白腐真菌胞外聚合物及其对菌体吸附 Pb²⁺ 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 Pb²⁺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 Pb²⁺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 Pb²⁺的吸附实验,讨论了 白腐真菌 EPS 与 Pb²⁺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 KH₂PO₄ ρ .5 g MgSO₄ ρ .1 g CaCl₂ ρ .001 g 维生素 B₁ ρ .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 MnSO₄ • H₂O,0.1 g FeSO₄•7H₂O ρ .1 g CoSO₄ ,1.5 g NTA ,1.0 g NaCl, 0.01 g CuSO₄ • 5H₂O ,0.01 g AlK(SO₄)₂ • 12H₂O, 0.1 g ZnSO₄ • 7H₂O,0.01 mg H₃BO₃,0.01 g NaMoO₄.

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 × 10⁵ 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 10000 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10000 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, 7000),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-H₂SO₄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 Pb²⁺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.

Pb²⁺溶液制备与分析:准确称取 1.598 5 g 优级 纯 Pb(NO₃)₂ 于烧杯中,加 5%(体积分数)HNO₃ 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 Pb²⁺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 Pb²⁺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:

$$q = \frac{(c_0 - c_t)V}{W} \times 1\ 000 \tag{1}$$

式中 $c_0 \, {}_{\circ} c_t \, \beta$ 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:

$$r = \frac{(m_2 - m_1)}{m_1} \times 100\%$$
 (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 产量与黄胞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 Pb²⁺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 Pb²⁺溶液,吸附时间为 4 h,考察白腐 真菌 EPS 与 *P. chrysosporium* 菌体对 Pb²⁺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.



随着培养时间的延长,原菌体和不含 EPS 菌体 对 Pb²⁺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 Pb²⁺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 Pb²⁺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Pb²⁺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 Pb²⁺ 吸附量最大,因此用来进行电镜分析,电镜 图见图 4.



(a) 原菌体 (×500)



(c)吸附后的原菌体 (×800)

(d) 吸附后的不含EPS菌体 (×1 000)

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 (U) 约形成 C₁O₁P 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 Pb²⁺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 Pb²⁺的过程中,菌体胞内所含 Mg²⁺运输到菌体表 面 ,与溶液中 Pb²⁺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 Pb²⁺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 Pb²⁺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 A0(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 Phanerocheate 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 ,FarrA 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 enthomopathogenic 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 natrue [J]. Letters in Applied Microbiology 2001 32(4):257-261.