

文章编号:1000-2367(2011)06-0101-05

# 白腐真菌包埋技术研究

姚晶晶<sup>1,2</sup>, 胡长庆<sup>3</sup>, 傅慧娟<sup>2</sup>

(1. 西北师范大学 环境科学系, 兰州 730070; 2. 浙江万里学院 环境科学院, 江浙 宁波 315000;

3. 宁波市微生物与环境工程重点实验室, 江浙 宁波 315000)

**摘要:**利用海藻酸钠, K-卡拉胶、明胶、PVA 4 种载体对白腐真菌进行包埋, 然后对包埋后的白腐真菌进行复活试验, 通过对白腐真菌菌剂菌丝体生长的速度及浓密程度的比较来验证其复活率。同时综合保存效果、制备成本等来选择制备白腐真菌菌剂的优势载体。结果表明, 白腐真菌在 4 种不同的载体中性质稳定, 杂菌感染率减少。其中用 PVA 和海藻酸钠作为载体对白腐真菌进行包埋, 制备而成的菌剂在本次实验中显示了最佳效果。但考虑到包埋交联过程中 PVA 放热以及试剂本身的毒性, 因此在白腐真菌处理有机固体废物时, 海藻酸钠小珠包埋法应是一种适合的选择。

**关键词:**白腐真菌; 包埋技术; 复活率; 菌丝体生长

**中图分类号:** X703. 1; TQ085

**文献标志码:** A

白腐真菌是一种能够引起木材白色腐朽的担子菌, 它能降解各种结构相异化学物质, 包括在环境中持久且难以处理的污染物, 尤其对木质素的降解能力强, 因而越来越多的应用在环境保护和环境治理领域<sup>[1]</sup>。

一直以来白腐真菌在处理有机固体废物时存在问题是: 一方面, 白腐真菌降解率本身不高, 降解性酶活性又低; 尤其是本来为了提高营养及氧的传质效率而采取的搅动措施, 却产生了机械剪切力, 反而导致胞外酶失活和降解反应机器的关闭<sup>[2-3]</sup>。此外由于白腐真菌生理生化活动特点, 即多细胞形态特点, 使菌体固定化后丝状生长对固定化结构的破坏; 降解反应对环境的苛刻, 与形成固定化结构或维持结构定性等的条件相对立<sup>[4]</sup>。包埋技术能解决这种有利于营养和氧供给所必须建立的动态反应体系与胞外酶容易受到伤害之间的矛盾, 是目前最有效的手段之一。由无毒凝胶载体包埋制成的凝胶小球通常表面有一层较薄的均匀球壳, 结构为外部密、内部疏且呈蜂窝状, 有大量孔洞, 可以包埋许多微生物<sup>[5-6]</sup>。这种多孔结构有利于微生物的包埋、基质及降解产物的传递, 凝胶表面的球壳还可以阻止生物从小球泄出<sup>[7-8]</sup>。本研究尝试用不同载体对白腐真菌进行包埋, 通过复活测定, 外观形态观察、保存时间验证等寻求一种经济可行的白腐真菌包埋手段。

## 1 实验材料

### 1.1 菌种

本研究选用的菌种为黄孢原毛平革菌, 凤尾菇, 平菇, 香菇 4 种白腐真菌。

### 1.2 菌种培养材料和实验试剂

土豆滤液; PDA 培养基(土豆琼脂培养基); YG 培养基(组织液培养基)、葡萄糖、琼脂、酵母浸汁膏、海藻酸钠、氯化钙、明胶, K-卡拉胶、聚乙烯醇、 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸钾缓冲液(pH 7.6)、 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的戊二醛( $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸钾缓冲液 pH 7.6)。以上化学试剂均为分析纯。

## 2 实验方法

收稿日期: 2011-05-24

作者简介: 姚晶晶(1986-)女, 浙江诸暨人, 西北师范大学硕士研究生, 主要研究方向: 环境科学城市生态。  
(C)1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

## 2.1 白腐真菌菌种的复活与续代培养

配制 PDA 固体培养基,在 121 °C,1.2 个大气压下灭菌 30 min,用接种环从斜面培养基中取一小块母种,接种到有 PDA 培养基的培养皿上,在 30 °C 的恒温培养箱中培养,直至菌丝体长满整个培养基。再按上述的方法,用打孔器从复活培养后的培养基中取一块圆形菌丝块做母种,植入新的 PDA 培养基中进行培养,大约经过 7~10 d 菌丝体长满整个培养基。

## 2.2 白腐真菌菌丝体的纯培养

配制一定量 YG 培养基,量取 100 mL 培养基于组织培养瓶中,在 121 °C,1.2 个大气压下灭菌 30 min,等冷却后,用接种环从斜面培养基中取一块圆形薄厚适当的菌丝块做母种,接种到 YG 培养基上,使菌丝块漂浮在培养基上,放入 30 °C 的恒温培养箱中培养,大约经过 10~15 d 菌丝体长满整个培养基。

## 2.3 白腐真菌包埋方法

2.3.1 海藻酸钠小珠包埋法 将 2 g 海藻酸钠溶于 60 mL 蒸馏水,108 °C 灭菌 10 min。取相当于 150 mg 干重的白腐真菌的鲜重菌团,过滤,碾磨,加入到 40 mL 蒸馏水中,形成细胞悬浮液。两部分相混合,获得 2% 海藻酸盐溶液。将海藻酸钠与菌的混合液滴入 50 mL 的 2% 氯化钙中,2 h 完全硬化。多次洗涤制得海藻酸钠包埋小珠。

2.3.2 明胶小珠包埋法 取相当于 150 mg 干重的白腐真菌的鲜重菌团,过滤,碾磨,形成细胞悬浮液的浓缩液,与 15 mL 质量浓度分别为 20% 和 1.875% 的明胶和海藻酸钠在 40 °C 混合。将混合物冷却形成胶,浸在 40 g · L<sup>-1</sup> 氯化钙中,产生硬胶,切割成 2~3 mm 小块。用 0.05 mol · L<sup>-1</sup> 的磷酸钾缓冲液(pH 7.6)洗涤,使海藻酸钠与明胶复合物中的海藻酸盐渗漏出,直至洗涤干净。最后用 0.01 mol · L<sup>-1</sup> 的戊二醛(在 0.05 mol · L<sup>-1</sup> 的磷酸钾缓冲液 pH 7.6 中),交联 1h;用无菌水彻底洗涤制得明胶包埋小珠。

2.3.3 K-卡拉胶小珠包埋法 将 2 g K-卡拉胶溶于 60 mL 蒸馏水,108 °C 灭菌 10 min。取相当于 150 mg 干重的白腐真菌的鲜重菌团,过滤,碾磨,加入到 40 mL 蒸馏水中,形成细胞悬浮液。两部分相混合,获得 K-卡拉胶溶液。将 K-卡拉胶与菌的混合液滴入 50 mL 的 2% 氯化钙中,2 h 完全硬化。多次洗涤制得 K-卡拉胶小珠。

2.3.4 PVA 小珠包埋法 取相当于 150 mg 干重的白腐真菌的鲜重菌团,过滤,碾磨,形成菌的细胞悬浮液的浓缩液,与 60 mL 的 10% 的聚乙烯醇和 1% 的海藻酸钠在 50 °C 混合。将聚乙烯醇与菌的混合液滴入 50 mL 的 2% 的氯化钙中,2 h 完全硬化。多次洗涤制得 K-卡拉胶小珠。

## 2.4 白腐真菌菌剂复活试验

在无菌条件下,用接种环从斜面培养基中取几小块包埋小珠,接种到 PDA 培养基上,堆成半径为 0.5 cm 左右,在 30 °C 的恒温培养箱中培养,直至菌丝体长满整个培养基。

## 2.5 白腐真菌菌丝体伸长长度的测定

将白腐真菌的 4 种菌剂摆成半径大约为 0.5 cm 左右的小珠,白腐真菌菌丝体在培养基中呈同心圆伸长。用游标卡尺在实验当天就开始测量,以后每天进行测量。第一次测量时在每个培养皿中选取 4 个点,并作好标记,以后均在这 4 个点位进行测量,并求取其平均值作为菌丝体伸长长度。

# 3 实验结果及分析

## 3.1 白腐真菌菌剂的感观

白腐真菌经过 4 种材料即海藻酸钠、PVA、明胶和 K-卡拉胶的包埋形成相同直径白腐真菌菌剂(图 1)。从图 1 可得 PVA 包埋白腐真菌的机械强度(以手感确定)最大,略带点粘性,且成球较容易;以海藻酸钠包埋白腐真菌,尽管比 PVA 包埋的可操作性好,极易成球,但其机械强度却不及 PVA 包埋白腐真菌形成的菌剂。K-卡拉胶和明胶也有和海藻酸钠类似的特性,K-卡拉胶包埋白腐真菌形成的菌剂较湿,不易保存。

## 3.2 白腐真菌菌剂菌丝体的生长状况

黄孢原毛平革菌、香菇、凤尾菇、平菇是白腐真菌庞大家族中典型的代表。将这 4 种菌分别用海藻酸钠、PVA、明胶和 K-卡拉胶作材料进行包埋制成菌剂,然后对菌剂进行复活试验。每天观察菌丝体的生长长度。

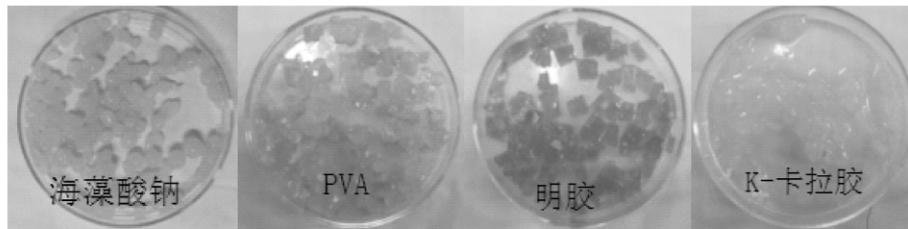


图 1 4 种白腐真菌菌剂的外观形

图 2 中 4 种菌剂复活培养实验的一开始可以看出显著差异,海藻酸钠包埋小珠和 PVA 包埋小珠复活菌丝体生长的速度、密度都优于明胶包埋小珠和 K-卡拉胶包埋小珠。

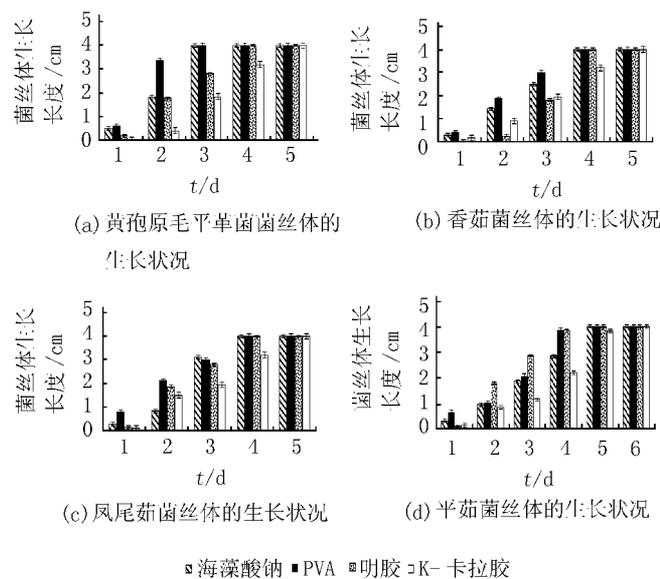


图 2 不同载体包埋的 4 种菌剂菌丝体的生长情况

经分析,得出该结果的原因是海藻酸钠,K-卡拉胶,明胶是一类天然高分子凝胶载体,虽对生物无毒,传质性能较好,但强度较低,在厌氧条件下易被微生物分解,此外,白腐真菌的比氧吸收率随着胶体小珠中细胞量的增加随载体的浓度升高而减低,真菌为获得氧而集中生长在小珠表面.菌丝体在小珠表面形成一种绒毛状覆盖物,随着小珠菌丝体量的增加,比氧吸收的速度呈抛物线状下降,生长缓慢.而 PVA 是一类有机合成高分子凝胶载体,交联过程中放热以及试剂本身的毒性,常常使细胞活性降低,但白腐真菌的菌胶团抵抗逆境作用较强,故在实验中处于优势地位。

### 3.3 白腐真菌菌剂的保存效果

白腐真菌菌剂是为减少感染率,可以进行低温保存,保存的效果可以通过白腐真菌菌剂的感观变化和复活率来体现。

经过一个月的低温保存,不管从色泽光度还是触感硬度都可以看到 PVA 包埋小珠同样是独占鳌头,与一个月前的 PVA 包埋小珠外表和手感都相差不大.海藻酸钠包埋小珠和明胶包埋小珠的状况相似,在整个过程中 K-卡拉胶包埋小珠的湿度比其他 3 种小珠的湿度更大些。

图 3 分析了 1 个月前后黄孢原毛平革菌包埋小珠的复活率变化,总体上黄孢原毛平革菌包埋小珠的复活率都没下降,其中 PVA 小珠包埋法仍然占有优势,使用这种复活方法增长的速率快,并且比较稳定,感染率少.其他 3 种包埋小珠的复活率也没随着时间的延长而下降。

图 4 中香菇的总体复活增长速率快,并且比较稳定,感染率少.明胶包埋法和 K-卡拉胶包埋法的复活率

也没随着时间的延长而下降.

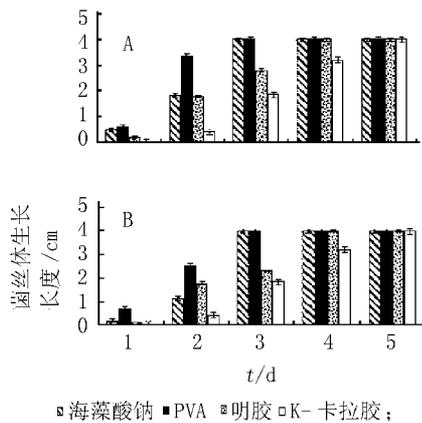


图3 黄抱原毛平革菌保存前后菌丝体的生长状况

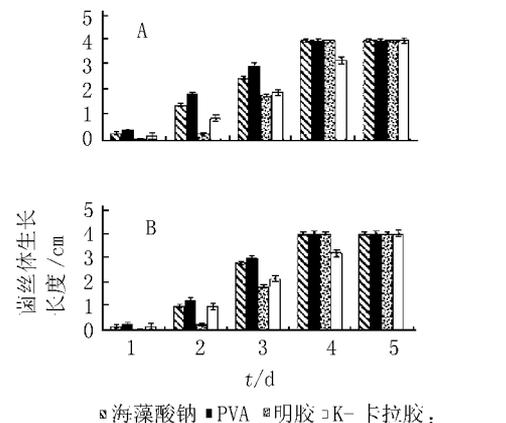


图4 香菇保存前后菌丝体的生长状况

图5显示了1个月前后凤尾菇包埋小珠的复活率都没下降,其中PVA小珠包埋法和海藻酸钠小珠包埋法对于包埋凤尾菇来说仍然占有优势.但明胶包埋法和K-卡拉胶包埋法包埋凤尾菇的复活率也没随着时间的延长而下降.

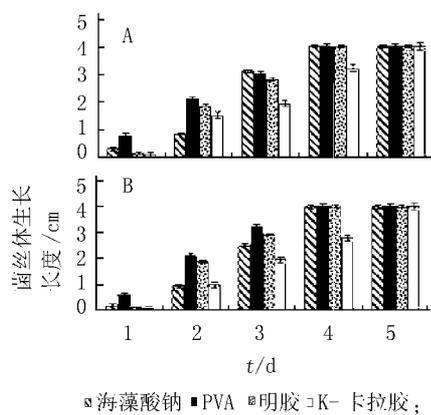


图5 凤尾菇保存前后菌丝体的生长状况

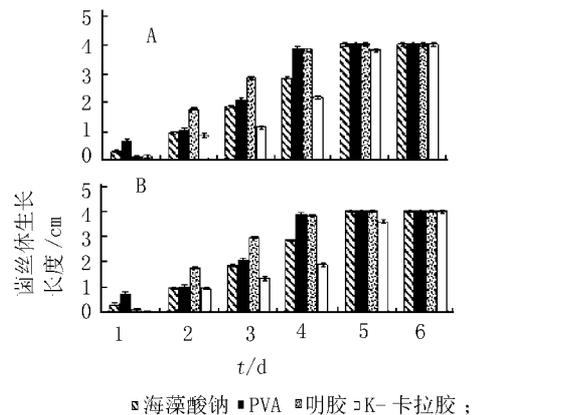


图6 平菇保存前后菌丝体的生长状况

从图6以看到在一个月后平菇包埋小珠的复活率都没下降,其中PVA小珠包埋法、海藻酸钠小珠包埋法和明胶小珠包埋法对于包埋凤尾菇来说仍然占有优势.但K-卡拉胶包埋法的复活率也随着时间的延长反而下降,也说明K-卡拉胶包埋法不适合做包埋材料包埋平菇.

综上所述,可以清楚的比较出,虽然保存了1个月,但对于各种方法形成的包埋小珠的成活率并没有减退,而PVA小珠包埋法和海藻酸钠小珠包埋法仍然是这4种菌最适合的包埋方法.对于平菇来说用K-卡拉胶作为载体时处于劣势地位.

### 3.4 制备成本分析

包埋法优于其他技术的原因除了其具有微生物密度高、反应速度快、耐毒害能力强、微生物流失少、产物易分离、处理设备小等优点,还更经济实惠.包埋材料的选择原则是成本低廉、操作简单、包埋固定化微生物活性高和使用寿命长等.除了要观察比较包埋小珠的复活率之外,制备成本也是值得关注的.本实验的使用各种材料的具体情况如表1.从表1中可以很明确的看出是海藻酸钠小珠包埋法在包埋150 mg干重的白腐真菌时所用的费用最少仅为0.32元,故是最便宜实惠的包埋方法,PVA包埋法次之,K-卡拉胶包埋法是这四种包埋法中花费最多一种包埋方法.

## 4 总 结

实验主要对黄孢原毛平革菌、香菇、平菇、凤尾菇四种菌分别采用海藻酸钠包埋法、K-卡拉胶包埋法、明胶包埋法、PVA 包

埋法这 4 种方法进行制备成菌剂,复活再试验,可以得出白腐真菌适合这几种包埋方法.从外形观察,海藻酸钠包埋小珠、K-卡拉胶包埋小珠、明胶包小珠、PVA 包埋小珠在色泽光度、硬度、弹性都不会随时间的改变而变质,并且 PVA 包埋小珠始终处于优势地位.从菌剂复活培养情况观察,PVA 和海藻酸钠小珠包埋方法最适合.从制备成本来观察,海藻酸钠小珠包埋法占优势,而 PVA 小珠包埋比海藻酸钠小珠多 0.04 元/150mg,但其菌剂复活培养情况比海藻酸钠小珠菌剂复活培养情况好,也是较理想的选择.所以综合以上状况得出海藻酸钠小珠包埋法和 PVA 小珠包埋法是最适合白腐真菌进行包埋的方法.

在处理有机固体废物时,PVA 小珠包埋法虽然操作性好,极易成球,包埋小珠的复活率高但是在交联过程中放热以及试剂本身的毒性会影响有机固体废物,因此可以得到在白腐真菌处理有机固体废物时,海藻酸钠小珠包埋法是最适合选择.

表 1 4 种材料的制备成本比较

规格	海藻酸钠/元	聚乙烯醇/元	明胶/元	K-卡拉胶/元
材料(1 g)	0.16	0.08	0.128	0.4
本次实验材料	0.32	0.36	0.38	0.8

## 参 考 文 献

- [1] 吴林林,阮宇鹰.白腐真菌在环境保护中研究与应用进展[J].上海化工,2006,(6):8-10.
- [2] Yang D Q, Zeng H P. Regio2and diastereoselectivity of Rhodi2um2catalyzedring opening reaction of oxabenzonorbomadieneswith heteroatom nucleophiles[J]. Chinese ChemLett,2005,14:697.
- [3] 徐 容,汤岳琴.固废菌体吸附铅与定化产黄青霉脱附平衡[J].环境科学,2007,19(4):72-75.
- [4] 葛文准,荣呈辉.固定化微牛物法处理氨氮废水[J].上海环境科学,2005,17(4):7-12.
- [5] 王 平,张洪林,蒋林时.固定化细胞技术在废水处理中的应用[J].东北大学学报:自然科学版,2004,5(12):77-79.
- [6] 刘宏斌,刘转年,金奇庭.固定化微生物在废水处理中的应用[J].环境污染治理技术与设备,2005,3(5):61-65.
- [7] 朱 鸣,硝 化.细菌包埋固定化及其在废水处理中的应用[J].环境保护,2004,(16):65-67.
- [8] 王建龙.生物固定化技术与水污染控制[M].北京:科学出版社,2004:10-11.

## Entrapment Technique of White-rot Fungi

YAO Jing-jing<sup>1,2</sup>, HU Chang-qing<sup>3</sup>, FU Hui-juan<sup>2</sup>

(1. Department of Environmental Science, Geography and Environment University, Lanzhou 730070, China; 2. Department of Environmental Science, Zhejiang Wanli University, Lanzhou 315000, China; 3. Ningbo Key Lab of Microorganism and Environmental Engineering, Ningbo 315000, China)

**Abstract:** This study ,using sodium alginate, K-carrageenan, gelatin, PVA as agents for the white-rot fungi preparation by entrapment technique, does the revivable test of white-rot fuugi which is entrapped, through comparing the growth rate and the extent dense of White-rot fungi preparation mycelium to validate the revival of the rate. At the same time, it also the keeping effect and preparation costs to find out the best carrier agent for the white-rot fuugi preparation. The results show that white-rot fuugi which is in various Matrices by entrapment technique has stable character and fewer bacteria. Using PVA and sodium alginate as agents for preparation of white-rot fungi by entrapment technique in this experiment shows the best results. However, considering the release of heat and toxic reagents of PVA in the process of entrapment, therefore it uses the calcium alginate as agents for the white-rot fuugi preparation by entrapment technique which is a fit choice in the White-rot fungi treatment of organic solid wastes.

**Key words:** white-rot fuugi; entrapment technique; revival of the rate; growth of dense mycelia