



废水处理中白腐真菌的 化学生物学

陈桂秋 曾光明 陈安伟 郭志 著



科学出版社

废水处理中白腐真菌的 化学生物学

陈桂秋 曾光明 陈安伟 郭 志 著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书在有关课题的深入研究基础上,汇集了近年来白腐真菌废水处理方面的最新成果。全书共6章,包括重金属与有机污染物、白腐真菌在环境中的应用、白腐真菌处理含重金属和有机污染物的废水、废水处理中白腐真菌的物质分泌与调控、白腐真菌对废水中重金属和有机污染物的应激与调控、废水处理中白腐真菌细胞膜与外界环境的物质交换。本书的研究成果是对白腐真菌的化学生物学的发展,理论研究较深入,是一本具有较高学术水平的著作。

本书可供环境科学、环境工程、化学、市政工程、环境生物技术等相关专业的科研人员和研究生参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

废水处理中白腐真菌的化学生物学/陈桂秋等著. —北京:科学出版社, 2016. 11

ISBN 978-7-03-050354-1

I. ①废… II. ①陈… III. ①废水处理—真菌—生物学—研究
IV. ①X703. 1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 258095 号

责任编辑:周 炜 / 责任校对:邹慧卿
责任印制:张 伟 / 封面设计:左 讯

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京教图印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016年11月第 一 版 开本:B5(720×1000)

2016年11月第一次印刷 印张:16

字数:320 000

定价:88.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

随着产业的发展,废水污染日益严重,污染物种类繁多复杂。其中,重金属和有机物这两类典型污染物形成的复合污染现象广泛存在。探索既能降解废水中有机污染物,又能去除废水中重金属的方法,实现高效的废水处理率,是废水处理技术的一个重要发展方向。

在废水处理方面,微生物技术因具有繁殖速率快、反应条件温和、处理效率高等优势,而受到科学家的广泛关注。白腐真菌以其对异生质的独特降解功能显示出在环境修复中的良好应用前景,近几年将白腐真菌用于治理重金属废水,已得到研究者的广泛重视。废水中的污染物往往具有较高的生物毒性,它们能抑制微生物的生长、繁殖和代谢活性,进而影响处理效率。因此,明确微生物与污染物相互作用的内在机制,可为有针对性地改善微生物的性能、创造有利于微生物处理废水的条件、从宏观上调控废水的处理效率提供坚实的理论基础和指导。

本书以白腐真菌废水处理技术为主线,全面总结作者所承担的国家自然科学基金青年科学基金项目(50908078)、国家自然科学基金面上项目(51178171、51521006、51579099)、国家自然科学基金重点项目(51039001)、教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-10-0361)、教育部创新团队发展计划滚动支持项目(IRT-13R17)等的研究成果。在写作上注重学科交叉,力求深入浅出。

本书得到湖南大学环境科学与工程学院各个方面的大力支持与帮助,是集体劳动的结晶。在课题的研究过程中,作者和合作者共申请国家发明专利 18 项,已获授权 11 项;在国内外的研究刊物上发表论文 22 篇,其中 SCI 收录 14 篇、EI 收录 13 篇。很多老师和同学参与了课题的研究和本书的撰写,非常感谢他们做出的贡献。具体如下(排名不分先后):第 1 章,重金属与有机污染物(郭志、易峰、黄真真、王利超、龚继来、陈桂秋、曾光明);第 2 章,白腐真菌在环境中的应用(黄真真、左亚男、尚翠、贺建敏、陶维、李忠武、徐卫华、曾光明);第 3 章,白腐真菌处理含重金属和有机污染物的废水(郭志、官嵩、谭琼、张文娟、范佳琦、刘媛媛、张长、晏铭、陈桂秋);第 4 章,废水处理中白腐真菌的物质分泌与调控(黄真真、易峰、易斌、邹正军、王亮、周颖、胡亮、陈安伟、汤琳、陈桂秋);第 5 章,白腐真菌对废水中重金属和有机污染物的应激与调控(陈安伟、何凯、左亚男、黄健、杜坚坚、张企华、陈耀宁、曾光明、陈桂秋);第 6 章,废水处理中白腐真菌细胞膜与外界环境的物质交换(陈安伟、李欢可、陈云、牛秋雅、曾光明、陈桂秋)。全书由陈桂秋和曾光明统稿,左亚男、易峰、郭志、黄真真、陈桂秋校核。在此,作者向所有对本书出版给予

关心和支持的前辈、领导、同事和朋友表示衷心的感谢。

限于作者水平,书中难免存在疏漏和不妥之处,敬请读者批评指正。

目 录

前言

第 1 章 重金属与有机污染物	1
1.1 重金属污染	1
1.1.1 我国重金属废水污染现状	1
1.1.2 重金属废水的处理特点	2
1.2 有机物污染	3
1.3 复合污染	4
第 2 章 白腐真菌在环境中的应用	6
2.1 白腐真菌及其酶学	6
2.1.1 白腐真菌概述	6
2.1.2 白腐真菌的分类	6
2.1.3 白腐真菌的生理特点	6
2.1.4 白腐真菌酶学	7
2.2 白腐真菌和水污染控制	9
2.2.1 白腐真菌处理技术	9
2.2.2 白腐真菌对重金属废水处理效率的影响因素	14
2.3 污染物对白腐真菌的影响	15
2.3.1 菌体生长代谢	15
2.3.2 影响酶活	16
2.3.3 重金属对白腐真菌生物降解过程的影响	19
第 3 章 白腐真菌处理含重金属和有机污染物的废水	21
3.1 黄孢原毛平革菌去除水体重金属的应用基础研究	21
3.1.1 <i>P. chrysosporium</i> 对含 Cd(Ⅱ)废水的去除	21
3.1.2 <i>P. chrysosporium</i> 对含 Cu(Ⅱ)废水的去除	29
3.1.3 <i>P. chrysosporium</i> 对含 Zn(Ⅱ)废水的去除	32
3.1.4 <i>P. chrysosporium</i> 去除水中重金属的两阶段方法	35
3.2 <i>P. chrysosporium</i> 处理 Cd(Ⅱ)和 2,4-二氯酚复合污染废水	37
3.2.1 pH 对吸附降解效果的影响	38
3.2.2 Cd(Ⅱ)初始浓度对吸附降解效果的影响	39
3.2.3 2,4-DCP 初始浓度对吸附降解效果的影响	40

3.2.4	接种量对吸附降解效果的影响	42
3.2.5	Cd(Ⅱ)初始浓度不同时酶活的变化	43
3.2.6	溶液 pH 和胞外蛋白质的变化	44
3.2.7	扫描电镜及能谱分析	45
3.2.8	红外光谱分析	46
3.2.9	小结	47
3.3	改性白腐真菌对 Cr(VI)废水吸附的研究	48
3.3.1	真菌在重金属废水处理中的作用	48
3.3.2	改性材料吸附重金属废水的作用机理	50
3.3.3	各种改性技术处理重金属废水的研究	50
3.3.4	影响吸附的因素和存在的一些问题	57
3.3.5	小结	58
3.3.6	白腐真菌改性吸附剂的性质	59
3.3.7	聚乙烯亚胺改性白腐真菌对含 Cr(VI)废水的吸附研究	62
3.3.8	展望	70
3.4	复合纳米生物材料处理重金属-有机物废水的研究	71
3.4.1	氮修饰纳米 TiO ₂ 的性质分析	71
3.4.2	复合纳米生物材料的性质分析	73
3.4.3	小结	75
3.4.4	复合纳米生物材料对 Cd(Ⅱ)和 2,4-DCP 处理能力的研究	75
3.4.5	小结	82
3.4.6	复合纳米生物材料的污染物去除机制研究	82
3.4.7	展望	86
第 4 章	废水处理中白腐真菌的物质分泌与调控	87
4.1	真菌胞外聚合物及其与重金属作用机制的研究	87
4.1.1	真菌胞外聚合物的研究进展	87
4.1.2	真菌胞外聚合物与重金属作用机制的研究进展	90
4.1.3	培养基类型对白腐真菌活菌体吸附 Pb(Ⅱ)的影响	94
4.1.4	白腐真菌胞外聚合物的产量与组成研究	102
4.1.5	白腐真菌胞外聚合物对菌体吸附 Pb(Ⅱ)的影响	105
4.1.6	展望	111
4.2	重金属 Cd(Ⅱ)诱导下白腐真菌胞外培养液中蛋白质的提取及分析	112
4.2.1	重金属对白腐真菌的影响	112
4.2.2	白腐真菌对 Cd(Ⅱ)的吸附及培养液中蛋白质的提取	113

4.2.3	Cd(II)诱导白腐真菌培养液中蛋白质的单向电泳及双向电泳	116
4.2.4	Cd(II)诱导白腐真菌培养液中蛋白质的质谱鉴定	119
4.2.5	展望	122
4.3	微生物胞外纳米结晶颗粒的形成及聚集生长机制的研究	122
4.3.1	微生物胞外纳米结晶颗粒	122
4.3.2	白腐真菌胞外 Cd(II)结晶颗粒的形成及聚集生长	127
4.3.3	白腐真菌胞外 Cd(II)结晶颗粒聚集生长机制研究	135
4.3.4	展望	140
4.4	<i>P. chrysosporium</i> 促进 CdS 量子点的生物合成及其机制	141
4.4.1	CdS 量子点的生物合成	141
4.4.2	<i>P. chrysosporium</i> 促进 CdS 量子点的生物合成及其机制研究	142
4.4.3	结论	152
第 5 章	白腐真菌对废水中重金属和有机污染物的应激与调控	155
5.1	Cd(II)诱导黄孢原毛平革菌产生氧化损伤及其解毒机制	155
5.1.1	Cd(II)诱导 ROS 产生对细胞活性的影响	155
5.1.2	细胞膜损伤	156
5.1.3	抗氧化酶类	158
5.1.4	谷胱甘肽	160
5.1.5	扫描电镜及能谱分析	162
5.1.6	透射电镜分析和 X 射线衍射分析	162
5.1.7	小结	164
5.2	硫化氢缓解 2,4-DCP 毒性并提升黄孢原毛平革菌对其的降解	164
5.2.1	溶液 pH 变化	165
5.2.2	降解效果对比	166
5.2.3	H ₂ S 促进作用的验证	167
5.2.4	细胞活性	167
5.2.5	氧化应激水平	168
5.2.6	小结	169
5.3	废水中 Pb(II)、Cd(II)胁迫下黄孢原毛平革菌产生酶类的氧化应激反应	170
5.3.1	重金属胁迫下胞外酶活随时间的变化	170
5.3.2	重金属离子浓度对酶活性的影响	172
5.3.3	Pb(II)、Cd(II)对胞内细胞色素 P450 含量的影响	173
5.3.4	小结	176
5.3.5	黄孢原毛平革菌抵抗重金属氧化应激机制分析	176

5.4	Cd(II)胁迫下黄孢原毛平革菌的适应性反应研究	178
5.4.1	Cd(II)胁迫对黄孢原毛平革菌生长的影响	178
5.4.2	Cd(II)胁迫下黄孢原毛平革菌对其生存环境 pH 的影响	181
5.4.3	Cd(II)浓度对黄孢原毛平革菌去除 Cd(II)效果的影响	181
5.4.4	小结	182
5.5	Cd(II)胁迫下黄孢原毛平革菌的抗性反应研究	183
5.5.1	Cd(II)胁迫下黄孢原毛平革菌谷胱甘肽代谢的动态响应	183
5.5.2	Cd(II)胁迫下黄孢原毛平革菌乙二酸代谢的动态响应	186
5.5.3	谷胱甘肽-乙二酸代谢对脂质过氧化作用的影响	187
5.5.4	小结	189
5.6	模拟 Cd(II)和 2,4-DCP 废水中黄孢原毛平革菌氧化应激产生的 机制研究	189
5.6.1	Cd(II)和 2,4-DCP 胁迫下黄孢原毛平革菌的氧化应激反应	189
5.6.2	Cd(II)和 2,4-DCP 胁迫对黄孢原毛平革菌抗氧化系统的影响	193
5.6.3	Cd(II)和 2,4-DCP 胁迫下黄孢原毛平革菌抗氧化应激机制分析	199
第 6 章	废水处理中白腐真菌细胞膜与外界环境的物质交换	201
6.1	Cd(II)和 2,4-DCP 胁迫下黄孢原毛平革菌质子流和氧气流响应特征	201
6.1.1	概述	201
6.1.2	黄孢原毛平革菌 H^+ 流和 O_2 流响应特征	201
6.1.3	小结	205
6.2	Cd(II)流揭示黄孢原毛平革菌对 Cd(II)的去除特征	205
6.2.1	概述	205
6.2.2	Cd(II)流响应特征	206
6.2.3	小结	209
6.3	黄孢原毛平革菌细胞膜对 Cd(II)胁迫的生理应答机制	209
6.3.1	概述	209
6.3.2	黄孢原毛平革菌对 Cd(II)胁迫的生理应答	210
6.3.3	小结	214
参考文献		215

第 1 章 重金属与有机污染物

1.1 重金属污染

1.1.1 我国重金属废水污染现状

我国河流的重金属污染问题十分突出,城市河流、湖泊、近岸海水等都不同程度地受到重金属的污染,导致其底泥污染率高,从而严重地威胁着我国的饮水安全问题。我国作为饮用水水源的地表水主要为河流、湖泊和水库,有关部门对这几类水体进行了监测和分析,认为:①近年来,我国各大湖泊、水系中各种重金属污染呈上升趋势,已经开始影响到水体的质量;②主要的重金属污染物为汞、镉、铬和铅,其他的重金属,如镍、铍、铊和铜等 in 各类地表水饮用水中也严重超标^[1-3]。朱映川等报道了我国水系部分河段的污染状况,发现长江水系、黄河水系、海滦河及大辽河水系均有不同程度的镉污染,而且在对所统计的 26 个国家控制湖泊、水库的监测中同时发现有镉和汞污染,其中汞污染程度大于镉污染^[4]。此外,研究者发现长江^[5-7]、黄河^[8]、海河^[9]、珠江^[10]及太湖^[11]也受到了不同程度的重金属污染。王海东等通过研究国内部分河流和湖泊(如长江、黄河、松花江、黄浦江、太湖及巢湖等)等地表水水体痕量重金属的含量及其变化得出我国地表水体中重金属污染的特征^[4]:①地表水受到重金属的复合污染;②受水体环境影响,重金属主要赋存在悬浮物和沉积物中;③湖泊支流中的重金属含量普遍高于湖区的重金属含量;④水体中的重金属含量与 pH 有密切关系^[12-14]。

我国江、河、湖、库底质的污染率高达 80.1%。长江支流赣江的镉和铅超标,靖江六价铬为主要污染物^[15]。苏州河上海市区段底泥呈现铬和镉污染状态,铬的污染尤为严重^[16]。太湖底泥中铜、铅、镉的含量均处于轻度污染水平。浙江千岛湖湖底沉积物中镉、锌、汞的自然富集系数大于正常值的 2 倍,出现污染现象^[17]。

目前,全国重金属污染最严重的河流是湘江流域,湘江是长江的第二大支流,流域面积约 9.5 万 km²,它集中了湖南省的六成人口和七成左右的国内生产总值,承载了 60% 以上的污染^[18-21]。长期以来,有色金属采冶一直是湖南省发展经济的重要手段,其生产的多种金属产量居全国首位,长期的掠夺式开采,使伴生矿被当成废矿渣而被遗弃,直接导致重金属污染问题遍及三湘大地^[22]。

近几年重金属污染问题日益突出^[23]。例如,2008 年广西河池市的砷污染饮

用水事件,云南高原九大明珠之一的阳宗海发生的严重砷污染事件;2009年陕西宝鸡的血铅超标事件,湖南浏阳的镉超标事件,湖南娄底的铬废渣事件;2011年紫金矿业汀江事件,渤海蓬莱油田漏油,云南曲靖铬渣非法倾倒;2012年广西龙江河的镉污染事件;2013年湖南的“镉大米”事件,广西贺江镉、铊等重金属污染事件;等等。因此,重金属污染问题成为当今最严重的环境问题之一,如何科学有效地解决重金属污染已经成为世界各国政府及广大环境保护工作者研究的热点。

湘江是长沙、株洲、衡阳等沿岸城市的饮用水源地,流域内遍布铅、锌、锰等重金属冶炼企业^[24,25],大量含重金属废水的排放和含重金属废渣的露天堆放,严重破坏了湘江的水环境和生态^[26];多种重金属在湘江底泥中沉积,使部分河段沉积物中铅、镉、铜、锌等的含量高达 $1050\mu\text{g/g}$ 、 $173\mu\text{g/g}$ 、 $465\mu\text{g/g}$ 和 $5076\mu\text{g/g}$ ^[27]。

湘江霞湾港位于湖南省株洲市境内,发源于株洲市区西北部的干旱塘,株洲市内矿藏丰富,冶炼厂的非达标污水排放造成霞湾港底泥中汞、镉、铅、砷等重金属严重超过国家土壤标准阈值^[28,29],图1.1为作者拍摄的湘江株洲段霞湾港重金属污染现状,从图中可以看出其底泥呈深黑色。



图 1.1 湘江株洲段霞湾港重金属污染现状

1.1.2 重金属废水的处理特点

水体中的重金属不易被分解破坏,通常只能转移它们的存在位置和转变其物化形态达到对其处理的目的^[30-34]。

重金属在水体中的迁移转化主要包括以下三种方式^[35]:①机械迁移,即水流

搬运;②物理化学迁移,包括吸附、沉淀作用和氧化还原作用^[36-38];③生物迁移,即重金属随生物体的新陈代谢、生长和死亡等过程进行流动和迁移。根据这些迁移转化方式,可以得到相应重金属废水的处理工艺。例如,采用化学沉淀法使废水中的重金属从溶解性的离子状态转变为难溶性的化合物状态,从而沉淀下来达到去除的目的;采用离子交换法将水中的重金属离子转移到离子交换树脂上,经再生后又从树脂上转移到再生废液中;等等^[39-41]。

重金属废水的治理要采取综合性措施^[42]。首先,改革生产工艺,尽量不用或少用毒性大的重金属,这是最根本的措施^[20];其次,生产过程中使用重金属需有合理的工艺和完善的设备,并实施科学的管理和运行操作,降低重金属的耗用量及其随废水的流失量,以此为基础对量少浓度低的废水进行处理^[43-46]。重金属废水治理还应遵循在生产地就地处理、不与其他废水混合,以免使处理工艺复杂化的原则。而不应未经处理直接排到城市下水道,混合城市污水进入污水处理厂。使用含有重金属的污泥和废水作为肥料或灌溉农田,会使土壤也受到污染,造成重金属在农作物中的积累。通常农作物中富集系数较高的重金属为镉、镍和锌^[47],水生生物中富集系数较高的重金属为汞和锌^[48]。

处理后的重金属废水包括两种产物:一种是基本上脱除了重金属的处理水。这部分废水若重金属浓度低于排放标准便可以排放,常见的几种毒害重金属的排放标准如表 1.1 所示,若符合生产工艺用水要求,最好回收利用。另一种是重金属的浓缩产物。浓缩产物中的重金属大都有使用价值,应尽量回收利用,没有回收价值的,要加以无害化处理。

表 1.1 废水中重金属最高允许排放浓度国家标准 (单位:mg/L)

项目	《污水综合排放标准》 (GB 8978—1996)	《城镇污水处理厂污染物排放标准》(日均值) (GB 18918—2002)
总铅	1.0	0.1
总镉	0.1	0.01
总汞	0.05	0.001
总铬	1.5	0.1
六价铬	0.5	0.05
总砷	0.5	0.1

1.2 有机物污染

有机物是生命产生的物质基础,对人类的生命、生活、生产具有重要意义。通常把含有碳元素的化合物称为有机物,其组成中除含有碳元素外,通常还含有氢、

氧、硫、氮等元素。有机污染物是指以碳水化合物、蛋白质、氨基酸及脂肪等形式存在的天然有机物及某些其他可生物降解的人工合成有机物。随着各国工业的发展,人工合成的有机物日益增多,目前已知的有机物种类约有 700 多万,其中人工合成的有机物种类达 10 万种以上,且以每年 2000 种的速率递增。水体中的有机物在生物氧化分解过程中会消耗水体中一定量的溶解氧,当水体中的溶解氧不足时,氧化作用就会停止,从而导致有机物的厌氧发酵,最终使水体发散出臭味,使水质遭到破坏^[49]。此外,有机污染物对生物体有毒性和致癌、致畸、致突变的“三致”作用,并且在人体内具有积累性。某些有机物还会对人的生殖系统产生不可逆的影响^[50]。

有机污染物分为天然的和人工合成的两类,相应的其来源也有天然来源的有机污染物和人类活动中排放的有机污染物。天然有机物主要来自于地下水中的痕量有机化合物,主要有腐殖酸,其对水体并无严重的影响,但它会引起地下水中重金属的活动性增加^[51]。目前,大部分有机污染物都来自于人类活动,主要有石油开采、城市垃圾填埋、化肥的施用^[52]、生活洗涤剂及空气污染物质的沉降。

目前,全球水污染问题已经到了岌岌可危的地步,严重影响了人类的正常生活,其中有机污染是一个不容忽视的因素。美国环境保护署水质调查发现,供水系统中有机污染物共有 2110 种,饮用水中含有 765 种。1994 年以来,美国在饮用水中发现了 100 多种合成有机物,如多氯联苯、多环芳烃,均具有“三致”作用。我国的水环境有机污染也十分严峻,危害人类健康的有机物有 200~300 种。全国有检测的 1200 多条河流中有 850 条受到不同程度的污染,并且有不断加重的趋势。南京水源水中发现多种有机污染物,其中的阳性水样中存在美国 EPA 所列的 129 种优先污染物及其他黑名单上的有毒有害物质。我国的多个江河合成有机物的污染也很突出,据调查,全国 35 个江段的水体中痕量有机物种类繁多,“三致”物超标倍数高。在有机污染物中,比较突出的主要有有机氯化物、多环芳烃类等难降解的物质^[53]。

1.3 复合污染

复合污染的研究最早源于药物学中两种药物联合毒性的研究,后来逐渐推广到化学物质联合毒性的研究,而真正复合污染的研究则始于 20 世纪 70 年代初。随着环境问题的加剧,复合污染日益受到人们的重视。

复合污染通常是指两种或两种以上不同性质的污染物或几种来源不同的污染物,在同一环境单元同时存在,并同时生物体产生胁迫作用的环境污染现象。复合污染中多种污染物同时存在,共同对大气、水体、土壤、生物和人体产生综合作用^[54]。随着工农业的快速发展,进入环境中的污染物种类日益增多,对多种污

染物共同存在于同一环境并相互作用所形成的环境污染效应应该受到重视^[55]。

复合污染有两种分类系统,按污染物来源分为:①同源复合污染。它是由处于同一环境介质中的多种污染物所形成的复合污染,根据介质的不同进一步分为大气复合污染型、水体复合污染型和土壤复合污染型。②异源复合污染。它是由不同环境介质来源的同一污染物或不同污染物所形成的复合污染现象,进一步分为大气-土壤复合污染、大气-水体复合污染和土壤-水体复合污染。另外,按污染物类型,复合污染又分为有机复合污染、无机复合污染及有机物-无机物复合污染。

国内外学者对复合污染物联合作用的概念和内涵进行了较多阐述,虽然目前没有被大众接受的统一说法,但归纳起来主要有三种类型:①相似联合作用,也称为剂量相加作用。各单个污染物间无相互作用,相互之间没有影响,所有污染物的作用方式、作用机制均相同,只是强度不同。②效应相加作用,污染物间不存在相互作用,而且污染物的作用方式、机制和部位不同。③交互作用,污染物间存在相互作用,所产生的联合作用效应大于(协同加和作用)或小于(拮抗抑制作用)各污染物单一污染所产生的效应之和。在上述三种作用中,交互作用最为普遍,也是目前研究的热点^[56,57]。

复合污染对生物体的毒害机理主要表现在:①影响生物细胞结构。复合污染通过影响生物的细胞结构,特别是膜结构而发生相互作用,膜结构是污染物相互作用的优先部位,膜结构的改变使膜的通透性发生变化,影响物质在生物体内的运输。②干扰生物生理活动与功能。通过干扰生物体的正常生理活动与功能而与其发生相互作用。③竞争结合位点。化学性质类似的污染物在细胞表面及代谢系统的活性部位存在竞争作用,从而影响污染物的相互作用。④络合或螯合作用。自然界中存在许多有机、无机络合剂,影响污染物在环境系统与生物系统中的物理化学行为,从而对其交互作用产生影响。此外,复合污染物的毒害作用还有毒害生物体内的酶、干扰生物体正常的生理过程、改变细胞的结构与功能、螯合作用与沉淀作用、干扰生物大分子的结构与功能^[58,59]。

第 2 章 白腐真菌在环境中的应用

2.1 白腐真菌及其酶学

2.1.1 白腐真菌概述

白腐真菌是一类使木材呈白色腐朽状态的真菌,其能够分泌胞外氧化酶降解木质素,且降解木质素的能力优于降解纤维素的能力,因这些胞外氧化酶可以促进木质腐烂成为淡色的海绵状团块——白腐,故将能分泌这些胞外氧化酶的真菌称为白腐真菌(white-rot fungi, WRF)。白腐真菌的概念是从功能角度上对生物进行的描述和界定。20 世纪 80 年代初, *Science* 杂志首次报道了白腐真菌黄孢原毛平革菌 [*Phanerochaete chrysosporium* (*P. chrysosporium*)] 的降解作用^[60], 引起了世界各国科学界及工业界的高度重视,并对白腐真菌的生物学特性、降解规律、生化原理、酶学、分子生物学、工业化生产及环境工程实际应用等方面进行了大量研究。

2.1.2 白腐真菌的分类

白腐真菌在分类学上属于真菌门,绝大多数为担子菌纲,少数为子囊菌纲,主要分布在革盖菌属(*Coriolus*)、卧孔菌属(*Poria*)、多孔菌属(*Polyporus*)、原毛平革菌属(*Phanerochaete*)、层孔菌属(*Fomes*)、侧耳属(*Pleurotus*)、烟管菌属(*Bjerkandera*)和栓菌属(*Trametes*)等。白腐真菌中研究历史最久、关注最多、研究最透的当属黄孢原毛平革菌(*P. chrysosporium* Burdsal),其属于担子菌门(Basidiomycota),层菌纲(Hymenomycetes),非褶菌目(Aphyllphorales),伏革菌科(Corticaceae),原毛平革菌属(*Phanerochaete*)。黄孢原毛平革菌主要有:①BMF-F-1767(ATCC 24725),1968 年从俄罗斯的中东地区(East Central Russia)分离得到;②ME-446(ATCC 34541);③OGC101,是 Gold 实验室将 ME-446 的分生孢子(conidia)涂抹在含山梨糖(sorbose)的培养基上筛选得到的单菌体,为 ME-446 的衍生物,其担孢子形成的菌落不能在含纤维素的培养基上生长,是异核体^[61]。

2.1.3 白腐真菌的生理特点

白腐真菌是一类丝状真菌,可以降解植物木质素,引起木质白色腐烂。在分

类学上白腐真菌大多数属于担子菌,少数属于子囊菌,可以分泌胞外酶降解木质素和纤维素,能在纯种培养中将木质素彻底降解为 CO_2 和 H_2O ,因此在全球碳循环中起着重要作用^[62-65]。其分类多种多样,各成员的生理特点表现出很大的差异。

P. chrysosporium 具有发达的菌丝体,菌丝常为多核。在合适的培养条件下,菌丝生长旺盛,在空气和水的界面上延展,容易产生大量无性分生孢子,分生孢子表面有小杆状结构,带负电荷,等电点近 2.5;具有疏水性,是直径为 $5\sim 7\mu\text{m}$ 的卵形颗粒;表面组成为 35% 的蛋白质、20% 的多糖和 33% 的类烃物质。

木质素降解酶系是白腐真菌独有的酶系统,可以对木质素和众多持久性有机污染物进行降解,因具有此特性,白腐真菌及提取的胞外酶被广泛用于氯苯^[66]、苯胺染料^[67]、内分泌干扰物^[68]等难降解有机污染物的降解。

2.1.4 白腐真菌酶学

白腐真菌酶学是其生物学和生物技术的核心,是研究最为活跃和发展最为迅速的领域之一。从化学角度来看,一些活体生物体参与的生物化学反应都是在生物催化剂的参加、催化和调控下进行的。因此,对白腐真菌的基础研究和应用研究,即无论是对其降解规律及机理的阐述、降解反应工艺条件的探索,还是其在各工业领域的利用开发等,核心问题始终都是围绕白腐真菌参与降解活动的代表性酶种及其生理和催化特点以及实现酶高产量和降解效率的调控开展的^[69,70]。

白腐真菌对木质素和许多异生质的降解依赖于一些酶的产生和分泌,这些酶被称为木质素降解酶系统或木质素修饰酶系统^[71-73]。它们或束缚在细胞壁上,或分泌在细胞外,各有分工又协同作用。作为一个酶系统,这些与降解过程有关的酶只有当一些主要营养物质,如氮、碳、硫受限时才形成,主要包括以下两类。

1. 木质素修饰酶

作为全球碳循环的重要调节者,白腐真菌分泌的木质素修饰酶,如锰过氧化物酶(MnP)、木质素过氧化物酶(LiP)和漆酶(Lac)^[74],不仅在裂解天然木质素中起着重要作用,而且是染料等外源化合物的降解者。其中,MnP 和 LiP 为含铁的血红蛋白胞外酶,需过氧化氢(H_2O_2)触发其氧化而启动酶的催化循环^[75];Lac 为含铜多酚氧化酶。一些白腐真菌可以产生这三种酶,然而有些白腐真菌只能产生其中的一种酶或两种酶。在裂解木质素的过程中,木质素修饰酶的作用至关重要,但是木质素的矿化往往需要木质素修饰酶与其他辅酶联合起作用^[76]。这种辅酶本身不能降解木质素,如乙二醇氧化酶和超氧化物歧化酶,它们主要是在细胞内产生过氧化氢,产生的过氧化氢对 MnP、LiP 和葡萄糖氧化酶等起辅助作用^[61]。

主要的木质素修饰酶为氧化还原酶,包括两种过氧化物酶(LiP、MnP)和一种酚氧化酶(Lac)。科学界在利用白腐真菌降解木质素和难降解污染物的过程中,对木质素修饰酶的生理特性进行了广泛的研究。对这些研究结果进行总结可以得出以下结论:白腐真菌在次生代谢阶段产生木质素修饰酶;通常在碳源或氮源受限制时才会诱导白腐真菌合成和分泌木质素修饰酶;白腐真菌的 LiP 和 MnP 在氧分压高时产生量较理想,在液体浸没式鼓气培养下 LiP 和 MnP 的表达受抑制,Lac 的产量增加。这些酶的生理特征对设计、优化白腐真菌处理染料废水等具有重要的指导意义。

几乎所有的白腐真菌和各种垃圾降解真菌产生的最普遍的木质素氧化酶为 MnP^[77]。这些酶是含有铁原卟啉 IX 辅基、分子质量为 32~62.5kDa、以多个亚基形式分泌的糖醇解蛋白。尽管 Fe 在过量时具有生物毒性,但它是生物生长代谢的必需元素。Fe 作为 LiP 和 MnP 的辅助因子,在酶催化降解反应中起着至关重要的作用。此外,Fe 还在 Fenton 反应对纤维素的裂解过程中起着关键作用^[78]。MnP 能将 Mn^{2+} 氧化为 Mn^{3+} ,通过乙二酸等螯合剂的螯合作用使其稳定,同时其本身也可由白腐真菌分泌。螯合的 Mn^{3+} 充当一个高活性的低分子质量的、分散的氧化还原反应调节剂。因此,MnP 能够氧化和分散木质素及难降解的外源性物质等基质。试验研究表明,巯基和不饱和脂肪酸等助氧化剂物质能增强其解聚作用^[79]。

LiP 能够催化非酚类芳香族木质素的氧化。LiP 被认为是真菌木质素分解系统的一部分^[80,81]。细胞外分子质量为 38~47kDa 的氮素糖基化的 LiP 的活性部位不仅含有亚铁血红素,并且拥有经典的过氧化物酶机制。LiP 通过催化氧化木质素侧链和相关化合物获得一个电子形成自由基。尽管 LiP 对芳香环的裂解作用已有相关报道,但 LiP 在转化 MnP 释放的木质素片段中的作用还有待进一步研究。对于有些活性很高的真菌,如垃圾降解真菌中的部分品种而言,LiP 并不是木质素降解中的一部分。LiP 主要用来降解一些难降解的芳香族化合物,这些化合物包括三环和四环的多环芳烃(PAH)、多氯联苯(PCB)和染料。2-氯-1,4-二甲氧基苯是白腐真菌新陈代谢的天然产物,被认为是 LiP 催化氧化过程中的氧化还原介体。多功能过氧化物酶(VP)作为第三类过氧化物酶,最近已有相关的研究报道。由于其不仅能氧化 Mn^{2+} ,还能氧化酚醛树脂和染料等非酚类多环芳烃化合物,被认为是 MnP 和 LiP 的混合物^[82]。

真菌 Lac 作为木质素氧化物酶系统的一部分,几乎所有木屑和垃圾转化担子菌属的真菌都可以分泌。这种分子质量为 60~390kDa 的氮素糖基化胞外氧化物酶类的活性中心含有 4 个铜原子,这些活性中心分布在不同的链接位点,并且被分为三种(I 型或蓝型铜、II 型或通常型铜、III 型或偶联的双核型铜)具有不同特性的类别。Lac 可催化氧化不同的芳香族化合物失去氢,并还原氧为水;Lac 能氧