

文章编号: 1005-8893(2003)02-0005-04

# 聚乙烯醇包埋固定黄孢原毛平革菌方法的探讨<sup>\*</sup>

李慧蓉<sup>1</sup>, 尹艳<sup>2</sup>, 高云霞<sup>2</sup>

(1. 江苏工业学院 环境与安全工程系, 江苏 常州 213016)

**摘要:** 以PVA为包埋剂对黄孢原毛平革菌进行固定, 并建立包埋颗粒对染料比布列希猩红的反应体系。表明: PVA浓度为10%较适合; 交联剂 $H_3BO_3$ 的pH为6.7有利于成球; 海藻酸钠的加入可防止粘连发生; 复合包埋、冷冻法、 $Al_2(SO_4)_3$ 处理小球或在培养基中添加 $CaCO_3$ 等, 均能或提高小球的机械强度或促进降解反应, 但有时也会引起负面效应。

**关键词:** 黄孢原毛平革菌; 聚乙烯醇; 包埋; 比布列希猩红; 脱色降解

中图分类号: Q 93

文献标识码: A

利用聚乙烯醇(PVA), 对许多细菌细胞和其它单细胞微生物进行包埋, 有一些成功报道<sup>[1]</sup>。PVA作为一种高分子的凝胶, 具有价格低廉、化学稳定性强、对微生物无毒、固定效果好、传质性能较佳、机械强度高及可反复使用等优点, 可能成为可选择的包埋剂之一。

黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)是一种丝状真菌, 区别于单细胞微生物, 其生长繁殖会对包埋颗粒构成一定程度的破坏<sup>[2]</sup>; 菌对底物进行降解时, 其次生代谢活动对反应环境的要求较为苛刻, 需要一定的营养组分和严格的偏酸环境(pH约4.5左右)。菌的这两个基本生理特点, 与作为包埋剂的PVA的分子结构特性及凝胶的成形条件相矛盾。这给黄孢原毛平革菌的PVA包埋固定方法增加了难度。

本文的主要目的, 是想在利用PVA包埋固定黄孢原毛平革菌的技术的可行性、基本方法和主要条件方面等, 作些初步的探索。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

选择黄孢原毛平革菌代表品系 OGC101。

### 1.2 培养基

固体培养基, 用于菌的生长; 液体营养限制培养基, 用于建立菌的降解体系。配方见文献[3]。

### 1.3 包埋颗粒的制备

(1) 悬滴法: 将PVA加热溶于水(有时再加其它包埋剂或吸附剂等介质), 50℃左右保温; 加入一定量的孢子, 混匀; 用注射器将PVA+菌的混和液逐滴滴入交联剂(常规为硼酸 $H_3BO_3$ , 有时为 $CaCl_2$ ), 形成直径约3~4mm的小球; 常温交联一定时间, 洗涤备用。

(2) 切块法: 将PVA加热溶于水(再加其它包埋剂或吸附剂等介质), 搅匀, 冷至室温; 加入一定量的孢子, 混匀; -18℃冰箱中冷冻24h, 融解后, 切成5mm×5mm小块, 洗涤备用。

### 1.4 包埋小球的强度试验

两块载玻片之间放置粒径相近的包埋小球, 在小球上面的载玻片上加砝码, 直至小球被压碎。以砝码的质量表征小球的强度。

\* 收稿日期: 2003-02-18

基金项目: 江苏省高校自然科学基金资助(02KJB610002)

作者简介: 李慧蓉(1947-), 女, 上海人, 教授, 主要从事环境生物技术的研究; 2-本院2001届环境与安全工程系毕业生。

## 1.5 模式染料及母液

以模式染料比布列希猩红的脱色降解, 快速、直观地标志菌的反应体系的工作状况。

配制 50 mg/10 mL 的母液, 0.2  $\mu$ m 孔径的醋酸纤维素滤膜超过滤除菌备用。

## 1.6 基本培养体系和培养方式

100 mL 三角瓶, 40 mL 液体营养限制培养基, 0.4 mmol/L 藜芦醇 (Veratry Alcohol, VA), 加入包埋制备的颗粒; 39  $^{\circ}$ C 恒温振荡器培养 6 d; 加入模式染料母液, 染料终浓度为 100 mg/L。

常规菌量为每 10 mL 培养液加入用  $5 \times 10^6$  孢子的菌量所制备的包埋颗粒。

## 1.7 染料脱色降解率的确定

参见文献 [4]。

# 2 结果和分析

## 2.1 PVA—H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 法的摸索试验

### 2.1.1 包埋条件对成球性的影响

主要试验 PVA 浓度、海藻酸钠、交联剂浓度、交联剂 pH 及交联时间等因素, 对成球性的影响。因为在预备实验中, 已对一些条件作初试, 缩小取值范围, 强调了表 1 的参数。

表 1 影响 PVA—H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 法成球性的摸索试验

| PVA,<br>% | 海藻酸钠,<br>% | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ,<br>% | CaCl <sub>2</sub> ,<br>% | 交联剂<br>pH | 交联时<br>间/h | 成球性  |
|-----------|------------|---------------------------------------|--------------------------|-----------|------------|------|
| 6         |            |                                       |                          |           |            | 不成形  |
| 10        | —          | 饱和                                    | —                        | 4.0       | —          | 不成形  |
| 12        |            |                                       |                          |           |            | 操作不便 |
| 10        | —          | 饱和                                    | —                        | 4.0       | —          | 不成形  |
| 10        |            |                                       |                          |           |            | 成形粘连 |
| 10        |            |                                       | —                        | 6.7       | —          | 不成形  |
| 10        | 0.015      | 饱和                                    | 1                        | 6.7       | —          | 成形   |
| 10        |            | 3                                     |                          |           |            | 不成形  |
| 10        | 0.015      | 4                                     | 1                        | 6.7       | —          | 不成形  |
| 10        |            | 5                                     |                          |           |            | 成形   |
| 10        |            |                                       |                          |           | 30         | 60   |
| 10        | 0.015      | 饱和                                    | 1                        | 6.7       | 40         | 120  |
| 10        |            |                                       | 2                        |           | 30         | 90   |
| 10        |            |                                       |                          |           | 40         | 120  |

说明: 用 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 调节交联剂 (为 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 或和 CaCl<sub>2</sub> 的混合液) pH 值达 6.7。

由表 1 可见: ①PVA 浓度太低时, 不能成球; PVA 浓度过高, 粘度大, 制备困难; 适宜浓度为 10%。②交联剂 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 的浓度是 PVA 成球的主

因素之一, 浓度 < 3% ~ 5% 时, PVA 不能成形; 随 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 浓度的下降, PVA 成形速度放慢、形成的颗粒表面发粘、硬度和弹性变小; 5% 时 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 溶液基本饱和, 固定效果很好。③饱和 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 的 pH 为 4.0, 影响凝胶强度; 用 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 调节 pH 值, 观察到 pH 升高, 成球性好, 强度增加, 且有利于小球的通透性。④PVA 中加入少量海藻酸钠, 有效地克服了小球粘连现象, 提高成球性和小球活性。

### 2.1.2 介质环境对小球保存的影响

将包埋制备成的白色小球转入不同 pH 的介质, 观察小球形态的变化, 归纳于表 2。

表 2 PVA 小球在不同介质环境中的成球情况

| 介质    | pH  |     |     |
|-------|-----|-----|-----|
|       | 4.5 | 6.0 | 7.0 |
| 水     | 软化  | 软化  | 完好  |
| 培养基   | 软化  | 软化  | 软化  |
| 磷酸缓冲液 | —   | 软化  | —   |

说明: 软化指白色消失, 球体透明, 强度下降。

PVA—H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 法制备的小球只有在 pH7.0 的水中才维持原形, 其原因可能是: 以 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 为主交联剂形成的 PVA 球只有在近中性的环境中才比较稳定; 培养基中含有的大量无机离子所形成的渗透压, 一定程度破坏了 PVA 小球的结构。

## 2.2 改良的 PVA—海藻酸钠法

改良的 PVA—海藻酸钠法的基本操作过程为: 10% 的 PVA + 1% 的海藻酸钠的复合溶液, 常规菌量, 混匀后滴入 2% 的 CaCl<sub>2</sub> 溶液中成形, 室温放置过夜 (12 h)。

按表 3 设计对小球进行不同参数的处理。先将小球置于不同 pH 的 5% H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 中交联 1 h, 洗涤多次。再对小球进行硬化处理: 10  $^{\circ}$ C 1% 的 Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> 溶液中浸泡 1 d。培养基处理: 在常规的液体营养限制培养基中加入 1% 的 CaCO<sub>3</sub>。

表 3 不同参数处理的 PVA—海藻酸钠小球对染料比布列希猩红的脱色率

| 体系<br>编号 | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub><br>pH | 硬化<br>处理 | 加<br>CaCO <sub>3</sub> | 时间/d |      |      |      |      |
|----------|--------------------------------------|----------|------------------------|------|------|------|------|------|
|          |                                      |          |                        | 2    | 3    | 10   | 15   | 20   |
| 1        | 6.7                                  | +        | +                      | 12.0 | 17.8 | 23.7 | 38.7 | 46.7 |
| 2        | 6.7                                  | +        | —                      | 61.6 | 63.9 | 43.2 | 57.2 | 27.9 |
| 3        | 6.7                                  | —        | +                      | 41.2 | 91.1 | 93.0 | 93.4 | 93.8 |
| 4        | 6.7                                  | —        | —                      | 70.0 | 75.4 | 76.4 | 92.2 | 95.8 |
| 5        | 4.0                                  | +        | +                      | 17.0 | 79.3 | 86.9 | 95.0 | 90.5 |
| 6        | 4.0                                  | +        | —                      | 56.8 | 57.0 | 57.1 | 59.4 | 44.5 |
| 7        | 4.0                                  | —        | +                      | 88.0 | 94.1 | 93.8 | 97.1 | 94.8 |
| 8        | 4.0                                  | —        | —                      | 34.0 | 47.2 | 87.9 | 91.8 | 92.9 |

将小球放入液体营养限制培养基中，预培养 6 d，加入染料。测得染料脱色率见表 3。

2.2.1 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 的 pH 的影响

图 1 显示 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 的 pH 的不同时，PVA—海藻酸钠小球对染料脱色效果的差异。

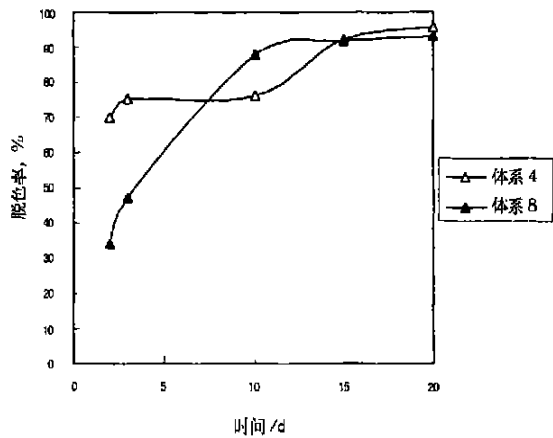


图 1 不同 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> pH 下制备的 PVA—海藻酸钠小球对染料比布列希猩红脱色的比较

pH 为 4.0 时，小球前期脱色能力受抑，后期与 pH6.7 的 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 交联剂的体系差别不大。

2.2.2 Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> 硬化处理的作用

图 2 将经 Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> 硬化处理的小球与对照进行比较，看硬化处理的作用。

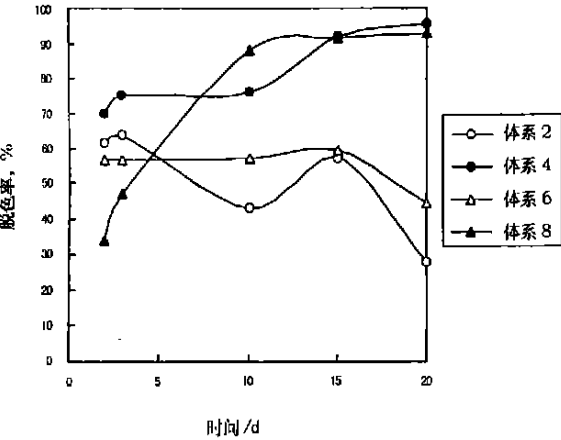


图 2 Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> 硬化处理对 PVA—海藻酸钠小球降解染料比布列希猩红的影响

体系 2 与体系 4，体系 6 与体系 8 为两组对比。体系 4 和体系 8 的反应结果分别明显优于体系 2 和体系 6，表明：Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> 硬化处理，虽然使铝盐中的铝离子将凝胶中的钙离子置换出来，增强了小球的稳定性，但可能也抑制小球的传质性能，影响了对染料底物的作用。

2.2.3 培养基中加 CaCO<sub>3</sub> 的效果

图 3 比较了培养基中加 CaCO<sub>3</sub> 的反应效果。

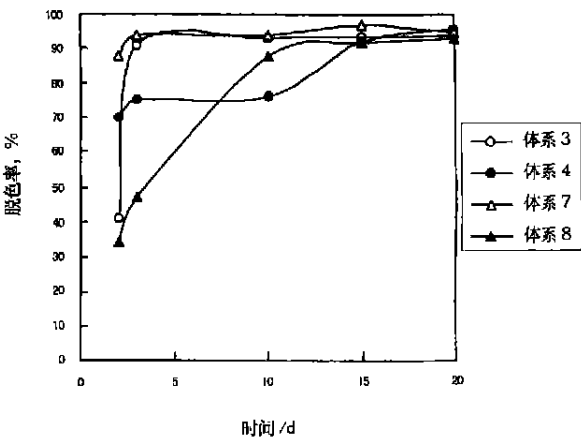


图 3 培养基中加 CaCO<sub>3</sub> 对 PVA—海藻酸钠小球降解染料比布列希猩红的效应

体系 3 与体系 4，体系 7 与体系 8 为两组对比。体系 3 和体系 7 的反应结果分别明显优于体系 4 和体系 8，表明：培养基中加入 CaCO<sub>3</sub> 有利于染料的脱色效率。海藻酸钠与 CaCl<sub>2</sub> 交联形成的海藻酸钙凝胶易受到培养基中争夺钙的阴离子的影响而使凝胶失稳。CaCO<sub>3</sub> 虽是难溶物，但在培养体系中受到酸效应、盐效应及温度等的影响，溶解度增大，从而平衡培养基中的阴离子影响，增强了凝胶的稳定性。同时 CaCO<sub>3</sub> 的加入还有效地消除了 pH4.0 的 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 在反应前期的抑制作用。

总体上，体系 7，反应启动快，周期短，脱色率高；中后期培养液和小球菌无色。但中后期，各体系的 PVA—海藻酸钠小球粒径增大，强度程度不同地减小；这使因为孢子在凝胶中萌发，菌丝的生长，在球体内产生一定的张力所致。

2.3 PVA—海藻酸钠小球—冷冻法

10% 的 PVA+1% 的海藻酸钠混合液，常规菌量，滴入 0.5 mol/L 的 CaCl<sub>2</sub> 中，形成小球，常温下静置 30 h；洗涤，-18℃ 冰箱冷冻 24 h。室温下融化，转入培养体系，6 d 后加入染料。

表 4 PVA—海藻酸钠小球—冷冻法和未冷冻处理对染料比布列希猩红的降解比较

| 方法      | 小球硬度 | 降解率, % |      |      |
|---------|------|--------|------|------|
|         |      | 2 d    | 3 d  | 5 d  |
| PVA 冷冻法 | 300  | 24.1   | 27.9 | 98.0 |
| PVA 未冷冻 | 180  | 24.9   | 98.5 | 100  |

PVA 冷冻处理后，球体的机械强度显著增强。PVA—海藻酸钠小球在反应期间，由于菌体的生长代谢，不断膨胀；经冷冻处理后的小球的变化速度明显慢于未冷冻的小球，但其对染料的降解速度

前期滞后, 因为从冷冻造成的休眠状态, 进入生长和代谢阶段, 需要时间。

## 2.4 PVA—复合包埋法

选择活性炭或硅藻土为复合包埋物, 按下述过程分别制备包埋颗粒: ①PVA—活性炭和 PVA—硅藻土小球: 10%PVA, 加 4%活性炭或硅藻土粉末, 接入常规的孢子量, 滴入经  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  调节 pH 值为 6.7 的饱和  $\text{H}_3\text{BO}_3$  中,  $4^\circ\text{C}$  静置交联 30 h, 洗涤。②PVA—活性炭和 PVA—硅藻土小块: 10% 的 PVA, 加 4% 的活性炭或 4% 及 8% 的硅藻土粉末, 接入常规的孢子量, 置  $-18^\circ\text{C}$  冰箱冷冻 24 h 后切块, 洗涤备用。

## 3 讨论

黄孢原毛平革菌对多种异生物质广谱高效的降解能力, 决定其在环境污染治理方面具有广阔的应用前景。但是, 与降解机制密切相关的两种关键酶的细胞外工作特点, 加上菌好氧需通气时的机械剪切力会造成胞外酶的失活等, 使如何有效地固定菌体, 成为该菌生物补救技术实现工业化的“瓶颈”问题<sup>[5]</sup>。

我们在追踪检索有关黄孢原毛平革菌固定方法的国内外文献中, 发现一个值得注意的现象: 采用包埋法较少<sup>[6]</sup>; 即使用包埋法, 选择的包埋剂也是海藻酸钠或卡拉胶等<sup>[7, 8]</sup> 而不用各种性能都较好的聚乙烯醇 (PVA)。

我们的研究表明, 利用 PVA 包埋固定黄孢原毛平革菌这种微生物并使包埋颗粒具有较高的

强度与活性, 确实有相当的难度, 主要因为许多条件和因素是相对立与相制约的。但是, 一些矛盾和障碍, 并非不可解决和逾越的; 核心问题是对常规包埋方法的改进, 是各种措施的有机结合, 是操作程序的重新组合, 是实验方案的设计和筛选。如冷冻法、复合法、调节介质的离子平衡关系等都有积极的意义。

## 参考文献:

- [1] 李峰, 吕锡武, 严伟. 聚乙烯醇作为固定化包埋剂的研究 [J]. 中国给排水, 2000, 16 (12): 14—16.
- [2] 李学梅, 林建平, 岑沛霖. 霉菌固定化综述 [J]. 生物工程进展, 1999, 19 (4): 62—66.
- [3] 李慧蓉, 陈建海. 黄孢原毛平革菌对五氯苯酚生物降解研究 [J]. 江苏石油化工学院学报, 1999, 11 (2): 24—27.
- [4] 李慧蓉. 真菌降解技术中载体固定和表面活性剂的作用 [J]. 上海环境科学, 2000, 19 (5): 235—239.
- [5] Paszczynski A, Crawford R L. Potential for Bioremediation of Xenobiotic Compounds by the White-rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Biotechnol Prog, 1995, 11 (4): 368—379.
- [6] Wang X, Ruckenstein E. Immobilization of *Phanerochaete chrysosporium* on Porus Polyurethane Particles with Application to Biodegradation of 2-chlorophenol [J]. Biotech Techniq, 1994, 8 (5): 339—344.
- [7] Linko Y-Y, Leisola M, Lindholm N, et al. Continuous Production of Lignin Peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Joun Biotechnol, 1986, 4, 283—291.
- [8] Yusef H H, Ghanem K M, El-Kassas H Y. Optimization of Biotreatment of Paper Industrial Effluent with *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Fresenius Envir Bull, 1999, 8, 668—677.

## Probing of the Entrapment Method for *Phanerochaete chrysosporium* with PVA

LI Hui-rong<sup>1</sup>, YIN Yan<sup>2</sup>, GAO Yun-xia<sup>2</sup>

(1. Department of Environmental and Safety Engineering, Jiangsu Polytechnic University, Changzhou 213016, China)

**Abstract:** *Phanerochaete chrysosporium* was entrapped with PVA and the reaction system for dye Biebrich Scarlet with entrapment particles was set up. The study showed: the appropriate concentration of PVA was 10%; pH6.7 of crosslinking agent  $\text{H}_3\text{BO}_3$  was of benefit to the forming of beads; the addition of sodium alginate could prevent agglomeration; the complex—supports—entrapment, the freezing method, the treatment of beads with  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  or the supplement of  $\text{CaCO}_3$  in culture medium ect. could increase the strength of beads or promote the degrading of dye, but it was possible that they also caused some negative effects.

**Key words:** *Phanerochaete chrysosporium*; PVA; entrapment; Biebrich Scarlet; decolorization and degradation