



# 混合白腐真菌的固定化及其在治理铅污染废水中的应用

毛轩雯, 李逸雯, 姜小羽, 王颜和, 吴楠, 蒋云杰, 刘粤, 游薇, 王婷舒, 肖茵翠, 方芳, 刘鹏\*

浙江师范大学生命科学学院植物学实验室, 浙江 金华 321004

毛轩雯, 李逸雯, 姜小羽, 王颜和, 吴楠, 蒋云杰, 刘粤, 游薇, 王婷舒, 肖茵翠, 方芳, 刘鹏. 混合白腐真菌的固定化及其在治理铅污染废水中的应用[J]. 微生物学报, 2024, 64(1): 283-302.

MAO Xuanwen, LI Yiwen, JIANG Xiaoyu, WANG Yanhe, WU Nan, JIANG Yunjie, LIU Yue, YOU Wei, WANG Tingshu, XIAO Yincui, FANG Fang, LIU Peng. Immobilization of mixed white rot fungi and its application in the treatment of lead-contaminated wastewater[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(1): 283-302.

**摘要:**【目的】为缓解重金属废水污染对全球食品安全和人类健康的威胁,降低铅(plumbum, Pb)在土壤及动植物体内的积累,借助固定化技术提高菌株的重金属去除效率。【方法】以白腐真菌(white rot fungi)为实验材料,通过混菌兼容性及铅离子(Pb<sup>2+</sup>)去除能力筛选出吸附效果好且兼容性优的复合菌种,探究最优混菌类型及其比例,优化菌球最佳固定化助剂配方,在此基础上深入探究菌球在实际应用中的最优吸附条件。【结果】黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)、云芝(*Coriolus versicolor*)、凤尾菇(*Lentinus sajor-caju*)和平菇(*Pleurotus ostreatus*) 4种菌株兼容效果佳,可进行后续实验;其中云芝和凤尾菇以体积 1:1 混合后对 Pb<sup>2+</sup>去除效果显著优于各单菌作用;固定化条件优化实验中,20.0 g/L 海藻酸钠、15.0 g/L 生物炭和 2.0×10<sup>6</sup> 个/mL 白腐真菌组成混菌体系,辅以二氧化硅及沸石制得的固定化菌球在 96 h Pb<sup>2+</sup>去除率为 90.63%,且制得的固定化菌球机械强度高,耐受机械剪切力强;环境条件优化实验中,固定化菌球投加量为 8.35 g/L、pH 5.64 时,96 h Pb<sup>2+</sup>去除率可达 97.45%;本固定化菌球吸附-解吸-再吸附后可重复利用 7 次并保持高效 Pb<sup>2+</sup>去除能力。【结论】固定化白腐真菌混合菌株相较于传统的单菌处理方式能够显著提高微生物利用率及含铅废水处理效率,在适宜的条件下短时间内可极大程度吸附废水中的 Pb<sup>2+</sup>,减轻重金属污染物造成的环境生态威胁,因此将固定化白腐真菌混合菌株应用于重金属废水修复领域对推进环

资助项目: 国家自然科学基金(32001224, 41702181); 金华市科技计划公益项目(2022-4-049)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32001224, 41702181) and the Jinhua City Science and Technology Plan Public Welfare Project (2022-4-049).

\*Corresponding author. E-mail: sky79@zjnu.cn

Received: 2023-06-20; Accepted: 2023-08-29; Published online: 2023-09-01

境保护事业具有重要意义。

关键词：铅污染；白腐真菌；混菌固定化；胞外聚合物组分变化

## Immobilization of mixed white rot fungi and its application in the treatment of lead-contaminated wastewater

MAO Xuanwen, LI Yiwen, JIANG Xiaoyu, WANG Yanhe, WU Nan, JIANG Yunjie, LIU Yue, YOU Wei, WANG Tingshu, XIAO Yincui, FANG Fang, LIU Peng\*

Botany Laboratory, College of Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang, China

**Abstract:** [Objective] To mitigate the threat of heavy metal pollution in wastewater to global food safety and human health, reduce the accumulation of lead (Pb) in soil, plants, and animals, and improve the removal rate of heavy metals by immobilizing microbial strains. [Methods] We carried out mixed strain test to select the white rot fungal strains with strong  $Pb^{2+}$  removal effects and excellent compatibility and explored the optimal strains and ratio for combination. Furthermore, we optimized the formula of the fungal strain composite and explored the optimal adsorption conditions of the composite in application. [Results] *Phanerochaete chrysosporium*, *Coriolus versicolor*, *Lentinus sajor-caju*, and *Pleurotus ostreatus* with good compatibility were selected for subsequent experiments. *C. versicolor* mixed with *L. sajor-caju* at a volume ratio of 1:1 outperformed the single strains in removing  $Pb^{2+}$ . The fungal strain composite composed of 20.0 g/L sodium alginate, 15.0 g/L biochar,  $2.0 \times 10^6$  CFU/mL white rot fungi, silica, and zeolite showed the  $Pb^{2+}$  removal rate of 90.63% within 96 h. Moreover, this composite had higher mechanical strength and strong resistance to mechanical shear. At the addition amount of 8.35 g/L and pH 5.64, the composite demonstrated the  $Pb^{2+}$  removal rate of 97.45% within 96 h. Moreover, this composite can be reused 7 times after adsorption-desorption-readsorption and maintained high  $Pb^{2+}$  removal capacity. [Conclusion] The immobilized white rot fungal strain composite can significantly improve the microbial utilization rate and wastewater treatment efficiency compared with single strains. It can greatly adsorb  $Pb^{2+}$  in wastewater under appropriate conditions within a short time and reduce the environmental threat caused by heavy metal pollutants. Therefore, the promotion of environmental protection greatly benefits from the use of immobilized mixed white rot fungal strains in the treatment of heavy metal-contaminated wastewater.

**Keywords:** lead pollution; white rot fungi; immobilization of mixed fungi; component variations of extracellular polymeric substances

随着化工工业的持续发展,全国范围内的废水排放量逐年增加,其中,铅(plumbum, Pb)污染

情况尤为严重<sup>[1]</sup>。废水中的铅多以离子化合物状态存在,铅离子( $Pb^{2+}$ )被土壤吸收后不仅会加重

土壤的酸化程度, 而且经食物链传递后进入人体, 会产生腹泻、贫血等症状<sup>[2]</sup>, 此外由于生物无法代谢  $\text{Pb}^{2+}$ , 使其成为永久性重金属污染<sup>[3]</sup>。目前, 主要利用物理吸附技术、离子交换技术和微生物修复技术等进行含铅废水的处理<sup>[4]</sup>。其中物化修复技术具有操作简便、设备要求低等优点, 但易产生二次污染, 且难以处理痕量重金属废水。而微生物修复法因其具有经济性突出、处理效果佳及环境友好程度高等优势<sup>[5]</sup>, 在重金属废水治理中具有较大应用前景。

白腐真菌(white rot fungi)是一类可以降解和利用植物木质素, 引起木质腐烂的白色丝状真菌集合体<sup>[6]</sup>。研究发现, 白腐真菌具有独特的重金属吸附能力, 其主要吸附方式是通过产生胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)<sup>[7]</sup>, 利用其中携带的特殊官能团(羧基、磷酸基、硫酸酯基、氨基和酰胺基等)上电负性较大的原子与重金属离子在细胞表面形成络合物或螯合物, 而使废水中的重金属被吸附<sup>[8]</sup>。因此, 国内外现多利用白腐真菌与重金属的互作形式进行有机污水的治理, 但目前应用或研究的白腐真菌以单一菌株为主, 较少涉及多种白腐真菌复合处理废水的效果探究。此外, 在利用游离微生物处理废水的过程中, 常采取振荡、搅拌等措施以提高营养物质及氧气的传质效率, 但此过程中易产生机械剪切力, 致使微生物胞外酶失活和反应体系关闭, 从而影响其吸附性能<sup>[9]</sup>, 结合固定化载体能够有效提高菌体的稳定性和重复利用性。

固定化是利用特定的技术手段将游离微生物固定于载体限定的空间区域, 被认为是目前制备稳定高效的生物反应器的最有效的手段之一<sup>[10]</sup>。将真菌固定在复合载体上可以形成稳定的吸附剂, 具有一定的抗冲击负荷能力, 避免了真菌的流失和不稳定性带来的问题。同时, 固定化技术还能够提高吸附剂的机械强度和耐受性,

在有效保证菌体自然生长和运作的同时, 调控生物量在反应体系中的合理分布, 能够适应复杂的应用条件<sup>[11]</sup>。目前固定化方法以吸附法、交联法、包埋法为主, 其中包埋法因其条件温和、密度高、稳定性好和增殖速度较快, 是固定化的首选方法<sup>[12]</sup>。包埋法的固定效果主要由载体决定, 现有研究表明, 生物炭可通过其多孔性固定较多的微生物, 对其分泌的 EPS 具有聚合作用, 从而充分发挥基质中微生物的吸附能力<sup>[13]</sup>。海藻酸钠(sodium alginate, SA)则凭借其高传质性、强抗分解性的优势, 进一步提升菌球机械强度, 显著提高菌的存活率, 同时其表面携带基因对保持微生物的长时净水效果具有帮助<sup>[14]</sup>, 综合两者优势可最大程度发挥固定化效果。张晓晓<sup>[15]</sup>发现固定化技术虽然可减少外界环境对白腐真菌形态的影响, 但在一定程度上会减小菌种净水的有效面积, 从而影响其处理效果。因此, 为同时保持固定化菌球的活性与稳定性, 需要进一步探究 SA、生物炭的质量浓度与白腐真菌孢子量的最佳比例, 以及从多因素水平探寻制备固定化菌球最佳环境条件。基于以上背景, 本研究选取白腐真菌中重金属吸附能力较强的黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)、云芝(*Coriolus versicolor*)、凤尾菇(*Lentinus sajor-caju*)和平菇(*Pleurotus ostreatus*)作为目标菌株, 以  $\text{Pb}^{2+}$  去除率为最终指标, 探究最优净水混菌类型及其比例, 并优化固定化菌球最佳固定化配方, 致力于提高微生物的利用率以及含铅废水处理效率, 以期对重金属废水的治理及微生物资源化利用提供技术保障。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料和试剂

#### 1.1.1 菌株

凤尾菇(*Lentinus sajor-caju*) (50112)和云芝

(*Coriolus versicolor*) (14001)购自中国工业微生物菌种保藏管理中心(China Center of Industrial Culture Collection, CICC), 黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*) (CCTCC AF 96007)和平菇(*Pleurotus ostreatus*) (CCTCC HF 2008087)购自中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection, CCTCC)。

### 1.1.2 主要试剂

菌种活化培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基购自广东环凯微生物科技有限公司; 马铃薯葡萄糖肉汤(potato dextrose broth, PDB)培养基购自北京索莱宝科技有限公司; 聚乙烯醇、SA、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 饱和硼酸溶液及其他生化试剂均为分析纯或生化试剂,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 为优级纯, 均购自国药集团。

## 1.2 仪器和设备

UV3000紫外可见分光光度计购自上海精科实业有限公司; JIDI-17D 微量高速离心机购自广州吉迪仪器有限公司; 有机元素分析仪购自大昌洋行(上海)有限公司; 电镜扫描结果来自上海国检浦东检测技术有限公司。

## 1.3 菌液的制备

用无菌吸管吸取 0.3–0.4 mL 的 PDA 液体培养基, 滴入含有 *Phanerochaete chrysosporium*、*Coriolus versicolor*、*Lentinus sajor-caju* 和 *Pleurotus ostreatus* 的 4 个菌种管内培养 12 h (150 r/min, 30 °C), 以 5.00% 的接种量接种于 PDB 培养基继续培养(160 r/min, 35 °C)。

单一菌株菌液: 用分光光度计在 600 nm 下测定菌液的 OD 值, 待  $\text{OD}_{600}$  为 0.5 后取菌液于 4 °C、8 000 r/min 条件下离心 10 min, 弃上清, 取下层沉淀稀释于 10 mL 无菌水中, 即为待试菌液。

混合菌株菌液: 将待试菌株浅层静置培养 7 d,

基于前期实验结果, 按最佳混菌比例取一定体积的白腐真菌单一菌株菌液, 形成混合菌株悬液, 后续操作同上。

## 1.4 重金属铅污染模拟废水的配制及 $\text{Pb}^{2+}$ 浓度测定

准确称取 1.598 5 g 优级纯  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  于烧杯中, 加 5.00% (体积分数)  $\text{HNO}_3$  溶解后, 移入 1 000 mL 容量瓶中, 稀释至刻度, 摇匀, 即制得 1 000 mg/L 的  $\text{Pb}^{2+}$  标准储备溶液, 贮存于棕色容量瓶中 4 °C 下避光保存<sup>[10]</sup>。

$\text{Pb}^{2+}$  浓度测定: 取 1 000 mg/L  $\text{Pb}^{2+}$  储备液, 用硝酸溶液(取 1 mL 分析纯硝酸沿壁缓慢加入 499 mL 超纯水中)稀释为 5 mg/L, 调 pH 值为 6, 即得待试  $\text{Pb}^{2+}$  模拟废水。将上述菌球分别置于装有 100 mL 模拟废水的三角锥形瓶中, 并置于 37 °C、150 r/min 的恒温振荡培养箱中, 于第 0、12、24、36、48、72、96、120、144 h 取 2 mL 的模拟废水, 置于离心机中离心 10 min, 取上清液并通过分光光度计测定 448 nm 下的 OD 值, 根据标准曲线计算出  $\text{Pb}^{2+}$  浓度。

$\text{Pb}^{2+}$  的去除率采用公式(1)计算。

$$W(\%) = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100 \quad (1)$$

式中,  $W$  为  $\text{Pb}^{2+}$  去除率, %;  $C_0$  为  $\text{Pb}^{2+}$  初始浓度, mg/L;  $C$  为  $\text{Pb}^{2+}$  最终浓度, mg/L。

## 1.5 单菌生长及单一菌株对重金属 $\text{Pb}^{2+}$ 吸附能力测定

取保存的不同白腐真菌菌液接种至灭菌且含 5 mg/L  $\text{Pb}^{2+}$  的 PDB 平板上<sup>[16]</sup>, 置于 28 °C、150 r/min 的培养箱中避光培养 120 h。于第 0、12、24、48、72、96、120 小时通过观察菌落面积测定菌株生长情况。

将 4 株菌以菌悬液的形式分别接入  $\text{Pb}^{2+}$  模

拟废水中(取 5 mg/L  $Pb^{2+}$  模拟废水 100 mL, 置于 250 mL 锥形瓶中), 每瓶接种 2 mL 菌悬液, 接种后置于 35 °C、自然 pH 下浅层静置处理 120 h, 并测定  $Pb^{2+}$  去除率(同上)。

### 1.6 混菌兼容性实验及最佳混菌比例筛选

混菌兼容实验: 取保存的 4 种白腐真菌菌液逐个接种至含 5 mg/L  $Pb^{2+}$  的 PDB 平板上, 各菌之间间隔 3 cm。在平板中滴加 0.5 mol/L 的 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐, 28 °C、150 r/min 避光培养 120 h, 于第 0、12、24、48、72、96、120 小时用十字交叉法<sup>[17]</sup>测量菌丝生长圈直径得出菌种兼容情况。

混合菌株筛选: 以上述可兼容菌株间的混合比例为自变量, 取 2 mL 不同菌种混合后的菌悬液, 分别接入 5 mg/L  $Pb^{2+}$  模拟废水中, 置于 35 °C、自然 pH 下浅层静置处理 96 h, 测定  $Pb^{2+}$  去除率(同上)。以  $Pb^{2+}$  去除率为实验指标, 探究具有最佳吸附  $Pb^{2+}$  能力的复合菌株。

最佳混菌比例筛选: 基于混合菌株筛选结果, 选取吸附  $Pb^{2+}$  能力强的复合菌株, 设置混菌比例(菌株体积比), 并将混合菌株接种至 5 mg/L  $Pb^{2+}$  模拟废水中, 于第 0、12、24、36、48、60、72、84、96 小时测定  $Pb^{2+}$  去除率, 测定方法同上。

### 1.7 固定化小球的制备

参考文献[18]的方法, 稍作修改。准确称取 SA 和生物炭于 80 °C 溶于 100 mL 无菌水, 115 °C 灭菌 15 min, 冷却至室温, 保存备用。将白腐真菌悬液( $OD_{600}=5.0$ )和 SA-生物炭溶液以相对应的比例混合, 用直径为 4 mm 的无菌制球器吸取混合液, 在距液面 10 cm 高度处, 将混合物匀速逐滴滴入  $CaCl_2$  溶液中(滴加过程在磁力搅拌器上完成), 形成凝胶珠, 固化 30 min, 无菌去离子水洗去凝胶珠表面的  $CaCl_2$ , 4 °C 冰箱储存备用。

### 1.8 固定化小球的物理性能测定、元素分析及电镜观察

采用平板计数法、浸液法、亚甲基蓝染料法<sup>[19]</sup>测定固定化小球载菌量、真密度、堆积密度和比表面积性质等表观参数。

机械强度测定: 制作并沥干后取出大小形状相近的 5 粒, 置于天平上用载玻片慢慢按压固定化菌球, 观察菌球变形直至不能恢复为止, 读出此时最大质量  $M_i$ , 根据公式(2)测量菌球平均机械强度。

$$\bar{M} = M_i / 5 \quad (2)$$

元素分析: 参考文献[20]的方法, 利用元素分析仪测定固定化菌球 C、H、O、N 元素含量并在电镜下观察菌球表面形态。

### 1.9 固定化菌球制作配方及其条件的选择

制作成分的选择: 采用正交实验, 配制海藻酸钠浓度分别为 15.0、20.0 和 25.0 g/L, 生物炭浓度为 10.0、15.0 和 20.0 g/L, 白腐真菌孢子量为  $1.5 \times 10^6$ 、 $2.0 \times 10^6$  和  $2.5 \times 10^6$  个/mL 的固定化白腐真菌小球, 共 27 组。分别测定其  $Pb^{2+}$  去除率以探究制作固定化菌球各组分的最佳使用量。

制作条件的选择: 利用 SA 与生物炭固定化白腐真菌, 基于预实验的基础上设定交联时间(0.5、1、2、3 和 4 h)、保存方法(冷冻保存、 $NaH_2PO_4$  饱和硼酸溶液保存、湿体冷藏环境保存、5 mg/L 模拟  $Pb^{2+}$  污染废水中冷藏保存), 并添加二氧化硅( $SiO_2$ )和改性沸石。对不同固定化处理的菌球机械强度与  $Pb^{2+}$  去除率进行测定, 方法同上。

### 1.10 响应面优化固定化菌球最佳环境条件

基于上述实验设计测得的最佳固定化条件, 共设计三因素三水平 15 组试验。自变量包括固定化菌球投加量(a: 1.0、2.5、4.0、8.0、12.0、16.0 g/L)、初始废水中  $Pb^{2+}$  浓度(b: 0、25、50、75、100 mg/L)、环境 pH(c: 3、4、5、6、7) 3 个因素。使用 0.1 mol/L  $HNO_3$  和 0.1 mol/L

NaOH 调节模拟废水的不同 pH 值, 以 96 h  $\text{Pb}^{2+}$  去除率为响应值, 进行响应面分析实验<sup>[21]</sup>, 从而探究菌球发挥最佳吸附效果时的环境条件。 $\text{Pb}^{2+}$  去除率测定方法同上。

### 1.11 固定化菌球的 EPS 产量及吸附性能

基于上述实验结果, 设置  $\text{Pb}^{2+}$  浓度梯度为 0、25、50、75、100 mg/L, 探究不同程度  $\text{Pb}^{2+}$  污染废水对固定化菌球的 EPS 产量与吸附性能的影响。利用蒽酮比色法<sup>[22]</sup>、Lowry 法<sup>[23]</sup>测定固定化菌球中多糖与蛋白质质量; EPS 产量与多糖、蛋白质质量之间的转换关系根据以下公式(3)得到; 单位 EPS 吸附性能与  $\text{Pb}^{2+}$  去除率、菌球 EPS 总产量的转换关系根据以下公式(4)得到。

$$P = m_1/m_2 \quad (3)$$

$$q = R_t/P_t \quad (4)$$

式中,  $P$  为固定化菌球的 EPS 产量(product, mg/g),  $P_t$  为固定化菌球的总 EPS 产量(total product, mg/g);  $m_1$  为固定化菌球中多糖与蛋白质质量之和(mass, mg),  $m_2$  为固定化菌球的干重(mass, g);  $q$  代表每单位质量 EPS 的  $\text{Pb}^{2+}$  去除率(%);  $R_t$  代表废水中的总  $\text{Pb}^{2+}$  去除率(total removal rate, %)。

### 1.12 傅里叶变换红外光谱分析

为确定固定化菌球吸附  $\text{Pb}^{2+}$  的主要官能团种类, 利用傅里叶变换红外光谱仪定性分析菌球吸附反应前后官能团的变化。取 20 mg 烘干的固定化菌球于研钵中, 加入 2 g 溴化钾(KBr), 研磨后转移至模具中压制为均匀的錠片, 在样品室中于相同条件下用傅里叶变换红外光谱仪测定红外光谱<sup>[24]</sup>, 光谱范围为 400–4 000  $\text{cm}^{-1}$ 。

### 1.13 游离化白腐真菌及固定化菌球重复使用性实验

使用直径 1 cm 的无菌打孔器制作 5 片菌饼, 放入盛有 50 mg/L  $\text{Pb}^{2+}$  模拟废水的 250 mL

锥形瓶中, 于 35 °C 自然 pH 下浅层静置 96 h 后测定  $\text{Pb}^{2+}$  浓度。吸附完成后, 将吸附后的白腐真菌滤出, 反复冲洗直至冲洗完全, 后将其加入到盛有 50 mL 500 mg/L  $\text{HNO}_3$  的锥形瓶中, 于 35 °C、200 r/min 的恒温振荡培养箱内解吸 2 h<sup>[25]</sup>, 测定解吸液中的  $\text{Pb}^{2+}$ 。

测定固定化菌球 96 h  $\text{Pb}^{2+}$  吸附量(同上)。待吸附完成后, 取出并擦干固定化菌球, 加入到盛有 50 mL 500 mg/L  $\text{HNO}_3$  的锥形瓶中, 于 35 °C、200 r/min 的恒温振荡培养箱内解吸 2 h<sup>[26]</sup>, 测定解吸液中的  $\text{Pb}^{2+}$  浓度, 之后用超纯水清洗上述小球若干次, 再转移到含有 100 mL 50 mg/L  $\text{Pb}^{2+}$  的溶液中进行吸附。重复进行 10 次, 比较多次吸附-解吸-再吸附后固定化菌球对  $\text{Pb}^{2+}$  去除效果。

### 1.14 数据处理

所有数据采用 Excel 2022 进行统计整理, 使用 SPSS 26.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA), Duncan 法进行多重比较( $\alpha=0.05$ ), Design-Expert 8.0 软件设计响应面优化实验, Omnic 9.0 分析红外光谱图。Origin 2021 软件进行作图, 所有数据以平均值±标准误差表示。每个指标测定均设定 3 次平行。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株筛选

#### 2.1.1 单菌 $\text{Pb}^{2+}$ 吸附能力即 $\text{Pb}^{2+}$ 去除率测定

如图 1 所示, 4 种菌对  $\text{Pb}^{2+}$  的吸附过程均出现较快的吸附过程, 随后吸附效率相对持平。在相同时间内黄孢原毛平革菌对  $\text{Pb}^{2+}$  的吸附作用最强, 在 96 h 可达到 36.52% (图 1A), 凤尾菇对  $\text{Pb}^{2+}$  的吸附速率最快, 在 36 h 即可达到峰值并维持在相对稳定状态(图 1B)。结合不同浓度、不同时间条件下的预实验, 推测在高浓度、长时间的吸附过程中, 菌体表面吸附的  $\text{Pb}^{2+}$  易出现解吸现象, 且解吸率与种类、时间、浓度等因素有关。

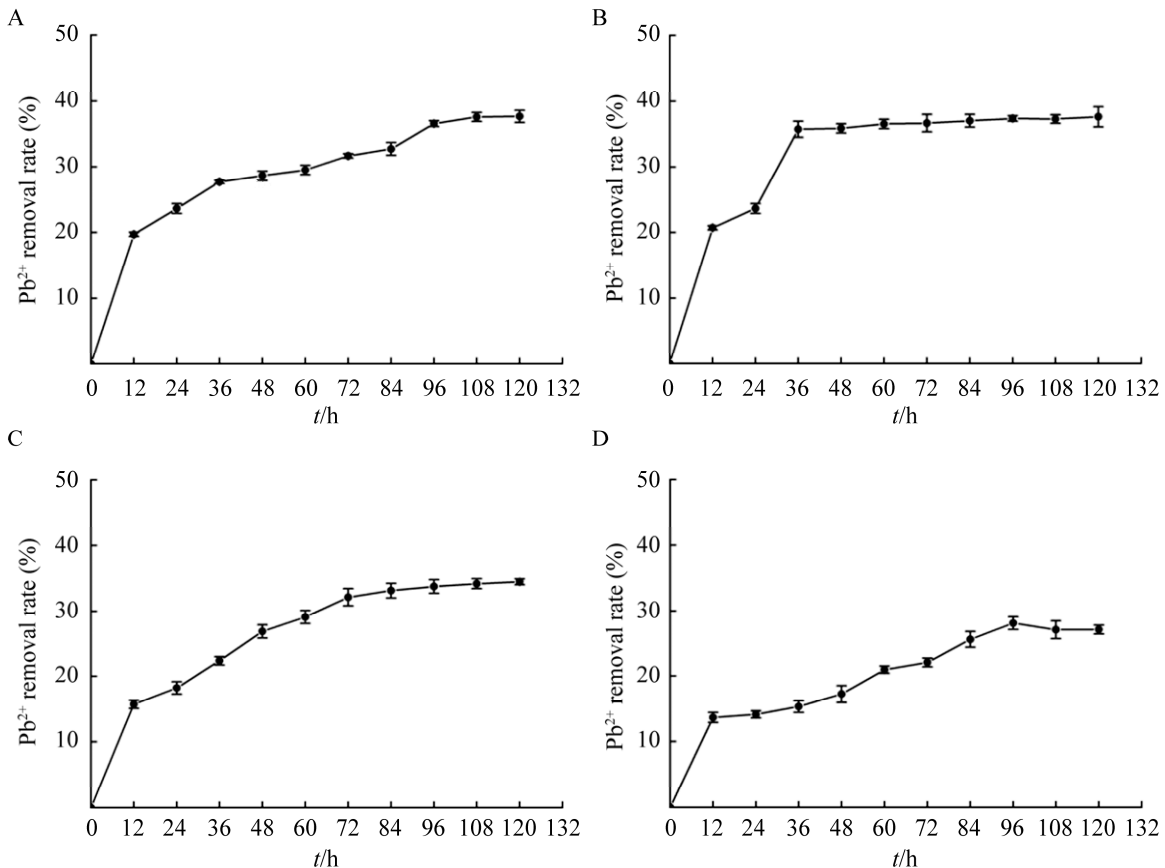


图 1 四种白腐真菌  $Pb^{2+}$  去除率随时间变化情况

Figure 1 Variation of  $Pb^{2+}$  removal rate by four species of white-rot fungus with time. A: *Phanerochaete chrysosporium*. B: *Lentinus sajor-caju*. C: *Coriolus versicolor*. D: *Pleurotus ostreatus*. Error bars in figures represent standard deviation.

### 2.1.2 混菌兼容性实验

通过共同培养 4 种白腐真菌探究各菌种之间的兼容性, 由图 2 可见 4 种菌均未出现明显的抑制作用, 即未出现透明的抑菌圈, 说明 4 种菌株之间混合长势良好, 满足混菌发酵的条件。此外, 从生长状况来看, 4 种菌株生长态势相当, 均能正常生长且对营养物质消耗多, 生长速度较快。

### 2.1.3 筛选吸附 $Pb^{2+}$ 的最佳混合菌株

结果表明(表 1), 混菌对  $Pb^{2+}$  去除率要明显高于单菌对  $Pb^{2+}$  的去除率。当黄孢原毛平革菌、平菇在混菌体系中体积占比越大, 混菌对  $Pb^{2+}$  去除率越低; 云芝、凤尾菇体积占比提高,  $Pb^{2+}$  去除率先升高后降低, 其中当云芝与凤尾菇体

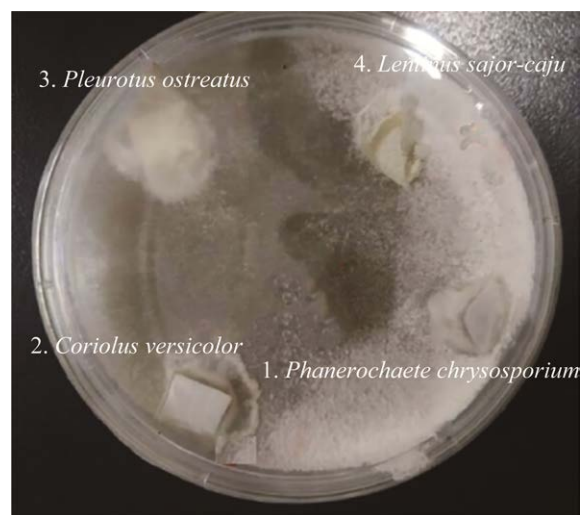


图 2 混菌平板兼容性试验结果

Figure 2 Compatibility test results of mixed white-rot fungus plate.

积比为 1:1 时,  $Pb^{2+}$  去除率最高, 为 48.23%。由此可见, 黄孢原毛平革菌与平菇在吸附  $Pb^{2+}$  存在拮抗作用, 凤尾菇和云芝的协同作用较强, 对  $Pb^{2+}$  去除率的促进效果显著, 可选为后续实验的混菌菌种。

#### 2.1.4 筛选混合菌株的最佳体积比例

基于上述结果, 进一步探究并验证云芝与凤尾菇促进  $Pb^{2+}$  去除率的最优体积比例, 设置混菌

体积比例(云芝:凤尾菇)为 1:3、1:2、1:1、2:1、3:1, 结果如表 2 所示。在混菌体积比例为 1:1 条件下, 各时间点废水中的  $Pb^{2+}$  去除率均高于其余组别, 其中 96 h 时模拟废水中  $Pb^{2+}$  的去除率可达到 46.80%, 相较于同时间段其余混菌组平均增长 10.25%, 可见该比例有利于发挥净化效果。

综上, 吸附  $Pb^{2+}$  的最优混菌菌种为云芝与凤尾菇, 最佳比例为云芝:凤尾菇为 1:1 (体积比)。

表 1 四种白腐真菌在混菌体系中不同体积比例的 96 h  $Pb^{2+}$  去除率

Table 1  $Pb^{2+}$  removal rate of four species of white-rot fungi in mixed fungal systems at 96 h

Experimental No.	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	<i>Coriolus versicolor</i>	<i>Lentinus sajor-caju</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>	$Pb^{2+}$ removal rate (%)
1	0.250	0.250	0.250	0.250	29.37±0.15
2	0.125	0.625	0.125	0.125	35.83±0.67
3	0.125	0.125	0.625	0.125	32.89±0.89
4	0.125	0.125	0.125	0.625	27.10±0.21
5	0.625	0.125	0.125	0.125	21.92±0.37
6	1.000	0.000	0.000	0.000	36.12±0.09
7	0.000	1.000	0.000	0.000	39.23±0.17
8	0.000	0.000	1.000	0.000	37.29±0.23
9	0.000	0.000	0.000	1.000	28.39±0.81
10	0.500	0.500	0.000	0.000	32.26±0.34
11	0.500	0.000	0.500	0.000	34.33±0.14
12	0.500	0.000	0.000	0.500	18.81±0.26
13	0.000	0.500	0.500	0.000	48.23±0.31
14	0.000	0.500	0.000	0.500	33.94±0.42
15	0.000	0.000	0.500	0.500	30.21±0.10

表 2 混菌(云芝:凤尾菇)不同体积比例下废水中  $Pb^{2+}$  去除率随时间的变化

Table 2 The change of  $Pb^{2+}$  removal rate in wastewater with time for different volume ratios of mixed white-rot fungus (*Coriolus versicolor*:*Lentinus sajor-caju*)

Volume ratios	Removal rate (%)							
	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h	84 h	96 h
1:3	13.19±0.66d	16.33±0.48c	21.50±0.35b	26.71±0.33c	30.80±0.32c	35.34±0.32c	36.11±0.36c	37.20±0.43c
1:2	11.52±0.96c	17.63±0.58c	25.10±0.24a	29.89±0.53b	33.41±0.28b	36.00±0.38c	38.16±0.74b	38.54±0.09b
1:1	23.14±0.04a	24.92±0.72a	25.32±0.44a	31.60±0.20a	38.17±0.08a	41.51±0.88a	43.42±0.94a	46.80±0.22a
2:1	17.38±0.66b	19.17±0.98b	22.27±0.55b	27.00±0.58c	31.92±0.78c	37.81±0.18b	38.91±0.44b	39.20±0.58b
3:1	6.33±0.24e	9.51±0.32d	12.71±0.21c	16.77±0.61d	21.31±0.82d	27.54±0.12d	30.79±0.76d	31.34±0.29d

Different lower case letters indicate significant differences between different treatment groups for the same period ( $P<0.05$ ).



## 2.2 固定化菌球的制备

### 2.2.1 固定化配方中主要成分浓度的确定

为考察 SA、生物炭、包埋菌量 3 种成分对固定化菌球吸附  $\text{Pb}^{2+}$  效果的影响, 明确固定化菌球的最佳制备条件, 选取  $\text{Pb}^{2+}$  去除率作为目标值进行正交试验。对比各因素所对应的  $R$  值(表 3), 3 种因素对固定化混菌小球性能的作用按其影响大小排序为: SA 质量浓度 > 白腐真菌孢子量 > 生物炭质量浓度。由表 3 可知, 随着 SA 质量浓度的升高, 成球效果及  $\text{Pb}^{2+}$  的去除率均有所上升, 但当 SA 质量浓度超过 20.0 g/L, 使用过程中易发生尾部断裂现象。此外, 当生物炭浓度超过 15.0 g/L 后, 狭小的内部空间对菌球的  $\text{Pb}^{2+}$  去除率有所抑制, 同时较大的投入菌量会使白腐真菌生长密度过高, 也会导致吸附效果的下降。

综上, 固定化最佳配方中主要成分浓度为: SA 质量浓度 20.0 g/L、生物炭质量浓度 15.0 g/L、白腐真菌孢子量  $2.0 \times 10^6$  个/mL, 在此基础上制得的固定化菌球在 96 h  $\text{Pb}^{2+}$  去除率高

达 90.63%, 显著优于未经固定的混菌, 证明该固定化条件能够有效促进菌球的  $\text{Pb}^{2+}$  吸附能力。

### 2.2.2 固定化配方次要成分及制作条件的选择

固定化配方次要成分与制作条件对固定化菌球机械强度和  $\text{Pb}^{2+}$  去除率具有显著影响(表 4)。结果显示, 若交联时间过短, 会导致小球机械强度差, 易破碎; 若交联时间过长, 会导致包埋菌的活力降低。其次, 选择 0.2 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  的饱和硼酸溶液作为交联剂可使制备的载体更易成型, 在强化菌球机械强度的同时, 进一步提升了其传质性能。此外, 在交联过程中加入  $\text{SiO}_2$  和改性沸石, 可明显提高菌球机械强度和  $\text{Pb}^{2+}$  去除率。

在上述条件下, 5 mg/L  $\text{Pb}^{2+}$  模拟废水冷藏、交联时间 1 h 时, 固定化菌球吸附  $\text{Pb}^{2+}$  性能,  $\text{Pb}^{2+}$  去除率达 93.32%, 且具有极高稳定性, 在实际应用中此固定化菌球在持续作用 96 h 后, 仍保持菌球性状与工作效率的稳定。以上证明, 本固定化菌球的制作配方可进一步提高菌球稳定性, 加强  $\text{Pb}^{2+}$  去除效果。

表 3 固定化白腐真菌的混菌正交实验( $3^3$ )因素水平

Table 3 The orthogonal experiment ( $3^3$ ) factor level for immobilized mixed white-rot fungus

Experimental No./Factors	SA mass concentration (g/L)	Biochar mass concentration (g/L)	White rot fungus spore volume ( $\times 10^6$ CFU/mL)	96 h $\text{Pb}^{2+}$ removal rate (%)
1	15.0	10.0	1.5	86.65 $\pm$ 0.16b
2	15.0	15.0	2.0	90.42 $\pm$ 0.35a
3	15.0	20.0	2.5	83.07 $\pm$ 0.01c
4	20.0	10.0	2.5	90.54 $\pm$ 0.56a
5	20.0	15.0	2.0	90.63 $\pm$ 0.74a
6	20.0	20.0	1.5	89.59 $\pm$ 0.21b
7	25.0	10.0	2.5	84.21 $\pm$ 1.47c
8	25.0	15.0	1.5	86.99 $\pm$ 0.83b
9	25.0	20.0	2.0	87.29 $\pm$ 0.82a
$\bar{k}_1/\%$	80.34	86.39	85.66	/
$\bar{k}_2/\%$	85.34	88.14	89.98	/
$\bar{k}_3/\%$	79.16	84.73	86.61	/
$R/\%$	6.18	3.41	4.32	/

$\bar{k}_1$  means  $\text{Pb}^{2+}$  removal rate of SA at different factor levels;  $\bar{k}_2$  means  $\text{Pb}^{2+}$  removal rate of white-rot fungus at different factor levels;  $\bar{k}_3$  means  $\text{Pb}^{2+}$  removal rate of biochar at different factor levels.  $R$  means measures of variation by  $\bar{k}_1$ ,  $\bar{k}_2$  and  $\bar{k}_3$ . The larger the  $R$ , the more effect of a change of that factor on the indicator for that experiment, means the more important the factor is; Conversely, the smaller the  $R$ , the less important the factor. Different lower case letters indicate significant differences between different treatment groups for the same period ( $P < 0.05$ ). /: No data (except “/” in parentheses).

表 4 固定化菌球其余制作配方及制作条件的选择

Table 4 Selection of the remaining recipes and conditions for the production of immobilized bacteriophages

Projects	Specific treatments	Mechanical strengths (mN)	96 h Pb <sup>2+</sup> removal rate (%)
Crosslinking time	0.5 h	1 531±47.49e	90.45±1.77b
	1 h	1 944±64.40d	93.32±0.55a
	2 h	2 024±44.92c	89.85±1.59b
	3 h	2 103±85.02b	75.55±1.62c
	4 h	2 388±41.54a	73.33±2.15d
Storage methods	Freezing	2 054±64.23d	80.67±0.51c
	0.2 mol/L NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in saturated boric acid	2 411±45.41b	83.54±1.03b
	Humid and refrigeration	2 326±06.43c	84.34±1.27b
	Refrigeration in 5 mg/L Pb <sup>2+</sup> wastewater	2 513±56.65a	91.44±1.35a
SiO <sub>2</sub> and zeolite addition	Without SiO <sub>2</sub> and modified zeolite	2 294±31.46c	71.50±2.96c
	No SiO <sub>2</sub> added, 5 g modified zeolite	2 321±36.32b	84.65±1.79b
	10 g SiO <sub>2</sub> added, no modified zeolite	2 362±42.68a	85.65±0.47b
	10 g SiO <sub>2</sub> added, 5 g modified zeolite	2 376±12.54a	92.12±1.68a

Different lower case letters indicate significant differences between different treatment groups for the same period ( $P < 0.05$ ).

### 2.2.3 固定化菌球表观测定及其电镜扫描与元素分析

由表 5 可知, 基于上述固定化配方制作的固定化菌球各项物理指标测试均表现优异, 弹性、成球性较好, 机械强度高, 既能承载足量白腐真菌, 又拥有优良的亲水性与传质性。由图 3A 可见小球成球性良好、弹性强, 形态均匀且无粘连、拖尾现象, 粒径约 3–4 mm。将固定化菌球置于扫描电镜下, 可见固定化菌球外被 SA 凝膜, 内部 SA 与混菌菌丝相互交织, 生物炭紧密结合其中(图 3B)。由此证明, 3 种因子共同发挥效用, 使得固定化菌球性能达到最优。

采用元素分析仪对固定化菌球的生物炭进行元素分析, 包括原生生物炭(biochar, BC)、含海藻酸钠的生物炭(biochar-sodium alginate, MB-SA)、含饱和硼酸溶液的生物炭(biochar-saturated boric acid, MB-Bas)、含二氧化硅的生物炭(biochar-SiO<sub>2</sub>, MB-SiO<sub>2</sub>), 相关元素组成变化见表 6。与 BC 相比, MB-SA、MB-Bas、MB-SiO<sub>2</sub> 的 C, N 含量、H/C、O/C 与(N+O)/C 等参数均有不同程度的降低, 代表处理后的菌球生物炭极性降低, 稳定性升高。综上所述, 添加 SA、饱和硼酸及

SiO<sub>2</sub> 均有利于提高生物炭的稳定性, 进一步证明了本固定化菌球最佳制作配方的可行性。

## 2.3 固定化对白腐真菌重金属吸附能力的影响

### 2.3.1 Pb<sup>2+</sup>胁迫下固定化菌球的 EPS 产量

低浓度 Pb<sup>2+</sup> 会促进白腐真菌产生 EPS (图 4), 各组 EPS 产量在胁迫初期迅速上升, 并于 96 h 时达到峰值后开始有所下降, 其中 50 mg/L Pb<sup>2+</sup> 处理时 EPS 产量达到峰值后维持稳定且该组各时间段 EPS 产量均明显高于其他浓度胁迫组别; 而 100 mg/L Pb<sup>2+</sup> 条件下, EPS 产量显著

表 5 固定化菌球表征参数

Table 5 Characterisation parameters of immobilized bacteriophages

Indicators	Results
Load capacity (CFU/mL)	(5.48±0.02)×10 <sup>6</sup>
True density (g/L)	1.376±0.013
Bulk density (g/L)	0.782±0.001
Water content multiplication (%)	52.40±2.46
Water content (%)	1.10±0.04
Specific surface area (m <sup>2</sup> /g)	332.89±4.23
Diameter(cm)	0.413±0.028
Broken ratio (%)	39.71±1.24
Transmissibility (%)	79.44±3.09

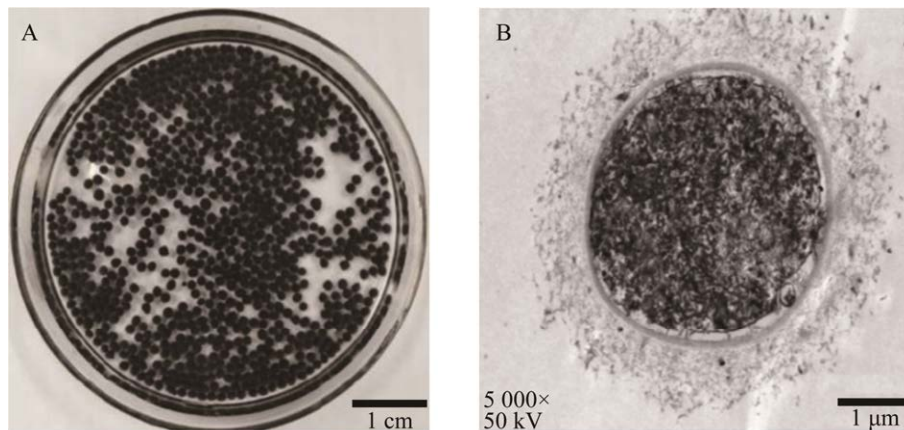


图3 固定化菌球滤出图(A)及其放大结构电镜图(B)

Figure 3 Filter-out diagram (A) and electron micrograph of the magnified structure (B) of immobilized bacteriophages.

表6 生物炭的元素组成

Table 6 The elemental composition of biochar

Item	C (%)	H (%)	N (%)	O (%)	H/C	O/C	(N+O)/C
BC	68.21	3.22	1.24	17.91	0.047	0.26	0.28
MB-SA	56.44	3.12	0.64	14.21	0.055	0.25	0.26
MB-Bas	45.58	2.18	0.77	9.45	0.049	0.21	0.22
MB-SiO <sub>2</sub>	43.20	2.25	0.79	11.76	0.052	0.27	0.29

BC means native biochar; MB-SA means biochar containing sodium alginate; MB-Bas means biochar containing saturated boric acid solution; MB-SiO<sub>2</sub> means biochar containing SiO<sub>2</sub>.

低于对照组(0 mg/L Pb<sup>2+</sup>)。由此可得, Pb<sup>2+</sup>在胁迫初期会促进EPS的分泌, 随着胁迫时间延长, Pb<sup>2+</sup>对EPS产量具有一定的抑制, 而50 mg/L Pb<sup>2+</sup>对固定化菌球分泌EPS具有持续正向促进作用。

### 2.3.2 Pb<sup>2+</sup>胁迫下单位质量EPS的吸附性能

如图5所示, 各处理组单位质量EPS的Pb<sup>2+</sup>去除率随处理时间的延长呈现先增后降的趋势, 前期增长速率较慢, 72 h时EPS的吸附性能显著增强, 并于120 h达到峰值。25 mg/L Pb<sup>2+</sup>处理组和50 mg/L Pb<sup>2+</sup>处理组的Pb<sup>2+</sup>去除率在各时间段均显著高于其他处理组, 其中50 mg/L Pb<sup>2+</sup>胁迫最有利于提高Pb<sup>2+</sup>去除率。而75 mg/L Pb<sup>2+</sup>和100 mg/L Pb<sup>2+</sup>则会抑制单位EPS对Pb<sup>2+</sup>的吸附能力。由此表明, 适宜浓度的Pb<sup>2+</sup>胁迫能够更好地发挥白腐真菌对Pb<sup>2+</sup>的吸附能力,

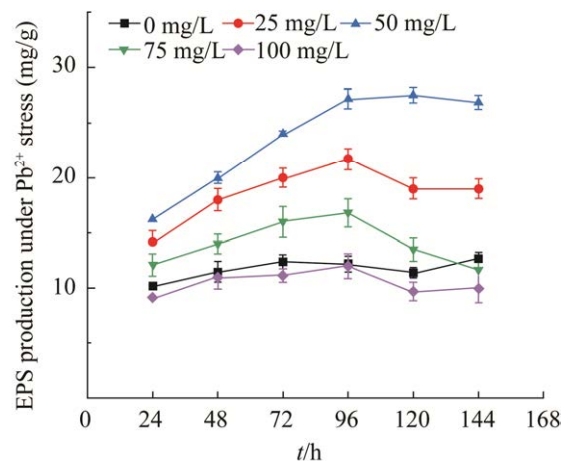


图4 Pb<sup>2+</sup>胁迫下固定化菌球的EPS产量

Figure 4 EPS production of immobilized bacteriophages under Pb<sup>2+</sup> stress. Error bars in figure represent standard deviation.

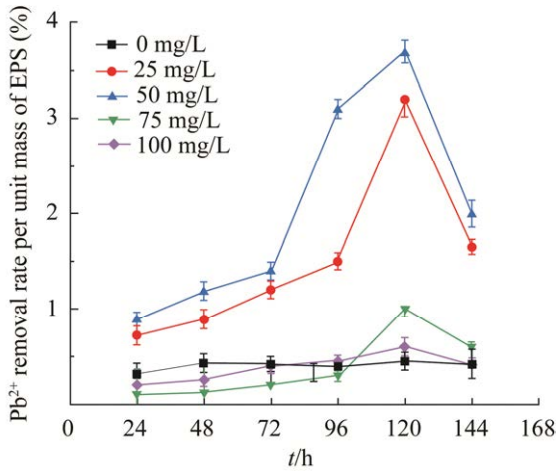


图 5  $Pb^{2+}$ 胁迫下固定化菌球单位质量 EPS 的  $Pb^{2+}$ 去除率

Figure 5  $Pb^{2+}$  removal rate per unit mass of EPS in immobilized bacteriophages under  $Pb^{2+}$  stress. Error bars in figure represent standard deviation.

减少废水中的  $Pb^{2+}$ 含量，从而提高含铅污水处理的效率。

### 2.3.3 傅里叶变换红外光谱分析

通过傅里叶变换红外光谱(图 6)分析鉴定吸附重金属铅离子前后的固定化混菌表面的官能团变化。由表 7 可知，官能团区  $3412\text{ cm}^{-1}$  (No. 2)附近为强极性基团-OH 伸缩振动峰，多来自羧酸、醇类、酚类等物质<sup>[27]</sup>，可为重金属离子进行离子交换提供  $H^+$ ， $1644\text{ cm}^{-1}$  (No. 6)处归属于酰胺的-C=O 不对称伸缩振动吸收峰， $1104\text{ cm}^{-1}$  (No. 8)左右为醇类、糖类或羧酸类-C-O 伸缩振动吸收峰。吸附  $Pb^{2+}$ 后，本固定化菌球-OH 的聚合度降低，-C=O 的伸缩振动峰从  $1644\text{ cm}^{-1}$  移动到  $1641\text{ cm}^{-1}$ ，醇类、糖类或羧酸类-C-O 伸缩振动吸收峰移动到  $1102\text{ cm}^{-1}$  处，表明在固定化菌球吸附重金属  $Pb^{2+}$ 的过程中在其表面的羟基、酰胺基、羧基等官能团起了重要的作用。

## 2.4 响应面优化固定化菌球吸附条件及优化条件验证

### 2.4.1 响应面优化固定化环境条件

以自变量为固定化菌球投加量(a)、 $Pb^{2+}$ 初

始浓度(b)和环境 pH (c)，响应值为 96 h 时  $Pb^{2+}$ 去除率进行响应面优化实验。由图 7 可知，在 3 种影响固定化菌球吸附  $Pb^{2+}$ 因素中，除图 7A、7D 呈现圆形外其余各图均呈现明显的椭圆形，曲率半径较大，表明  $Pb^{2+}$ 受菌球投加量和环境 pH 影响较大。此外，随着菌球投加量和 pH 的增加， $Pb^{2+}$ 去除率呈先升高后降低的趋势，结果表现为固定化菌球投加量  $8.35\text{ g/L}$ ， $Pb^{2+}$ 初始浓度  $41.36\text{ mg/L}$ ，pH 5.64 条件下 96 h  $Pb^{2+}$ 去除率最大，为 98.77% (图 7D-7F)。

### 2.4.2 最优条件下固定化菌球吸附 $Pb^{2+}$ 能力验证

将上述实验所得的最优混菌(云芝、凤尾菇)以 1:1 (体积比)混合，通过最佳固定化配方(SA 质量浓度  $20.0\text{ g/L}$ 、生物炭质量浓度  $15.0\text{ g/L}$ 、白腐真菌孢子量  $2.0 \times 10^6$  个/mL 和交联剂为  $0.2\text{ mol/L NaH}_2\text{PO}_4$  的饱和硼酸溶液)在最适制备条件 ( $5\text{ mg/L Pb}^{2+}$ 模拟废水冷藏、交联时间 1 h、交联过程加入  $\text{SiO}_2$  和改性沸石)下制作固定化菌球。设置环境条件为固定化菌球投加量  $8.35\text{ g/L}$ 、 $Pb^{2+}$ 初始浓度  $41.36\text{ mg/L}$ 、pH 5.64 下进行  $Pb^{2+}$ 去除实验，测定不同时间下的  $Pb^{2+}$ 去除率，以验证优

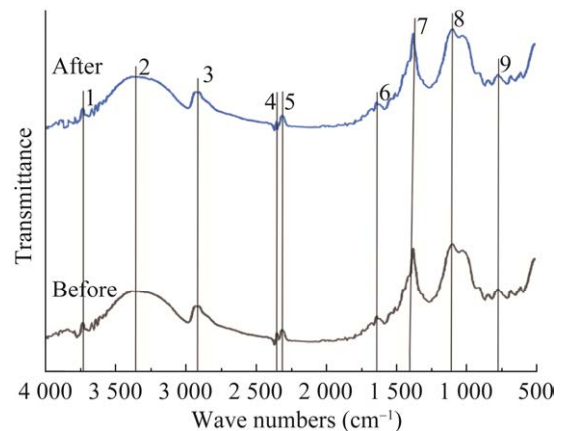


图 6 固定化菌球吸附  $Pb^{2+}$ 前后的傅里叶红外光谱图

Figure 6 The FTIR spectra of IMFA before and after biosorption of  $Pb^{2+}$ . 1 to 9 indicates the characteristic absorption peaks of different functional groups.

表 7 固定化菌球吸附  $Pb^{2+}$  前后的 FTIR 特征峰变化情况

Table 7 FTIR spectra variations of IMFA before and after biosorption of  $Pb^{2+}$

Experimental No.	Before biosorption ( $cm^{-1}$ )	After biosorption ( $cm^{-1}$ )	Types of functional groups
1	3 735	–	$-NH_2$
2	3 412	3 401	$-OH$
3	2 938	–	$-CH_2$
4	2 360	2 356	$-PH$
5	2 325	2 319	$-PH$
6	1 644	1 641	$-C=O$
7	1 376	–	$-CH_3$
8	1 104	1 102	$-C-O$
9	616	–	Metal-O

Number 1–9 indicates the characteristic absorption peaks of different functional group; – means not observed.

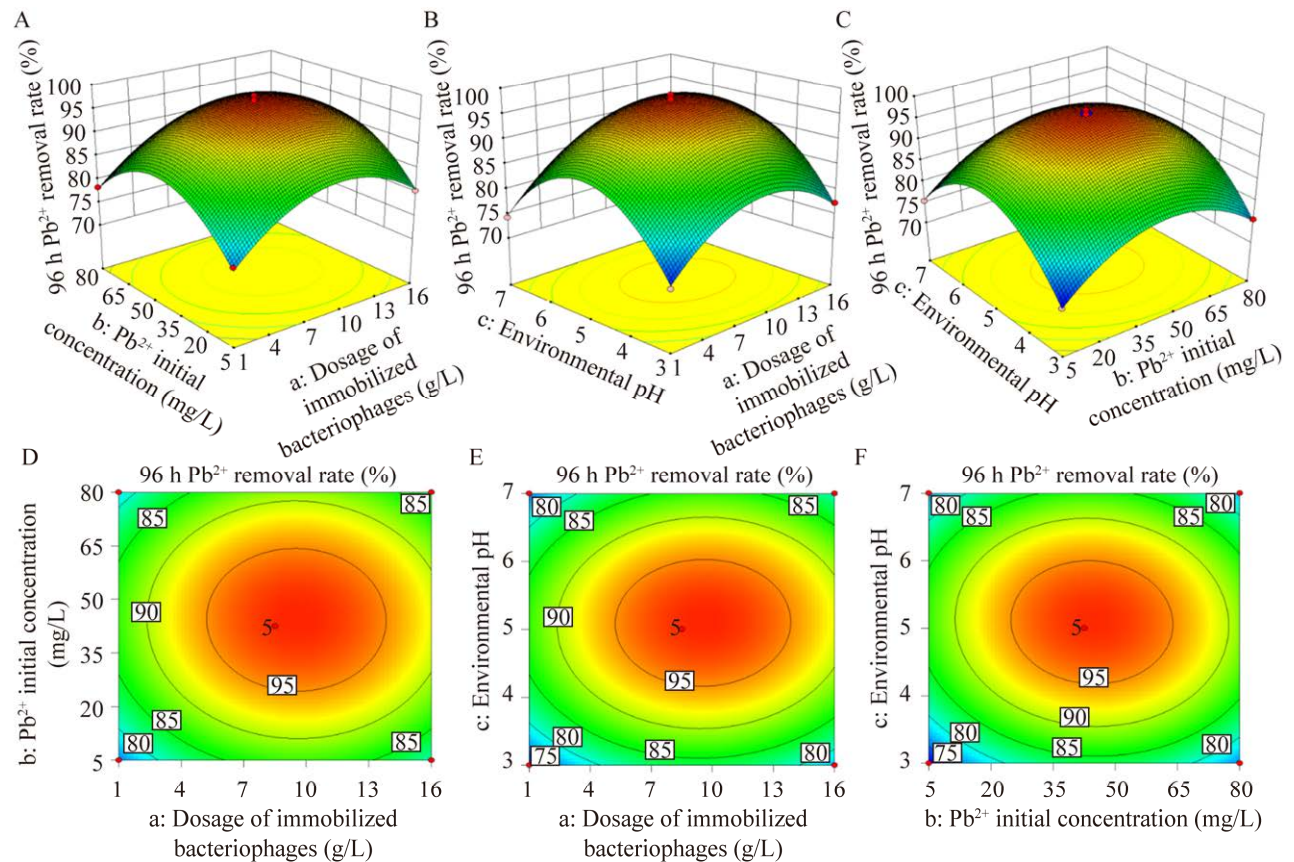


图 7 固定化菌球处理条件响应面优化曲线图及等高线图

Figure 7 Response surface optimisation graphs and contour plots for removal conditions of immobilized bacteriophages. A: The removal rate graph for a, b interaction. B: The removal rate graph for a, c interaction. C: The removal rate graph for b, c interaction. D: The contour plot of removal rates for a, b interaction. E: The contour plot of removal rates for a, c interaction. F: The contour plot of removal rates for b, c interaction.

化条件在实际应用中的可行性。结果如图 8 所示，可知，随着处理时间的延长，废水中的  $Pb^{2+}$  去除率迅速升高，于 96 h 达到最佳处理效果 ( $Pb^{2+}$  去除率为 97.45%) 后趋于稳定，即固定化白腐真菌混菌小球的  $Pb^{2+}$  吸附效果随时间上升且具备高效处理含  $Pb^{2+}$  废水能力。

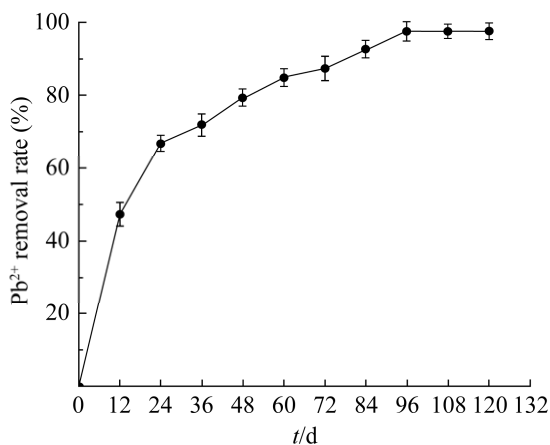


图 8 最优条件下不同时间内固定化菌球的  $Pb^{2+}$  去除率

Figure 8  $Pb^{2+}$  removal rate of immobilized bacteriophages at different times under optimal conditions. Error bars in figure represent standard deviation.

### 2.4.3 固定化与游离化菌球的重复利用对比

为考察固定化菌球的实际应用效果，进行解吸-再利用实验。将游离的白腐真菌投入到  $Pb^{2+}$  废水中进行吸附并解吸，结果如图 9A 所示，未固定的白腐真菌在初次解吸再次投放后，其  $Pb^{2+}$  吸附量显著下降，且  $Pb^{2+}$  解吸量显著低于未解吸的组别，仅为 1.25 mg/L。此外，游离白腐真菌解吸出的  $Pb^{2+}$  量与吸附  $Pb^{2+}$  量的差值显著，在第三次解吸再利用时达到峰值，表明游离白腐真菌体内残留较多  $Pb^{2+}$ 。而固定化菌球在经过多次吸附-解吸处理后，仍保持高效的  $Pb^{2+}$  去除能力，由图 9B 可知，在前 7 次重复投放-吸附-解吸中，本固定化菌球  $Pb^{2+}$  去除能力无显著变化，7 次之后， $Pb^{2+}$  去除量下降 8.34%，解吸量下降 11.78%，表明当解吸次数达到阈值后，固定化菌球  $Pb^{2+}$  吸附能力有所下降。综上可知，固定化相较于游离化白腐真菌不仅具有更强的  $Pb^{2+}$  耐受能力，还能多次解吸重复利用，可见本固定化菌球在实际应用过程中较游离化白腐真菌更具有优势，应用前景良好。

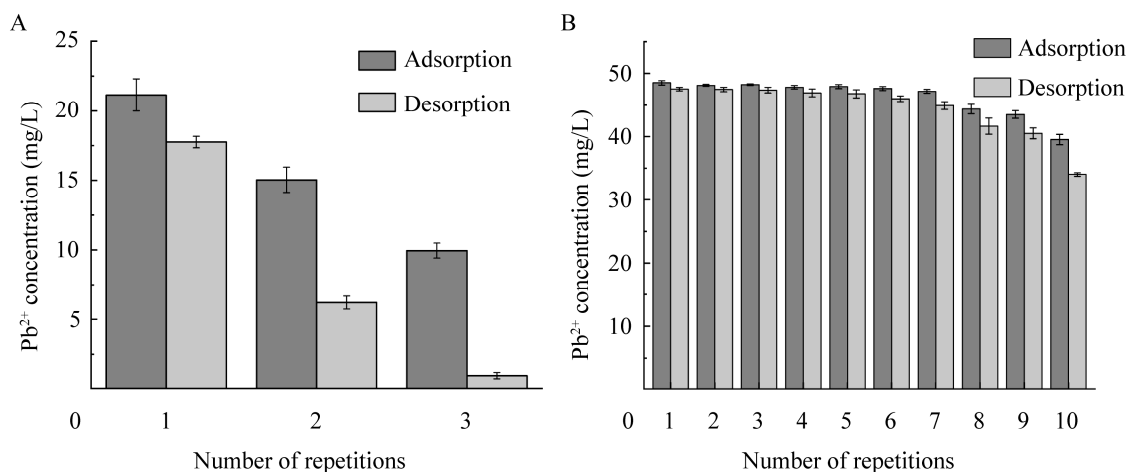


图 9 96 h 游离化白腐真菌及固定化菌球的  $Pb^{2+}$  吸附量与解吸量

Figure 9  $Pb^{2+}$  adsorption and desorption of free white rot fungus (A) and immobilized bacteriophages (B) at 96 h. Error bars in figure represent standard deviation

### 3 讨论

本实验首先对不同白腐真菌的单菌  $\text{Pb}^{2+}$  去除率进行测定, 结果显示各菌均具有一定的  $\text{Pb}^{2+}$  去除能力, 后续对菌种兼容性进行探究, 在共培养过程中发现 4 种菌株之间混合长势良好, 满足混菌发酵条件。以这 4 种白腐真菌进行混合, 各组混菌对  $\text{Pb}^{2+}$  去除率明显高于单菌, 其中混菌中含有黄孢原毛平革菌与平菇时吸附  $\text{Pb}^{2+}$  效果不佳, 而含有云芝、凤尾菇的吸附效果显著优于其余组别, 由此可见不同的菌种不仅存在协同作用, 还具有拮抗作用, 推测云芝、凤尾菇在吸附  $\text{Pb}^{2+}$  具有协同效应。混菌最佳比例实验中, 云芝与凤尾菇体积比为 1:1 时,  $\text{Pb}^{2+}$  去除率最高, 为 46.80%, 显著优于其他比例组, 可见该比例有利于发挥净化效果。本实验与施巧琴等<sup>[28]</sup> 的重金属富集实验结果一致, 施巧琴等<sup>[28]</sup> 发现凤尾菇相对于香菇 (*Lentinus edodes*)、金针菇 (*Flammulina velutiper*) 及木耳 (*Auricularia auricula*) 具有更强的重金属富集效果。此外, 葛飞等<sup>[29]</sup> 用云芝和香菇联合作用可高效降解偶氮染料, 此结果也与本实验相吻合。

固定化技术可将游离菌株制作成具有催化活性但不溶于水的固相菌株, 从而提高菌株稳定性, 进而保证其正常的生理活性<sup>[14]</sup>。SA 作为最常用、有效的固定剂之一, 其优势在于对微生物的本身影响较小, 回收率高, 能够满足实际应用中的需要<sup>[30]</sup>。2020 年彭海渊<sup>[31]</sup> 利用聚乙烯醇与 SA 作为固定化载体对菌株固定化, 固定化菌球具有丰富的孔隙结构, 介孔结构丰富, 有利于对重金属的吸附。本文得出了与之相似的结论, 在 SA 质量浓度 20.0 g/L、生物炭质量浓度 15.0 g/L、白腐真菌孢子量  $2.0 \times 10^6$  个/mL 条件下制作的固定化菌球于 96 h  $\text{Pb}^{2+}$  去除率可达 90.63%, 优于传统固定化条件下的单菌吸附

与未经固定的混合菌株吸附效果, 证明该条件能够有效促进菌球的  $\text{Pb}^{2+}$  去除能力, 即本固定化配方可显著提高微生物对于重金属成分的吸附能力。基于此, 可推知本固定化菌球中的白腐真菌可通过菌球内部的孔隙将分泌的 EPS 传递到菌球的表面, 此时分泌的 EPS 在固定化菌球外结合  $\text{Pb}^{2+}$ , 并将  $\text{Pb}^{2+}$  吸附于固定化菌球之上。与此同时, 由于 SA 与生物炭在菌体表面形成的多孔性载体和凝胶结构阻拦  $\text{Pb}^{2+}$  的进入, 加之生物炭较强的疏水性, 进一步排斥溶液中的  $\text{Pb}^{2+}$ , 因此内部的白腐真菌并不会直接受到  $\text{Pb}^{2+}$  的伤害, 从而白腐真菌可持续分泌 EPS, 以抵御  $\text{Pb}^{2+}$  胁迫。此外, 当  $\text{Pb}^{2+}$  扩散入固定化菌体时, 需要克服重重阻碍, 因而相对于游离的白腐真菌存在时间滞后性, 相对游离白腐真菌 EPS 的产量更大, 结合  $\text{Pb}^{2+}$  能力更强。在此基础上, 创新性探究了固定化菌球的其他固定化助剂对菌球  $\text{Pb}^{2+}$  去除率的影响, 当交联时间固定为 4 h 时, 于固定剂中加入  $\text{SiO}_2$ 、沸石可使菌球在持续作用 96 h 后, 仍保持稳定的菌球性状与工作效率,  $\text{Pb}^{2+}$  去除率达 93.32%, 此结果与吴亚杰等<sup>[32]</sup> 得出  $\text{SiO}_2$  和人造沸石可提升固定化凝胶球的性能的结论相一致。

对固定化菌球的理化性质进行测定, 固定化菌球的传质性与机械强度均显著上升, 表明经固定化后的菌株在高效传递营养物质与氧气的同时, 可抵抗机械剪切力<sup>[33]</sup>。该结果与茆云汉等<sup>[34]</sup> 固定化微生物时, 加入饱和硼酸可提高固定化微生物颗粒的机械稳定性和生物活性的结论一致。电镜下观察固定化菌球, 可见 SA 与菌丝相互交织, 生物炭紧密结合其中, 即本固定化菌球中生物炭主要起骨架作用, 并可利用多孔性载体将菌体包裹, 该结构与陈弘钊等<sup>[35]</sup> 观察的结果相似。通过对固定化菌球中生物炭的元素分析发现, 与原生生物炭相比, 加入

SA、饱和硼酸溶液、SiO<sub>2</sub>，生物炭的 C、N 含量均下降，这是由于饱和硼酸与 SiO<sub>2</sub> 的相对浓度增加所致。而 MB-SA、MB-Bas、MB-SiO<sub>2</sub> 的 H/C 原子比、H 和 C 的含量均略低于 BC，表明 3 者的碳芳香程度增加，这可能是导致生物炭稳定性增强的主要原因。此外，生物炭极性可用 O/C 和(N+O)/C 原子比等参数来表示，与 BC 相比，MB-SA、MB-Bas、MB-SiO<sub>2</sub> 的 O/C 比值、(N+O)/C 均明显降低，说明它们内部的含氧官能基团成分较少、极性小、疏水性强，造成生物炭表面的低亲水性，排斥溶于水中的 Pb<sup>2+</sup>，使其更难接触到菌体，从而使固定化菌球的稳定性得到提升。综上可知，生物炭表面孔隙结构使得小分子底物和产物能够自由进出，并利于微生物附着进行生长和繁殖。而 SA 与菌丝相互交织，最终于菌球表面形成 SA 凝胶包被，能够将菌丝分泌的 EPS 聚集成球型，微生物不会扩散到周围介质中的同时，Pb<sup>2+</sup>难以进入菌球内，相较于游离白腐真菌有更强的 Pb<sup>2+</sup>吸附能力。

以固定化菌球的 EPS 产量与单位 EPS 的吸附性能为指标，验证不同 Pb<sup>2+</sup>胁迫环境下固定化菌球对废水中 Pb<sup>2+</sup>吸附的性能，结果显示，50 mg/L Pb<sup>2+</sup>胁迫条件最有利于混合菌株 EPS 的合成与运输，并不影响其对 Pb<sup>2+</sup>的吸附性能，与此同时在其他浓度胁迫下均能表现出良好的净水效能。表明 Pb<sup>2+</sup>会促进白腐真菌分泌 EPS，这是由于白腐真菌与 Pb<sup>2+</sup>之间存在相互作用，Pb<sup>2+</sup>在对白腐真菌产生伤害的同时，白腐真菌本身也对 Pb<sup>2+</sup>进行抵御<sup>[7]</sup>。为明确固定化菌球产生 EPS 吸附 Pb<sup>2+</sup>的具体官能团，通过傅里叶变换红外光谱分析鉴定吸附重金属铅离子前后的固定化混菌表面的官能团变化。红外光谱下固定化菌球在吸附 Pb<sup>2+</sup>后，强极性基团-OH 的聚合度降低，-C=O 的伸缩振动峰从 1 644 cm<sup>-1</sup> 移动

到 1 641 cm<sup>-1</sup>，-C-O 吸收峰移动到 1 102 cm<sup>-1</sup> 处，暗示羧基官能团与 Pb<sup>2+</sup>可能发生配位反应，而后-OH 对 Pb<sup>2+</sup>起束缚作用<sup>[36]</sup>，进而促使废水中 Pb<sup>2+</sup>含量下降，与此同时由于 Pb<sup>2+</sup>被吸附在菌球上导致酰胺基团被分解破坏<sup>[37]</sup>，此结论与固定化菌球在处理含铅废水后期 EPS 产量与单位 EPS 的吸附性能下降相呼应。为达到更好的净水效果，本团队通过响应面优化法探索固定化菌球投加量、Pb<sup>2+</sup>初始浓度和环境 pH 这三项环境指标对固定化菌球去除废水中 Pb<sup>2+</sup>的影响，结果显示在固定化菌球投加量 8.35 g/L，Pb<sup>2+</sup>初始浓度 41.36 mg/L，pH 5.64 条件下固定化达到最佳效果，表明弱酸性且中等胁迫的环境更有利于固定化菌球发挥作用。在验证实验中，本固定化菌球的 Pb<sup>2+</sup>去除率于 96 h 达 97.45%，表明基于本优化条件下制作的固定化菌球对 Pb<sup>2+</sup>的吸附能力强，能够满足去除含 Pb<sup>2+</sup>废水的净水要求。

为探求本固定化菌球在实际生产过程中的作用效果，判定是否可通过吸附-解吸-再吸附从而多次重复利用，以节约处理成本。结果显示，各白腐真菌处理组 Pb<sup>2+</sup>吸附量与解吸量均存在一定的差值，其中固定化白腐真菌其吸附能力、Pb<sup>2+</sup>解吸量远高于游离白腐真菌，且吸附量与解吸量二者差值远远低于游离白腐真菌，可知，固定化菌球的 Pb<sup>2+</sup>吸附能力与重复利用性远高于游离白腐真菌。考虑到固定化菌球差值的产生可能是由于载体介质残留的问题，2015 年黄真真<sup>[26]</sup>利用固定化无菌小球吸附重金属污染物，而后将其置于解吸液中，结果显示重金属离子解吸率为 100%，证明了固定化菌球介质不会滞留重金属离子。为检验本实验固定化菌球是否存在特殊情况，在最优混菌配比、最佳固定化配方及环境条件下对固定化无菌小球做了 Pb<sup>2+</sup>吸附-解吸实验，结果显示 Pb<sup>2+</sup>



解吸率为 100%，证明了本固定化菌球载体不存在残留  $Pb^{2+}$  的问题。因此，推测此部分差值的出现是由于  $Pb^{2+}$  进入白腐真菌体内。可推知，无论固定化与否都有一定量的  $Pb^{2+}$  进入到白腐真菌体内，但进入固定化后的白腐真菌体内的  $Pb^{2+}$  含量微乎其微，其体内  $Pb^{2+}$  含量是游离白腐真菌的 10%，可见固定化菌球抵御  $Pb^{2+}$  能力强。此外，固定化的白腐真菌前 7 次重复利用时对  $Pb^{2+}$  基本保持原有的吸附性能，几乎没有损失，具有良好的可重复利用性和稳定性，而多次解吸后期  $Pb^{2+}$  去除量开始下降。陈旭婷<sup>[38]</sup> 利用枯草杆菌去除镉离子时发现镉离子对枯草芽孢杆菌的毒性存在积累作用，推测本试验中  $Pb^{2+}$  对白腐真菌的损害同样存在剂量效应。即本固定化菌球在重复利用超过 7 次后， $Pb^{2+}$  吸附量及解吸量显著下降的主要原因或为白腐真菌长期处于逆境条件下， $Pb^{2+}$  的持续胁迫导致其生长机理受损，使得白腐真菌 EPS 产量下降，导致胞外  $Pb^{2+}$  螯合能力减弱，进而有少量  $Pb^{2+}$  进入白腐真菌体内，在多次使用后，由于抵抗能力下降，前期进入白腐真菌体内的  $Pb^{2+}$  达到阈值，进而对其产生毒害作用，从而使白腐真菌的吸附量显著下降。此结论与循环利用 7 次以后， $Pb^{2+}$  去除率显著下降相呼应。

## 4 结论

本研究探究了利用复合白腐真菌治理铅污染废水的新型固定化工艺。吸附  $Pb^{2+}$  的最优白腐真菌混菌菌种为云芝与凤尾菇，其最佳比例为云芝:凤尾菇为 1:1 (体积比)。固定化菌球最佳制作配方为 SA 质量浓度 20.0 g/L、生物炭质量浓度 15.0 g/L、白腐真菌孢子量  $2.0 \times 10^6$  个/mL，在此基础上以 5 mg/L  $Pb^{2+}$  模拟废水冷藏，选用 0.2 mol/L  $NaH_2PO_4$  的饱和硼酸溶液作为交联剂，交联过程中加入  $SiO_2$  和沸石，交联时间 4 h。

此外，环境条件为 pH 5.64，固定化菌球投加量 8.35 g/L， $Pb^{2+}$  初始浓度 41.36 mg/L，最有利于混合菌株 EPS 的合成与运输，不影响其对  $Pb^{2+}$  的吸附性能的同时，可充分利用其表面的羟基 (-OH)、酰胺基 (-C-O-NH<sub>2</sub>)、羧基 (-COOH) 等官能团高效络合铅离子形成共价键，达到有效去除废水中金属离子目的，最终使得  $Pb^{2+}$  去除率达 97.45%。此外，本固定化菌球在实际使用过程中，可通过吸附-解吸-再吸附保持高效净水能力且重复利用 7 次以上，满足实际应用需求，与此同时可向废水中投放碳源、氮源等白腐真菌所需的营养物质，进一步延长其使用寿命。

本固定化菌球缓解了游离化白腐真菌在应用过程中因振荡、搅拌等操作受到强剪切力作用而影响其吸附效率的问题，在各  $Pb^{2+}$  胁迫环境均具有良好的吸附能力，兼具专一性强、菌体耐受性好、固定化小球机械强度高等优势，可有效处理含铅废水，可用于蓄电池生产、石油加工等含铅工业污水的治理，拓宽污染水体的可修复范畴，为环境生态的治理与保护增添新思路。

## 参考文献

- [1] 李亚星, 吴升, 阎波杰. 中国工业废水排放空间分异影响机制研究[J]. 环境污染与防治, 2021, 43(9): 1089-1093.  
LI YX, WU S, YAN BJ. Influence mechanism of spatial differentiation of industrial wastewater discharge in China[J]. Environmental Pollution and Control, 2021, 43(9): 1089-1093 (in Chinese).
- [2] 王思远, 杨树俊, 张贺, 孙东年, 刘耕苑. 土壤中铅污染来源及其危害综述[J]. 农业与技术, 2022, 42(9): 78-81.  
WANG SY, YANG SJ, ZHANG H, SUN DN, LIU GY. Review on sources and harms of lead pollution in soil[J]. Agriculture & Technology, 2022, 42(9): 78-81 (in Chinese).
- [3] STENHOLM Å, HEDELAND M, PETTERSSON CE. Neomycin removal using the white rot fungus *Trametes versicolor*[J]. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 2022, 57(6): 436-447.

- [4] CAO FS, BOURVEN I, GUIBAUD G, RENE ER, LENS PNL, PECHAUD Y, HULLEBUSCH ED. Alteration of the characteristics of extracellular polymeric substances (EPS) extracted from the fungus *Phanerochaete chrysosporium* when exposed to sub-toxic concentrations of nickel(II)[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2018, 129: 179-188.
- [5] 张建广, 陈全, 田路萍, 施柯廷, 吴敏. 环境友好型土壤重金属修复技术及其应用[J]. *材料导报*, 2023, 37(5): 191-201.
- ZHANG JG, CHEN Q, TIAN LP, SHI KT, WU M. Environmental-friendly remediation technology and its application in heavy metal polluted soil[J]. *Materials Reports*, 2023, 37(5): 191-201 (in Chinese).
- [6] SUN S, LIU PY, ULLAH M. Efficient azo dye biodecolorization system using lignin-co-cultured white-rot fungus[J]. *Journal of Fungi*, 2023, 9(1): 91.
- [7] 许飘. 白腐真菌对重金属的吸附富集特性及其重金属耐受性和抗性机制研究[D]. 长沙: 湖南大学博士学位论文, 2016.
- XU P. Research on heavy metal biosorption/accumulation by white-rot fungi and fungi tolerance/resistance analysis[D]. Changsha: Doctoral Dissertation of Hunan University, 2016 (in Chinese).
- [8] OGIDI CO, UBARU AM, LADI-LAWAL T, THONDA OA, ALADEJANA OM, MALOMO O. Bioactivity assessment of exopolysaccharides produced by *Pleurotus pulmonarius* in submerged culture with different agro-waste residues[J]. *Heliyon*, 2020, 6(12): e05685.
- [9] 王玫, 刘艳. 固定化微生物处理有机废水的初步研究[J]. *广州化工*, 2014, 42(2): 105-106.
- WANG M, LIU Y. A preliminary study of organic wastewater treatment by immobilized microorganism[J]. *Guangzhou Chemical Industry*, 2014, 42(2): 105-106 (in Chinese).
- [10] 黄仕元, 李胜, 王振宇, 林森焕, 邓简. 固定化白腐真菌对复合污染废水的处理[J]. *应用化工*, 2022, 51(1): 103-106.
- HUANG SY, LI S, WANG ZY, LIN SH, DENG J. Treatment of compound polluted wastewater by immobilized white rot fungi[J]. *Applied Chemical Industry*, 2022, 51(1): 103-106 (in Chinese).
- [11] OMONI VT, IBETO CN, LAG-BROTONS AJ, BANKOLE PO, SEMPLE KT. Impact of lignocellulosic waste-immobilised white-rot fungi on enhancing the development of 14C-phenanthrene catabolism in soil[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 811: 152243.
- [12] 谭正尧, 肖妮, 李天琦, 王小凤, 陈金毅. 水处理中微生物固定化技术的研究进展[J]. *当代化工研究*, 2022(19): 97-99.
- TAN ZY, XIAO N, LI TQ, WANG XF, CHEN JY. Research progress of microbial immobilization technology in water treatment[J]. *Modern Chemical Research*, 2022(19): 97-99 (in Chinese).
- [13] 朱晓丽, 林姝欢, 张星, 张子夜, 马晓杰. 生物炭固定化解有机磷菌对  $Pb^{2+}$  的吸附行为研究[J]. *环境科学学报*, 2023, 43(3): 116-126.
- ZHU XL, LIN SH, ZHANG X, ZHANG ZY, MA XJ. Adsorption of  $Pb^{2+}$  by biochar immobilized organic phosphorus-degrading bacteria[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2023, 43(3): 116-126 (in Chinese).
- [14] 余泽海, 胡云霜, 张晏菘, 邱慧敏, 李志霞, 林宏飞. 聚乙烯醇/海藻酸钠/水性聚氨酯复合载体制备及固定化硝化菌降解氨氮废水的研究[J]. *水处理技术*, 2022, 48(11): 94-97.
- YU ZH, HU YS, ZHANG YS, QIU HM, LI ZX, LIN HF. Preparation of polyvinyl alcohol/sodium alginate/waterborne polyurethane composite carrier and degradation of ammonia nitrogen wastewater by immobilization of nitrifying bacteria[J]. *Technology of Water Treatment*, 2022, 48(11): 94-97 (in Chinese).
- [15] 张晓晓. 白腐真菌对噻虫嗪污染水体和土壤的修复研究[D]. 长沙: 湖南农业大学硕士学位论文, 2020.
- ZHANG XX. Remediation of thiamethoxam-contaminated water and soil by white rot fungi[D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [16] 赵颖杰, 钱依恣. LLMO 微生物菌处理低浓度模拟含铅废水试验研究[J]. *工业用水与废水*, 2023, 54(1): 24-27, 74.
- ZHAO YJ, QIAN YM. Experimental study on simulated low concentration lead-containing wastewater treatment by LLMO microbial agent[J]. *Industrial Water & Wastewater*, 2023, 54(1): 24-27, 74 (in Chinese).
- [17] BELTRÁN EF, SARRÀ M, BLÁNQUEZ P. Pesticide bioremediation by *Trametes versicolor*: application in a fixed-bed reactor, sorption contribution and bioregeneration[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 794: 148386.
- [18] 肖雨, 王刚, 于潇潇, 张明磊, 王希庆, 张洁静, 刘娟, 张斯童, 苏英杰, 李艳丽, 陈光. 保加利亚乳杆菌微胶囊化工艺研究[J]. *中国微生态学杂志*, 2018, 30(6): 654-658.

- XIAO Y, WANG G, YU XX, ZHANG ML, WANG XQ, ZHANG JJ, LIU J, ZHANG ST, SU YJ, LI YL, CHEN G. Microencapsulation of *Lactobacillus bulgaricus*[J]. Chinese Journal of Microecology, 2018, 30(6): 654-658 (in Chinese).
- [19] 陈瑞环, 刘云, 张澜, 田坤, 董元华. 高吸附量有机聚合物的合成及其对亚甲基蓝吸附性能研究[J]. 环境科学学报, 2020, 40(12): 4297-4305.
- CHEN RH, LIU Y, ZHANG L, TIAN K, DONG YH. Synthesis and super adsorption performance of a novel polyacrylic acid polymer for methylene blue[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2020, 40(12): 4297-4305 (in Chinese).
- [20] 陈静文, 张迪, 吴敏, 王朋. 两类生物炭的元素组分分析及其热稳定性[J]. 环境化学, 2014, 33(3): 417-422.
- CHEN JW, ZHANG D, WU M, WANG P. Elemental composition and thermal stability of two different biochars[J]. Environmental Chemistry, 2014, 33(3): 417-422 (in Chinese).
- [21] IKHMAL ZAIJI, MUHAMAD NFB, HARIZ AH, ANWAR AM, FARAH HAH. Progressive freeze concentration: optimization of trichlorophenol removal in wastewater via response surface methodology[C]//Advances in Science and Technology, "Global Sustainability and Chemical Engineering". September 14-15, 2021. SHAH ALAM, SELANGOR, Malaysia. Switzerland: Trans Tech Publications Ltd, 2023: 11-22.
- [22] KRASNOSHTANOVA AA, BEZYAEVA AD. Comparative analysis of the properties of biocatalysts based on chymotrypsin immobilized on polysaccharide supports[J]. Catalysis in Industry, 2022, 14(4): 395-400.
- [23] 刘子森, 肖恩荣, 张丽萍, 吴振斌. EPS 及其测定方法分析[J]. 膜科学与技术, 2015, 35(4): 103-109, 122.
- LIU ZS, XIAO ER, ZHANG LP, WU ZB. Analysis on the determination methods of EPS[J]. Membrane Science and Technology, 2015, 35(4): 103-109, 122 (in Chinese).
- [24] 艾金祥, 葛杰克, 张子仪, 陈文倩, 梁嘉怡, 王馨怡, 吴巧缘, 余婕, 叶怡彤, 周天逸, 粟金怡, 李文文, 吴玉环, 刘鹏. 水杨酸对铜胁迫下菊芋的生理调控及根系 FTIR 分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(2): 695-712.
- AI JX, GE JK, ZHANG ZY, CHEN WQ, LIANG JY, WANG XY, WU QY, YU J, YE YT, ZHOU TY, SU JY, LI WW, WU YH, LIU P. Physiological regulation of salicylic acid on *Helianthus tuberosus* upon copper stress and root FTIR analysis[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(2): 695-712 (in Chinese).
- [25] 邹玉春. 真菌-纳米粉体联合处理染料的研究[D]. 南昌: 江西科技师范大学硕士学位论文, 2017.
- ZOU YC. Study on combined treatment of dyes by fungi and nano-powder[D]. Nanchang: Master's Thesis of Jiangxi Science and Technology Normal University, 2017 (in Chinese).
- [26] 黄真真. 聚乙烯醇固定化白腐真菌对复合废水的处理及其机理研究[D]. 长沙: 湖南大学硕士学位论文, 2015.
- HUANG ZZ. Study on the treatment of compound wastewater by white rot fungi immobilized on polyvinyl alcohol and its mechanism[D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan University, 2015 (in Chinese).
- [27] XIAO X, LUO SL, ZENG GM, WEI WZ, WAN Y, CHEN L, GUO HJ, CAO Z, YANG LX, CHEN JL, XI Q. Biosorption of cadmium by endophytic fungus (EF) *Microsphaeropsis* sp. LSE10 isolated from cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L.[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(6): 1668-1674.
- [28] 施巧琴, 林琳, 陈哲超, 陈松生, 谢必峰, 吴松刚, 陈静仪, 柯毅龙, 李贤明, 林园. 重金属在食用菌中的富集及其生长代谢的影响[J]. 真菌学报, 1991(4): 301-311.
- SHI QQ, LIN L, CHEN ZC, CHEN SS, XIE BF, WU SG, CHEN JY, KE YL, LI XM, LIN Y. Studies on the accumulation of heavy metals and their effect on the growth and metabolism in edible fungi[J]. Mycosystema, 1991(4): 301-311 (in Chinese).
- [29] 葛飞, 石贝杰, 唐尧, 杨良军, 郑述祥, 张谐天, 段震超. 11 株白腐真菌对 5 种偶氮染料脱色效果比较及其脱色条件优化[J]. 环境工程学报, 2016, 10(2): 963-970.
- GE F, SHI BJ, TANG Y, YANG LJ, ZHENG SX, ZHANG XT, DUAN ZC. Comparison of degradation effect on 5 azo dyes by 11 strains white-rot fungi and optimization of decolorization conditions by *Coriolum hirsutum* SG0027[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2016, 10(2): 963-970 (in Chinese).
- [30] JIANG Y, YU GB, ZHOU Y, LIU YY, FENG YH, LI JC. Effects of sodium alginate on microstructural and properties of bacterial cellulose nanocrystal stabilized emulsions[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2020, 607: 125474.

- [31] 彭海渊. 固定化微生物活性小球处理含 Cd(II)和 Zn(II)废水的性能与机理研究[D]. 长沙: 长沙理工大学硕士学位论文, 2020.  
PENG HY. Study on the performance and mechanism of immobilized microbe active beads in treating wastewater containing Cd(II) and Zn(II)[D]. Changsha: Master's Thesis of Changsha University of Science & Technology, 2020 (in Chinese).
- [32] 吴亚杰, 李辉军, 戴昕, 安立超. 无机材料对固定化微生物凝胶球性能的影响[J]. 环境工程学报, 2014, 8(8): 3289-3293.  
WU YJ, LI HJ, DAI X, AN LC. Effect of inorganic materials on properties of immobilized microorganism gel beads[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2014, 8(8): 3289-3293 (in Chinese).
- [33] MIAO JH, WANG FH, LI Q, LI JN, ZHANG ST, JIANG YN. Fir bark modified by *Phanerochaete chrysosporium*: a low-cost amendment for cd-contaminated water and agricultural soil[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021, 209: 111830.
- [34] 茆云汉, 王建龙. 聚乙烯醇固定化微生物新方法的研究[J]. 环境科学学报, 2013, 33(2): 370-376.  
MAO YH, WANG JL. Immobilization of activated sludge in PVA matrix using innovative methods[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2013, 33(2): 370-376 (in Chinese).
- [35] 陈弘钊, 赵聿文, 袁文娟. 纳米 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 固定化腐败希瓦氏菌处理水体铅污染的研究[J]. 水污染及处理, 2020(2): 44-52.  
CHEN HZ, ZHAO YW, YUAN WJ. Study on the treatment of lead pollution in water by nano-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> immobilized *Shewanella putrefaciens*[J]. Water Pollution and Treatment, 2020(2): 44-52 (in Chinese).
- [36] CHEN GQ, GUAN S, ZENG GM, LI XD, CHEN AW, SHANG C, ZHOU Y, LI HK, HE JM. Cadmium removal and 2,4-dichlorophenol degradation by immobilized *Phanerochaete chrysosporium* loaded with nitrogen-doped TiO<sub>2</sub> nanoparticles[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(7): 3149-3157.
- [37] HUANG F, DANG Z, GUO CL, LU GN, GU RR, LIU HJ, ZHANG H. Biosorption of Cd(II) by live and dead cells of *Bacillus cereus* RC-1 isolated from cadmium-contaminated soil[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2013, 107: 11-18.
- [38] 陈旭婷. 固定化白腐真菌处理有机难降解废水的研究[D]. 西安: 陕西科技大学硕士学位论文, 2014.  
CHEN XT. Study on treatment of organic refractory wastewater by immobilized white rot fungi[D]. Xi'an: Master's Thesis of Shaanxi University of Science & Technology, 2014 (in Chinese).