

真菌漆酶活性与石油降解率的关系

贾洪柏¹, 曲丽娜^{1,2}, 王秋玉^{1*} (1. 东北林业大学生命学院, 黑龙江哈尔滨 150040; 2. 大庆师范学院生命学院, 黑龙江大庆 163712)

摘要 [目的]研究真菌漆酶活性与原油降解率之间的关系。[方法]对4株石油降解真菌在液体培养基中的漆酶活性、菌丝干重、原油降解率及石油组分进行了测定,分析了漆酶在原油降解过程中的作用,探讨真菌漆酶活性与原油降解率之间的关系。[结果]在基础液体培养基中,不同菌株的菌丝干重和漆酶活性差异较大,培养7 d后菌株DQ7(*Aspergillus* sp.)的菌丝干重最大,培养15 d后菌株D2(*Actinomyces* sp.)的漆酶活性最高;相关分析表明菌株的菌丝干重与漆酶活性相关不显著。在原油液体培养基中,培养30 d后菌株D2对原油的降解率和漆酶活性最大,分别为42.41%和48.26 IU/ml;菌株DQ5(*Fusarium* sp.)和DQ7对原油的降解率及漆酶活性最低;不同菌株对石油组分降解情况不同;仅菌株D2的漆酶活性与原油的降解速率相关性较大($r=0.869$),但没有达到显著性水平。[结论]漆酶是影响真菌降解原油效率的重要因素之一,能够提高真菌对原油的降解速率和降解率,但真菌对原油的降解率还与菌株的种类及其生长特性等因素有关。

关键词 石油降解真菌;漆酶活性;菌丝干重;原油降解率

中图分类号 S181.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)07-02097-04

Study on the Relationship between Laccase Activity and Crude-oil Degradation Rate of the Fungus

JIA Hong-bai, QU Li-na, WANG Qiu-yu (College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

Abstract [Objective] The research aimed to study the relationship between laccase activity and crude-oil degradation rate of the fungus. [Method] The laccase activity, dry mycelial weight (DMW), crude-oil degradation rate (CODR) and petroleum components of four petroleum degradation fungus were measured in the liquid medium, the function of laccase was studied in crude oil degradation process, and the relationship between laccase activity and CODR of the fungus were explored. [Result] In the liquid medium with the sucrose, there were significant differences of DMW and the laccase activity among the fungi strains. DMW of DQ7(*Aspergillus* sp.) was the heaviest after 7 d, and the laccase activity of D2(*Actinomyces* sp.) was the highest after 15d, and correlation analysis showed that there was no significant correlation between DMW and the laccase activity. After 30d cultivation in the liquid medium with the crude oil, CODR and the laccase activity of D2 were the highest, they were 42.41% and 48.26 IU/ml. CODR of DQ5(*Fusarium* sp.) and DQ7 were the lowest. The results showed that different strains could degrade different components of petroleum hydrocarbons by GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) analysis. A positive relationship between CODR and the laccase activity of D2 was observed($r=0.869$), but it was not significant. [Conclusion] The laccase is important factor affecting the oil degradation, it can increase the oil degradation rate of the fungus, but the oil degradation rate is also related with fungi strains, the growth characteristics of the fungus.

Key words Petroleum degradation fungus; Laccase activity; Dry mycelial weight; Crude-oil degradation rate

石油被称为整个社会的“黑色黄金”,但由于技术和设备的原因大量的石油污染物渗入到土壤和水系中,造成严重的环境污染,同时也严重影响了土壤和水体的生态系统^[1]。一般落地原油被截留在表层土壤中,逐渐积累会对土壤结构造成破坏,影响土壤中微生物群落变化,阻碍植物根系的呼吸和吸收功能,妨碍农作物的生长和发育,严重地导致植物死亡^[2-3]。同时,土壤吸附的石油会污染地下水,进而对人类健康产生危害^[4]。研究表明,土壤石油浓度增加至0.31%时,玉米则减产10%;土壤石油浓度>10%时,造成玉米不出苗并且绝收^[5]。

油污的生物修复技术因为安全、高效、经济、可原位处理和操作相对简单等优点而成为近年来研究和应用的热点^[6-7]。筛选高效的石油降解微生物是油污物生物修复技术的核心和关键,是提高修复效率的有效途径之一^[8-9],同时对微生物代谢产物,如生物表面活性剂、脱氢酶和氧化酶等与油污降解之间的关系也进行了研究^[10-13]。漆酶(laccase)是一种含铜的电子氧化还原酶,它通过“加氧”的作用对包括酚类化合物在内的多种芳烃化合物以及氯代酚、多氯联

苯、杀虫剂、染料等多种难降解的有机化合物进行氧化性聚合和解聚。在中介底物的存在时,漆酶可以间接催化大分子底物和非芳香族化合物的氧化反应^[14-15]。目前对漆酶降解酚、萘、苯、多氯联苯等剧毒物质的研究较多^[16-19]。该研究对真菌漆酶活性及原油降解率进行测定,分析漆酶在原油降解过程中的作用,为提高石油污染物的生物修复效率奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种。从大庆油井附近表层(0~20 cm)油污土壤筛选得到4株降解石油真菌,经鉴定DQ5和D51菌株属于镰孢霉属(*Fusarium* sp.),D2属于雅致放射毛霉属(*Actinomyces* sp.),DQ7属于曲霉属(*Aspergillus* sp.)。

1.1.2 原油样品。来自大庆石油公司第二采油厂。

1.2 方法

1.2.1 培养基配方。基础液体培养基包括大量元素KCl 0.25 g/L、Na₂HPO₄·2H₂O 3.24 g/L、Na₂HPO₄·12H₂O 10.46 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L、NH₄NO₃ 1.0 g/L和微量元素ZnSO₄·7H₂O 1.0 mg/L、MnCl₂·4H₂O 0.1 mg/L、FeSO₄·7H₂O 1.0 mg/L、CuSO₄·5H₂O 0.5 mg/L、CaCl₂·7H₂O 0.1 mg/L,蔗糖15.0 g/L,pH 7.0。原油液体培养基是用原油代替蔗糖的基础液体培养基。

1.2.2 液体培养基真菌菌丝干重及漆酶活性测定。取长势

基金项目 提高油气采收率教育部重点实验室开放课题(2013-004)。
作者简介 贾洪柏(1978-),男,辽宁辽阳人,工程师,博士,从事油污生物修复方面的研究。*通讯作者,教授,博士,博士生导师,从事遗传学方面的研究。

收稿日期 2014-02-07

良好的直径 1 cm 的菌饼接种到已灭菌的 30 ml 的液体培养基中,28 ℃、150 r/min 振荡培养,每 24 h 取出培养液,用滤纸过滤,并用蒸馏水冲洗 2 次,置烘箱中 100 ℃ 烘至恒重并计算菌丝重量,共测定 6 d。另在第 2、4、6、9、12 和 15 天用 ABTS 氧化法^[20]测定培养液中的漆酶活性。

1.2.3 液体培养原油降解试验。取长势良好的直径 1 cm 的菌饼加入到已灭菌的 30 ml 原油液体培养基中,28 ℃、150 r/min 培养。在第 6、12、18、24、30 天测定原油的降解率和培养液的漆酶活性。将 30 d 降解试验后的原油萃取用于石油组分分析。所有试验均重复 3 次。

1.2.4 石油组分分析。将晾干恒重的原油样品加入 5 ml 的石油醚完全溶解,检测前将样品稀释 3 倍。测定仪器为 Agilent GC-MSD 6890N-5973 气质联用仪,色谱条件为:毛细管色谱柱为 DB-17MS,柱长 30 m,内径 0.25 mm,膜厚 0.25 μm,汽化室温度 270 ℃,载气为氦气,柱流量 1 ml/min,不分流进样,进样量 1 μl,柱温 80 ℃ 保留 2 min,以 10 ℃/min 升至 250 ℃ 保留 20 min,GC-MSD 接口温度 280 ℃。质谱条件为电离源 EI、电子能量 70 eV、离子源温度 230 ℃、扫描范围为 15~500 amu(原子质量单位),利用 NIST02 谱库进行分析。

1.3 数据处理 采用 SPSS17.0 软件对试验数据处理分析。

其中,原油降解率(%) = $\frac{\text{降解前原油重量} - \text{降解后原油重量}}{\text{降解前原油重量}} \times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 基础液体培养基中的菌丝干重及漆酶活性

2.1.1 真菌的生长状态。从 4 株真菌在 30 ml 的液体培养基中的菌丝干重(表 1)可以看出,随着培养时间的增加,真菌菌丝的干重呈现出先增大后减小的趋势;菌株 DQ7 和 D2 在培养至第 4 天时菌丝的干重达到最大,菌株 DQ5 和 D51 在培养至第 5 天时菌丝的干重达到最大;4 株真菌的菌丝干重差异较大,DQ7 菌株的菌丝干量最大,普遍高于同时期的其他真菌的菌丝干量。

2.1.2 基础培养基中的漆酶活性。从图 1 可以看出,在基础液体培养基培养 15 d 后,不同真菌的漆酶活性具有显著的差异,D2 漆酶的活性最高,达 216.452 IU/ml,DQ7 最低,最高时仅有 3.200 IU/ml。相关分析表明,菌株菌丝干量与漆酶活性相关性较小。

很多研究者提出漆酶是一种胞外酶^[21-22],那么在培养的后期,随着菌丝体自溶,培养液中的漆酶活性应该表现出逐渐降低的趋势;但该研究中菌株 DQ5 和 D2 的漆酶活性在培养过程中呈现逐渐增加的趋势。这可能是这些菌株胞内也产生漆酶,当菌体自溶时胞内漆酶释放到培养液中使漆酶活性增加;也可能是漆酶活性受到菌体自身变化和环境影响。因此对于真菌产漆酶的方式和影响因素需要进一步研究。

表 1 基础液体培养基中不同培养时间的真菌菌丝干重

菌种	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
DQ5	0.045 ± 0.002	0.174 ± 0.006	0.190 ± 0.006	0.268 ± 0.002	0.265 ± 0.013	0.134 ± 0.005
DQ7	0.195 ± 0.001	0.261 ± 0.010	0.379 ± 0.003	0.316 ± 0.009	0.274 ± 0.008	0.199 ± 0.004
D2	0.132 ± 0.002	0.145 ± 0.009	0.175 ± 0.010	0.171 ± 0.009	0.160 ± 0.004	0.133 ± 0.009
D51	0.097 ± 0.002	0.146 ± 0.007	0.166 ± 0.011	0.294 ± 0.006	0.196 ± 0.006	0.152 ± 0.009

注:表中数据为平均值 ± 标准误。

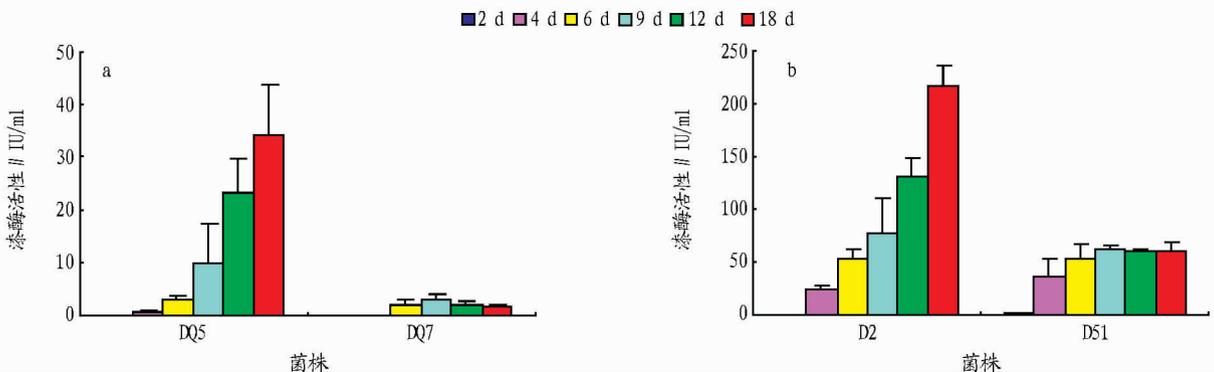


图 1 基础液体培养基中 DQ5、DQ7(a)和 D2、D51(b)的漆酶活性

2.2 液体培养原油的降解率及漆酶活性

2.2.1 原油的降解率。从真菌在液体培养条件下对原油的降解率(表 2)可看出,前 6 d 的原油降解速率最高,除了菌株 DQ5 外,其他菌株的原油降解率均明显高于对照组 CK;原油的降解速率整体表现为由高到低再升高的趋势;30 d 后 D2 对原油的降解率最大,为 42.41%;菌株 DQ5 和 DQ7 对原油的降解率及漆酶活性最低。由此看出,基于重量法的检测,

菌株 D2 在液体培养条件下对原油具有较好的降解性能。

2.2.2 真菌的漆酶活性。由图 2 可见,在降解原油过程中,D2 与 D51 的漆酶活性随着培养时间的增加而增加,30 d 时漆酶活性最大,分别为 48.26 和 3.54 IU/ml;DQ7 漆酶活性很小,在培养中期几乎检测不到漆酶活性,DQ5 的漆酶活性则是先逐渐增大而后减小的趋势;DQ5 和 DQ7 的漆酶活性最低,最大漆酶活性不超过 0.80 IU/ml。经相关分析表明,菌株的漆酶活性与原

油的降解速率相关不显著,菌株 D2 的漆酶活性与原油的降解率相关系数为 0.869,其他菌株的相关系数较小。

表 2 液体培养条件下不同培养时间段的丝状真菌对原油的降解率

菌种	0~6 d	7~12 d	13~18 d	19~24 d	25~30 d	0~30 d
CK	5.71 ± 1.11	3.92 ± 0.499	0.49 ± 0.269	5.32 ± 1.050	3.68 ± 0.992	19.11 ± 1.39
DQ5	10.18 ± 1.60	2.32 ± 0.723	3.85 ± 0.236	3.55 ± 0.750	8.31 ± 1.206	28.22 ± 1.55
DQ7	15.49 ± 1.77	3.83 ± 1.055	4.05 ± 0.895	1.76 ± 1.279	3.73 ± 0.120	28.86 ± 1.50
D2	16.61 ± 1.94	5.37 ± 0.419	5.35 ± 1.244	6.27 ± 1.549	8.82 ± 0.620	42.41 ± 2.58
D51	19.88 ± 2.40	5.16 ± 1.086	2.05 ± 0.470	3.13 ± 1.676	5.35 ± 2.096	35.57 ± 3.44

注:表中数据为平均值 ± 标准误。

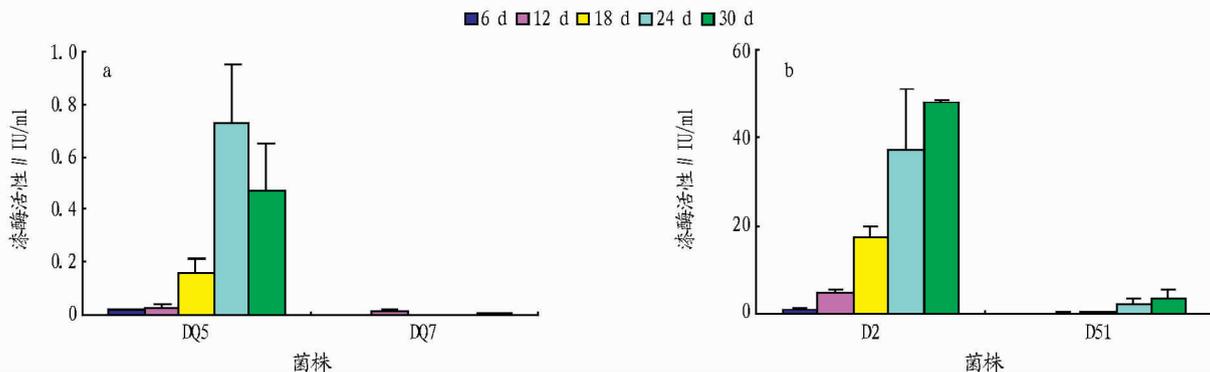


图 2 原油液体培养基中 DQ5、DQ7 (a) 和 D2、D51 (b) 的漆酶活性

KEUM 等研究发现在培养环境中含有 10% 有机溶剂时真菌漆酶活性没有变化,当超过 10% 时,漆酶活性马上降低很多^[17]。TSIOLPAS 等在研究漆酶对橄榄油厂废水中酚的降解率时发现,因为漆酶与不溶水的漆酶反应产物形成沉淀,使漆酶活性降低^[23]。基础液体培养基中真菌的漆酶活性均高于原油液体培养基中的漆酶活性,这可能是原油中的某些成分对真菌分泌漆酶有所抑制或在降解原油过程中消耗了大量的漆酶。在 2 种液体培养基中 DQ5 的漆酶活性均有一个突然增高很多的过程(9~12 和 18~24 d),其 24~30 d 的原油降解率也增加了 8.31%,而前期每 6 d 的平均降解率仅有 5%;具有同样变化趋势的还有 D2 和 D51。DQ7 的漆酶活性非常低,但菌丝生长量最大,其原油降解率比 DQ5 略

高。由此可见,漆酶是与石油烃降解相关的主要因素之一,促进了微生物对石油烃的降解;菌株对原油的降解还受多种因素影响,包括菌种种类、菌种的生长特性、菌种对原油不同组分偏好性及菌种对环境适应性等。

2.2.3 石油组分分析。经 GC-MC 分析(图 3)表明,原油中主要含油 C15~C35 的直连烃、C19 和 C20 的支链烃、C7 和 C10 2 种同分异构体的芳香烃;经 30 d 真菌降解后发现,DQ5 菌株可以完全降解 C7 芳香烃、C19 和 C20 的支链烃,D2 可以完全降解 C10 的芳香烃和 C15、C16 的直连烃,D51 可以完全降解 C15 的直连烃;同时,DQ7、D2 和 D51 菌株对 C17~C28 的直连烃组分降解较多。

在微生物进行石油污染物的降解过程中,漆酶可以催化

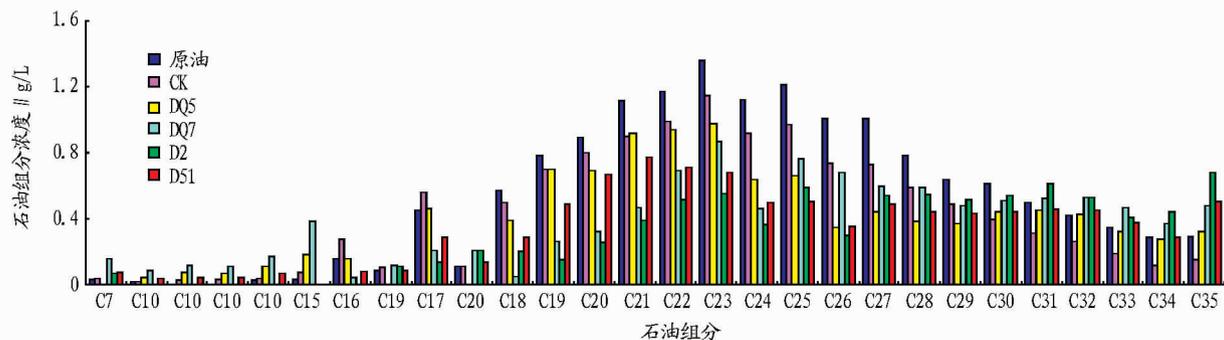


图 3 原油及液体条件下真菌对原油组分的降解情况

C-C 键和 C-O 键断裂,扩大微生物可降解石油烃的范围,从而提高微生物对石油污染物的降解率。一些研究表明,加入真菌后碳氢化合物的降解率增加了,这与微生物产生的包括漆酶在内的胞内酶和胞外酶有关^[22,24-25]。实验中的 4 株真菌降解的主要石油组分基本相同,但漆酶活性较高的 D2 和 D51 菌株 30 d 的原油降解率较高。经 GC-MC 分析发

现,除了具有完全降解 C7 或 C10 芳香烃的菌株外,CK 及其他菌株降解后的石油组分均增加了 2 种 C10 芳香烃的同分异构体,且原来的 C7 和 C10 芳香烃组分也增加了,推测 C7 和 C10 芳香烃可能是石油烃降解的中间产物。

3 结论

(1) 在基础液体培养基中,不同菌株培养液中的漆酶

活性随着培养时间的延长变化趋势不同,培养 7 d 后菌株 DQ7(*Aspergillus* sp.)的菌丝干重最大,培养 15 d 后菌株 D2(*Actinomucor* sp.)的漆酶活性最高(216.45 IU/ml);相关分析表明菌株的菌丝干重与漆酶活性相关不显著。

(2)在原油液体培养基中培养 30 d 后,菌株 D2 对原油的降解率和漆酶活性最大,分别为 42.41% 和 48.26 IU/ml;菌株 DQ5(*Fusarium* sp.)和 DQ7 对原油的降解率及漆酶活性最低;分析表明,仅菌株 D2 的漆酶活性与原油的降解速率相关性较大($r=0.869$),但没有达到显著性水平。

(3)在原油液体培养基中,DQ5、D2 和 D51 菌株的漆酶活性与原油降解速率表现了一致的变化过程,表明漆酶对石油烃的降解起到促进作用,但只是影响降解率的重要因素之一,原油的降解还受到多种因素的影响。在进行油污土壤或污水生物修复时,加入产漆酶菌株可以提高修复效率。

(4)经 GC-MC 分析发现,不同菌株对石油组分降解情况不同。此外,除了具有完全降解 C7 或 C10 芳香烃的菌株外,降解后的石油组分均增加了 2 种 C10 芳香烃的同分异构体,且原来的 C7 和 C10 芳香烃组分也增加了。

参考文献

- [1] 张学佳,纪巍,康志军,等.石油类污染物对土壤生态环境的危害[J].化工科技,2008,16(6):60-65.
- [2] 张树才,牟桂芹.石油污染地的土壤修复技术[J].生产与环境,2009,9(8):29-31.
- [3] 黄延林,唐智新,徐金兰,等.黄土地区石油污染土壤生物修复室内模拟试验研究[J].农业环境科学学报,2008,27(6):2206-2210.
- [4] MOHAN S V, KISA T, OHKUMA T, et al. Bioremediation Technologies for Treatment of PAH-contaminated Soil and Strategies to Enhance Process Efficiency[J]. Reviews in Environmental Science and Bio-Technology, 2006, 5(4):347-374.
- [5] 刘德敏,马晓红.油田开发对生态环境的影响研究[J].中国科技信息,2010,22(6):25-27.
- [6] HUBALEK T, VOSAHLOVA S, MATEJU V, et al. Ecotoxicity Monitoring of Hydrocarbon-contaminated Soil During Bioremediation; a Case Study[J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2007, 52(1):1-7.
- [7] DIPLOCK E E, MARDIN D P, KILLHAM K S, et al. Predicting Bioremediation of Hydrocarbons: Laboratory to Field Scale[J]. Environmental Pollution, 2009, 157(6):1831-1840.
- [8] GREENWOOD P F, WIBROW S, GEORGE S J, et al. Hydrocarbon Biodegradation and Soil Microbial Community Response to Repeated Oil Exposure[J]. Organic Geochemistry, 2009, 40:293-300.

- [9] CUNNINGHAM C J, IVSHINA I B, LOZINSKY V I, et al. Bioremediation of Diesel-contaminated Soil by Microorganisms Immobilised in Polyvinyl Alcohol[J]. International Biodeterioration Biodegradation, 2004, 54(2/3):167-174.
- [10] 张娜,郑青松,刘玲,等.产表面活性剂石油降解菌的筛选及发酵条件优化[J].南京农业大学学报,2011,34(4):133-137.
- [11] ARCA-RAMOS A, EIBES G, MOREIRA M T, et al. Surfactant-assisted Two Phase Partitioning Bioreactors for Laccase-catalyzed Degradation of Anthracene[J]. Process Biochemistry, 2012, 47(7):1115-1121.
- [12] 陆昕,陈立,李娟,等.假单胞菌 *Nwu1-mu* 对陕北石油污染土壤的生物修复作用研究[J].农业环境科学学报,2010,29(5):910-917.
- [13] 齐建超,张承东,乔俊,等.微生物与有机肥混合剂修复石油污染土壤的研究[J].农业环境科学学报,2010,29(1):66-72.
- [14] ALEXANDRE G, ZHULIN I B. Laccases are Wide Spread in Bacteria[J]. Trends Biotechnology, 2000, 18(2):41-42.
- [15] 钞亚鹏,钱世钧.真菌漆酶及其应用[J].生物工程进展,2001,21(5):23-28.
- [16] ZHANG J B, LIU X P, XU Z Q, et al. Degradation of Chlorophenols Catalyzed by Laccase[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2008, 61(4):351-356.
- [17] KEUM Y S, LI Q X. Fungal Laccase-catalyzed Degradation of Hydroxy Polychlorinated Biphenyls[J]. Chemosphere, 2004, 56(1):23-30.
- [18] LU C, CAO L, LIU R, et al. Effect of Common Metal Ions on the Rate of Degradation of 4-nitrophenol by a Laccase-Cu2+ Synergistic System[J]. Journal of Environmental Management, 2012, 113:1-6.
- [19] BAUTISTA L F, MORALES G, SANZ R. Immobilization Strategies for Laccase from *Trametes versicolor* on Mesoporous Silica Materials and the Application to the Degradation of Naphthalene[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(22):8541-8.
- [20] 付时雨,周攀登.真菌漆酶及其催化对苯基苯酚聚合条件的研究[J].化学通报,2005,68(3):225-228.
- [21] SURESH P S, KUMAR A, KUMAR R, et al. An Insilco Approach to Bioremediation; Laccase as a Case Study[J]. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 2008, 26(5):845-849.
- [22] POZDNIKOVA N N, NIKITINA V E, TURKOVSKAIA O V. Bioremediation of Oil-polluted Soil with an Association including the Fungus *Pleurotus Ostreatus* and Soil Microflora[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2008, 44(1):69-75.
- [23] TSILOULPAS A, DIMOU D, ICONOMOU D, et al. Phenolic Removal in Olive Oil Mill Wastewater by Strains of *Pleurotus* spp. in Respect to their Phenol Oxidase(Laccase) Activity[J]. Bioresource Technology, 2002, 84(3):251-257.
- [24] NOVOTNY C, ERBANOVA P, SASEK V, et al. Extracellular Oxidative Enzyme Production and PAH Removal in Soil by Exploratory Mycelium of White Rot Fungi[J]. Biodegradation, 1999, 10(3):159-168.
- [25] GULLOTTO A, BRANCIAMORE S, DUCHI I, et al. Combined Action of a Bacterial Monooxygenase and a Fungal Laccase for the Biodegradation of Mono- and Poly-aromatic Hydrocarbons[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(17):8353-8359.

(上接第 2092 页)

治要求,在拟建项目整体设计时必须要求统一设置与经营规模相符的隔油池,预留油烟气净化装置安装位置以及安装专门的排烟管道及排气筒。这部分要求可以通过拟建项目环保审批文件体现,并不会影响整个项目的环评等级的确定。

3.3 完善部门间的协调制度 《建设项目环境影响评价分类管理名录》规定建设涉及环境敏感区的项目,不得擅自提高或降低环境影响评价类别。因此,随意降低环评等级的建设项目环评审批是无效的。建议各部门在各司其职的基础上,相互沟通合作,环保部门能提前介入房地产项目,在选址、污染防治等方面给予相应的环保咨询服务,保证该类项

目后续环评审批的高效和快速。

调整房地产建设项目的环评评价内容、降低评价等级的前提是符合相关环境保护法律法规的要求。在编制区域规划环评的基础上,若拟建项目选址合理、周边项目环境污染较轻,则适当调整简化房地产类建设项目环评评价内容、降低环评等级是可行的。

参考文献

- [1] 房地产经济对我国经济发展的影响[EB/OL]. <http://lunwen.1kejian.com/jingjixue/53789.html>.
- [2] 鱼红霞,杨坤.房地产类项目环评中新问题探讨[J].云南环境科学,2006(25):103.