

以染料为底物的 *Trametes hirsuta* 降解反应体系的建立*

李慧蓉 张琳 沈炎

(江苏工业学院环境与安全工程系 常州 213016)

摘要: 建立 *Trametes hirsuta* 的生长繁殖和对模式染料比布列希猩红脱色降解的反应体系, 研究表明: 菌的生长与降解活动的适宜温度为 30℃, 静培养; 培养基组分对脱色降解的影响不大; 从便于观察和缩短反应周期考虑, 土豆液体培养基有明显的优点, 可作为建立 *Trametes hirsuta* 反应体系的首选培养基。菌对比布列希猩红、直接深蓝 L-3RB、活性艳蓝 X-BR、碱性紫 5BN 和亚甲基蓝等均有较好的脱色降解效果。

关键词: *Trametes hirsuta*, 染料, 培养基, 脱色降解

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 05-0072-06

THE PRELIMINARY ESTABLISHMENT OF DEGRADATIVE REACTION SYSTEMS FOR DYES BY *TRAMETES HIRSUTA*

LI Hui-Rong ZHANG Lin SHEN Yan

(Department of Environment and Safety Engineering, Jiangsu Polytechnic University, Changzhou 213016)

Abstract: The growth-propagation and decolorization-degradation systems for the model dye Biebrich Scarlet by *Trametes*

* 江苏省高校自然科学基金资助课题 (No.02KJB610002)

收稿日期: 2002-11-13, 修回日期: 2003-05-10

hirsuta were established preliminarily. It was showed that 30°C and the static culture were better; the effects of components in culture media on the efficiencies of decolorization and degradation were not significant; considering the convenience of observing the changes of dye colors and shortening the culture period, the potato liquid medium had the advantage of others as a preferable medium for reaction systems of *Trametes hirsuta*. The decolorization and degradation of all dyes Biebrich Scarlet and Direct Deep Blue L-3RB, Reactive Blue X-BR, Basic Violet 5BN, and Methylene Blue by *Trametes hirsuta* were better.

Key words: *Trametes hirsuta*, Dyes, Culture media, Decolorization-degradation.

白腐真菌是一类丝状真菌的总称,其代表种黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)因对异生物质具有独特的降解能力而一直成为研究的重点菌种。虽然具有降解对象广谱、降解能力高效等优点,黄孢原毛平革菌的降解反应体系对营养限制的严格依赖,对活性因子的苛刻需求,受培养条件的约束影响等等,却给其工业化应用带来很大的制约^[1]。因此,近年来,人们对白腐真菌家族中的其他成员如 *Trametes versicolor* 及 *Trametes hirsuta* 等产生了新的兴趣^[2-4]。研究这些菌的降解规律,期望利用它们的降解能力,作为对现有的以黄孢原毛平革菌为核心的真菌技术的补充和完善。

因反应迅速、直观等优点,染料一直作为研究白腐真菌反应体系的启动和工作状况的指示性作用底物^[5]。本文建立 *Trametes hirsuta* 的降解反应体系,研究菌对模式染料的降解能力及对培养条件的基本要求。

1 材料与方 法

1.1 菌种

Trametes hirsuta 由奥地利 Graz 大学 G.M.Guebitz 博士赠送。

1.2 染料

比布列希猩红,双偶氮染料;活性艳蓝 X-BR,葱醌染料;碱性紫 5BN,三苯甲烷染料;亚甲基蓝,噻嗪染料;直接深蓝 L-3RB,三偶氮染料。

1.3 培养基

固体培养基用于菌的生长和扩增,液体培养用于菌的繁殖或反应体系的建立。

1.3.1 Th 培养基系列:根据参考文献^[4],适合 *Trametes hirsuta* 菌生长和反应的培养基系列,简称 Th 培养基。

Th-A 液体培养基:麦麸片 45g,葡萄糖 10g,酵母浸膏 15g, NH₄Cl 2.5g, 维生素 B₁ 0.5g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, KH₂PO₄ 2g, CaCl₂ 0.1g 和 KCl 0.5g, 定容至 1L。

加 20g 琼脂为 Th-A 固体培养基。Th-B₁ 液体培养基和 Th-B₂ 液体培养基,除不加麦麸片且后者再将酵母浸膏换成酵母浸粉外,其余均与 Th-A 液体培养基相同。Th-C 液体培养基:将用于繁殖菌的 Th-A 液体培养基接种培养 10d 后过滤,除去菌体,滤出液即为 Th-C 液体培养基。

1.3.2 Pc 培养基:Pc 培养基系适合于黄孢原毛平革菌的培养基,简称 Pc 培养基。根据文献^[6]配制。

1.3.3 土豆汁液体培养基:除不加琼脂外,其余均与 Pc 固体生长培养基相同。

1.3.4 麦芽汁液体培养基:除把酵母浸膏换成麦芽浸粉外,其余均与 Th-B₁ 液体培养基相同。

1.4 脱色率的测定与计算

染料的脱色率是通过与菌共培养，培养液最大吸收波长处吸光度减少来确定。参见文献[6]。

2 结果与分析

2.1 *Trametes hirsuta* 扩增和繁殖

2.1.1 平板扩增体系：对扩增菌的平板的形态观察表明：培养基成分不同，影响菌体的生长形态。在 Th-A 固体生长培养基上，菌的生长呈成团向上趋势；而在 Pc 固体生长培养基上，呈向周缘铺展式生长。培养温度不同，对菌的生长也有影响。30℃ 培养的菌落生长较均匀，且菌老化的时间较 39℃ 下培养的平板要迟些。

2.1.2 液体繁殖体系：100mL 三角瓶中加入 10mL（静培养）或 40mL（动培养）培养基，分别接入菌。接菌量以扩增后平板上菌落的表面积为基准，静培养接入 0.25cm²，动培养为 0.5cm²。静培养，30℃ 恒温培养箱静置培养；动培养，30℃ 摇床 100r/min 培养。菌的形态观察表明：

动培养中，菌丝缠绕成菌团；静培养中菌丝伸展交织成片为菌垫。在土豆汁液体培养基和麦芽汁培养基培养基中菌的繁殖速度较 Th-A 液体培养基要快。可见，用于扩增黄孢原毛平革菌的 Pc 固体生长培养基，同样适用于 *Trametes hirsuta* 菌的扩增，且效果比文献中的 Th-A 固体生长培养基更好。土豆汁液体培养基的成分与 Pc 固体培养基相同，同样优于 Th-A 液体培养基。30℃ 为 *Trametes hirsuta* 的适宜生长繁殖温度。

2.2 以比布列希猩红为底物的反应体系

100mL 三角瓶中建立反应体系，培养方式及相应的培养基体积同上。30℃ 或 39℃ 培养。模式染料比布列希猩红的浓度均为 0.1mmol/L。

2.2.1 Th-A、土豆汁、麦芽汁液体培养基反应体系：静培养或动培养体系，分别接入 0.25 cm² 或 0.5cm² 菌，加入一定量的染料。30℃ 培养。

随着共培养时间的持续，培养液颜色逐渐变淡。最后，土豆和麦芽汁液体培养基基本无色透明，而 Th-A 液体培养基则由加入染料后的红褐色恢复到培养基原来的褐色。

表 1 Th-A、土豆汁、麦芽汁液体体系中 *Trametes hirsuta* 菌对比布列希猩红溶液的脱色率

培养基	培养方式	脱色率 (%)				
		3d	5d	6d	10d	15d
麦芽汁	静	74.9	97.4	99.7	100	100
	动	25.0	69.5	92.1	100	100
土豆汁	静	68.8	98.6	100	100	100
	动	23.5	53.1	88	100	100
Th-A	静	80.9	91.4	81.4	100	100
	动	20.0	81.9	82.6	79.9	94.2

由表 1 可知：(1) 静培养的脱色效果始终优于动培养；(2) 土豆汁液体培养基比麦芽汁液体培养基体系的脱色效果稍好；Th-A 液体培养基体系，培养周期较长出现反弹现象。

2.2.2 Th-B₁ 和 Th-B₂ 液体培养基反应体系：两个体系均在 30℃ 下进行静培养或动培养。

Th-B₁ 体系分别接入 0.25g 及 1.0g 菌丝体；Th-B₂ 体系分别接入 0.5cm² 及 1.0cm² 菌落块。

可见: (1) 静培养的脱色效果优于动培养; (2) Th-B₂ 液体培养基体系的脱色效果比 Th-B₁ 液体培养基体系好, 可能与酵母浸粉的成分相对纯一点或活性较高有关。

2.2.3 Th-C 液体培养基

反应体系: 加入染料后, 培养液为红褐色, 随着时间的推移, 经历由红褐色→暗红色→洋红色的变化。

比较表 3 与表 1、2, Th-C 体系的反应效果明显要好。前两个体系中, 从接种到酶的产生和分泌, 需要一定的时间; Th-C 体系中, 胞外酶是现成的, 这就缩短了反应的启动时间。

2.2.4 Pc 液体营养限制培养基反应体系: 静培养或动培养体系中, 均加入 0.4mmol/L 的活性因子藜芦醇 (Veratryl Alcohol, VA)。

静培养体系的接种量为 0.25cm² 及 0.5cm²; 动培养体系的接种量分别为 0.5cm² 及 1.0cm²。5d 后, 部分样品的菌体与培养基转为很淡的粉红色, 最快的 7d, 菌体与培养液接近无色。培养基颜色经历了由猩红→粉红→无色, 或由猩红→橙红→橙黄→无色两种变化过程; 前者发生在脱色降解较快的样品中, 后者主要存在于脱色降解历程较长的样品中。

表 4 Pc 液体营养限制培养基体系中 *Trametes hirsuta* 菌对比布列希猩红溶液的脱色率

培养方式	接种量 (cm ²)	脱色率 (%)									
		2d	3d	5d	6d	7d	9d	11d	13d	15d	19d
静 (30℃)	0.25		2.1		20.3				54.4	68.9	94.2
	0.5	13.7		43.0		49.7	65.6	70.8	84.8		
静 (39℃)	0.25	4.5			22.9				73.5	82.7	90.5
	0.5	1.6		16.5		53.0	96.1	91.7	97.2		
动 (30℃)	0.5		0		0				26.4	33.2	48.2
	1.0	7.1		17.4		21.7	35.7	66.7	82.2		
动 (39℃)	0.5		0		0.1				63.8	91.9	98.6
	1.0	1.0		56.5		91.9	97.2	89.7	99.0		

可见: (1) 30℃ 培养时, 静培养体系的脱色效果优于动培养体系; (2) 39℃ 培养时, 动培养体系的脱色效果优于静培养体系; (3) 接种量与培养方式相同时, 39℃ 培养的脱色效果优于 30℃ 培养的; (4) 培养方式与培养温度相同时, 接种量增加一倍, 脱色率明显增大。

摇床培养, 虽然有利于传质及通气, 但菌丝缠绕形成直径约 3mm~6mm 的紧固菌团, 浸没在液体中, 不利于氧的扩散传递; 搅动造成的剪切力严重破坏胞外降解酶系统的活性。而静培养形成的垫状菌体很薄, 能从环境中得到充分的氧; 静培养不构成对胞外酶有破坏作用的剪切力。

Trametes hirsuta 菌与不同培养基组成的共培养体系, 对比布列希猩红染料的脱色效

表 2 Th-B₁ 和 Th-B₂ 体系中 *Trametes hirsuta* 菌对比布列希猩红溶液的脱色率

培养基	培养方式	脱色率 (%)					
		3d	6d	8d	10d	12d	14d
Th-B ₁	静	78.1	81.6	85.6	98.8	99.1	91.4
	动	37.3	54.0	47.6	66.3	65.8	77.3
Th-B ₂	静	33.2	99.8	88.8	100	100	100
	动	24.9	79.9	83.7	97.5	99.9	96.8

表 3 Th-C 体系中 *Trametes hirsuta* 菌对比布列希猩红溶液的脱色率

培养方式	脱色率 (%)			
	3d	5d	9d	14d
静 (30℃)	92.2	91.9	100	99.2
静 (39℃)	76.3	88.0	99.7	100
动 (30℃)	92.2	88.6	92.5	95.3
动 (39℃)	87.2	92.2	91.9	96.4

果均比较好, 这表明, *Trametes hirsuta* 菌受培养基的营养组分及其相互比例的影响不大。总体上看, 土豆汁液体培养基体系的降解效果最好。因麦麸和酵母提取物的存在, Th-A、Th-B、及 Th-C 液体培养基均有很深的颜色, 给检测造成困难; 麦芽汁液体培养基中的麦芽淀粉, 价格昂贵; 所以土豆汁液体培养基可作为建立 *Trametes hirsuta* 菌反应体系的最佳培养基。

2.3 几种代表性染料底物的脱色及降解

2.3.1 脱色率的动态变化: 100mL 三角瓶中 100mL 培养基, 接入 0.5m² 菌, 加入染料。30℃ 静培养。

表 5 土豆汁液体培养基体系中 *Trametes hirsuta* 菌对 5 种代表性染料溶液的脱色率

染料品种	浓度 (mmol/L)	脱色率 (%)							
		2d	4d	6d	8d	10d	12d	15d	17d
比布列	0.1	40.4	82.5	98.1	99.0	99.8	100	100	
	0.2	52.7	69.9	83.6	84.9	93.3	99.5	100	
希猩红	0.3	65.8	85.3	94.3	89.5	92.5	98.2	99.8	
	0.4	73.3	80.5	84.4	82.0	81.4	90.8	99.3	
活性艳蓝	0.1	69.2	100	100					
X-BR	0.2	64.6	93.8	97.7					
碱性紫	0.1	63.1	60.3	66.0	73.8	96.8	97.9		
	5BN	0.2	59.8	62.1	63.2	66.5	66.9	75.7	
亚甲基蓝	0.1	18.4	50.7	64.0	61.2	68.1	80.3	98.5	100
	0.2	20.8	69.4	67.2	72.5	75.8	82.3	91.8	96.9
直接深蓝 L-3RB	0.1	70.5	99.7						
	0.2	76.7	100						

总体上看, 菌对活性艳蓝 X-BR 的脱色降解效果最好。菌对直接深蓝 L-3RB 有十分迅速的吸附能力, 染料加入后, 4d 内脱色率基本达到 100%。多数文献中碱性紫 5BN 浓度仅为 5mg/L^[7], 我们采用文献量浓度 8、16 倍的底物量, 培养 12d, 均得到较好的脱色率。

2.3.2 染料吸光度曲线波形的变化: 在亚甲基蓝的实验中, 15d 后, 浓度为 0.2mmol/L 的体系中培养基颜色为蓝绿色, 测出最大吸收波长的移动。图 1 是 *Trametes hirsuta* 菌与 0.2mmol/L 亚甲基蓝共培养 15d、19d 后, 培养液的吸收曲线与作为对照的标准 0.02mmol/L 亚甲基蓝溶液的吸收曲线的比较, 清楚地看到最大吸收波长朝短波方向的明显移动及染料浓度的显著下降。

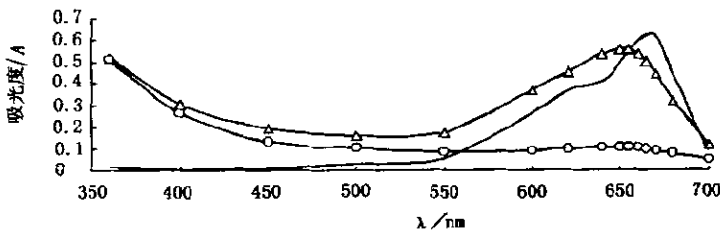


图 1 *Trametes hirsuta* 菌与 0.2mmol/L 亚甲基蓝共培养 15d 与 19d 培养液
的吸收曲线和 0.02mmol/L 对照的吸收曲线比较
— 对照, -△- 15d, -○- 19d

分别以比布列希猩红、活性艳蓝 X-BR、碱性紫 5BN 为底物的共培养体系中, 染料颜色均有明显变化。虽然未测出有最大吸收波长的移动, 但根据它们某一天的吸光度

曲线可以看出波形有了显著变化,沿短波方向均有一个形成波峰的趋势,说明有新的物质产生。

3 结论

培养基的不同,对脱色降解效果的影响不是很大。土豆汁液体培养基表现出明显的优势,可作为建立 *Trametes hirsuta* 菌反应体系的首选培养基。菌生长与降解活动的适宜温度为 30℃,培养方式为静培养。菌对各种不同结构的染料均有广谱的有效降解能力。

4 讨论

与白腐真菌的代表种黄孢原毛平革菌相比, *Trametes hirsuta* 的降解反应体系更容易建立,它对培养基组分、培养方式和基本条件的要求,并不十分苛刻;而且对染料的脱色降解也较迅速。这些都充分表明, *Trametes hirsuta* 是一种非常有研究利用价值的白腐真菌。

实验中, *Trametes hirsuta* 菌的降解反应体系表现为对蒽醌染料有显著的脱色降解效果,这可能涉及到染料分子结构中稠环的开裂。直接深蓝 L-3RB 是一种较为典型的三偶氮基磺酸染料,其偶氮基 (-N=N-) 和磺酸基 (-SO₃),通常难以发生氧化性降解^[8];菌对其表现出强烈的吸附能力,尽管吸附脱色与降解脱色是有差别的,但吸附的作用也是一个可以利用的重要方面。

在染料脱色降解的过程中,培养液的颜色随着培养时间的推移,发生动态变化。但我们除亚甲基蓝 (0.2mmol/L) 体系测出有最大吸收波长的移动外,其余均未测出。这可能是由于最大吸收波长已移到紫外区域,需用紫外分光光度法测出,作深入探讨。

参考文献

- [1] Moreira M T, Palma C, Feijoo G, *et al.* Journal of Biotechnology, 1998, 66: 27 ~ 39.
- [2] Kapdan, I K, Kargi F, McMullan G, *et al.* Enzyme Microb Technol, 2000, 26: 381 ~ 387.
- [3] Majcherzyk A, Johannes C, Huettermann A. Enzyme Microb Technol, 1998, 22: 335 ~ 341.
- [4] Abadulla E, Tzanov T, Costa S, *et al.* Appl Environ Microbiol, 2000, 66 (8): 3357 ~ 3362.
- [5] Magalhaes D B, Andrade M E, Bon E, *et al.* Biotechnology Techniques, 1996, 10 (4): 273 ~ 276.
- [6] 李慧蓉, 高云霞, 尹 艳. 上海环境科学, 2002, 21 (4): 205 ~ 209.
- [7] Bumpus J A, Brock B J. Appl Environ Microbiol, 1988, 54 (5): 1143 ~ 1150.
- [8] Pasti-Grigsby M B, Paszcynski A, Goszcynski S, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1992, 58 (11): 3605 ~ 3613.