

黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*) 厚垣孢子降解阿特拉津的探究

王莹, 秦雨, 李慧, 王海磊

(河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007)

摘要:阿特拉津(atrazine)是一类普遍存在于环境中且难降解的污染物. 本文探究了黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)厚垣孢子对阿特拉津降解的最佳条件, 包括温度、摇床转速、初始培养基 pH 及接种量. 并在大田土壤盆栽实验中, 研究 *P. chrysosporium* 厚垣孢子和土壤土著微生物对土壤中阿特拉津的降解情况. 结果表明: *P. chrysosporium* 厚垣孢子可以有效去除阿特拉津, 在 33 ℃、转速为 180 r·min⁻¹、pH 值为 7.0、接种量是 4 g·L⁻¹ 时, 去除效果最好, 去除率达 90.77%. 土壤盆栽实验结果表明: 施用 *P. chrysosporium* 厚垣孢子 28 d 后, 非灭菌土壤中阿特拉津去除率为 97.8%, 其中 *P. chrysosporium* 的降解贡献最为突出, 去除能力为 59.3%. 而土著土壤微生物的去除率仅为 20.7%, 表明 *P. chrysosporium* 厚垣孢子对 AT 降解效果明显.

关键词:黄孢原毛平革菌; 厚垣孢子; 阿特拉津; 微生物修复

中图分类号:Q939.9

文献标志码:A

白腐真菌是一群具有两组同工酶系, 可利用同工酶系, 分解木质素的丝状真菌集合^[1]. 白腐真菌的两类同工酶由木质素过氧化物酶(lignin peroxidase)和锰依赖性过氧化物酶(Manganese dependent peroxidase)构成^[2]. 白腐真菌通常以自身酶系统的独特功能, 在环境污染治理方面广泛应用, 对生物修复、环境治理具有深刻意义^[3]. 白腐真菌属中有一种突出的菌株——黄孢原毛平革菌^[4] (*Phanerochaete chrysosporium*), *P. chrysosporium* 归于非褶菌目, 伏革科, 显革菌属. *P. chrysosporium* 菌丝球细胞属于胞内多核, 其菌丝通常没有隔膜, 菌丝内部也没有锁状联合. *P. chrysosporium* 对环境污染物的去除, 主要通过本身所产 MnP 和 LiP, 进行无特异性的分解^[5].

P. chrysosporium 通常以分生孢子和菌丝体的形式存在, 本实验室成功研发一种产厚垣孢子培养基, 在高锰条件下, 厚垣孢子的产量可达 1.06×10⁸ g⁻¹. 厚垣孢子从菌丝体分化出来, 具有一层厚壁, 厚垣孢子内部营养物质集中, 在逆境中有超强的抗逆性. 由于厚垣孢子内的 MnP 和 LiP 对环境污染物进行降解^[6], 因此可通过大量发酵厚垣孢子, 实现环境污染物的降解. 液体发酵产 *P. chrysosporium* 的培养基可以用马铃薯葡萄糖培养基^[7], 液体发酵产厚垣孢子具有明显特点: 菌体生长周期明显缩短, 产物量大, 菌龄保持一致, 接种后菌可迅速萌发. 黄孢原毛平革菌固体培养产厚垣孢子需要 7~10 d, 而液体培养仅需 3~5 d. 本实验室不断优化高产厚垣孢子的培条件, 发酵时间减短, 厚垣孢子产量数量级增高, 当温度 33 ℃、180 r·min⁻¹、培养基初始 pH 值 4.5, 葡萄糖含量 20 g·L⁻¹, 厚垣孢子的产量可达到 1.42×10⁹ L⁻¹.

阿特拉津(atrazine 缩写 AT), 化学结构名称: 2-氯-4-乙基胺-6-异丙基胺-1,3,5-三嗪. 国内外, 在除草方面 AT 都占有很重要的地位^[8], 目前 80 多个国家均使用该除草剂; 美国进行最广泛除草剂的统计, AT 也被列入其中; 在 2002 年世界除草剂排行中, 除草剂 AT 被记为第 10 名. AT 主要用途: 阔叶杂草、

收稿日期: 2015-12-02

基金项目: 国家自然科学基金(51008119)

第1作者简介: 王莹(1990-), 女, 河南洛阳人, 河南师范大学硕士研究生, 研究方向为应用微生物, E-mail: 15136720912@163.com.

通信作者: 王海磊(1978-), 男, 河南睢县人, 河南师范大学教授, 中国科学院生物物理学博士, 主要从事应用微生物学方面的研究, E-mail: whl@henannu.edu.cn.

普通田地除草以及在种植土壤中除草(玉米地、高粱地等)^[9]。但该除草剂化学结构稳定,难以被土著微生物矿化,在土壤中存留期很久^[10],因此对后茬作物再次种植造成药害,并且残留物对人和动物具有毒害作用,易发生致畸、致癌、致突变^[11]。传统治理 AT 的方法:物化去除和生物去除。农业土壤残留的 AT,物理去除有吸附法、光催化法等;化学去除有催化氧化法、化学氧化法等;生物方法利用土壤微生物分解消化,降解 AT。微生物修复降解与物化去除相比,有更令人青睐的优势:1. 微生物以污染物为营养物,在利用终点,污染物以 CO₂ 和 H₂O 无毒形式归于自然界;2. 微生物降毒迅速,节约成本,少于物化消耗的一半;3. 微生物去除属于低碳节能,达到节能减排的理念。由于 *P. chrysosporium* 厚垣孢子相较于一般的固定化酶,有着制备简单、成本低、重复实用性高、储藏性能好的优点,所以本实验立足地利用 *P. chrysosporium* 厚垣孢子生物降解 AT 的研究^[12]。

1 实验材料

1.1 菌种

黄孢原毛平革菌(*P. chrysosporium*)由河南师范大学生命科学学院 AEM 实验室筛选保藏。

1.2 培养基

P. chrysosporium 生长培养基^[13]; *P. chrysosporium* 高产厚垣孢子培养基^[14]。

1.3 实验试剂

AT 标准品(ZhiBao biotechnology company, xinxiang, China)

1.4 实验器材

超净工作台;恒温摇床;恒温培养箱;高度液相色谱仪器(美国安捷伦公司 型号 1200)

2 实验方法

2.1 厚垣孢子的制备

P. chrysosporium 于 PDA 培养基培养 3~5 d,即长出白色菌丝,将灭菌后的蒸馏水加入试管斜面中,接种环轻刮孢子丝制菌丝悬液,于 500 mL 摇瓶含 250 mL 高产厚垣孢子培养基,向其中打入 3 mL 菌丝悬液,放置在 180 r·min⁻¹,温度为 35 ℃ 的振荡培养箱进行培养,5 d 后即可得到 *P. chrysosporium* 菌丝球,研磨,在电镜下观察厚垣孢子^[15]。

2.2 厚垣孢子对 AT 降解能力

本实验从 4 个因素:接种量、培养基初始 pH 值、温度以及摇床转速,探究厚垣孢子降解 AT 的影响。分别从接种量 2 g·L⁻¹、3 g·L⁻¹、4 g·L⁻¹、5 g·L⁻¹,培养基原始 pH 值 5、6、7、8,温度 25 ℃、28 ℃、33 ℃、37 ℃,摇床转速 120 r·min⁻¹、150 r·min⁻¹、180 r·min⁻¹、200 r·min⁻¹。探究 *P. chrysosporium* 厚垣孢子降解 AT 影响^[16]。每隔一天取样一次,放入 4 ℃ 冷藏室储藏,进行 HPLC 分析。

2.3 研究厚垣孢子在土壤盆栽实验中对 AT 的去除

河南师范大学试验田取回大田土壤,去除杂质,晾晒风干,取若干土壤置于灭菌锅灭菌,进行 6 种处理的盆栽实验。A 组:厚垣孢子加入含有 AT 的灭菌土壤;B 组:AT 加入灭菌土壤;C 组:厚垣孢子加入含有 AT 的风干土壤;D4:AT 加入风干土壤;E5:厚垣孢子加入灭菌土壤;F6:厚垣孢子加入风干土壤^[16]。

配置 AT 溶液:100 mg·L⁻¹,土壤质量(g)与喷洒量(mL)比例 5:1,即:50 g 土壤加入 10 mL AT 溶液。使土壤中所含 AT 浓度为 20 μg·g⁻¹。每 50 g 土壤加 30 mL *P. chrysosporium* 厚垣孢子(1.2×10⁷ m·L⁻¹)。

操作过程中:为使土壤含水量保持在 60%,定时定量喷洒一定水,分别于 1、4、7、10、13、16、19、22、25、28 d 取土样,将样品中阿特拉津成分提出,离心并经型号为 0.45 μm 的有机滤膜处理,HPLC 分析,(因组 5、组 6 土壤中 AT 含量结果为 0 μg·g⁻¹),所以没有测定后续实验组 5、组 6 中 AT 的含量。

2.4 高效液相测定 AT 条件

ODS 反向硅胶柱(C18),流动相:甲醇:水(5:1, V:V)柱温:30 ℃,流速 1 mL·min⁻¹,检测波长:

263 nm, 进样量 $10\ \mu\text{L}$ ^[17]. AT 标准方程见下图:

3 实验结果

3.1 液体培养 *P. chrysosporium* 产生厚垣孢子

按方法 2.1 培养 *P. chrysosporium*, 培养出菌丝球(图 2a); 分生孢子悬液接人摇瓶后, 在摇床作用下, 菌丝不停碰撞, 包裹成球状, 直径长 3 mm, 用时 3 d. 将培养成型的菌丝球置于研钵内研磨后, 制备电镜样品, 在电镜下, 可观察到小球状的厚垣孢子(图 2b), 是一种真菌产生的无性孢子, 有一层厚壁, 可在不良的外界环境中延长寿命^[18]; 厚垣孢子具有一层很厚的细胞壁(图 2c), 用结晶紫染色后, 外壁和内壁都能明显的观察到, 细胞壁的厚度约为 895~950 nm 左右. 显微镜中可看到菌丝(图 2d), 厚垣孢子细胞壁是菌丝细胞壁厚度的 5 倍.

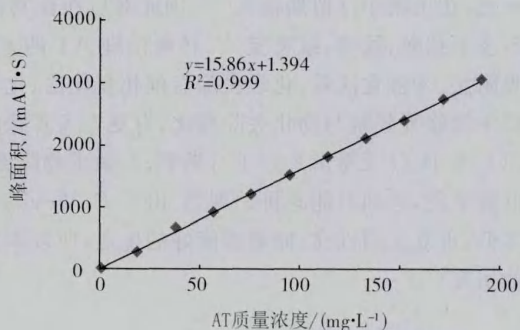
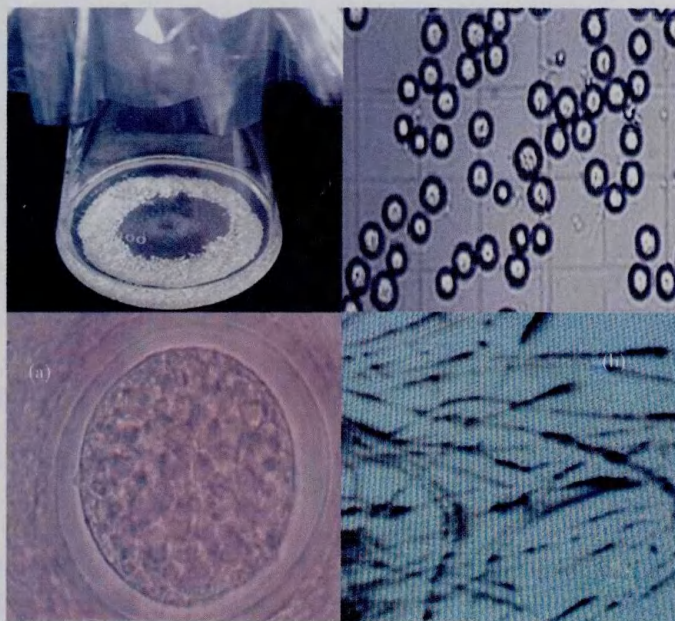


图1 AT标准曲线



a. *P. chrysosporium* 产生菌丝球; b. 厚垣孢子; c. 厚垣孢子细胞壁; d. *P. chrysosporium* 菌丝.

图2 *P. chrysosporium* 的几种不同形态

3.2 *P. chrysosporium* 厚垣孢子对 AT 降解能力

3.2.1 温度对 *P. chrysosporium* 厚垣孢子降解 AT 能力的影响

P. chrysosporium 是嗜温性微生物, 该菌的生长所需温度范围相对宽泛, 需要找出酶的活性充分发挥的最佳温度, 使酶的作用充分发挥, 最大程度的降解 AT, 当 *P. chrysosporium* 在转速条件为 $150\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、pH 值为 6.0 的初始状态下, 对降解 AT 过程中, 探究随时间变化中, 温度对 AT 降解的影响^[19], 实验结果(图 3(a)), 在 $25\ ^\circ\text{C}$ 时去除率最低, 仅 29.92%, 在 $33\ ^\circ\text{C}$ 时酶去除 AT 的效果最好, 为 52.78%. 降解率并没有随温度的增高而增大, 可见温度太高、太低都会减弱 *P. chrysosporium* 酶活, 减少 AT 去除力.

3.2.2 摇床转速对 *P. chrysosporium* 厚垣孢子降解 AT 能力的影响

转速对厚垣孢子降解 AT 的差异, 设置初始条件为 pH 值为 6.0, 以及实验已优化好的培养温度 $33\ ^\circ\text{C}$ 作为不变条件, 以转速为唯一变量进行实验, 实验结果(图 3(b)), 表明 *P. chrysosporium* 厚垣孢子在 $180\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的振荡培养条件下. 处理 8 d 后, 对厚垣孢子 AT 去除率最突出, 达到 73.18%. 当转速在 $120\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$

时,去除力最差,可能转速太低,影响了酶的释放,从而影响了底物与酶的接触.而过高的转速可能会破坏细胞的剪切力,影响酶的形成.

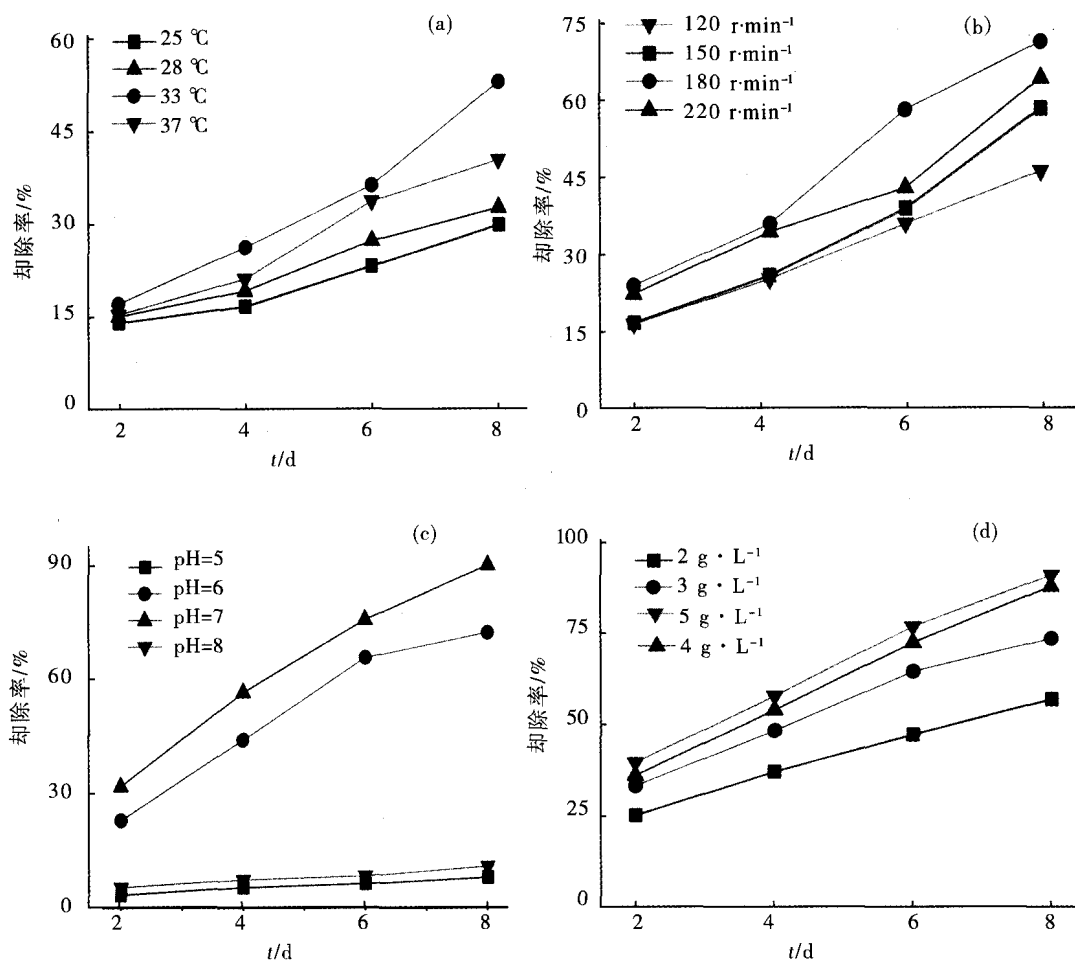


图3 不同条件对降解阿特拉津的影响

3.2.3 培养基初始 pH 值对 *P. chrysosporium* 厚垣孢子降解 AT 能力的影响

利用优化后的培养温度,以及转速条件,设置 *P. chrysosporium* 厚垣孢子的不同培养基初始 pH 值,探究 pH 对 AT 的去除效果(图 3(c)),数据显示出厚垣孢子作用于 AT,随反应时间的增长,去除率的效果差异较大,在 pH 值为 7.0 时,去除率最高,实验结果与张颖等的实验结果一致^[20].厚垣孢子降解 AT 的效果最好,为 89.69%,在 pH 为 5.0 或 8.0 时,去除效果较差,分别为 7.94%、10.82%,说明 LiP 和 MnP 在过酸或过碱的条件下,酶活性都减弱.

3.2.4 接种量对 *P. chrysosporium* 厚垣孢子降解 AT 能力的影响

不同接种量厚垣孢子降解 AT 效果见(图 3(d)),实验表明厚垣孢子接种量这个因素,对 AT 去除效果显著.由于厚垣孢子内包含 LiP 和 MnP,随着摇瓶内接种量的增加,参与反应的酶也就随之增多,图中显示出当接种量为 4 g·L⁻¹,去除效果最好,达到 90.77%,此时的浓度与底物浓度使反应达到最大值.王志刚、王溪等人使用固定化酶进行对 AT 的降解^[21],其降解率仅为 72.84%,并且成本高,操作复杂,所以利用黄孢原毛平革菌厚垣孢子进行对 AT 的降解,成本低,效率高.

3.3 *P. chrysosporium* 厚垣孢子对土壤盆栽实验中 AT 的去除

喷洒到田间的土壤中的 AT,可通过物理去除(例如:吸附、光催化等)、化学去除(例如:催化氧化法、化学氧化法等)、以及土壤中原有微生物的分解作用,使土壤中 AT 被部分降解^[22].本实验在土壤中加入 *P. chrysosporium* 厚垣孢子,实验结果见(图 4):组 1(厚垣孢子加入含有 AT 的灭菌土壤)AT 去除率为

77.15%,组2(AT加入灭菌土壤)AT去除率为17.83%,组3(厚垣孢子加入含有AT的风干土壤)AT去除率为97.8%,3组数据两两差值显示出:a.土壤物化去除作用为17.83%;b.土壤中自身存在的微生物去除AT的能力为20.71%;c. *P. chrysosporium* 厚垣孢子去除AT的能力最明显,达到59.32%。验证土壤施加厚垣孢子,通过酶系统去除AT,效果突出。

经过土壤盆栽实验的结果显示出:喷洒厚垣孢子悬液对降解土壤中的AT效果突出,并且该菌株培养厚垣孢子的方法简单,成本较低,并且厚垣孢子悬液制作简单,厚垣孢子由于厚壁包被,存活率高,所以对于施用于大田进行田间AT去除与修复具有良好的市场前景性,应大面积广泛推广。

4 讨 论

本实验立足于研究 *P. chrysosporium* 厚垣孢子对AT进行降解作用,在摇瓶实验中,33℃,摇床转速 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,初始培养基pH值为7.0,接种量是 $4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 去除能力最高,高达90.77%;盆栽实验中, *P. chrysosporium*厚垣孢子去除59.3%的AT,而土壤自身存在的微生物去除率仅有20.7%,表明厚垣孢子对AT去除效果明显。但是,未来在大田环境的实际操作中,可受天气、土壤硬度、土壤土著微生物种类等各种不可控制因素,会对AT降解效果造成不同程度的影响,未来将进一步考察。

P. chrysosporium 可利用液体发酵大规模高产厚垣孢子,又具有较好的存货期,因此拥有良好的市场前景。

参 考 文 献

- [1] 张 晶,黄民生,徐亚同.白腐真菌木质素降解酶的研究及应用进展[J].净水技术,2004,23(1):19-21.
- [2] 彭 丹,曾光明.白腐真菌生物技术降解氯酚污染物[J].生态学杂志,2007,26(10):1657-1664.
- [3] Kapdan I, Kargi F, McMullan G, et al. Comparison of white-rot fungi cultures for decolorization of textile dyestuffs[J]. Bioprocess Engineering, 2000, 22(4):347-351.
- [4] Yong L, Yan L, Ying W, et al. Biodegradation of phenolic compounds from coking wastewater by immobilized white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 165(1/3):1091-1097.
- [5] Yadav J S, Soellner M B, Loper J C, et al. Tandem cytochrome P450 monooxygenase genes and splice variants in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: cloning, sequence analysis, and regulation of differential expression. [J]. Fungal Genetics & Biology, 2003, 38(1):10-21.
- [6] 贾燕南,文湘华,李佳喜.木质素降解酶对四环素的降解可行性[J].环境科学学报,2008,28(1):68-75.
- [7] 周信华,王扬军,陈若霞,秀珍菇、平菇、香菇液体菌种培养基与培养方式试验[J].宁波农业科技,2006(2):4-6.
- [8] Wesenberg D, Kyriakides I, Agathos S N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents[J]. Biotechnology Advances, 2003, 22(1/2):161-187.
- [9] 弓爱君,刘建森.莠去津在土壤及作物中残留量测定[J].农药科学与管理,2000(6):16-19.
- [10] Aracagök Y D, Kolankaya N. Biodegradation of atrazine by *Phanerochaete chrysosporium* in optimized conditions[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2013, 24(4):S71.
- [11] Huang D L, Zeng G M, Jiang X Y. Bioremediation of Pb-contaminated soil by incubating with *Phanerochaete chrysosporium* and straw [J]. Journal of Hazardous Materials, 2006, 134(1/3):268-276.
- [12] Fragoiro S, Magan N. Impact of *Trametes versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium* on differential breakdown of pesticide mixtures in soil microcosms at two water potentials and associated respiration and enzyme activity. [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2008, 62(4):376-383.
- [13] 刘国生.微生物学实验技术[M].北京:科学出版社,2007.
- [14] 王海磊,李 平.一种黄孢原毛平革菌厚垣孢子的培养方法 2010105537984[P]2013-11-20.
- [15] 肖 媛,刘 伟,汪 艳,等.生物样品的扫描电镜制样干燥方法[J].实验室研究与探索,2013,05(5):45-53.
- [16] Sabourmoghaddam N, Zakaria M P, Omar D. Evidence for the microbial degradation of imidacloprid in soils of Cameron Highlands[J]. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 2014, 14(2):182-188.
- [17] Gupta V K I. Analysis of atrazine and its degradation products in loamy soil by SPE and HPLC[J]. International Journal of Environment & Pollution, 2006, 27(1/2/3):204-210.
- [18] Wang H, Li P, Pang M. Rapid decolourization of azo dyes by a new isolated higher manganese peroxidase producer, *Phanerochaete* sp. HSD[J]. Biochemical Engineering Journal, 2009, 46(3):327-333.

- [19] Debasmita N, Rajasimman M. Optimization and kinetics studies on biodegradation of atrazine using mixed microorganisms[J]. Alexandria Engineering Journal, 2013, 52(3): 499-505.
- [20] 刘颖, 李一凡, 宋晓梅. 除草剂阿特拉津的污染与降解[J]. 农业与技术, 2012, 32(12): 5-6.
- [21] 王溪, 王志刚. 固定化酶修复阿特拉津污染土壤效果及土壤细菌多样性动态变化分析[J]. 东北农业大学学报, 2013, 44(11): 1-6.
- [22] Hiller E, Krascenits Z, Cernianský S. Sorption of Acetochlor, Atrazine, 2,4-d, Chlorotoluron, MCPA, and Trifluralin in Six Soils From Slovakia[J]. Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology, 2008, 80(5): 412-416.

The Bio-degradation of Atrazine by Chlamydospore of *Phanerochaete chrysosporium*

WANG Ying, QIN Yu, LI Hui, WANG Hailei

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: Atrazine is one kind of refractory organics extensively existing in the environment. In the study, results showed that chlamydospore of *Phanerochaete chrysosporium* can significantly degrade Atrazine in both laboratory studies and field trials. The highest degradation rate reached 90.77% with the optimal conditions as following: 33 °C, 180 r · min⁻¹, pH 7.0 and 4 g · L⁻¹ inoculum quantity into a 250 mL/500 mL flask. When chlamydospore of *Phanerochaete chrysosporium* was applied to the soil, the degradation rate was 97.8% while control soil without chlamydospore was 20.7%. The pot cultivation experiments showed that the degradation rate reached 97.8% after *Phanerochaete chrysosporium* chlamydospore was applied to sterilized soil for 28 days. This suggests that chlamydospore of *Phanerochaete chrysosporium* is the main factor during the whole degradation process in field conditions. The degradation rate of *Phanerochaete chrysosporium* was 59.3% while indigenous soil microbial was only 20.7%. In summary, chlamydospore of *Phanerochaete chrysosporium* can degrade Atrazine effectively and has a potential use in the area of environment protection.

Keywords: *Phanerochaete chrysosporium*; chlamydospore; Atrazine; Microbial remediation