

白腐真菌胞外聚合物及其对菌体吸附 Pb^{2+} 的影响

王亮^{1,2}, 陈桂秋^{1,2*}, 曾光明^{1,2}, 张文娟^{1,2}, 范佳琦^{1,2}, 沈国励³

(1. 湖南大学环境科学与工程学院, 长沙 410082; 2. 湖南大学环境生物与控制教育部重点实验室, 长沙 410082; 3. 湖南大学化学生物传感与计量学国家重点实验室, 长沙 410082)

摘要:以黄孢原毛平革菌为研究对象,探讨了白腐真菌胞外聚合物及其对白腐真菌吸附 Pb^{2+} 的影响. 通过培养实验,研究了白腐真菌胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)的产量、组成以及对 Pb^{2+} 吸附量的影响,并采用带能谱仪的环境扫描电镜(ESEM-EDX)表征了胞外聚合物提取前后及 Pb^{2+} 吸附前后白腐真菌菌体表面的变化. 结果表明,在振荡培养 113 h 后,获得最大的 EPS 量 125.5 mg/L,其中糖类占 46.6% ~ 54.3%,蛋白质占 31.2% ~ 35.1%. 对照吸附实验显示提取胞外聚合物后,白腐真菌对 Pb^{2+} 的吸附量明显降低,最小降低 2.12 mg/g(113 h),最大降低 7.73 mg/g(41 h). 环境扫描电镜(ESEM)结果显示,EPS 提取前后,白腐真菌菌体表面结构发生了改变. 在吸附 Pb^{2+} 后,菌体表面产生了球状含 Pb 颗粒物. 此研究对进一步深入探讨重金属生物吸附机制具有重要意义.

关键词:白腐真菌;胞外聚合物;生物吸附; Pb^{2+} ;球状颗粒

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2011)03-0773-06

Extracellular Polymeric Substances (EPS) of White-Rot Fungus and Their Effects on Pb^{2+} Adsorption by Biomass

WANG Liang^{1,2}, CHEN Gui-qiu^{1,2}, ZENG Guang-ming^{1,2}, ZHANG Wen-juan^{1,2}, FAN Jia-qi^{1,2}, SHEN Guo-li³

(1. College of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China; 2. Key Laboratory of Environmental Biology and Pollution Control, Ministry of Education, Hunan University, Changsha 410082, China; 3. State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract: The extracellular polymeric substances (EPS) of *P. chrysosporium* and their effects on Pb^{2+} biosorption were studied. The product, composition of EPS and the effects on Pb^{2+} biosorption capacity were investigated in lab via flask experiments. The surface changes of mycelium before and after EPS extraction, before and after Pb^{2+} adsorption were researched by environment scanning electron microscope with energy-dispersive X-ray analysis (ESEM-EDX). Results showed that at 113 h, the maximum yield of EPS was 125.5 mg/L, which contained 46.6% - 54.3% of sugar and 31.2% - 35.1% of protein. The results of control test after EPS extraction displayed a decrease of biosorption capacity of Pb^{2+} among 2.12 mg/g (113 h) - 7.73 mg/g (41 h). The results of environment scanning electron microscope (ESEM) showed that the EPS extraction affected the cell wall of white-rot fungus and the Pb-contained globular particle after Pb^{2+} uptake, which was very useful for further study on heavy metal biosorption mechanism.

Key words: white-rot fungi; extracellular polymeric substances (EPS); biosorption; Pb^{2+} ; globular particle

去除工业废水中的重金属,对于保持水生环境、水生态系统和地下水圈是非常重要的环节. 传统的处理方法主要是将重金属离子以氢氧化物形式沉淀^[1]或者用合成树脂^[2,3]进行离子交换. 近年来,由于成本低廉和较高的离子交换容量,微生物技术越来越多地被用来处理重金属废水. 白腐真菌由于其独特的对异生物质的处理能力,既能降解难处理的有机污染物^[4,5],也能应用于重金属废水^[6,7],正成为废水生物处理技术的研究热点. 目前,白腐真菌处理重金属废水的研究,主要集中在吸附条件对其吸附效率、吸附量的影响^[8,9]和开展生物合成草酸盐晶体^[10]、纳米颗粒^[11,12]等方面.

吴涓等^[13]对黄孢原毛平革菌吸附 Pb^{2+} 的机制进行了初步研究,证明是以细胞壁表面络合反应为

主的物理化学吸附过程,但由于细胞本身结构组成的复杂性,没有对细胞壁上的附着物质在吸附过程中所起的作用展开探讨. 真菌细胞壁上的附着物质,主要为胞外聚合物(EPS),占总附着物质含量的75%左右^[14],是一类由真菌分泌并附着在细胞壁表面的多聚糖蛋白类物质,在保持真菌细胞形态、胞外酶的分泌以及对重金属离子的积极防御机制上起着重要作用. 而国内鲜有关于白腐真菌 EPS 与重金属废水处理之间关系的相关报道.

收稿日期:2010-03-24;修订日期:2010-06-04

基金项目:国家自然科学基金项目(50908078);中国博士后科学基金特别资助项目(200902467);中国博士后科学基金项目(20080430153)

作者简介:王亮(1986~),男,硕士研究生,主要研究方向为重金属废水生物处理技术, E-mail: wangliang312@126.com

* 通讯联系人, E-mail: gqchen@hnu.cn

本研究选用白腐真菌的模式菌种——黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)作为对象,分析白腐真菌 EPS 产量、组成随着培养时间的变化,利用提取 EPS 前后的菌体对 Pb^{2+} 的吸附实验,讨论了白腐真菌 EPS 与 Pb^{2+} 吸附之间的关系,并通过带能谱仪的环境扫描电镜(ESEM-EDX)探讨了 EPS 对白腐真菌菌体表面结构的影响。

1 材料与方法

1.1 菌种和培养基

黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*) BKMF-1767,购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。

菌种平皿培养保存采用土豆汁培养基(1 L):葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,200 g 新鲜土豆浸出液,1 000 mL 蒸馏水,自然 pH 值。

参考国内外学者的研究成果^[15,16],本实验采用的液体培养基组成成分为(1 L):10 g 葡萄糖,2 g KH_2PO_4 ,0.5 g $MgSO_4$,0.1 g $CaCl_2$,0.001 g 维生素 B_1 ,0.2 g 酒石酸铵,无机溶液 70 mL,pH 值为 4.5。无机溶液(1 L):0.5 g $MnSO_4 \cdot H_2O$,0.1 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$,0.1 g $CoSO_4$,1.5 g NTA,1.0 g NaCl,0.01 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$,0.01 g $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$,0.1 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$,0.01 mg H_3BO_3 ,0.01 g $NaMoO_4$ 。

接种前,培养基均在 105℃ 下灭菌 30 min。

1.2 菌种液体培养

取 4℃ 下保存的黄孢原毛平革菌平皿,在 37℃ 下活化 2 h 后制备孢子悬液,接种 5 mL 孢子悬液到盛有 50 mL 种子培养基的 250 mL 的锥形瓶中,孢子浓度为 2×10^5 个/mL,置于空气浴摇床中恒温培养(35℃、150 r/min)。在 41、65、89、113、137 h 定时取样。其中,41 h 相当于 *P. chrysosporium* 生长的对数期,137 h 相当于其生长的静止期^[17]。

1.3 EPS 的分离与组分分析

采用改进的离心沉淀法^[18]提取白腐真菌的胞外聚合物(EPS)。将培养后的菌体悬液在 4℃ 下以 10 000 r/min 高速离心 15 min (Sartorius 4K15,德国),上清液用 0.45 μm 滤膜过滤。然后在滤液中加入 4 倍体积的 95% (体积分数) 无水乙醇,在 4℃ 下放置 12 h。再以 10 000 r/min 离心 10 min,所得的沉淀物为粗 EPS。再将此粗 EPS 装入透析袋(MWCO,7 000),密封后在室温下以去离子水进行透析,得到纯净 EPS。

纯净胞外聚合物(EPS)用蒸馏水溶解后,测定 EPS 产量和各组分含量。EPS 产量用总有机碳(TOC)表示,采用 TOC 自动分析仪(Phoenix 8 000,美国)测定。以葡萄糖为标准物,用蒽酮- H_2SO_4 比色法测定糖的含量^[19]。以牛血清蛋白为标准物,用 Lowry 法测定蛋白质含量^[20]。

1.4 菌体样品制备

在采样时间点,将培养好的菌体过滤,获得培养后的菌体,用蒸馏水洗涤 2 次,去离子水洗涤一次后,作为原菌体样品。不含 EPS 菌体样品是指由提取完 EPS 后的菌体用同样的洗涤方法处理后制备获得。用原菌体样品、不含 EPS 菌体样品分别吸附初始浓度为 50 mg/L Pb^{2+} 溶液,在 pH 4.5、35℃ 和 150 r/min 条件下吸附 4 h,过滤获得吸附后菌体样品。

1.5 分析方法

由于白腐真菌菌体呈球状,所以测定生物量所用菌体采用整瓶培养物全部过滤,在 105℃ 下干燥至恒重,在各采样点测定生物量干重(dry cell weight, DCW),绘制白腐真菌生长曲线。

环境扫描电镜分析:将菌体样品置于滤纸上,在自然通风状态下干燥 10 min 后,采用环境扫描电镜(FEI Quanta-200,荷兰)分析。

Pb^{2+} 溶液制备与分析:准确称取 1.598 5 g 优级纯 $Pb(NO_3)_2$ 于烧杯中,加 5% (体积分数) HNO_3 溶解后,移入 1000 mL 容量瓶中,稀释至刻度,摇匀,即制得 1 mg/mL 的 Pb^{2+} 标准溶液,实验中所用 50 mg/L 浓度用此标准稀释配成。吸附完成后,溶液中 Pb^{2+} 浓度用原子吸收分光光度计(PerkinElmer AA700,美国)测定。

Pb^{2+} 吸附量 q (mg/g) 通过公式(1)计算:

$$q = \frac{(c_0 - c_t)V}{W} \times 1000 \quad (1)$$

式中, c_0 、 c_t 分别为吸附实验初始 Pb^{2+} 浓度和最终 Pb^{2+} 浓度(mg/L); V 为吸附实验用 Pb^{2+} 溶液体积(mL); W 为吸附用菌体干重(g);

EPS 中组分的增幅 r (%) 通过公式(2)计算:

$$r = \frac{(m_2 - m_1)}{m_1} \times 100\% \quad (2)$$

式中, m_1 、 m_2 分别为培养时间为 t_1 和 t_2 时,EPS 中糖类或者蛋白质的质量分数(%)。

每个样品均设 2 个平行样,实验数据取其平均值。

2 结果与分析

2.1 白腐真菌的生长与 EPS 产量

将接种有孢子的液体培养基放入空气浴摇床中振荡培养,生物量干重(DCW)和 EPS 产量随着培养时间的变化如图 1 所示。

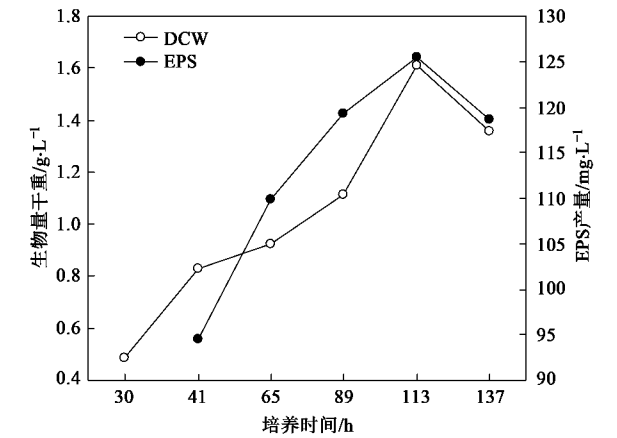


图1 DCW 和 EPS 量随着培养时间的变化

Fig.1 Changes of DCW and EPS during culture process

从图 1 可以看出,随着培养时间的延长,DCW 和 EPS 产量都有显著增加。在 30 ~ 113 h,黄孢原毛平革菌生长迅速,生物量干重 DCW 从 0.486 g/L 增加到最大值 1.612 g/L(113 h),增长了 3.3 倍。从 EPS 产量上看,随着培养时间的延长,EPS 产量从 41 h 时的 94.5 mg/L 增加到最大值 113 h 的 125.5 mg/L。113 h 以后,DCW 和 EPS 产量均开始下降。说明 EPS 产量与黄孢原毛平革菌的生长有着非常紧密的联系。

2.2 白腐真菌 EPS 的组成性质

在不同培养时间,分别提取 EPS,测定 EPS 中糖类组分和蛋白质组分所占的比例,考察培养时间对 EPS 组成的影响,结果如图 2 所示。

从图 2 可以看出,在培养时间内,EPS 中糖类含量呈现缓慢增长,其质量分数从 41 h 的 46.6% 到 137 h 的 54.3%,增幅为 16.5%,仅在培养初期(41 ~ 65 h)增长较快。分析原因,可能是 *P. chrysosporium* 在 41 ~ 65 h 处于对数生长期,生长迅速,新陈代谢旺盛,分泌到细胞壁上的各种胞外酶增多^[21]。从 41 ~ 137 h,蛋白质含量增长缓慢,其质量分数仅从 31.2% 增长到 35.1%,增幅为 12.5%。糖类和蛋白质含量的质量分数在 89 h 以后变化均较小。在整个培养周期内,糖类和蛋白质含量(质量分数)之和为 77.8% ~ 89.4%,其他组分的质量分数仅为 10.6% ~ 22.2%,但其具体组成有待进一步研究。组分含量数据表明 *P. chrysosporium* 胞外聚合物中主要组分为糖类和蛋白质类物质。这与文献

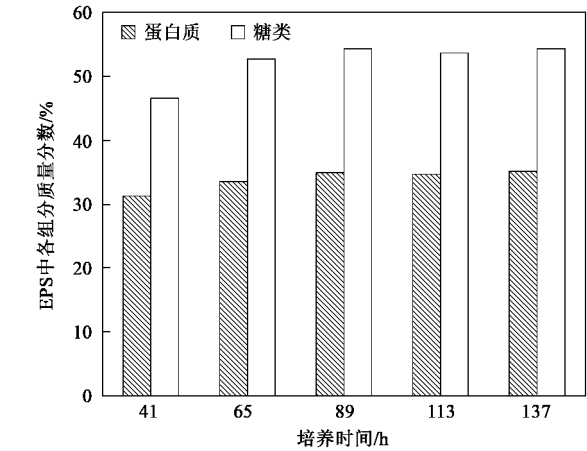


图2 EPS 中糖类和蛋白质含量随培养时间的变化

Fig.2 Contents of sugar and protein in EPS during culture process

[22,23] 研究其他真菌胞外聚合物组成的结果相似。

2.3 白腐真菌 EPS 与其吸附 Pb^{2+} 的关系

利用原菌体和不含 EPS 的菌体,吸附初始浓度为 50 mg/L 的 Pb^{2+} 溶液,吸附时间为 4 h,考察白腐真菌 EPS 与 *P. chrysosporium* 菌体对 Pb^{2+} 的吸附之间的关系,结果如图 3 所示。其中吸附实验所用原菌体干重包括 EPS 量,不含 EPS 菌体干重不包括 EPS 量。

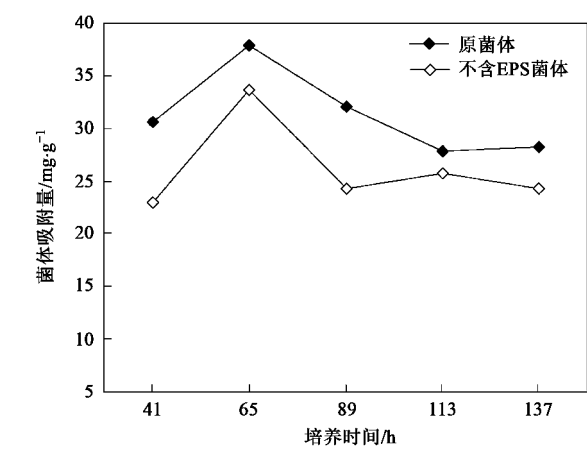


图3 白腐真菌 EPS 与其吸附 Pb^{2+} 的关系

Fig.3 Relationship of EPS and Pb^{2+} biosorption by white-rot fungus

随着培养时间的延长,原菌体和不含 EPS 菌体对 Pb^{2+} 的吸附量均在 41 ~ 65 h 内显著增加,在 65 h 时达到最大值,原菌体为 37.86 mg/g,不含 EPS 菌体为 33.63 mg/g。65 h 以后,菌体对 Pb^{2+} 的吸附量开始下降,在 89 h 后趋于稳定(图 3)。实验结果与李清彪等^[24]的研究一致。从图 3 可以看出,与原菌

体相比,不含 EPS 菌体对 Pb^{2+} 的吸附量出现了明显降低,最小降低 2.12 mg/g(113 h),最大降低 7.73 mg/g(41 h). 从图 2 也可以看出,*P. chrysosporium* 胞外聚合物 EPS 中糖类和蛋白质所占比例先增长,89 h 以后趋于稳定,变化较小. 因此,菌体对 Pb^{2+} 的吸附量与 EPS 含量有关,原因可能是 EPS 中所含的组

分如糖类和蛋白质等,与菌体吸附重金属的作用位点有关.

2.4 SEM-EDX 分析

由于培养时间为 65 h 的 *P. chrysosporium* 菌体对 Pb^{2+} 吸附量最大,因此用来进行电镜分析,电镜图见图 4.

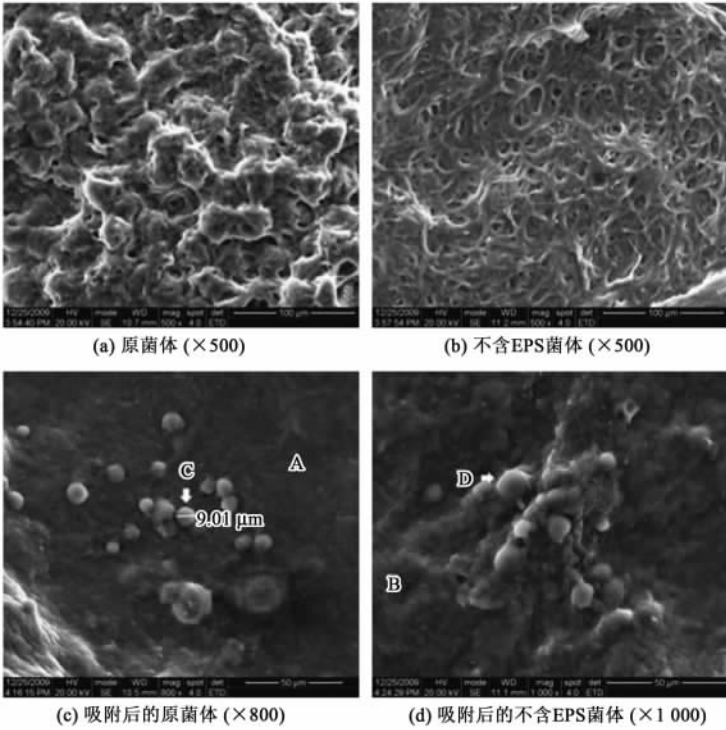


图 4 菌丝球环境电镜扫描图
Fig.4 ESEM photomicrographs of biomass

观察图 4(a)、4(b),可以看出,未提取胞外聚合物 EPS 的原菌体表面由很多的团状菌丝相互缠绕形成;并附着有大量的 EPS[图 4(a)]. 而提取 EPS 后,菌体表面团状菌丝消失,菌体表面呈面状,可能是由于高速离心分离 EPS 过程中,菌体相互碰撞挤压所致[图 4(b)]. 可见,白腐真菌胞外聚合物 EPS 在保持 *P. chrysosporium* 细胞生物形态、细胞壁结构上起着重要作用. 吸附了 Pb^{2+} 以后[图 4(c)、4(d)],与吸附前相比,菌体表面发生了显著变化,菌体表面均呈块状,独立的菌丝几乎未见. 而且在菌丝表面形成了大量的规则球状颗粒[如图 4(c)、4(d)中箭头所示]. 图 4(c)中箭头所示颗粒 C 直径达 9.01 μm . 比较 C、D 颗粒后发现,颗粒 C 形态饱满,成完整球状. 颗粒 D 形态欠饱满. 可能原因是,图 4(c)中所用的原菌体与图 4(d)中所用的不含 EPS 菌体相比,具有丰富的胞外聚合物,细胞壁上附着的 EPS 参与了球形颗粒物的形成.

为了研究球形颗粒的物质组成,对图 4(c)、4(d)中无颗粒区域(A、B)和箭头所示球形颗粒物(C、D)进行了 X 射线光散射能谱(EDX)分析,能谱结果见图 5. 表中数据由 EDX 定量分析软件计算获得.

从图 5 可以看出,区域 A、B 的元素组成与颗粒 C、D 的元素组成存在差异. 在区域 A、B,各元素及含量相似,均形成 C、O、P 和 K 峰;其中 C 和 O 的峰值较强,P 和 K 的峰值较弱. 与 A、B 区域相比,颗粒 C、D 的 C、O 的峰值减弱,P 的峰值增强. P 峰的加强与文献[25]结果一致,可能是由于菌体吸附 Pb^{2+} 以后,影响了细胞膜结构,导致磷脂扩散到球形颗粒.

颗粒能谱图新出现了 Pb、Mg、N 和 S 峰(Mg、S 峰在图 5 表中未列出). Pb 峰证实了白腐真菌菌体表面球状颗粒含有 Pb. Mg 峰是由于菌体在吸附 Pb^{2+} 的过程中,菌体胞内所含 Mg^{2+} 运输到菌体表面,与溶液中 Pb^{2+} 发生离子交换作用^[13]. N 峰的出

现,是由于胞外聚合物 EPS 中蛋白质参与了球形颗粒物的形成. 白腐真菌可能通过分泌 EPS 附着在菌体表面,利用 EPS 中的蛋白质包裹 Pb 的作用机制,增强对 Pb^{2+} 毒性的积极防御能力. 颗粒中 S 峰的出现,

可能是 EPS 所含蛋白质中化学键 SH,但有待进一步研究确认. 含 Pb 球形颗粒的分离、结构特征,还需要借助其他分析手段,例如光电子能谱(XPS)、X射线衍射(XRD)等方法进一步研究.

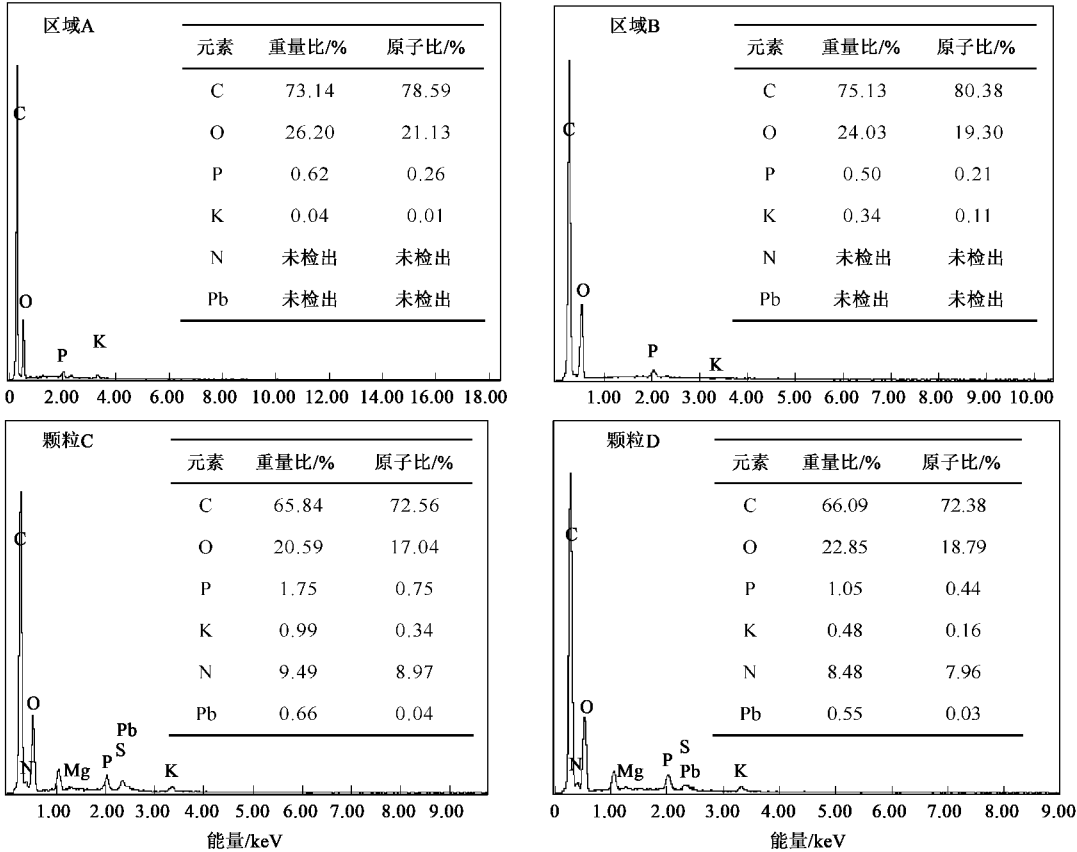


图5 区域 A、B 和颗粒 C、D 的 X 射线光散射能谱图

Fig.5 Energy dispersive X-ray spectra of Zone A,B and Particle C,D

3 结论

- (1)白腐真菌胞外聚合物(EPS)产量与其生长关系密切,EPS 中主要组分为糖类和蛋白质类物质.
- (2)白腐真菌在提取胞外聚合物(EPS)后,菌体对铅的吸附量显著降低.
- (3)电镜和能谱结果表明,胞外聚合物(EPS)提取前后,白腐真菌菌体表面结构发生了明显变化.在吸附 Pb^{2+} 后,菌体表面形成了微米级的、呈规则球状含 Pb 颗粒物. 颗粒的分离与结构特征有待进一步研究.

参考文献:

[1] Chen Q Y, Luo Z, Colin H, *et al*. Precipitation of heavy metals from wastewater using simulated flue gas; Sequent additions of fly ash, lime and carbon [J]. Water Research, 2009, **43** (10): 2605-2614.

[2] Asem A A, Ahmed M D, Ahmed M Y. Removal of some hazardous

heavy metals from aqueous solution using magnetic chelating resin with iminodiacetate functionality[J]. Separation and Purification Technology, 2008, **61** (3):348-357.

[3] Nadir D, Bulent K, Hulusi B. Sorption of Ni (II) ions from aqueous solution by Lewatit cation-exchange resin[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, **167** (1-3) :915-926.

[4] Alam M Z, Mansor M F, Jalal K C A. Optimization of decolorization of methylene blue by lignin peroxidase enzyme produced from sewage sludge with *Phanerocheate chrysosporium* [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, **162**(2-3) : 708-715.

[5] Kim Y, Yeo S, Kim M K, *et al*. Removal of estrogenic activity from endocrine-disrupting chemicals by purified laccase of *Phlebia tremellosa* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, **284** (2) : 172-175.

[6] Yahaya Y A, MatDon M, Bhatia S. Biosorption of copper (II) onto immobilized cells of *Pycnoporus sanguineus* from aqueous solution; Equilibrium and kinetic studies [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, **161** (1) :189-195.

- [7] Das B K, Roy A, Koschorreck M. Occurrence and role of algae and fungi in acid mine drainage environment with special reference to metals and sulfate immobilization [J]. Water Research, 2009, **43**(4):883-894.
- [8] Pakshirajan K, Swaminathan T. Biosorption of copper and cadmium in packed bed columns with live immobilized fungal biomass of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2008, **157**(2):159-173.
- [9] Aksu Z, Kilic N K, Ertugrul S, *et al.* Inhibitory effects of chromium(VI) and remazol black B on chromium(VI) and dyestuff removals by *Trametes versicolor* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, **40**(5):1167-1174.
- [10] Anna J W, Gadd G M. Oxalate production by wood-rotting fungi growing in toxic metal-amended medium [J]. Chemosphere, 2003, **52**(3):541-547.
- [11] Nadanathangam V, Kathe A A, Varadarajan P V, *et al.* Biomimetics of silver nanoparticles by white rot fungus *Phaenerochaete chrysosporium* [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2006, **53**(1):55-59.
- [12] Rashmi S, Preeti V. Biomimetic synthesis and characterisation of protein capped silver nanoparticles [J]. Bioresource Technology, 2009, **100**(1):501-504.
- [13] 吴涓,李清彪. 黄孢原毛平革菌吸附铅离子机理的研究 [J]. 环境科学学报, 2001, **21**(3):291-295.
- [14] Gutierrez A, Martinez M J, Almendros G, *et al.* Hyphal-sheath polysaccharides in fungal deterioration [J]. Science of the Total Environment, 1995, **167**(1-3):315-328.
- [15] 李越中,高培基. 黄孢原毛平革菌合成木素过氧化物酶的营养调控 [J]. 微生物学报, 1994, **34**(1):29-36.
- [16] Stepanova E V, Koroleva O V, Vasilchenko L G, *et al.* Fungal decomposition of oat straw during liquid and solid-state fermentation [J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2003, **39**(1):65-74.
- [17] Ulku Y, Ayla D, Filiz B D, *et al.* The removal of Pb(II) by *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Water Research, 2000, **34**(16):4090-4100.
- [18] Xu C P, Yun J W. Influence of aeration on the production and the quality of the exopolysaccharides from *Paecilomyces tenuipes* C240 in a stirred-tank fermenter [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, **35**(1):33-39.
- [19] 白玲,黄健. 基础生物化学实验 [M]. 上海:复旦大学出版社, 2004. 63-65.
- [20] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, *et al.* Protein measurement with Folin phenol reagent [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1951, **193**(1):265-275.
- [21] 周群英,高廷耀. 环境工程微生物学 [M]. 北京:高等教育出版社, 2000. 85.
- [22] Xu C P, Kim S W, Hwang H J, *et al.* Production of exopolysaccharides by submerged culture of an entomopathogenic fungus, *Paecilomyces tenuipes* C240 in stirred-tank and airlift reactors [J]. Bioresource Technology, 2006, **97**(5):770-777.
- [23] Po H L, Zhao S N, Kwok P H, *et al.* Chemical properties and antioxidant activity of exopolysaccharides from mycelial culture of *Cordyceps sinensis* fungus Cs-HK1 [J]. Food Chemistry, 2009, **114**(4):1251-1256.
- [24] 李清彪,吴涓,杨宏泉,等. 白腐真菌菌丝球形成的物化条件及其对铅的吸附 [J]. 环境科学, 1999, **20**(1):33-38.
- [25] Sar P, Kazy S K, Singh S P. Intracellular nickel accumulation by *Pseudomonas aeruginosa* and its chemical nature [J]. Letters in Applied Microbiology, 2001, **32**(4):257-261.