

微量元素对白腐真菌的生长影响和抑制酵母菌效果的研究

高大文, 文湘华, 周晓燕, 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: 采用振荡培养方式研究了微量元素对白腐真菌生长以及在非灭菌环境下对液体培养基抑制酵母菌的影响, 结果表明, 在灭菌环境培养方式下投加含有铁元素的微量元素液体培养基培养的菌丝球大小和数量均优于不含铁但含有其它微量元素液体培养基, 而不含铁的液体培养基又优于不投加任何微量元素液体培养基; 如果采用灭菌环境培养后在非灭菌环境降解染料方式, 则不含微量元素和含其它微量元素但不含铁的液体培养基培养的白腐真菌在非灭菌环境对染料的脱色效果与灭菌环境得到的结果基本相当, 而铁浓度为 3.5 mg/L 液体培养基培养的白腐真菌的脱色效果不如灭菌环境得到的结果, 并且镜检发现铁浓度为 3.5 mg/L 液体培养基中感染的酵母菌的量要多于不含铁元素液体培养基和不投加任何微量元素培养体系. 微量元素铁在抑制酵母菌生长方面具有很重要的作用, 同时铁元素又是白腐真菌生长所必需的, 只要在不影响白腐真菌生长的前提下, 合理调控培养基中的铁浓度, 就有可能达到抑制酵母菌的目的.

关键词: 微量元素; 铁; 白腐真菌; 酵母菌; 活性艳红 K-2BP; 脱色

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)08-1623-04

Effect of Trace Element on the Growth of White Rot Fungus and Suppressing Yeast in Liquid Medium

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

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

Abstract: Growth of white rot fungus in liquid medium with different trace element and effect of these medium on suppressing the growth of yeast under non-sterile were investigated in agitated Erlenmeyer flasks. Results showed that the size and amount of mycelium pellets in liquid medium with trace element and Fe 3.5 mg/L was more than that with trace element but no iron and without any trace element under sterile condition; moreover, the size and amount of mycelium pellets increased with the rise of the concentration of trace element and iron. In addition, if applying the mode of incubating under sterile condition and degrading under non-sterile condition, the decolorization of reactive brilliant red K-2BP in liquid medium without any trace element and with trace element but no iron was similar to that of degrading under sterile condition; but the decolorization in liquid medium with trace element and Fe 3.5 mg/L was less than the results under sterile condition. Through observing under microscope, it was found that the amount of yeast in liquid medium with Fe 3.5 mg/L was more than the medium without any trace element and with trace element but no iron. Therefore, trace element, especially iron, plays a very important role in suppressing yeast in liquid medium; furthermore, iron also is necessary to the growth of white rot fungus. So that, to control the concentration of iron in liquid medium could reduce the invasion of yeast under non-sterile condition as long as it does influence the growth of white rot fungus.

Key words: trace element; iron; white rot fungus; yeast; reactive brilliant red K-2BP; decolorization

目前应用白腐真菌降解染料废水普遍采用的方法是在白腐真菌培养液中直接加入染料, 利用白腐真菌分泌的胞外过氧化物酶对其直接氧化. Tatarko 等^[1]采用 *Phanerochaete chrysosporium* 对刚果红偶氮染料进行脱色研究, 发现振荡液体培养和麦芽汁琼脂固体培养 *Phanerochaete chrysosporium* 对刚果红偶氮染料都具有较好的脱色能力. Swamy^[2]评价了 *P. chrysosporium* BKM-F-1767, *T. versicolor* ATCC 20869, *Trametes hirsuta*, *Bjerkandera* sp. BOS55, 和 *Pleurotus ostreatus* 5 种白腐真菌在琼脂

平板培养基中对苋红、Remazol 黑 B、Remazol 橙、Remazol 亮蓝、活性蓝、金莲橙 O 的脱色效果, 研究结果显示 *Bjerkandera* sp. BOS55、*Phanerochaete chrysosporium* 和 *Trametes versicolor* 3 种白腐真菌的降解效果较好; 另外, *Bjerkandera* sp. BOS55 和 *Phanerochaete chrysosporium* 的间歇培养液对重复

收稿日期: 2005-09-14; 修订日期: 2005-11-01

基金项目: 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, 主要研究方向为环境生物技术与水污染控制, E-mail: gdw@mail.tsinghua.edu.cn

投加的染料的脱色能力有一定限制,而 *Trametes versicolor* 则能迅速对不断重新加入的不同染料和混合染料进行脱色. Borchert 等^[3] 用 *Trametes versicolor* 处理 3 种活性染料证明其降解率达 91% ~ 99%. Novotny 等^[4] 用 *Irpex lacteus* 和 *Pleurotus ostreatus* 处理代表 5 种结构的染料,即 Remazol 亮蓝 R (RBBR)、甲基红、刚果红、溴酚蓝、酞菁,在 28 °C 下处理 14 d 后,它们对各种染料均有一定程度的降解. 研究中还发现将白腐真菌细胞固定化后有利于白腐真菌菌丝体的生长和产酶,并提高脱色效率,从而可以解决白腐真菌在实际工程应用中的生长控制和长时间保持胞外酶浓度问题.

但是,目前无论国内还是国外,对白腐真菌处理染料废水的研究都还停留在实验室研究阶段,应用到实际工程中的基本没有. 是什么制约了白腐真菌在实际工程中的应用呢? 白腐真菌属于低等真核微生物,生长速度很慢,因此,一旦反应体系有生长速度比它快的其它菌群进入,它们就会与白腐真菌争夺培养基中的营养物质,而白腐真菌将因缺乏营养而停止生长,进而影响胞外降解酶系的分泌,致使整个处理系统失去降解染料的功能^[5]. 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瓶颈. 不解决染菌问题,该工艺则很难在实际工程中使用,将会严重制约该项技术的发展.

随着白腐真菌降解染料等一些有机污染物技术的越来越成熟,对在非灭菌条件下有效抑制杂菌生长而使白腐真菌在整个处理过程始终占优势的方法显得越来越迫切. 这一问题已经引起国外科学家的重视,并在最近几年开始研究^[6,7].

前期研究发现,非灭菌环境下氮限制液体培养基(C/N = 56/2.2, 单位: mmol/L) 容易抑制细菌生长,相反,碳限制液体培养基(C/N = 28/44, 单位: mmol/L) 容易感染细菌,从而影响脱色效果^[8]; 虽然氮限制液体培养基不容易感染细菌,但容易被酵母菌侵入^[9]; 另外,低 pH 值(pH = 3.6, pH = 4.4) 氮限制液体培养基虽然在一定程度上可以抑制细菌,但也不能抑制酵母菌^[10]. 因此,为了有效抑制酵母菌在氮限制液体培养基中的繁殖,减轻其对白腐真

菌降解活性染料的影响,经对酵母菌生长特性分析,本研究选择控制液体培养基中微量元素特别是铁浓度考察不同微量元素氮限制液体培养基的染酵母菌情况及其在不同环境培养出的 *P. chrysosporium* 对活性艳红 K-2BP 的脱色效果,进而提出自然非灭菌环境应用 *P. chrysosporium* 降解活性染料避免或减轻酵母菌影响的控制策略.

1 材料与方法

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]. 成分如下: 葡萄糖 10 g/L; 酒石酸氨 0.8 g/L; KH_2PO_4 2.0 g/L; MgSO_4 0.5 g/L; CaCl_2 0.1 g/L; 微量元素: MgSO_4 0.21 g/L, MnSO_4 35 mg/L, NaCl 70 mg/L, CoCl_2 7 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7 mg/L, CuSO_4 7 mg/L, $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.7 mg/L, H_3BO_3 0.7 mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.7 mg/L, Nitrilotriacetate 0.105 g/L; 1.5 mmol/L 藜芦醇. 所不同的是为获得不同微量元素液体培养基,在配制液体培养基时选择不投加任何微量元素、投加其它微量元素但不含铁($\text{Fe} = 0.0$ mg/L) 和投加含铁浓度为 3.5 mg/L 的微量元素 3 种方式. 选择氮限制液体培养基(碳氮比取 56/8.7, mmol/L),用 0.2 mol/L 醋酸钠和醋酸缓冲溶液调节液体培养基 pH 值为 4.4. 其它内容参照文献[10].

试验方案: 首先考察不投加任何微量元素、投加微量元素但不含铁和投加铁浓度为 3.5 mg/L(培养基中终浓度,以下类同) 微量元素 3 种条件的液体培养基在灭菌培养体系对白腐真菌生长的影响. 培养 5d 后,分别选择灭菌环境和非灭菌环境对以上 3 种液体培养基投加染料,考察灭菌环境和非灭菌环境下 *P. chrysosporium* 降解系统的脱色效果. 并对灭菌培养后在非灭菌环境降解染料体系的液体培养基进行显微镜观察,评价染料降解过程中不同微量元素液体培养基的染酵母菌情况. 每个条件做 3 个平行样.

2 结果与讨论

2.1 发酵培养阶段微量元素对菌体生长及体系染酵母菌的影响

由于前期静止培养试验发现非灭菌环境 3 种条件液体培养基在培养第 2d 时全部感染酵母菌^[12],结合前期非灭菌环境氮限制液体培养基振荡培养也同样感染酵母菌的结果^[13],因此,这批振荡培养试

验全部是在灭菌环境下进行的,待培养 5d 后,再将样品分成 2 部分,一部分在灭菌环境下加染料,并在灭菌环境对染料脱色;另一部分则在非灭菌环境下加未经灭菌处理的染料,然后在非灭菌环境下对染料脱色。

振荡培养 1d 后,锥形瓶中即出现少量表面光滑白色菌丝小球,直径为 0.5~1mm 左右,液体培养基澄清且略带酸性气味。培养第 2d 时,不投加任何微量元素的液体培养基中菌丝小球数量增长缓慢,但直径有明显增大,培养第 4d 时开始有少量毛刺产生;而含有其它微量元素但不含铁和铁浓度为 3.5 mg/L 微量元素液体培养基的体系菌丝小球数量和大小都有显著增加,培养第 3d 时开始有大量毛刺产生。在 3 种条件液体培养基中,不投加任何微量元素的培养基中菌丝小球生长最差,其数量最少,直径最小,而投加 Fe 浓度 3.5 mg/L 的液体培养基中菌丝小球生长情况最优,其数量较多,直径也较大($D=2\sim4\text{mm}$),投加微量元素但不含铁的培养基中菌丝小球大小和数量介于二者之间,直径在 2.5mm 左右。因此,可以得出,尽管微量元素在整个培养基中所占的份额较小,但培养基中微量元素对 *P. chrysosporium* 的生长繁殖影响很大,缺少微量元素 *P. chrysosporium* 的生长繁殖将受到抑制。同时,还可以得出,微量元素铁对 *P. chrysosporium* 生长繁殖也有一定影响,增加培养基中铁浓度对 *P. chrysosporium* 生长有一定的促进作用,但缺乏铁 *P. chrysosporium* 也可以生长。

2.2 染料脱色阶段微量元素对脱色效果及体系染

酵母菌的影响

2.2.1 微量元素对脱色效果的影响

由于 *P. chrysosporium* 培养过程均是在灭菌环境下进行的,因此,为了考察 *P. chrysosporium* 在非灭菌环境对染料的降解情况,在 *P. chrysosporium* 培养 5 d 后选择灭菌和非灭菌环境投加染料,并在灭菌和非灭菌环境降解染料,结果如图 1 所示。从图 1 可以看出,液体培养基中有无微量元素以及微量元素中有无铁元素对 *P. chrysosporium* 脱色活性艳红 K-2BP 影响很大,其中投加铁浓度为 3.5 mg/L 微量元素的液体培养基培养的 *P. chrysosporium* 的脱色效果最好,其在灭菌环境下 10h 的脱色率达到 90% 以上,而含有其它微量元素但不含铁的液体培养基培养的 *P. chrysosporium* 对活性艳红 K-2BP 的 10h 脱色率才达到 43.7%,不投加任何微量元素液体培养基培养的 *P. chrysosporium* 对活性艳红 K-2BP 的 10h 脱色率低于 17%。比较灭菌和非灭菌环境对染料的脱色效果,发现不含微量元素和含其它微量元素但不含铁的液体培养基培养的 *P. chrysosporium* 在非灭菌环境对染料的脱色效果与灭菌环境得到的结果基本相当,其 10h 的脱色率分别为 20.1% 和 43.7%;只有铁浓度为 3.5 mg/L 液体培养基培养的 *P. chrysosporium* 的脱色效果不如灭菌环境得到的结果,其 10h 的脱色率仅为 72.1%。镜检发现铁浓度为 3.5 mg/L 液体培养基中感染的酵母菌的量要多于不含铁元素液体培养基和不投加任何微量元素培养体系。

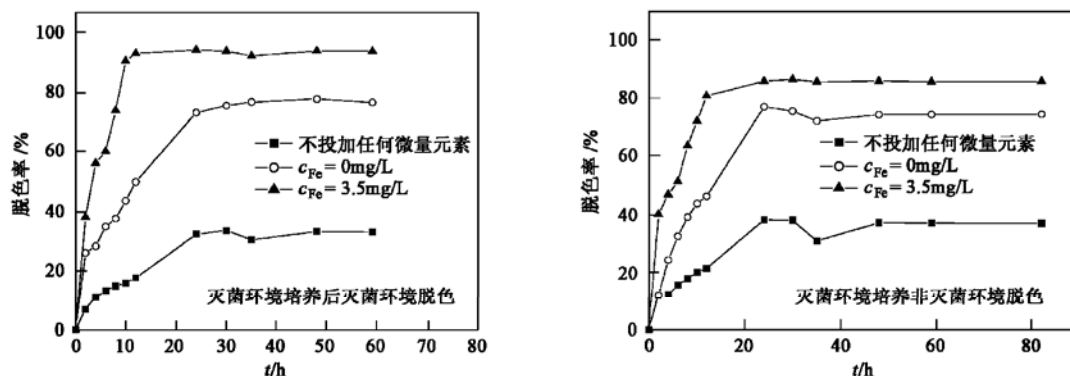


图 1 不同脱色环境下 *P. chrysosporium* 对活性艳红 K-2BP 的脱色效果

Fig. 1 Decolorization of reactive brilliant red K-2BP in different degrading conditions

2.2.2 微量元素对非灭菌环境脱色体系感染酵母菌的影响

投加微量元素但不含铁和投加铁浓度为 3.5 mg/L 微量元素液体培养基在非灭菌环境脱色第 3d

时分别感染了酵母菌,从感染酵母菌数量来看,铁浓度为 3.5 mg/L 液体培养基感染得酵母菌要多于不含铁的培养基,而不投加任何微量元素的液体培养基在脱色第 3d 时却没有感染酵母菌,如图 2 所示。

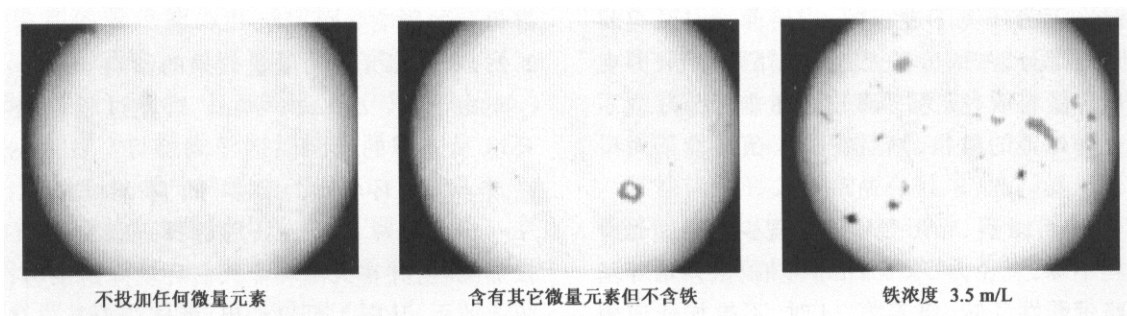


图2 不同微量元素液体培养基在非灭菌环境下脱色第3d时体系染菌情况(40×10)

Fig. 2 Growth of yeast in liquid medium with different trace element under non-sterile condition for 3 days

因此,可以得出微量元素铁在抑制酵母菌生长方面具有很重要的作用,同时铁元素又是 *P. chrysosporium* 生长所必需的,只要在不影响 *P. chrysosporium* 生长的前提下,合理调控培养基中的铁浓度,就有可能达到抑制酵母菌的目的。

3 结论

(1) 微量元素对于 *P. chrysosporium* 生长是必需的,如果培养基中缺乏微量元素, *P. chrysosporium* 生长就会受到抑制,主要表现为菌丝小球产生的数量以及大小均不如含有微量元素培养体系;另外,如果微量元素中缺乏铁元素, *P. chrysosporium* 生长也在一定程度上受到抑制。因此,元素铁对于 *P. chrysosporium* 生长是必需的。

(2) 液体培养基中有无微量元素以及微量元素中有无铁元素对 *P. chrysosporium* 脱色活性艳红 K-2BP 影响很大,在灭菌环境下,含有铁元素微量元素的液体培养基培养的 *P. chrysosporium* 对活性艳红 K-2BP 的脱色率比含有其它微量元素但不含铁的培养体系高,同时含有其它微量元素但不含铁的液体培养基培养的 *P. chrysosporium* 的脱色率又比不含任何微量元素培养体系高。

(3) *P. chrysosporium* 经灭菌培养后,在非灭菌环境下对活性艳红 K-2BP 的脱色效果,只有铁浓度为 3.5 mg/L 的脱色体系与灭菌环境得到的结果略有差别,而其它 2 种脱色体系所得结果与灭菌环境基本相当,造成这一差别的主要原因是含有铁元素的液体培养基在非灭菌环境下比不含铁元素的培养体系更容易感染酵母菌。因此,微量元素铁在抑制酵母菌生长方面具有很重要的作用,同时铁元素又是 *P. chrysosporium* 生长所必需的,只要在不影响 *P. chrysosporium* 生长的前提下,合理调控培养基中的铁浓度,就有可能达到抑制酵母菌的目的。

参考文献:

- [1] Tatarko M, Bumpus J A. Biodegradation of Congo Red by *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Wat. Res., 1998, 32(5): 1713~ 1717.
- [2] 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.
- [3] Borchert M, Libra J A. Decolorization of reactive dyes by the white rot fungus *Trametes versicolor* in sequencing batch reactors [J]. Biotechnol. Bioeng., 2001, 75(3): 313~ 321.
- [4] Novotny C, Rawal B, Bhatt M, et al. Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes [J]. Journal of Biotechnology, 2001, 89(2-3): 113~ 122.
- [5] 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.
- [6] Leidig E, Prusse U, Vorlop K D, et al. Biotransformation of Poly R-478 by continuous cultures of PVAL-encapsulated *Trametes versicolor* under non-sterile conditions [J]. Bioprocess Eng., 1999, 21: 5~ 12.
- [7] Libra J A, Borchert M, Banit S. Competition strategies for the decolorization of a textile reactive dye with the white rot fungi *Trametes versicolor* under non-sterile conditions [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2003, 82(6): 736~ 744.
- [8] Gao D W, Wen X H, Qian Y. 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.
- [9] 高大文, 文湘华, 钱易. 不同培养方式对白腐菌降解染料体系抑杂菌效果的影响 [J]. 清华大学学报, 2005, 45(12): 1625~ 1628.
- [10] 高大文, 文湘华, 周晓燕, 等. pH 值对白腐真菌液体培养基抑制杂菌效果的影响研究 [J]. 环境科学, 2005, 26(6): 173~ 179.
- [11] Tien M, Kirk T K. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Methods in Enzymology, 1988, 161: 238~ 249.
- [12] Gao D W, Wen X H, Zhou X Y, et al. The Effect of Trace Element-iron on Decolorization of Reactive Brilliant Red K-2BP Dye Using *Phanerochaete chrysosporium* under Non-sterile Condition [A]. Annual Conference of the China Association for Science and Technology, Urumqi, 2005.
- [13] 高大文, 文湘华, 周晓燕, 等. 非灭菌环境投加染料时间对白腐真菌降解活性染料的影响 [J]. 环境科学学报, 2005, 25(4): 519~ 524.