,因此,即使前面研究发现非灭菌环境培养 *Phanerochaete chrysosporium* 时 3 种初始 pH 培养体系均不同程度地感染了大量酵母菌和球/杆菌,但是,为了考察感染这些真菌和细菌的 *Phanerochaete chrysosporium* 培养体系对活性

染料的脱色效果,进行了非灭菌环境培养 *Phanerochaete chrysosporium* 后在非灭菌环境降解活性艳红 K-2BP 的试验研究,结果如图 6 所示.

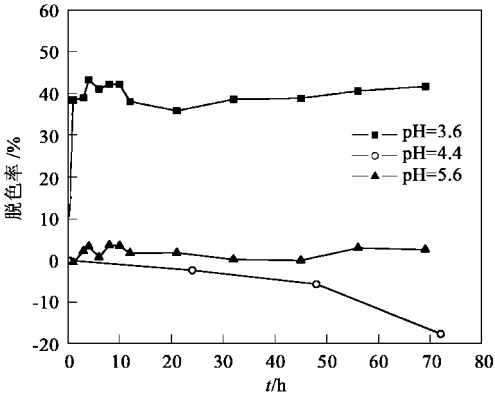


图 6 非灭菌培养下 *P.chrysosporium* 在非灭菌环境对染料的脱色效果

Fig.6 Decolorization of reactive dye under non-sterile condition after incubation of *P.chrysosporium* under non-sterile condition

由图 6 可以看出,除初始 pH 为 3.6 的培养体系,其它 2 种初始 pH(pH = 4.4 和 pH = 5.6)培养体系几乎对活性艳红 K-2BP 没有脱色效果.而即使 pH 为 3.6 的培养体系对活性艳红 K-2BP 有一定的脱色效果,但其脱色率也在 44 %以下.因此,可以得出培养体系感染酵母菌和细菌对白腐真菌 *Phanerochaete chrysosporium* 脱色影响较大.造成染菌体系脱色效果变差的原因是,酵母菌和细菌的生长繁殖速度比 *Phanerochaete chrysosporium* 快,一旦体系感染这些真菌和细菌,它们就会在培养体系大量繁殖,使得 *Phanerochaete chrysosporium* 因缺乏营养而失活,而失活的 *Phanerochaete chrysosporium* 对活性艳红 K-2BP 不仅不具有降解脱色能力,而且对其的吸附作用也很弱.有关初始 pH 为 3.6 的培养体系对活性艳红 K-2BP 具有一定脱色效果的原因还有待于进一步研究.

2.2.3 灭 菌 环 境 培 养 下 *Phanerochaete chrysosporium* 在非灭菌环境对染料的脱色效果

由于非灭菌环境 *Phanerochaete chrysosporium* 培养阶段感染了酵母菌和细菌等微生物,影响了 *Phanerochaete chrysosporium* 生长和产酶,使得后续对活性艳红 K-2BP 的脱色能力丧失或降低.因此,如果 *Phanerochaete chrysosporium* 培养阶段采用灭菌条件,待菌丝体形成后再在非灭菌环境降解活性艳红 K-2BP 仍然具有较好的脱色效果或接近灭菌环境降解活性艳红 K-2BP 的脱色率,将具有重要意

义和应用价值.由此开展了灭菌环境培养 *Phanerochaete chrysosporium* 在非灭菌环境降解活性艳红 K-2BP 的试验研究,结果如图 7 所示.

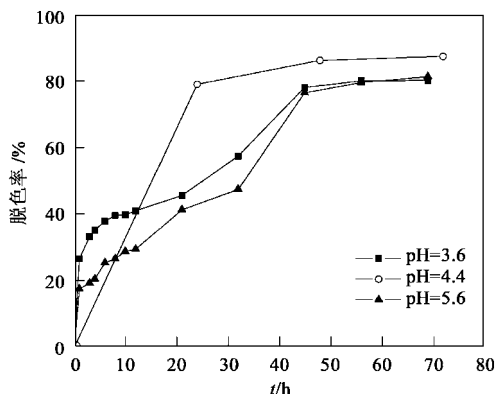


图 7 灭菌培养下 *P. chrysosporium* 在非灭菌环境降解染料的脱色效果

Fig. 7 Decolorization of reactive dye under non-sterile condition after incubation of *P. chrysosporium* under sterile condition

由图 7 可以看出,3 种初始 pH 值的液体培养基在灭菌环境培养 *Phanerochaete chrysosporium* 5d 后在非灭菌环境对活性艳红 K-2BP 均有较好的脱色效果.3 种培养体系对活性艳红 K-2BP 45h 的脱色率均在 70% 以上,同灭菌环境培养灭菌环境降解染料体系基本相当.另外,与灭菌环境脱色活性艳红 K-2BP 一样,初始 pH 值为 4.4 的液体培养基培养出的 *Phanerochaete chrysosporium* 在非灭菌环境对活性艳红 K-2BP 的脱色效果最好,24h 的脱色率接近 80%;而初始 pH 为 3.6 和 5.6 的液体培养基培养出的 *Phanerochaete chrysosporium* 在非灭菌环境的脱色效果较差,其 32h 的脱色率分别为 57.4% 和 47.4%.经过对这 3 种非灭菌环境降解染料体系的培养液进行显微镜观察和接平板试验,发现初始 pH 值为 3.6 和 4.4 的培养体系均感染了少量酵母菌,而初始 pH 为 5.6 的培养体系除感染了酵母菌外还感染了少量球/杆菌,但同非灭菌环境培养 *Phanerochaete chrysosporium* 体系相比,感染真菌和细菌的量要小很多.因此,如果在培养 *Phanerochaete chrysosporium* 时采用灭菌培养方式,至 *Phanerochaete chrysosporium* 菌丝体形成,并开始产酶时,再将未经灭菌处理的活性艳红 K-2BP 在不经灭菌操作下加入 *Phanerochaete chrysosporium* 培养体系,则 *Phanerochaete chrysosporium* 对活性艳红 K-2BP 的脱色效果将不受非灭菌环境的影响.原因为经灭菌培养后,

Phanerochaete chrysosporium 在脱色体系已成为优势菌种,且培养体系已积累了一定量过氧化物酶,因此,即使有少量酵母菌和细菌侵入也不会对脱色效果造成影响.

3 结论

(1) 当采用 *Phanerochaete chrysosporium* 孢子作为种子在非灭菌环境进行培养时,pH 值分别为 3.6 4.4 和 5.6 的液体培养基在培养第 1d 全部感染酵母菌;培养 5d 时,pH 为 3.6 和 4.4 的培养体系仍然以酵母菌为主,没有发现其它微生物;而 pH 为 5.6 的培养体系除感染酵母菌外还感染了细菌.因此,得出氮限制条件下低 pH 值液体培养基可以对细菌进行抑制,但不能对酵母菌产生抑制,而 pH = 5.6 的液体培养基不但不能抑制酵母菌,而且还容易感染细菌.

(2) pH 值为 3.6 的液体培养基在非灭菌环境培养 *Phanerochaete chrysosporium* 时,虽然液体培养基感染了酵母菌,但是对活性艳红 K-2BP 仍有一定脱色效果,其脱色率在 44% 左右.

(3) pH 值为 5.6 的液体培养基在非灭菌环境培养 *Phanerochaete chrysosporium* 时,由于培养体系不仅感染了酵母菌,而且还感染了细菌,使得对活性艳红 K-2BP 的脱色效果受到了极大影响,69h 脱色率在 3% 以下.

(4) 采用灭菌环境培养 *Phanerochaete chrysosporium* 非灭菌环境脱色活性艳红 K-2BP 的方法获得了较好的脱色效果,3 种初始 pH 值氮限制液体培养基培养出的 *Phanerochaete chrysosporium* 对活性艳红 K-2BP 45h 的脱色率均在 70% 以上,该方法的脱色效率接近或超过灭菌环境的结果.

(5) 在灭菌环境培养体系中,虽然初始 pH 为 3.6 和 5.6 的液体培养基都能使 *Phanerochaete chrysosporium* 菌丝体生成,且生成的菌丝体在灭菌环境和非灭菌环境对活性艳红 K-2BP 也都有一定的脱色作用,但从生成的菌丝小球的数量、大小以及对活性艳红 K-2BP 的脱色效果来看,均不如 pH 为 4.4 液体培养基.因此,确定 pH = 4.4 为 *Phanerochaete chrysosporium* 生长和脱色的最佳 pH.

参考文献:

- [1] Assadi M M, Rostami K, Shahvali M, et al. Decolorization of textile waste water by *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Desalination, 2001, 141(3): 331 ~ 336.

- [2] Fenice M, Sermanni G G, Federici F D, Annibale A. Submerged and solid-state production of laccase and Mn- peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media[J]. Journal of Biotechnology, 2003, **100**(1):77~85.
- [3] Shin K W. The role of enzymes produced by white-rot fungus *Irpe x lacteus* in the decolorization of the textile industry effluent [J]. Journal of Microbiology, 2004, **42**(1):37~41.
- [4] Borchert M, Libra J A. Decolorization of reactive dyes by the white rot fungus *Tra metes versicolor* in sequencing batch reactors[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2001, **75**(3):313~321.
- [5] Swamy J, Ramsay J A. The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes[J]. Enzyme Microbial Technology, 1999, **24**(3~4):130~137.
- [6] Lorenzo M, Moldes D, Couto S R, *et al.* Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Tra metes versicolor* [J]. Bioresource Technol., 2002, **82**(2):109~113.
- [7] Heinfling A, Martinez M J, Martinez A T, *et al.* Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1998, **64**(8):2788~2793.
- [8] Leidig E, Prusse U, Vorlop K D, *et al.* Biotransformation of Poly R-478 by continuous cultures of PVAL-encapsulated *Tra metes versicolor* under non-sterile conditions[J]. Bioprocess Eng., 1999, **21**:5~12.
- [9] Libra J A, Borchert M, Banit S. Competition strategies for the decolorization of a textile-reactive dye with the white-rot fungi *Tra metes versicolor* under non-sterile conditions[J]. Biotechnol. Bioeng., 2003, **82**(6):736~744.
- [10] Gao Dawen, Wen Xianghua, Qian Yi. Decolorization of reactive brilliant red K-2BP with the white rot fungi under non-sterile conditions[J]. Chinese Science Bulletin, 2004, **49**(9):981~982.
- [11] Tien M, Kirk T K. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*[J]. Methods in Enzymology, 1988, **161**:238~249.
- [12] Mahnaz Mazaheri Assadi, Khosrow Rostami, Majid Shahvali, *et al.* Decolorization of textile wastewater by *Phanerochaete chrysosporium*[J]. Desalination, 2001, **141**:331~336.