

固定化野丝膜菌降酚的初步研究

邓元修 钱丽川 向玉竹

(华中理工大学生物工程系, 武昌 430074)

摘要 使用药食兼用真菌野丝膜菌 (*Cortinarius torvus*) 的固化残体降解苯酚可忽略固定化成本问题, 因而可望用于废水处理。本文报道该固化菌丝处理含酚废水的特性和前景。

关键词 固定化; 野丝膜菌; 酚; 废水

酚类化合物是化工、造纸、钢铁等工业废水的主要有毒成份, 因而是各国关注的对象之一^{1,2}。含酚废水的生物处理目前主要采用活

性污泥法。为消除活性污泥法的缺点, 近年引入了固定化细胞技术。该法为大幅度提高处理效率开辟了光明的前景, 因而成为研究的热点。

国内外有关工作不外乎从含酚废水中分离出具有较高降酚活性的假丝酵母或假单胞菌株,包埋于琼脂、海藻酸钙、聚丙烯酰胺、聚乙二醇等有机载体或吸附于活性炭中固定进行降酚处理。但与生产较昂贵的生物产品相比较,上述方法用于废水处理时成本过高,因而至今仍停留在实验室阶段。所以,探讨新的更好的固化方法是今后努力的方向之一^[3-5]。

本文报道,用一种富含多酚氧化酶的药食兼用真菌,以废弃纤维素材料为固定化载体,利用收获子实体后的残余固化菌体来处理苯酚,探索一条极为廉价的固化细胞处理含酚废水新途径。

材料与方 法

(一) 材 料

1. 菌种: 野丝膜菌 (*Cortinarius torvus*) 831, 本室分离保存菌种。

2. 培养基

(1) 耐酚培养基(%): 土豆汁 20, 葡萄糖 2, 酵母膏 0.5, 合成微量元素 ($MgSO_4$ 0.3%, KH_2PO_4 0.3%, $FeSO_4$ 0.005%, $CaCl_2$ 0.005%) 10ml, 苯酚 0.008—0.072, 琼脂 2。

(2) 液体生长培养基: 除不含酚和琼脂外,其他同上。

(3) 碳源对照培养基(%): a. 葡萄糖 0.05, 尿素 0.1, 合成微量元素(同上) 10ml。b. 苯酚 0.05, 尿素 0.1, 合成微量元素(同上) 10ml。

3. 固定化载体: 木屑 40g, 上述液体生长培养基 60ml。

4. 合成含酚废水(%): 苯酚 0.025, $MgSO_4$ 0.3, KH_2PO_4 0.3。

(二) 方 法

1. 耐酚实验: 将菌种分别接入不同含酚浓度的耐酚培养基, 30℃ 培养, 以无酚培养基作对照。

2. 游离菌丝培养: 取 250ml 三角瓶装液体培养基 150ml, 接种后于 30℃、200r/min 摇床培养 96 小时备用。

3. 固定化菌丝培养: 在直径 1.5cm、长 15cm 的试管中装上上述固定化载体, 接种后 30℃ 培养至菌丝长满。打碎试管, 取出固化菌丝柱并放在一起, 继续培养至分化子实体。收取子实体后将残余固化菌丝体放入冰箱保存备用。使用前 30℃ 温箱培养活化 1—2 天。

4. 碳源对照实验: 取游离菌丝碎片少许, 用葡萄糖对照培养基洗 3 次, 在研究型 Nikon 倒置显微镜上 30℃ 无菌培养并定时拍摄菌丝生长情况。从培养时间 t_0 照片上任选若干条菌丝, 分别测量其初长, 再从培养至时间 t 的照片上分别测量菌丝的终长。菌丝平均生长速度按下式计算:

$$\bar{v} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{L_i - L_{i0}}{t \cdot a \cdot b}$$

其中 $i = 1, 2, 3, \dots, n$, 为测量菌丝的总条数, L_{i0} 为菌丝初长 (mm), L_i 为菌丝终长, t 为培养时间 (小时), a 为显微镜放大倍数, b 为照片放大倍数。

另取菌丝用酚对照培养基重复该实验。

5. 菌丝对苯酚的降解: 容量为 1 升 (内径 6cm, 高 40cm) 的气升式反应器 (图 1) 装合成含酚废水 400ml, 游离菌丝 22g, 30℃ 培养。通气量分别为 30L/h 和 120L/h。定时测定残酚浓度。

用上述固化菌丝柱 5 根重复该实验。

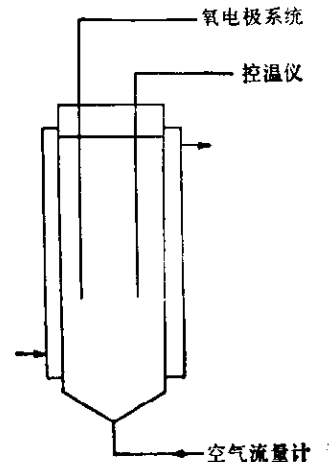


图 1 气升式反应器
容量 1 升 径高比 1:7

6. 苯酚的测定: 4-氨基安替比林法^[6]。

7. 溶氧测定: FCY-4型溶氧电极-XWCJ自动平衡记录仪系统。用不加菌丝的合成含酚废水充分通气搅拌时自动平衡记录仪记录数为溶氧100%,用RSS-5100数字式测氧仪标定该条件下的溶氧量为7.04mg/L。

结果与讨论

1. 菌丝对苯酚的耐受与利用: 该菌丝在pH3—7, 10—35℃均能正常生长。其中pH6—7, 25—30℃生长最好。用自然pH、含不同浓度酚的耐酚培养基30℃下培养时,菌丝在酚浓度≤0.064%段生长良好,酚浓度为0.072%时生长速度明显下降(图2)。

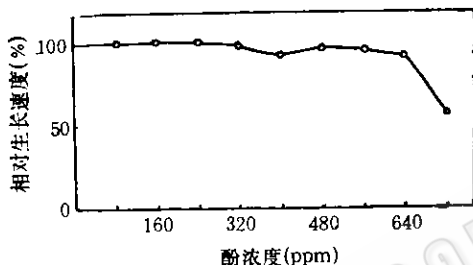


图2 菌丝对苯酚的耐受图。菌丝在不同酚浓度的斜面试管培养基上的生长速度(自然pH, 30℃)

葡萄糖作唯一碳源时菌丝的生长速度为 $\bar{V}_G = 0.027\text{mm/h}$,略高于苯酚作唯一碳源时的 $\bar{V}_P = 0.024\text{mm/h}$ 。但菌丝在酚作唯一碳源时仍能迅速生长且酚浓度下降,表明菌丝多酚氧化酶系确能有效分解利用苯酚。

2. 通气量对苯酚降解的影响: 不同通气量明显影响降酚速度(图3)。通气量30L/h的降酚时间比通气量120L/h的降酚时间长约1倍。

在整个降酚过程中降酚速度并不恒定。最初较慢而后加速并逐渐趋于恒定,表明菌丝由无酚环境转入有酚环境后有一个代谢调节适应期,一旦新的代谢模式形成则保持相应反应速度直至终点。

取菌丝镜检,在高或低通气时均未见菌丝形态变化。但分别将菌丝置冰箱保存数天后再次镜检,发现30L/h通气组的菌丝有自溶现象。因

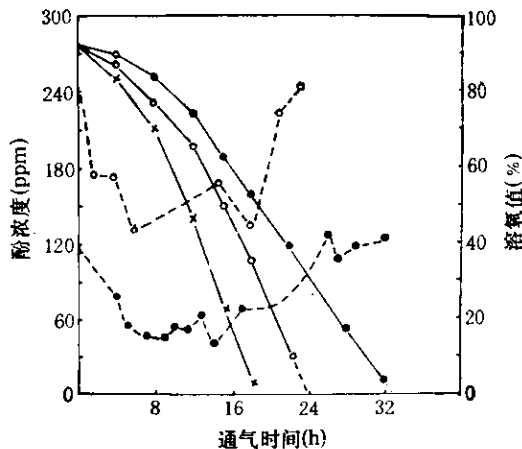


图3 通气量与降酚速度的关系 (×) 通气量120L/h降酚曲线 (○) 通气量80L/h降酚及溶氧曲线 (●) 通气量30L/h降酚及溶氧曲线 (---) 降酚曲线 (----) 溶氧曲线

为二组残酚浓度均<30ppm,可排除不同浓度残酚毒害作用的差异。菌丝在酚浓度高达640ppm,但通气良好的试管斜面上仍能正常生长,表明较高的通气可能有保护菌丝抵抗苯酚毒害的作用。

3. 游离菌丝与固化菌丝的重复使用性: 为进一步考查菌丝固化后的降酚特性,将游离菌丝与上述固化菌丝分别在通气80L/h和30L/h下重复使用。游离菌丝重复使用时降酚速度下降,降酚时间延长约50%;而固化菌丝重复使用时降酚速度却明显加快,降酚时间缩短50%;二者相差高达1倍以上(图4)。考虑到

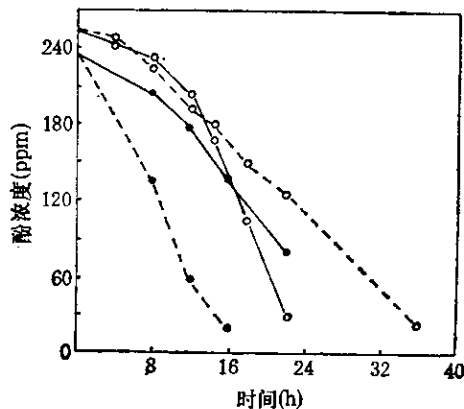


图4 游离菌丝与固化菌丝重复使用比较 (○) 游离菌丝通气80L/h (●) 固化菌丝通气30L/h (—) 第一次使用 (----) 重复使用

固化菌丝组的通气量不到游离菌丝组的50%，这种速度上的差异就更重要了，因为它将明显影响用于通气的能耗，即运行成本。

此外，值得注意的是本实验合成含酚废水不含其它氮源及碳源，因而游离菌丝组除由苯酚取得碳源外，处于氮饥饿状态。而固化组由于能从固化载体中不断取得氮源补充，因而能长期保持活性。这是二者重复使用时降酚效果不同的原因之一。在其它方法中，为保持菌体活性不得不在废水中补充氮源^[3]。这也是处理成本高、难于进入实用化的原因之一。

镜检发现，游离菌丝组的部份菌丝有老化现象，而固化菌丝组形态正常，原因可能包括两方面：其一，游离菌丝组处于氮饥饿状态，容易衰老。其二，固化作用本身对菌丝的保护作用。事实上，固定化本身明显延长被固定的酶或细胞的活性半衰期并减轻底物或产物的毒害作用是一种普遍现象^[7]。本实验中这种保护作用可能包括：第一，如前所述，高通气量将减小酚对菌丝的毒害，但低通气的固化菌丝反而比高通气的游离菌丝健壮，反映固定化确有增强细胞抵抗底物毒性的作用。第二，固化组通气量仅

为游离组通气量的40%左右，因而明显减小通气搅拌对菌丝的剪切损害。

药食兼用的野丝膜菌因含较高多酚氧化酶活性而有可能用于处理含酚废水。该菌可利用废弃纤维素作固定载体及营养源，因而收获子实体后的残余固化菌体，其固化成本可以不考虑。这是海藻酸钙等常规固化方法所无法比拟的。此外，该菌能以酚为唯一碳源，固化后菌丝的重复使用性和降酚速度明显改善，可大幅度降低通气量等特性均表明，该菌有希望成为有实用意义的降酚新途径，尚待进一步的研究。

参 考 文 献

1. 乌锡康等：有机水污染治理技术，华东化工学院出版社，上海，1989。
2. Klivanov A M et al.: *Biotech. and Bioeng.*, **11**: 373—398, 1981.
3. 周定等：环境科学，**11**(1): 2—5, 1990。
4. Ehrhardt H M et al.: *Applied Microbiology Biotech.*, **21**(1/2): 32—36, 1985.
5. Anselmo A M et al.: *Biotech. Letters*, **7**(12): 889—894, 1987.
6. 城乡建设环境保护部环境保护局：环境监测分析方法，中国环境出版社，1986。
7. Ichiro Chibata: *Immobilized Microbial Cells*, Academic Press, Inc. (London) **43**, 1983.