同时培养法与吸附法微生物固定化对比

山 丹[1,2], 马 放[1], 张 斯[1], 王 晨[1,3]

(1. 哈尔滨工业大学 城市水资源与水环境国家重点实验室, 150090 哈尔滨; 2. 中日友好环境保护中心, 100029 北京; 3. 中国国际工程咨询公司, 100044 北京)

摘 要: 为寻找一种适用于菌丝球生物质载体高效、快捷的微生物固定化方法,分别采用同时培养法和吸附法将高效苯胺降解细菌 JH-9 固定于黑曲霉菌 Y3 形成的生物质载体菌丝球上,并对两种微生物固定化方法所形成的混合菌丝球的特性和内部结构进行对比. 结果表明:在接种细菌数量相同的条件下,同时培养法固定化细菌所用的时间缩短,且在单位时间内固定的细菌数量更多. 同时培养法形成的混合菌丝球堆积体积更大,成球总数量更多,球体直径较小,总质量和总相对密度也较小. 当采用同一种固定化方法时,混合菌丝球的堆积体积、成球大小与功能菌的接种量成正比;而形成混合菌丝球的总质量和总相对密度却与功能菌的接种量成反比. 同时培养法形成的混合菌丝球内部细菌非常均匀地排列生长在每一根菌丝上.

关键词: 微生物固定化;同时培养;菌丝球;吸附

中图分类号: **文献标志码:** A **文章编号:** 0367-6234(2012)04-0053-05

Comparative study of two immobilization technology —simultaneity culture and adsorption

SHAN Dan[1,2], MA Fang[1], ZHANG Si[1], WANG Chen[1,3]

(1. State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, 150090 Harbin, China;
2. China-Japan Friendship Centre for Environmental Protection, 100029 Beijing, China;
3. China International Engineering Consulting Corporation, 100044 Beijing, China)

Abstract: To find a method of microbial immobilization which was efficient, fast and applied to biomass carrier — mycelial pellet, bacteria JH-9 were immobilized onto mycelial pellet formed by Aspergillus Y3. And the characteristics and internal structure of two different immobilization methods were compared. The simultaneity culture immobilization method could immobilize more bacteria and with little time with same bacteria inoculation count. Moreover, the volume and quantity of combined mycelial pellets formed by simultaneity culture immobilization method were bigger than that by adsorption immobilization method, and its diameter、weight and relative density were smaller. To immobilize with the same method, the size and volume of combined mycelial pellets were in direct proportion to the inoculation count of engineering bacteria, whereas its weight and relative density were opposite. Bacteria were immobilized and grew on each mycelium of combined mycelial pellets formed by simultaneity culture immobilization method.

Key words: microorganism immobilization; simultaneity culture; mycelial pellets; adsorption

微生物固定化技术是指将微生物通过一定的技术手段(如利用载体材料、包埋物质或合理控制水力条件等)保持在反应器内. 菌丝球是由霉菌的自絮凝现象产生的具有一定机械强度和大小的球体,它除了具有生物活性良好、沉降速度快、易于固液分离等优点外,吸附和降解效能近来也被广泛关注[1-4]. 目前,国外主要注重对菌丝球基础理论和结构方面的研究,国内的研究则大多是

收稿日期: 2011-01-10.
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51178139);国家创新研究群体科学基金资助项目(51121062);黑龙江省杰出青年科学基金资助项目(JC200601).
作者简介: 山 丹(1980—),女,博士;
马 放(1963—),男,教授,博士生导师.
通讯作者: 马 放,mafang@hit.edu.cn.

面向应用的[5-7]. 菌丝球在工业废水处理方面的研究起步比较晚,目前还没有实际应用的例子,实验室研究也只涉及到对重金属废水和印染废水的吸附[8-13]. 应用菌丝球作为载体是最新的研究方向,文献[14]以曲霉形成的菌丝球吸附并固定产氢细菌——产酸克雷伯氏菌进行连续流产氢,解决了产氢菌流失和产氢速率降低的问题,实现了霉菌和功能菌的生态位分离,将各自的功能有机地结合到了一起. 但是,考虑到采用吸附法向菌丝球上固定化微生物的方法操作步骤繁琐、耗时、固定微生物量有限、形成的混合菌丝球内部微生物分布不均匀,势必影响固定化微生物的活性和整个球体的传质效果. 本实验为菌丝球这种新型生物质载体提出了一种新的固定化方法——同时培养法,并以高效低温苯胺降解细菌 JH-9 作为研究对象,对同时培养和吸附两种固定化方法作了对比研究,为混合菌丝球的实际应用提供了有力的理论基础.

1 实 验

1.1 实验材料

1.1.1 仪器和试剂

用于本试验的设备主要为 8037—SGS 超型全自动压力蒸汽灭菌器、ZHWY—2112B 型双层全温度恒温振荡器、紫外分光光度仪(UNICAMHEλIOS)、CX31 型显微镜、电子天平(ALC-210.4)、显微数码成像系统、垂直流超净工作台、鼓风干燥箱、石蜡切片机.

1.1.2 菌种来源

实验所用曲霉 Y3 和细菌 JH-9 都是实验室菌种库保存菌种. 其中,Y3 是由空气中分离得到的,该菌能在纯培养的条件下自絮凝成球;JH-9 是由某化工厂污水处理厂曝气池活性污泥中分离得到,该菌能以苯胺为唯一碳源和氮源,在 7 ℃的低温条件下,培养 52 h 对初始质量浓度为 150 mg/L 的苯胺去除率可达 100%.

1.2 实验方法

1.2.1 单纯霉菌菌丝球的培养

配置液体培养基,121 ℃,灭菌 20 min,接种孢子悬液,于 160 r/min、37 ℃的摇床中培养 24 h.

1)菌丝球生长培养基成分. 蔗糖 30 g,NH_4Cl 0.5 g,$K_2HPO_3 \cdot H_2O$ 0.1 g,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g,$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g, H_2O 1 000 mL.

2)孢子悬液的配置. 用无菌的生理盐水冲洗长有曲霉菌的斜面固体培养基的表面,用接种环轻刮斜面,直至菌体被完全冲洗下来. 轻轻震荡试管,使悬液中的孢子呈均匀分散状态. 用可见分光光度计在波长 620 nm 下测其吸光度 (A).

$$\text{接种量} = \frac{0.25 \times 0.1\% \times \text{液体培养基体积}}{\text{孢子悬液吸光度}(A)}.$$

3)菌丝碎片的制备. 用量筒取球龄 4 d 的菌丝球,静置 30 min. 使菌丝球充分沉降,量取量筒底部沉降下来的菌丝球 150 mL,用无菌水稀释至 300 mL 倒入粉碎机中 1 800 r/min,粉碎 30 s,制成混合均匀的菌丝片段悬液.

1.2.2 混合菌丝球培养方案

取低温条件下的 JH-9 培养液在 12 000 r/min 下离心 5 min,然后弃离心上清液,用磷酸盐缓冲溶液清洗离心管底部的菌体,在上述条件下再次离心,如此操作两次. 洗菌后将离心管底部的菌体取出,用适量无菌水配成均匀菌悬液. 按照菌丝球片段繁殖和孢子繁殖这两种不同的繁殖方法,分别采取同时和先后接种的方法培养混合菌丝球,并以不接种 JH-9 细菌的单纯菌丝球作为对照(具体实验设计方案见表 1).

表 1 混和菌丝球培养方案

方案编号	菌丝球传代方式	功能菌接种方式
1	孢子传代	同时接种
2	孢子传代	菌丝球培养 2 d 后接种
3	菌丝碎片传代	同时接种
4	菌丝碎片传代	菌丝球培养 2 d 后接种

注: 分别以孢子传代和菌丝碎片传代两种传代方式培养的未接种功能菌的单纯菌丝球作为空白.

1.2.3 菌丝球直径的测定

随机选取 10 个菌丝球,用滤纸吸去菌丝球外表面水分. 吸取的水分应适量,保证菌丝球不因失去过多水分而变形. 然后以游标卡尺量取直径数值. 菌丝球直径表示为 10 个菌丝球直径的平均值.

1.2.4 成球堆积体积测定方法

将 250 mL 三角瓶中的菌丝球培养液倒入一个 200 mL 量筒中,静置 10 min,读取菌丝球沉降体积作为成球堆积体积.

1.2.5 菌丝球形态观察

将接种后的液体培养基置于 160 r/min, 37 ℃摇床培养,当菌丝球培养到直径 1 ~ 2 cm 时,将菌丝球接入培养皿中用数码照相机拍照观察外观形态,而后将菌丝球切开用扫描电子显微镜观察其微观菌丝形态和混合菌丝球生态构成.

1.3 实验过程

1.3.1 不同固定化方法对混合球成球速度的影响

将霉菌 Y3 和菌株 JH-9 分别以同时接种培养

(向培养液中同时接种 Y3 和 JH-9)和吸附法培养(在培养液中先接种 Y3 待培养 48 h 菌丝球形成时向培养液中接种 JH-9)的方式形成混合菌丝球,两种接种方式中霉菌 Y3 初始的接种量相等,而工程菌 JH-9 的初始接种量分别为 5、10、20 mL(母液细菌量 1.2×10^9/mL). 每隔 8 h 测定培养液的吸光度 *A*.

1.3.2　不同固定化方法对混合菌丝球成球堆积体积的影响

按照 1.3.1 中所述的两种方法进行固定化,培养混合菌丝球. 当培养液的吸光度值 *A* 降为 0 时,将培养液中混合菌丝球移至量筒,静止沉降 30 min 后测量全部菌丝球堆积体积,本实验以单纯霉菌菌丝球作对照.

1.3.3　不同培养方法对混合菌丝球成球大小的影响

按照 1.3.1 所述的两种方法进行固定化,培养混合菌丝球. 当培养液的吸光度值 *A* 降为 0 时,随机各取不同固定化方法形成的混合菌丝球 10 个,分别测量其直径 *d* 的大小, 取其平均值作为菌丝球的大小(这里所指成球大小即菌丝球的直径 *d*).

1.3.4　不同培养法对混合菌丝球总质量和相对密度的影响

按照 1.3.1 中所述的两种方法进行固定化,培养混合菌丝球. 当培养液的吸光度值 *A* 降为 0 时,将不同固定化方法形成的全部混合菌丝球从三角瓶中取出,去除多余水分(吸取量控制在不使菌丝球变形为宜)后放至已恒重的蒸发皿中,置于烘箱,95 ℃烘干至恒质量,读取皿和球的总质量,去掉空皿质量得到混合菌丝球的总质量. 成球总相对密度定义为成球总质量除以成球堆积体积.

1.3.5　混合菌丝球内部形态观察

采用同时培养法和吸附法培养混合菌丝球,随机取两种混合菌丝球各 1 个,切开后在扫描电子显微镜下观察其内部形态结构,同时以没有固定化细菌的单纯霉菌菌丝球内部形态结构作对比.

2　结果分析

2.1　不同固定化方法对混合菌丝球成球速度的影响

将霉菌 Y3 和功能菌 JH-9 分别以同时培养(向培养液中同时接种 Y3 和 JH-9)和吸附法培养(在培养液中先接种 Y3 待培养 48 h 菌丝球形成时向培养液中接种 JH-9)的方式形成菌丝球,两种接种方式中霉菌 Y3 初始的接种量相等,而功能菌 JH-9 的初始接种量分别为 5、10、20 mL(母液细菌量 1.2×10^9/mL). 每隔 8 h 测定培养液的吸光度 *A*. 如图 1、2 所示,不论同时培养法还是吸附法,培养液的吸光度值自接种时起一直持续降低,最后降为 0. 不同接种量的同时培养法培养液吸光度值都在 72 h 降为 0. 而吸附法只有接种 5 mL菌液的培养液在培养 72 h 时吸光度值降为 0. 同时培养法固定化细菌的时间比先后接种法要短. 将培养液吸光度降为 0 视为混合菌丝球成球完全, 以单位时间内培养液吸光度值 *A* 减少量 *V* 来表示混合菌丝球的成球速度, 将以上数据重新整理,以混合菌丝球成球速度成图,结果如图 3 所示.

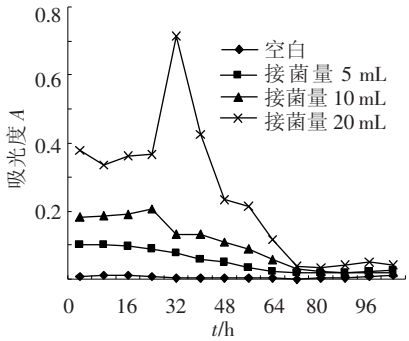


图 1　同时培养法不同接种量对成球的影响

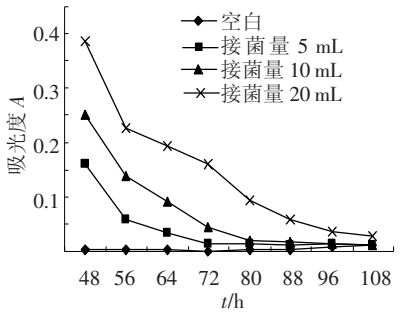


图 2　吸附法不同接种量对成球的影响

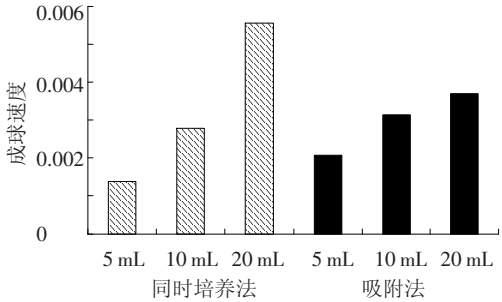


图 3　不同固定化方法对混合菌丝球成球速度的影响

由图 3 可以看出,随着 JH-9 接种量的增加混合菌丝球的成球速度逐渐提高,即霉菌数量一定时,混合菌丝球的成球速度与功能菌的接种量成正比. JH-9 接种 5 mL 时,同时培养法成球速度小于先后接种培养法;JH-9 接种 10 mL 时,同时培养法与吸附法成球速度基本相等;JH-9 接种

20 mL时,同时培养法成球速度明显大于吸附法.这说明在相同的培养条件下同时培养法能够以更快的速度固定化更多的细菌,其单位时间内固定化细菌量更多.

2.2　不同固定化方法对混合菌丝球成球堆积体积的影响

当培养液吸光度降为 0 以后,将培养液中混合菌丝球取出以量筒测量全部菌丝球堆积体积,以单纯霉菌菌丝球作对照,结果如图 4 所示. 可以看出,随着 JH-9 接菌量的增多,最终形成混合菌丝球的体积也增多,即混合菌丝球的堆积体积与功能菌的接种量成正比. 同时培养法比吸附法所形成的混合菌丝球堆积体积略大一些.

2.3　不同固定化方法对混合菌丝球成球大小的影响

随机各取不同固定化方法形成的混合菌丝球 10 个,分别测量其直径大小,再取平均值作为菌丝球的平均大小. 不同固定化方法形成的混合菌丝球成球大小如图 5 所示,可以看出,相同接种量的条件下,同时培养法形成的混合菌丝球直径比吸附法的小,且成球总数量多. 接种方法相同时,混合菌丝球的大小随着接种细菌数量的增多而变大.

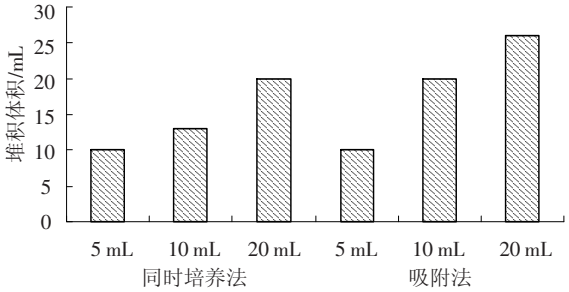


图 4　不同固定化方法对混合菌丝球成球堆积体积的影响

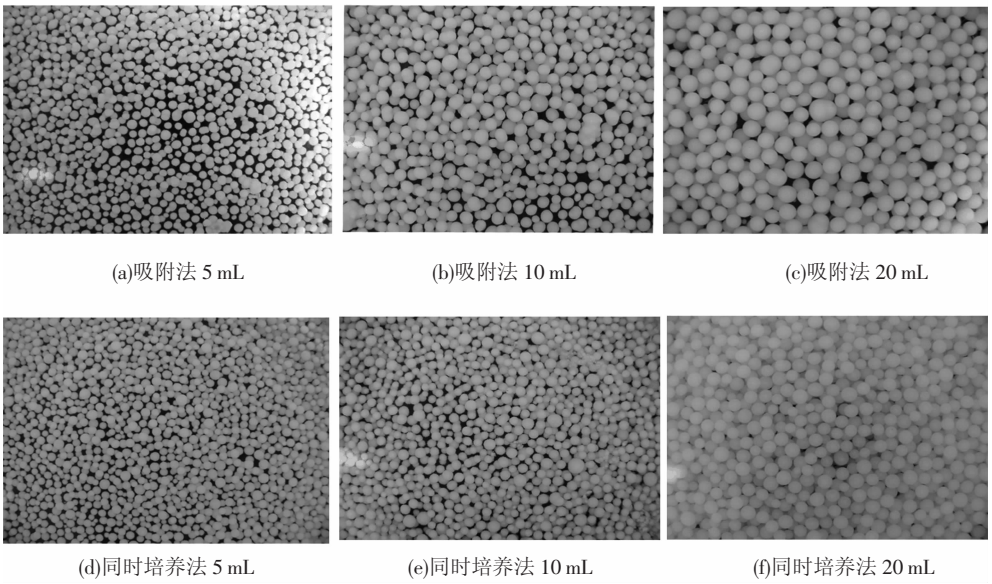


图 5　不同固定化方法对混合菌丝球成球大小的影响

2.4　不同固定化方法对混合菌丝球总质量和总相对密度的影响

将不同固定化方法形成的全部混合菌丝球从三角瓶中取出,尽量去除多余水分后放到已经恒重的蒸发皿中,吸取量控制在不使菌丝球变形为宜,将处理好的菌球置于烘箱内,95 ℃烘干至恒质量,读取皿和球的总质量,去掉空皿质量得到混合菌丝球的总质量. 以成球总质量除以成球堆积体积即定义为成球总相对密度.

由图 6 可以看出,当细菌接种量相同时,同时培养法形成的混合菌丝球的总质量和总相对密度都要小于吸附法形成的混合菌丝球;而相同固定化方法,随着细菌接种量的增加形成混合菌丝球的总质量和总相对密度却减少.

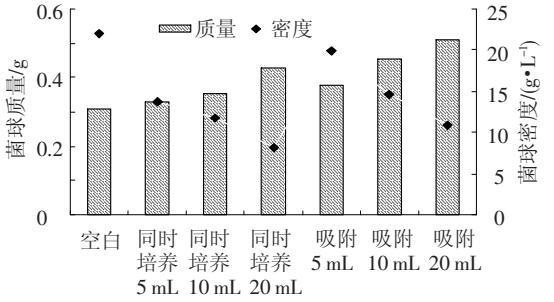
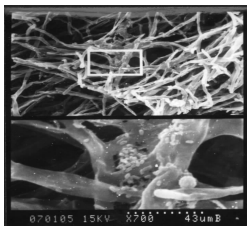


图 6　不同固定化方法对混合菌丝球成球总质量和密度的影响

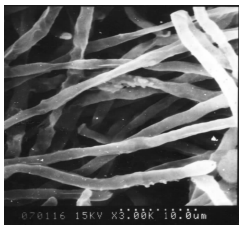
2.5　不同固定化方法对混合菌丝球内部形态的影响

分别采用同时培养法和吸附法培养混合菌丝球,随机取两种混合菌丝球各 1 个,切开后在扫描电子显微镜下观察其内部形态结构,同时以没有固定化细菌的单纯霉菌菌丝球内部形态结构作对比,

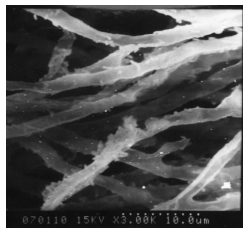
结果如图 7 所示. 可以看出:图 7(a)中采用吸附固定化方法形成的混合菌丝球内部的细菌只固着在菌丝交叉形成平台的地方,而在没有交叉的菌丝上就没有细菌存在;而图 7(c)中采用同时培养固定化方法形成的混合菌丝球内部,细菌是非常均匀地排列生长在每一根菌丝上,无论菌丝交联与否,而且单位面积上固定化生长的细菌数量也明显多于图7(a)的混合菌丝球. 而且,图7(c)中细菌均匀排列,很少出现堆积和分层的现象,不影响菌丝球内部的能量和氧的供给,不会影响菌丝球对内部细菌的传质,这样被固定的细菌就能够保持较高的活性,更有利于在水处理工艺中的应用.



(a) 吸附法形成的混合菌丝球扫描电镜照片(上图×700 倍,下图 3 500 倍)



(b) 单纯霉菌菌丝球的扫描电镜照片(×3 000 倍)



(c) 同时培养法形成的混合菌丝球扫描电镜照片(×3 000 倍)

图 7　不同固定化方法形成的混合菌丝球内部形态结构的扫描电子显微镜照片

3　结　论

1)相同接种量的条件下,同时培养法固定化细菌所用的固定化时间缩短,而且在单位时间内可固定化细菌量更多. 同时培养法与吸附法所形成的混合菌丝球相比,其堆积体积更大,成球总数量更多,球体直径较小,总质量和总相对密度也较小.

2)当采用同一种固定化方法时,混合菌丝球的堆积体积、成球大小与功能菌的接种量成正比;而形成混合菌丝球的总质量和总相对密度却与功能菌的接种量成反比.

3)同时培养法形成的混合菌丝球内部细菌非常均匀地排列生长在每一根菌丝上,无论菌丝交联与否;而吸附法形成的混合菌丝球内部,细菌只存在于多条菌丝交叉形成平台的地方. 所以,新型微生物固定化方法可能会有效解决传统方法的传质效率低、固定生物量低、成本高等问题,具有较大的开发潜力和应用价值.

参考文献:

[1] 张一竹, 王清棋, 刘剑书等. 橘青霉菌丝球形成条件及其处理废水的应用[J]. 氨基酸和生物资源, 2003, 25(1):44 – 46.

[2] 袁丽梅, 张书军, 杨敏,等. 应用气升式反应器培养草酸青霉菌菌丝球的研究[J]. 微生物学报, 2004, 44(3): 39 – 395.

[3] BIZUKOJC M, LEDAKOWICZ S. Physiological, morphological and kinetic aspects of lovastatin biosynthesis by aspergillus terreus[J]. Journal of Biotechnology, 2009, 4: 647 – 664.

[4] SARASWATHY A, HALLBERG R. Mycelial pellet formation by penicillium ochrochloron species due to exposure to pyrene[J]. Microbiological Research, 2005, 160(4): 375 – 383.

[5] WUCHERPFENNIG T, KIEP K A, DRIOUCH H, *et al*. Morphology and rheology in filamentous cultivations[J]. Advances in Applied Microbiology, 2010, 72: 89 – 136.

[6] HILLE A. Effective diffusivities and mass fluxes in fungal biopellets[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2009, 103: 1202 – 1213.

[7] 姜绍通, 吴学凤, 潘丽军, 等. 米根霉菌丝球半连续发酵产乳酸的工艺研究[J]. 农业机械学报, 2009, 40(11): 150 – 155.

[8] 曹晓婷, 熊小京, 郑天凌, 等. 黑曲霉菌丝球对直接耐晒翠蓝 FBL 的脱色特性[J]. 华侨大学学报:自然科学版, 2008, 29(1): 34 – 37.

[9] 范天黎, 席宇姚, 东升, 等. 土曲霉 M11 菌丝球对结晶紫的吸附脱色研究[J]. 化学与生物工程, 2010, 27(3): 77 – 79.

[10] 肖继波, 胡用有. 烟曲霉菌吸附染料的解析及其机理[J]. 环境科学与技术, 2008, 31(5): 18 – 22.

[11] 刘桂萍, 陈晓霞. 霉菌 Dh-B1 菌丝球吸附铅离子的研究[J]. 沈阳化工大学学报, 2008, 22(3): 218 – 221.

[12] 吴涓, 钟升, 李玉成. 黄孢原毛平革菌对 Pb^{2+} 的生物吸附特性及吸附机理[J]. 环境科学研究,2010,23(6):754 – 761.

[13] 王慕华, 徐宏英, 苏槟楠. 黑曲霉菌丝球还原水中六价铬的研究[J]. 科学技术与工程, 2010, 10(26): 6472 – 6477.

[14] 黄锦丽, 龙敏南, 傅雅婕,等. 产酸克雷伯氏菌吸附固定及其产氢研究[J]. 厦门大学学报, 2005, 44(5): 710 – 713.

(编辑　刘　彤)