

非灭菌条件下酸性蓝 45 在白腐真菌反应器中的降解特性

周成, 文湘华*

(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 在非灭菌条件下维持白腐真菌反应器连续运行是在水处理领域实际应用白腐真菌的前提. 采用臭氧控制白腐真菌反应器中的污染细菌, 以连续运行方式考察了自由悬浮培养的白腐真菌体系中控菌、产酶、pH 变化及对酸性蓝 45 的降解特性. 结果表明, 在白腐真菌反应器系统的控菌单元, 以 0.0144 mg/min 臭氧投加速率, 可成功将白腐真菌反应器内污染细菌控制在 $1 \times 10^6 \text{ CFU/以下}$, 其去除率接近 99%, 成功实现了白腐真菌反应器连续合成锰过氧化物酶(最大剩余酶活 50 U/L)和对酸性蓝 45 的持续降解(40% ~ 80%); 发现 pH 值在 6 左右时, 白腐真菌培养体系仍然具有合成锰过氧化物酶和对酸性蓝 45 的持续降解的能力, 提出在控制污染细菌的前提下, 如何维持白腐真菌的持续生长及高产酶是进一步实现白腐真菌反应器连续运行的主要问题.

关键词 白腐真菌反应器 酸性蓝 45 ; *Phanerochaete chrysosporium* ; 臭氧 ; 细菌污染 ; 锰过氧化物酶

中图分类号 : X172 文献标识码 : A 文章编号 : 0250-3301(2009)06- -

Degradation of Acid Blue 45 in a White-Rot Fungi Reactor Operated Under Non-sterile Conditions

ZHOU Cheng, WEN Xiang-hua

(State Key Joint Laboratory of Environmental Simulation and Pollution Control, Department of Environment Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract To operate the white-rot fungal reactor under non-sterile conditions has important significance for its practical applications. Ozone (0.0144 mg/min) was selected as the bactericide to control the bacterial contamination in a white-rot fungal reactor. The control effect on bacteria, enzyme production, pH variation and decolorization of a recalcitrant dye (acid blue 45) in the reactor were studied during continuously operating the reactor. It was found that, the contaminating bacteria were controlled at under a number of $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6 \text{ CFU/mL}$ and the inactivation rate of contaminating bacteria in white-rot fungal reactor was close to 99%. The *Phanerochaete chrysosporium* continuously produced MnP with the maximum residual activity of 50 U/L and degraded the acid blue 45 with a rate of 40%-80%. At around pH 6, the system still had the capability to continuously produce MnP and degrade the acid blue 45. To keep the growth of white-rot fungi and production of MnP for a long term operation is a next step point to be solved.

Key words white-rot fungal reactor; acid blue 45; *Phanerochaete chrysosporium*; ozone; contaminating microorganism; manganese peroxidases (MnP)

随着社会的发展, 人工合成有机、有毒物质的种类和数量急剧增加. 常规理化和生物方法往往难以去除这些物质, 促使人们研究新方法和新技术以解决这些污染物带来的日益突出的环境问题.

白腐真菌(*Phanerochaete chrysosporium*) 在次生代谢阶段能向胞外分泌木质素降解酶系统, 主要包括过木质素过氧化物酶(LiP)和锰过氧化物酶(MnP), 对木质素进行降解. 此酶系的催化反应是以自由基为基础的链反应过程, 具有非特异性和强氧化性, 使其除了可以降解木质素, 还能降解环境中的许多异生物质和有毒有机污染物^[1]. 因此, 白腐真菌在水污染控制、土壤修复、造纸工业的生物制浆以及纸浆的生物漂白等方面具有重要的潜在应用价值.

然而, 无论国内还是国外, 对白腐真菌处理含难降解污染物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案例基本没有. 制约白腐真菌在实际工程中应用的主要原因之一是反应体系的染菌问题^[2]. 一旦其它菌群进入白腐真菌反应体系中, 这些菌群就会与白腐真菌争夺营养物质和生存空间. 由于这些菌群(主要是单细胞微生物)的繁殖速度比白腐真菌快, 很快即可在白腐真菌反应体系

收稿日期 2008-08-02; 修订日期 2008-09-27

基金项目 国家自然科学基金项目(20677033)

作者简介 周成(1972~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为环境微生物, E-mail: zc-zhou04@tsinghua.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: xhwen@tsinghua.edu.cn

内占优势^[3],而白腐真菌因缺乏营养将停止生长,进而影响胞外降解酶系的分泌^[4],使整个处理系统不能正常运行^[5]。

目前有关白腐真菌反应器的研究几乎都是在灭菌条件下进行的^[6,7]。但是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。

最近几年,白腐真菌的染菌问题引起了国外科学家的重视,并开始了一些初步的研究工作,但都未能取得满意的效果。Fujita 等^[8]采用温度(50℃下停留 10 min)对污染的细菌进行控制,达到约 80%的控制率。Libra 等^[9]采用限氮培养基、低 pH 条件都未能抑制住细菌的污染。

基于木质素降解酶和臭氧的反应机制,笔者提出采用低浓度臭氧控制白腐真菌反应器中的污染细菌。前期的研究表明:在不影响白腐真菌和 MnP 活性的条件下,低浓度臭氧能有效控制污染细菌的数量(可达到 99.7%的控制率)^[10]。采用 Taguchi 法对臭氧控制白腐真菌反应器中的细菌污染的条件进行优化,得到其最佳条件组合为:反应器水力停留时间 3 d、杀菌单元循环速率 5 mL/min、的臭氧作用时间 60 min、臭氧投加速率 0.0144 mg/min。

本研究在前期工作的基础上,在采用臭氧对白腐真菌反应器中污染细菌进行控制的非灭菌条件下,考察 *P. chrysosporium* 对酸性蓝 45 的降解特性,进一步探索白腐真菌反应器运行中所存在的问题,以期在自然(非灭菌)环境下实施白腐真菌处理废水奠定基础。

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黄孢原毛革菌(*P. chrysosporium* BKM2F21767)。

1.2 接种白腐真菌的培养

培养基主要成分为:葡萄糖 10 g/L;酒石酸铵 0.8 g/L;磷酸二氢钾 2 g/L;硫酸镁 0.5 g/L;氯化钙 0.1 g/L;硫酸锰 0.175 g/L;维生素 B1 0.000 1 g/L;微量元素^[11]70 mL;乙酸与乙酸钠为缓冲溶液将 pH 值调节为 4.5。

取 250 mL 的三角瓶,加入 100 mL 培养基,接种 1×10^5 个/mL 孢子。将三角瓶在 37℃,摇床转速为 120 r/min 条件下培养 3 d。

1.3 酸性蓝 45

酸性蓝 45 由辽宁省东港市前进染料厂提供,其结构如图 1 所示。其最大吸收波长约在 593 nm 处。

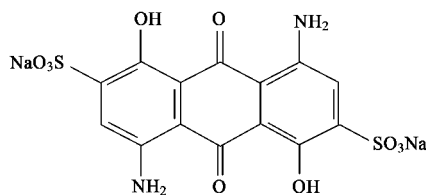


图 1 酸性蓝 45 的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of the acid blue 45

1.4 臭氧发生器及臭氧

臭氧发生器为 DHX-SS-O₃ (哈尔滨久久电化有限公司)。采用空气(100 mL/min)为气源,将空气产生的臭氧进行稀释至浓度为 0.12 mg/L。试验中的臭氧流速通过流量计进行控制。过量臭氧采用 KI 溶液进行吸收。

1.5 反应器的运行

在试验中采用的反应器装置见图 2 所示。

反应器进水为自配水,除采用 6 g/L 的葡萄糖和 0.014 g/L 的酒石酸铵外,其余成分与白腐真菌培养基(2.2)相同。反应器运行 1 d 后,开始在进水中投加 50 mg/L 的酸性蓝 45。

同时运行两组反应器(1 号和 2 号反应器),其运行的试验步骤如下:①先将配制好的反应器进水 2.16 L 加入白腐真菌反应器,然后以 2.7 L/min 的空气使反应器的进水充分混合,并采用恒流泵控制连续进水(0.5 mL/min);②在 1 号反应器中接种约 1.7 g/L(菌丝干重)的菌丝球以考察白腐真菌对酸性蓝 45 的降解,在 2 号反应器中不投加白腐真菌用以考察臭氧与污染细菌对酸性蓝 45 的降解;③开启臭氧发生器,将臭氧导入臭氧作用单元(0.014 4 mg/min),同时将白腐真菌反应器的上清液通过恒流泵导入臭氧作用单元(5 mL/min)进行臭氧杀菌,经过预定时间(60 min)的臭氧作用后再流回白腐真菌反应器。

反应器采用连续运行的方式,其中白腐真菌反应器的运行温度为 35℃,臭氧作用单元的温度为 25℃。

1.6 参数测定方法

细菌的测定采用稀释平板计数确定。

锰过氧化物酶(MnP)采用文献[12]方法,定义每 1 min 氧化 1 μmol Mn²⁺ 为 Mn³⁺ 所需的酶量为 1 个酶活力单位。

葡萄糖测定:采用葡萄糖氧化酶法进行测定(葡

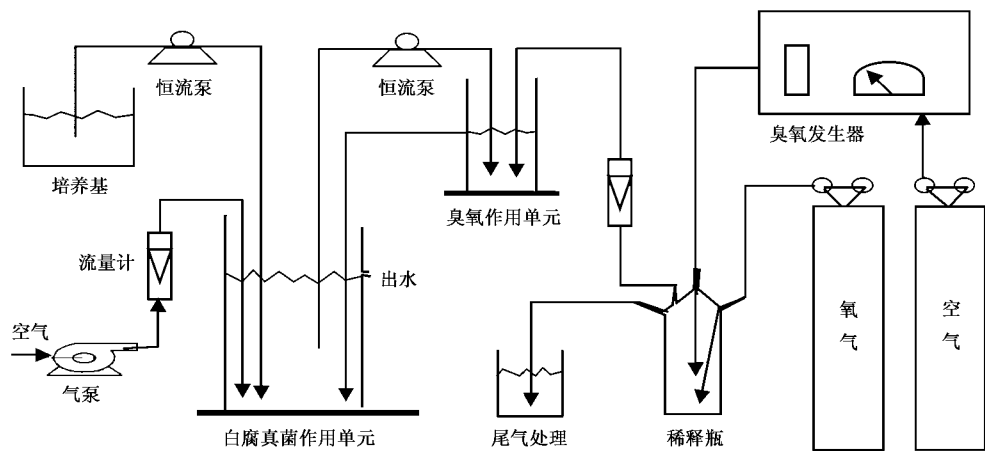


图2 白腐真菌反应器示意

Fig.2 Scheme of the white-rot fungal reactor

葡萄糖试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司)。

氨氮测定:采用纳氏试剂分光光度法^[13]。

白腐真菌对酸性蓝 45 的脱色率的计算:分别在吸收波长 593 nm 处测定 1 号和 2 号反应器出水的吸光值 A_1 、 A_2 ,白腐真菌对染料脱色率 $= [(A_1 - A_2) / A_1] \times 100\%$

2 结果与讨论

2.1 pH 的变化

从反应器运行过程中 pH 的变化来看(图 3),在运行初期,处理液的 pH 首先下降,在第 1 d 运行结束后达到最低值,随后开始上升。在运行 4 d 后 pH 值达到 6.26,在以后的运行中基本保持在 6 左右。

研究表明^[14]:*P. chrysosporium* 的生长所需的适宜 pH 值为 5.5 左右,而木质素降解所需的最佳 pH 值为 4.5 左右,当 pH 值低于 3.5 和高于 4.5 的情况下,会显著抑制木质素降解酶活性。而在非灭菌体系下,白腐真菌反应器中的 pH 值维持在 6 左右,这可能与污染的细菌有关。由于细菌的生长和代谢使得 pH 值升高。但尽管 pH 值在 6 左右,白腐真菌培养体系仍然具有合成锰过氧化物酶的能力(数据见 2.4)和对酸性蓝 45 保持降解能力(数据见 2.4)。

2.2 葡萄糖与氨氮的利用

非灭菌条件下白腐真菌培养体系的葡萄糖、氨氮利用情况如图 4 所示。从中可以看出,葡萄糖的利用速率很高,运行 3 d 后浓度接近于 0。氨氮的利用出现同样的趋势,但氨氮的利用速率比葡萄糖更快,运行 1 d 后,浓度接近于 0。Kirk 等^[14]的研究证实:木质素降解酶系的 *P. chrysosporium* 在次生代谢中表达木质素降解酶系,此表达被氮限制所激活,且碳源浓

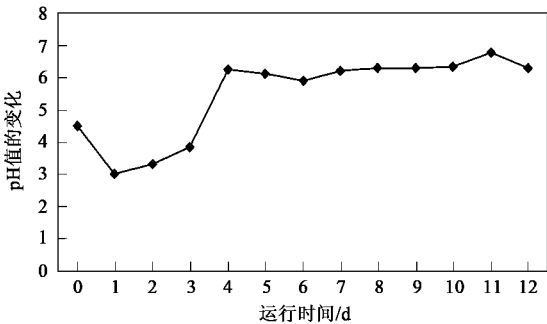


图3 白腐真菌反应器中的 pH 变化

Fig.3 Variation of pH in the white-rot fungal reactor

度应较低。从图 4 的结果表明在运行 1d 后,反应器内的溶液条件即满足木质素酶系产生条件,有利于白腐真菌合成锰过氧化物酶。

在运行至第 8 d 后,氨氮的浓度开始上升,至第 11 d 达到 8 mg/l 左右。这可能与 *P. chrysosporium* 的变化有关。在运行至第 8 d 时,观察到白腐真菌培养体系出现从菌丝球上脱落菌丝的现象,由于菌丝的断裂脱落可能导致菌丝内的内容物流出,这些内容物可能含有氨氮;另外,*P. chrysosporium* 菌丝的脱落可能与其菌丝的老化相关,由于菌丝的老化使得 *P. chrysosporium* 对氨氮的利用率降低。

2.3 细菌的数量变化

白腐真菌反应器运行期间污染细菌的数量变化如图 5 所示。

由图 5 可见,细菌污染在运行前期呈上升趋势,在第 3 d 后基本稳定在 5.8×10^5 CFU/mL,在运行的末期污染细菌的数量略有上升,接近于 1×10^6 CFU/mL。在前期的研究中发现,当采用相同的运行条件但不投加白腐真菌运行反应器时,污染的细菌

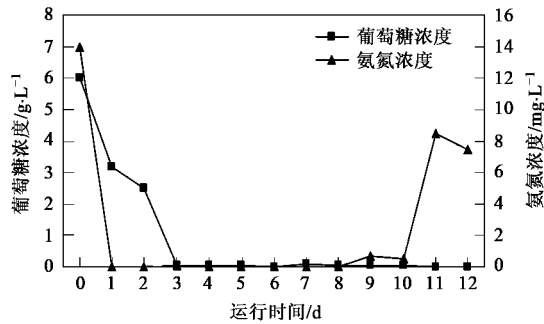


图 4 白腐真菌反应器中葡萄糖和氨氮的利用
Fig.4 Glucose and ammonium nitrogen consumption in the white-rot fungal reactor

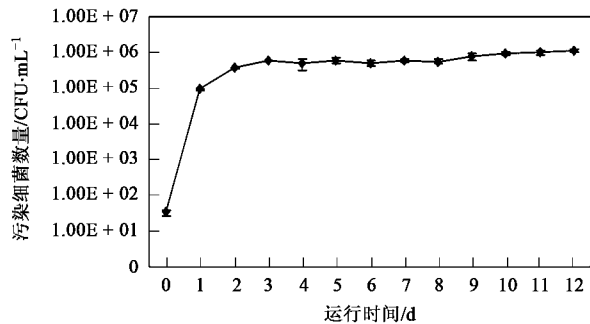


图 5 白腐真菌反应器中污染细菌的数量变化
Fig.5 Bacterial concentration in white-rot fungal reactor

可达 5×10^7 CFU/mL^[9],因此,在本研究中污染细菌的抑制率接近 99% 左右,大大高于 Fujita 等^[8]采用温度进行控制的效果(其抑制率达到 80%)。

2.4 MnP 合成与酸性蓝 45 的降解

锰过氧化物酶在第 1 d 后开始出现,第 6 d 达到峰值(51 U/L),然后活性下降。锰过氧化物酶的第 2

次升高在第 9 d,而后锰过氧化物酶的活性开始下降直至到 α (图 6)。迄今为止,关于在非灭菌条件下白腐真菌合成锰过氧化物酶的特性很少有研究报道。本研究在非灭菌条件下,成功实现了锰过氧化物酶的连续合成近 12 d,相应对实现了对酸性蓝 45 的连续脱色 12 d,脱色率基本保持在 40% ~ 80%。酸性蓝 45 的脱色率变化与 MnP 的活性的变化规律相似,说明酸性蓝 45 的脱色与 MnP 活性相关。

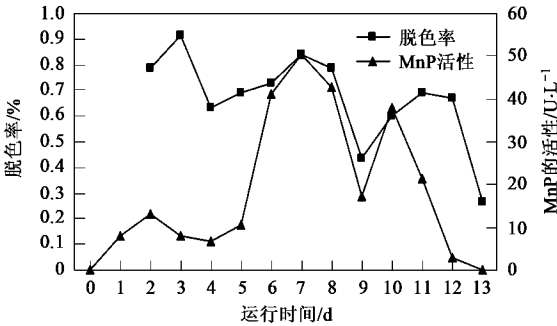


图 6 在非灭菌条件下 *P. chrysosporium* 合成 MnP 和对酸性蓝 45 的脱色

Fig.6 Production of MnP and decolorization of acid blue 45 by *P. chrysosporium* under non-sterile conditions

2.5 白腐真菌的生长情况

在运行至第 8 d 时 *P. chrysosporium* 培养体系出现菌丝从菌丝球上脱落和老化现象,脱落的菌丝未能观察到进一步的生长的迹象(图 7)。因此,在控制污染细菌的前提下,如何防止白腐真菌菌丝老化并维持白腐真菌的持续生长是进一步实现白腐真菌反应器连续运行的主要问题。

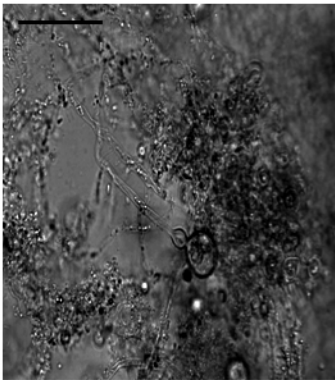
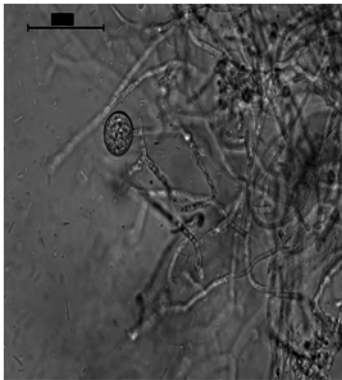


图 7 反应器中 *P. chrysosporium* 的形态变化(标尺 50μm)
Fig.7 Morphology of mycelium in the reactor

3 结论

(1)在白腐真菌反应器系统的控菌单元,以 0.0144 mg/min 臭氧投加速率,可成功将白腐真菌反应器内污染细菌控制在 1×10^6 CFU/mL 以下,其去除率接近 99%。

(2)在利用臭氧控制反应器内细菌污染的条件下,成功实现了白腐真菌反应器连续产酶(最大剩余酶活 50 U/L)与对酸性蓝 45 的持续降解(40% ~ 80%)。

(3)发现在 pH 值在 6 左右,白腐真菌培养体系仍然具有合成锰过氧化物酶的能力和对酸性蓝 45 的持续降解能力。

(4)反应器未能实现长时间运转,主要原因是 *P. chrysosporium* 培养体系出现菌丝老化现象。因此,在控制污染细菌的前提下如何维持白腐真菌的持续生长及高产酶是进一步实现白腐真菌反应器连续运行的主要问题。

参考文献：

[1] Wingate K G ,Stuthridge T ,Mansfield S D. Colour remediation of pulp mill effluent using purified fungal cellobiose dehydrogenase : Reaction optimisation and mechanism of degradation [J]. Biotechnology and Bioengineering 2005 **90**(1) 95-106.

[2] 高大文 ,文湘华 ,周晓燕 ,等 . 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 [J]. 环境科学 2006 **27**(8) :1623-1626.

[3] Dhoubi A ,Aloui D ,Hamad N *et al.* Pilot-plant treatment of olive mill wastewaters by *Phanerochaete chrysosporium* coupled to anaerobic digestion and ultrafiltration [J]. Process biochemistry 2006 **41** :159-167.

[4] Borchert M ,Libra J. Decolorization of reactive dyes by the white rot

fungus *Trametes versicolor* in sequencing batch reactors [J]. Biotechnology and bioengineering 2001 **75**(3) 313-321.

[5] Aggelis G ,Iconomou D ,Christou M ,*et al.* Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process [J]. Water research , 2003 **37** 3897-3904.

[6] Blázquez P ,Glória C ,Montserrat S ,*et al.* The effect of HRT on the decolourisation of the grey lanaset G textile dye by *Trametes versicolor* [J]. Chemical engineering journal 2007 **126** :163-169.

[7] Couto S R ,Rosales E ,Sanroman M A. Decolorization of synthetic dyes by *Trametes hirsute* in expanded-bed reactors [J]. Chemosphere 2006 **62** :1558-1563.

[8] Fujita M ,Era A ,Ike M ,*et al.* Decolorization of heat-treatment liquor of waste sludge by a bioreactor using polyurethane foam-immobilized white rot fungus equipped with an ultramembrane filtration unit [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering 2000 **90** 387-394.

[9] 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 condition [J]. Biotechnology and bioengineering 2003 **82**(6) :736-744.

[10] 周成 ,文湘华 ,赵曦 . 采用臭氧对白腐真菌反应器中的细菌进行控制的可能性研究 [A]. 见 :第十次全国环境微生物学术研讨会论文摘要集 . 2007 . 90.

[11] Tien M ,Kirk T K. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Methods Enzymol , 1988 , **161** 238-248.

[12] Paszczynski A ,Crawford R L ,Huynh V B. Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* : purification [J]. Methods in Enzymology ,1988 **161** 264-270.

[13] 国家环境保护局 . 水和废水监测分析方法 [M]. (第三版). 北京 :中国环境科学出版社 ,1989 . 252-286.

[14] Kirk T K ,Schultz E ,Connors W J ,*et al.* Influence of cultural parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Arch Microbiol ,1978 **117** 277-285.