文章编号：1674－9057(2020)01－0177－05 doi:10.3969/j.issn.1674－9057.2020.01.023

胞外聚合物在白腐真菌去除镉过程中的作用

吴 磊[1,2]，张学洪[1]，李宁杰[1]，陈中维[1]，兰 琪[1]，刘 洁[1]

(1. 桂林理工大学 a. 环境科学与工程学院；b. 广西环境污染控制理论与技术重点实验室，广西 桂林 541006；
2. 南京水利科学研究院，南京 210029)

摘 要：采用白腐真菌的模式菌种黄孢原毛平革菌进行镉的去除试验，研究了胞外聚合物(EPS)去除镉量占菌体去除总镉量的比例、EPS的组分含量，并对EPS中各组分含量与EPS去除的镉含量进行了相关性分析，通过SEM-EDS分析了菌体表面的微区元素组成。研究表明，在10 mg/L Cd^{2+}实验组中EPS去除镉量占菌体去除镉量的比例最高，为37.39%；Cd^{2+}初始浓度越高，菌体EPS中蛋白质含量越少、多糖含量则越多，多糖含量最高为20.00 mg/g菌球；EPS中多糖含量与EPS的镉去除量有较明显的相关性；提取EPS后，菌体表面镉的质量分数会下降到4.42%。结果表明，EPS在低浓度镉的去除过程中发挥的作用更大，而EPS各组分中多糖发挥的作用更大；Cd^{2+}的胁迫会使菌体EPS中多糖含量更高，更有利于镉的有效去除；除了EPS，菌体胞外还有其他的镉去除机制。

关键词：白腐真菌；胞外聚合物；镉；相关性分析

中图分类号：X172 **文献标志码**：A

0 引 言

随着现代工业的发展和人类的活动，环境中重金属污染越来越严重[1]。微生物对重金属具有吸附和转化作用，可以将其从废水中去除，已发现的用于重金属离子吸附的微生物数量众多，主要有细菌、真菌和藻类[2-5]。

胞外聚合物(extracellular polymeric substances，EPS)是微生物在特定条件下分泌并附着在细胞表面或周围的多聚化合物，其组分一般以多糖、蛋白质和腐脂类等为主[6-7]。由于这些大分子物质的存在，EPS含有丰富的官能团(如羟基、羧基、氨基等)，在微生物对重金属离子的积极防御和去除中都有重要的作用[8-9]。

由于白腐真菌对重金属有较强的吸附能力，使其在微生物修复重金属污染的研究中受到了广泛的关注[10-11]。虽然EPS作为白腐真菌与环境接触的最直接桥梁，然而目前对EPS在白腐真菌去除重金属过程中的具体作用却并不明确，多是引用细菌EPS的作用来解释实验现象。据曹秀芹等[12]报道，活性污泥中细菌EPS的70%～80%是由蛋白质和多糖构成，余下的20%～30%来自于腐殖酸、核酸和脂类等。另据陈苗苗等[13]报道，冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* EPS中以多糖为主，含有少量其他物质。由此可见，细菌与真菌的EPS之间有很大差别。因而有必要对白腐真菌EPS在重金属污染修复中的作用进行详细的研究。

本文采用白腐真菌的模式菌种——黄孢原毛平革菌进行镉的去除试验，通过分析胞外聚合物(EPS)去除镉的含量占菌体去除总镉量的比例来研究黄孢原毛平革菌EPS在镉去除过程中的作用。重金属胁迫会影响微生物EPS的组成[14]，这可能

收稿日期：2019－03－15
基金项目：国家自然科学基金项目(51608142)；广西科技计划项目(桂科AD19110151；桂科AD19110105；2016GXNSFBA380076；2018GXNSFGA281001)
作者简介：吴 磊 (1993—)，男，博士研究生，研究方向：环境生物修复技术，1693260842@qq.com。
通讯作者：李宁杰，博士，副教授，echoningjie_333@126.com。
引文格式：吴磊，张学洪，李宁杰，等. 胞外聚合物在白腐真菌去除镉过程中的作用［J］. 桂林理工大学学报，2020，40(1)：177－181.

进一步影响 EPS 在微生物去除重金属过程中的作用，因而本研究将进一步分析镉胁迫下 EPS 中各组分变化，并对 EPS 各组分含量与 EPS 去除的镉含量进行相关性分析，从而得出镉胁迫下菌体 EPS 各组分在去除镉过程中发挥的具体作用。

1 材料与方法

1.1 菌种的培养

黄孢原毛平革菌（*Phanerocheate chrysosporium* BKMF－1767）保存在葡萄糖土豆琼脂培养基上。使用微量元素液体培养基培养，具体配制如下（L^{-1}）：2 g KH_2PO_4、0.1 g $CaCl_2$、0.5 g $MgSO_4$、0.115 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$、0.112 g $MnSO_4 \cdot H_2O$、0.089 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$、0.05 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$、0.001 g 维生素 B_1、0.206 g $C_4H_{12}N_2O_6$、10 g 葡萄糖，pH 4.5。试验中使用的药剂均为分析纯，溶液全部使用超纯水配制。

培养液经 121 ℃高温蒸汽灭菌 30 min 后，每 200 mL 接种 2 mL 孢子悬液，于 650 nm 波长下吸光度为 0.5，置于恒温振荡培养箱中培养（30 ℃、180 r/min），48 h 后加入 $Cd(NO_3)_2$ 溶液，使培养液中 Cd^{2+} 浓度分别为 0、10、25、50、100 mg/L，并定时取样。每个浓度设置 3 个平行样。

1.2 EPS 的提取及菌球干重的测定

采用高速冷冻离心法提取黄孢原毛平革菌 EPS，培养得到的菌球经超纯水清洗后再加入一定体积的超纯水，在高速冷冻离心机 10 000 r/min 下离心 20 min，得到的上清液即为 EPS 溶液。对提取 EPS 后的菌球进行真空冷冻干燥至恒重，测得菌球干重。

1.3 多糖、蛋白质浓度的测定

EPS 溶液中多糖浓度采用蒽酮硫酸比色法测定，在波长 620 nm 下比色，以葡萄糖作为标准物质。EPS 溶液中蛋白质浓度采用考马斯亮蓝 G250 法测定，在 595 nm 波长下比色，以牛血清蛋白作为标准物质。

1.4 镉的测定

镉浓度采用电感耦合等离子体发射光谱仪（PerkinElmer Optima 7000DV，美国）测定，测定前对样品进行酸化预处理并经 0.45 μm 滤膜过滤。

1.5 菌体扫描电镜及 X 射线能谱仪分析

采用场发射扫描电镜（Zeiss Σigma，德国）和 X 射线能谱仪（Oxford Inca，英国）分别对 100 mg/L Cd^{2+} 胁迫下未提取 EPS 和已提取 EPS 的菌体进行形貌观察以及微区成分分析，其中样品镀金膜时间为 50 s。

2 结果与讨论

2.1 EPS 对镉的去除作用

由图 1 可知，在 10 和 25 mg/L Cd^{2+} 实验组中，EPS 去除镉量占菌体去除镉量的比例最高分别为 37.4% 和 39.3%；在 50 和 100 mg/L Cd^{2+} 实验组中，该比例最高仅为 23.7% 和 7.7%。镉初始浓度越高，黄孢原毛平革菌去除镉过程中，菌体 EPS 去除的镉量占菌体去除镉总量的比例越低。该比例在培养初期呈现持续增长的趋势。这表明 EPS 在黄孢原毛平革菌去除镉初期发挥着更重要的作用，且在低浓度镉的去除过程中作用更大。

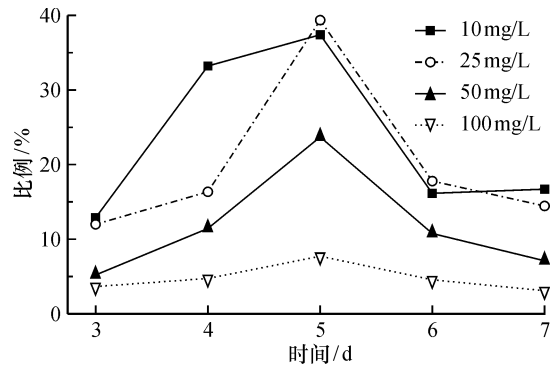


图 1 不同培养时间下 EPS 去除镉量占菌体去除镉总量的比例

Fig. 1 Proportion of removal amount of Cd by EPS to total Cd^{2+} amount by *Phanerocheate chrysosporium* at different culture times

2.2 镉胁迫下 EPS 的组分含量变化

在 EPS 组分中，蛋白质含量相对较少，多糖是主要成分。由图 2a 可知，在黄孢原毛平革菌培养 5 d 后，对照组中含量为 0.77 mg 蛋白质/g 菌球；10 mg/L Cd^{2+} 实验组中含量为 0.56 mg 蛋白质/g 菌球；100 mg/L Cd^{2+} 实验组中含量仅为 0.22 mg 蛋白质/g 菌球，这说明 Cd^{2+} 浓度越高，蛋白质含量整体越低。由图 2b 可知，在黄孢原毛平革菌培养 5 d 后，100 mg/L Cd^{2+} 实验组中含量为 20.00 mg 多糖/g 菌球；10 mg/L Cd^{2+} 实验组中含量仅为 12.16 mg 多糖/g 菌球；对照组中含量最高为 26.64 mg 多糖/g 菌球，这说明 Cd^{2+} 浓度越高，EPS 中多糖含量整体越高，但实验组中多糖含量均要低于空白组。这表明镉胁迫会影响黄孢原毛平革菌 EPS 中组分的含量。在 1～100 mg/L 范围内，镉胁迫浓度越高，单位干重菌球的 EPS 中蛋白质含量越低，而多糖含量越高。

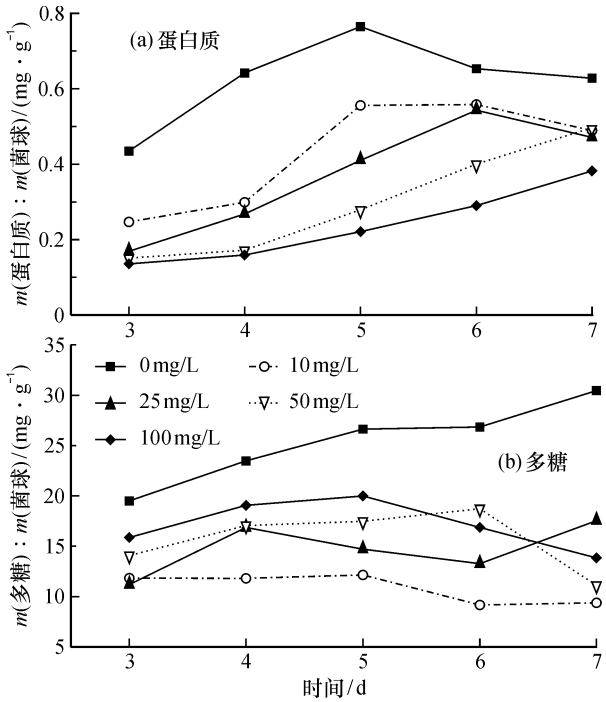


图 2　不同培养时间的单位干重菌球的 EPS 组分含量变化

Fig. 2　Changes in EPS composition of unit dry weight of *Phanerocheate chrysosporium* at different culture times

2.3　EPS 与镉去除量的相关性

分别对镉胁迫下 EPS 中多糖、蛋白质含量与镉去除量进行线性拟合（图 3）。

由图 3a 可知，EPS 中蛋白质含量与镉去除量之间呈现负相关，且线性关系一般；由图 3b 可知，

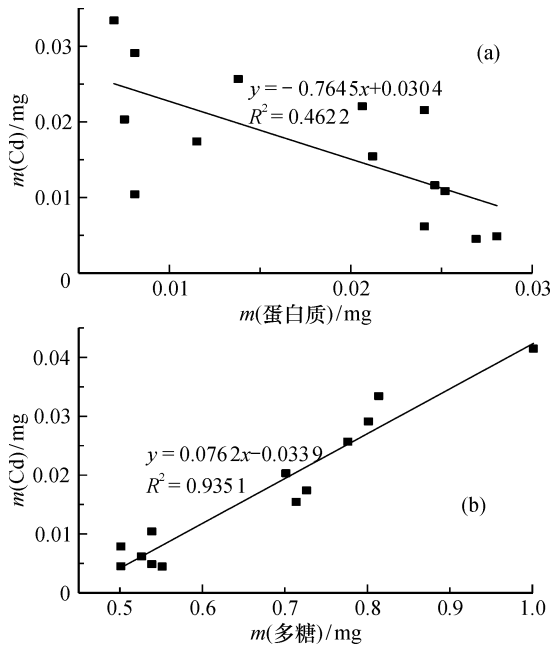


图 3　EPS 组分含量与镉去除量的拟合

Fig. 3　Correlation fitting between EPS component content and Cd removal amount

EPS 中多糖含量与镉去除量之间呈现正相关，且线性关系良好。多糖含量与镉去除量之间的相关性强于蛋白质含量与镉去除量之间的相关性，这表明在 EPS 去除镉的过程中，多糖发挥的作用较蛋白质更大。Cd^{2+} 初始浓度越大，诱导菌体分泌更多多糖（图 2），多糖中羟基羧基在 EPS 去除镉过程中起关键作用[15]。此外，在被黄孢原毛平革菌去除的过程中 Cd^{2+} 的形态可能会发生变化。黄孢原毛平革菌会产生有机酸，如草酸会螯合 Cd^{2+} 形成草酸镉沉淀，菌体表面 EPS 中多糖有粘性，能粘附沉淀达到去除镉的效果，因而 Cd^{2+} 诱导菌体 EPS 组分产生的变化有助于去除更多的镉[16]。

2.4　SEM 及 EDS 分析

对 100 mg/L Cd^{2+} 实验组获取的菌球进行 SEM 形貌观察发现提取 EPS 前、后菌丝体形态未出现明显变化（图 4）。使用 EDS 能谱分析菌体表面元素组成，结果见表 1。菌体经提取 EPS 后，其表面成分中镉含量从 5.14% 下降到 4.42%，进一步证明了EPS在镉去除过程中发挥着一定的作用。同

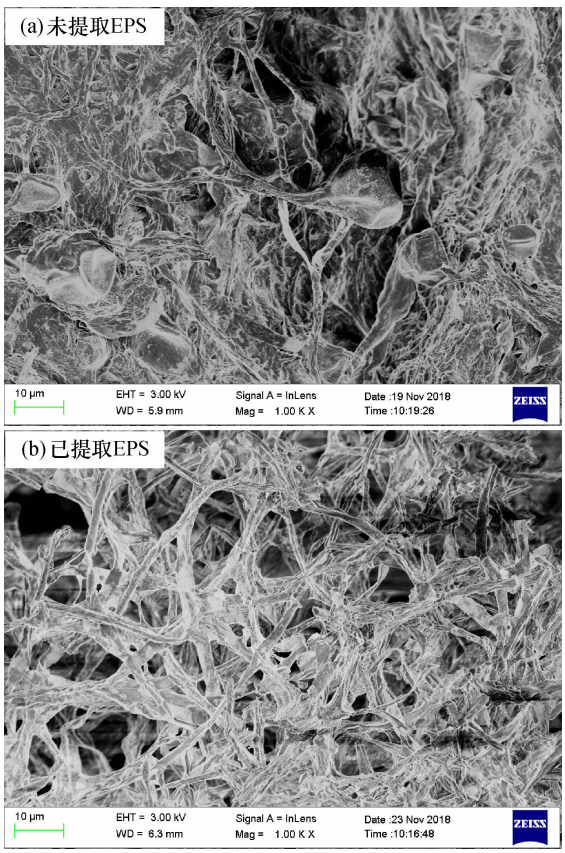


图 4　100 mg/L Cd^{2+} 胁迫下菌体扫描电镜

Fig. 4　SEM images of *Phanerocheate chrysosporium* under the stress of 100 mg/L Cd^{2+}

表 1 100 mg/L Cd^{2+} 实验组菌体微区成分及含量

Table 1 Composition and mass fraction of microzone in 100 mg/L Cd^{2+} experimental group w_B/%

菌体类型	O	P	S	K	Fe	Cd
未提取 EPS	35.31	15.73	1.78	11.43	28.01	5.14
已提取 EPS	37.81	17.67	3.03	10.11	23.03	4.42

时也说明菌体表面还存在其他去除镉的方式，如重金属离子在细胞壁表面形成络合物、细胞壁与重金属离子的交换等[17-19]，因此去除 EPS 后菌体表面仍能检测到镉。

3 结 论

采用白腐真菌的模式菌种黄孢原毛平革菌进行镉的去除试验，得到以下结论：

（1）EPS 在黄孢原毛平革菌去除镉初期发挥着更重要的作用，且在低浓度镉的去除过程中作用更大。

（2）镉胁迫会影响黄孢原毛平革菌 EPS 中组分的含量。Cd^{2+} 在 1 ~ 100 mg/L 范围内，镉胁迫浓度越高，单位干重菌球的 EPS 中蛋白质含量越低，而多糖含量越高。

（3）多糖含量与 EPS 中镉去除量之间的相关性明显强于蛋白质含量与 EPS 中镉去除量之间的相关性，说明在 EPS 去除镉的过程中多糖发挥的作用相较于蛋白质更大。

（4）提取 EPS 后的菌球表面微区成分中镉含量下降，证明了 EPS 在镉去除过程中发挥着一定的作用。

参考文献：

[1] 李海翔，张学洪，严俊，等. 重金属污染农田修复生态补偿的农户调查分析——以广西环江为例 [J]. 桂林理工大学学报，2016，36（4）：765 - 770.

[2] Zeng G M，Li N J，Huang D L，et al. The stability of Pb species during the Pb removal process by growing cells of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology，2014，99（8）：3685 - 3693.

[3] 洪晨，李益飞，司艳晓，等. 土壤芽孢杆菌产胞外聚合物对 Pb^{2+} 吸附特性研究 [J]. 中国环境科学，2017，37（5）：1805 - 1813.

[4] 周旭东，李彩云，高鹏程，等. 活体微藻吸附水体中 Cd^{2+} 的性能特征 [J]. 微生物学通报，2017，44（5）：1182 - 1188.

[5] 梁美娜，张涛，王敦球，等. 生物质吸附剂去除废水中镉的研究进展 [J]. 桂林理工大学学报，2017，37（4）：676 - 681.

[6] 赵冉冉，陈国炜. 模拟胞外聚合物对单细胞藻类聚集行为的影响 [J]. 合肥工业大学学报（自然科学版），2018，41（11）：1531 - 1536.

[7] 魏亮亮，王胜，薛茂，等. 城镇污泥胞外聚合物对重金属吸附特征及机制 [J]. 哈尔滨工业大学学报，2018，50（8）：188 - 198.

[8] Xu P，Zeng G M，Huang D L，et al. Metal bioaccumulation，oxidative stress and antioxidant defenses in *Phanerochaete chrysosporium* response to Cd exposure [J]. Ecological Engineering，2016，87：150 - 156.

[9] Zuo Y N，Chen G Q，Zeng G M，et al. Transport，fate，and stimulating impact of silver nanoparticles on the removal of Cd（Ⅱ）by *Phanerochaete chrysosporium* in aqueous solutions [J]. Journal of Hazardous Materials，2015，285：236 - 244.

[10] 林治岐，张信，邵尉，等. 废水生物处理过程中微生物胞外聚合物与污染物的分子间相互作用 [J]. 中国科学（化学），2018，48（9）：1102 - 1108.

[11] Cao F S，Bourven I，Guibaud G，et al. 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

[12] 曹秀芹，赵自玲. 胞外聚合物（EPS）构成的影响因素分析 [J]. 环境科学与技术，2010，33（S2）：420 - 424.

[13] 陈苗苗，郑鑫，李小方. 大型真菌重金属富集能力与机制研究进展 [J]. 农业资源与环境学报，2017，34（6）：499 - 508.

[14] 简静仪，宋卫锋，李海宇，等. 锌铜胁迫对 *Bacillus vallismortis* EPS 组分变化特征及其吸附性能的影响 [J]. 环境科学学报，2017，37（6）：2099 - 2106.

[15] 苏春彦，康春莉，董德明. 自然水体细菌胞外有机组分吸附铅镉红外光谱特征 [J]. 长春理工大学学报，2005，28（4）：110 - 112.

[16] Li N J，Zeng G M，Huang D L，et al. Oxalate production at different initial Pb^{2+} concentrations and the influence of oxalate during solid-state fermentation of straw with *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Bioresource Technology，2011，102：8137 - 8142.

[17] 金科，李小明，杨麒，等. 白腐真菌吸附废水中重金属离子的研究进展 [J]. 工业用水与废水，2005，36（2）：15 - 18.

[18] 刘瑞霞，汤鸿霄，劳伟雄. 重金属的生物吸附机理及吸附平衡模式研究[J]. 化学进展，2002，14（2）：87 - 92.

[19] 吴涓，钟升，李玉成. 黄孢原毛平革菌（*Phanerochaete chrysosporium*）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.

Roles of extracellular polymeric substances in cadmium removal by white rot fungi

WU Lei[1,2], ZHANG Xue-hong[1], LI Ning-jie[1], CHEN Zhong-wei[1], LAN Qi[1], LIU Jie[1]
(1. a. College of Environmental Science and Engineering; b. Guangxi Key Laboratory of Environmental Pollution Control Theory and Technology, Guilin University of Technology, Guilin 541006, China; 2. Nanjing Hydraulic Research Institute, Nanjing 210029, China)

Abstract: The cadmium removal experiment was carried out by strain of white rot fungi, *Phanerochaete chrysosporium*. The ratio of cadmium removal by extracellular polymeric substances (EPS) to the total cadmium removal by the fungi and the content of EPS was studied. The correlation between the content of each component in EPS and the cadmium content in EPS was analyzed. The micro-element composition of the fungi surface was analyzed by SEM-EDS. The analysis found out that in the 10 mg/L Cd^{2+} experimental group, the removal of cadmium by EPS accounted to the highest proportion of cadmium removal, which was 37.39%. The higher the initial concentration of Cd^{2+}, the smaller the protein content of the fungal EPS and the more polysaccharide content. The content of polysaccharide was 20.00 mg/g. The content of polysaccharide in EPS had a significant correlation with the amount of cadmium in EPS. After EPS extracted, the mass fraction of cadmium on the surface of the mycelium decreased to 4.42%. The results showed that EPS played a great role in the removal of low-concentration of cadmium, and the polysaccharides in the EPS components played a more impartant role. The stress of Cd^{2+} made the polysaccharides higher in the EPS, favorable for cadmium effective removal. In addition to EPS, there were other cadmium removal mechanisms for the whtte rot.

Key words: *Phanerochaete chrysosporium*; extracellular polymeric substances; cadmium removal; correlation analysis