

白腐菌的研究现状及其在堆肥中的应用展望*

黄丹莲 曾光明 黄国和 胡天觉 陈耀宁 时进钢

(湖南大学环境科学与工程系 长沙 410082)

摘要: 白腐真菌是一种能够引起木材白色腐朽的担子菌, 因其特殊的代谢类型及其独有的细胞外降解特质, 能降解各种难生物降解的有机污染物而成为近年来国内外研究的热点。本文从白腐菌的分类与来源、降解机制及其在工业、环境污染治理方面的应用研究进展等对近年来白腐菌的研究现状予以综述, 并对其在城市垃圾堆肥化中的应用前景做了展望。

关键词: 白腐菌, 研究现状, 堆肥, 展望

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2004) 02-0112-05

RECENT RESEARCH ON WHITE-ROT FUNGI AND ITS EXPECTED APPLICATION IN COMPOSTING

HUANG Dan-Lian ZENG Guang-Ming HUANG Guo-He HU Tian-Jue CHEN Yao-Ning SHI Jin-Gang

(Dept. of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha 410082)

Abstract: White-rot fungi is a kind of basidiomycetes making wood rotten. For their particular metabolism and extracellular degrading ability, they can degrade a lot of organic pollutants, and then become the hot point of international academic research. This paper reviews the recent research progress in many aspects, such as the sort and degradation mechanism of white rot fungus, advances in applied research for white rot fungi on industry and environmental pollution disposal and so on. In addition, some suggestions on the prospective application in the composting of municipal solid waste are presented in the end.

Key words: White-rot fungi, Advances in research, Composting, Expectation

自 70 年代以来, 筛选降解木质素微生物的工作取得了长足的进展, 人们从腐烂的木材中得到了能降解木质素的微生物—白腐菌, 是一类奇特的丝状真菌, 属于担子菌纲, 其腐生在树木或木材上, 因引起木质白色腐烂而得此名。20 世纪 80 年代初, 《Science》首次报道白腐真菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) 的降解作用, Tien 和 Glenn 两研究小组几乎同时从黄孢原毛平革菌的培养液中发现了木质素过氧化物酶, 便引起了环境界的广泛关注, 随后对白腐真菌生物学特性、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^[1]。据大量相关文献报道^[2,3], 对白腐菌的研究遍及全球, 主要包括英、美、法、德、瑞士、瑞典及日本等

* 国家自然科学基金资助项目 (No.50179011、70171055)

Project Granted by Chinese National Science Fund (No.50179011、70171055)

国家高技术研究发展计划项目 (“863” 项目) (No. 2001AA644020)

Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No.2001AA644020)

国家杰出青年科学基金 (No.50225926)

Project Supported by the Natural Science Foundation of China for Excellent Youth (No.50225926)

2000 年教育部高等学校优秀青年教师教学科研奖励计划资助项目

收稿日期: 2003-03-10, 修回日期: 2003-04-28

国,我国也进行了大量研究。

传统生物工艺主要是针对易降解有机物进行设计、运行的,但是仍然有许多特殊异生物质和排放污染物难于生物降解。而研究表明,白腐菌能降解各种结构相异的化学物质,包括在环境中持久且难以处理的污染物,其有着其它生物系统所不具备的优点,因而在环境保护与环境治理方面显示出富有希望的应用前景。

1 白腐菌的研究现状

1.1 白腐菌的分类及来源

白腐菌菌丝体一般为多核,少有隔膜,通常担子菌的两性结合是以锁状联合方式形成新的双核细胞,而白腐菌虽属担子菌纲却无锁状联合。多核的分生孢子常为异核,存在同宗配合和异宗配合两类交配系统,多数多孔菌、伞菌都属于此类型,《中国真菌志》便记载了 46 属 137 种。

目前,已研究的白腐菌有:黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*)、彩绒革盖菌 (*Coliulus versicolor*)、变色栓菌 (*Trametes versicolor*)、射脉菌 (*Phlebia radiata*)、凤尾菇 (*Pleurotus pulmonarius*)、朱红密孔菌 (*Pycnoporus cinnabarinus*) 等。其中研究得最多、也是最重要的是黄孢原毛平革菌及其所产生的木素过氧化物酶和锰过氧化物酶,该菌广泛分布于北美各地,在我国尚未发现,包括其在内的一些典型白腐菌及其来源见表 1^[1]。

表 1 一些白腐真菌及其生长的宿主木材

微生物	来源
<i>Coliulus versicolor</i>	落叶树木
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	来源不清楚
<i>Phlebia radiata</i>	落叶树木, 针叶树木
<i>Coriolus pruinatum</i>	落叶树木
<i>Polyporus varius</i>	山毛榉、赤杨
<i>Phellinus noxius</i>	橡胶树
<i>Dichomitus squaleus</i>	桦木、杨木、云杉等
<i>Panus tigrinus</i>	落叶树木

1.2 白腐菌的降解机制及其优势

1.2.1 降解机制:到目前为止,研究表明^[3],白腐菌是降解芳香化合物能力最强的微生物,特别是在降解木质素方面研究得最多。木质素是由苯丙烷结构单元通过醚键和碳碳键联接而成的复杂的、近似球状的无定形芳香族高聚物,溶解性差,并难以被酸水解。由于含有各种生物学稳定的复杂键型,导致微生物及其分解的胞外酶难与之结合,且对酶的水解呈抗性,故是目前公认的微生物难降解的芳香族化合物之一。

白腐菌对木质素的降解分两步进行:一是白腐菌利用菌丝体对木质素进行吸附;二是白腐菌利用分泌出的过氧化物酶对木质素进行催化氧化反应,从而降解木质素分子。白腐菌降解这类污染物的机理相当复杂,一般认为白腐菌降解木质素等环境污染物主要分为细胞内和细胞外两过程,且白腐菌的降解活动只发生在次生代谢阶段,并在主要营养物质(碳、氮、硫)限制条件下,启动形成整个降解系统^[2-3]。其过程是首先在细胞内,白腐菌自身产生 H_2O_2 的氧化酶:细胞内葡萄糖氧化酶和细胞外乙二醛氧

化酶。它们在分子氧的参与下氧化相应底物,激活过氧化物酶,从而启动酶的催化循环,对污染物降解起作用的木质素过氧化物酶(Lip)、锰过氧化物酶(Mnp)、漆酶(La)均在细胞内合成,分泌到细胞外,属细胞外酶,其中前两者均须以 H_2O_2 为底物,而漆酶以氧气作电子受体催化多酚化物经四次单电子传递形成醌及自由基。故降解污染物时,白腐菌借助 H_2O_2 激活,先形成高度活性的自由基中间体,由酶触发启动一系列自由基链反应,特别是其产生的细胞外 $\cdot OH$ 因具有超常的氧化能力,能攻击芳香化合物,产生正碳离子自由基,接着发生一系列反应,于是在对付难处理的环境污染物时仍能促使底物氧化,显示出高度的非特异性、无立体选择性,从而实现白腐菌对底物的细胞外氧化降解^[6]。

1.2.2 优势:白腐菌凭借其独特的细胞外解毒机制能承受并降解相当浓度的有毒物质,在降解难降解的污染物上有以下优势^[2]:(1)不需经过特定污染物的预条件化,便可非常有效地降解环境中的低浓度污染物。(2)具动力学优势,催化启动初始氧化反应的酶对底物无真正意义上的 K_m 值,从而有利于氧化产物的形成,并能将污染物降至零的水平。(3)产生氧化能力极强的 $\cdot OH$,抑制其他微生物生长,具竞争优势。(4)降解对象—有毒污染物不必进入细胞内代谢而在其细胞外即可得到有效降解,白腐菌从而显现出旺盛的生命力。(5)非专一性降解的特性使之能降解大量结构不同的化学物质,这便使白腐菌有更广的适用性。(6)适应于固、液两种体系,优于其它只能用于水溶液中可溶性底物的处理的其它微生物系统。(7)可利用废弃物中的木质纤维等廉价营养源,从而对营养物的要求低,所需投入成本低。由此可见,白腐菌作为高效、低耗、广谱、适用性强的微生物,在环境治理及工业生产方面都很有研究价值。

1.3 白腐菌的应用研究进展

尽管白腐菌降解机制复杂,而其技术本身也有一定难度,但由于其某些特性和降解优势而成为各国广泛研究的热点,在生物学特性和应用技术方面都有大量报道。到目前为止,白腐菌的应用研究总的说来体现在以下两大方面:一是利用其或者其所产的过氧化物酶系应用于工业上预处理某些原料以降低工业能耗,且实现清洁生产;二是利用其对底物的非专一性降解污染物而应用于环境污染治理。

1.3.1 白腐菌在工业上的应用:白腐菌现用于生物制浆主要可采用两种方法。一种是直接用菌丝体或经提取后的酶降解木质素,在处理硬木牛皮纸浆时取得较好结果,5d后纸浆的Kappa指数从11.6降到7.9;另一种在处理软木牛皮纸浆时效果不明显,但进一步用碱抽提后,Kappa指数可降到8.5^[1]。Kashino利用白腐菌IZU-154对阔叶木和针叶木生物机械制浆进行了研究,发现粗磨的山毛榉机械浆经真菌处理7d以后,可使后续磨浆能量消耗降低1/3~1/2;粗磨的云杉机械浆等采用真菌处理十多天后,强度性能得到改善。此外,白腐菌还可应用于饲料工业上,利用其处理饲料可提高动物对饲料的消化率,从而突破了秸秆仅用于反刍动物饲料的禁地;在食品工业如啤酒的生产中,可使用漆酶等进行沉淀和絮凝的脱除,使酒类得到澄清,且已有很多实验尝试使用秸秆进行酒精发酵或有机酸发酵。

1.3.2 白腐菌污染治理上的应用:美国的Bumpus研究利用白腐菌对煤进行解聚及增溶,避免了直接使用煤所引起的大气污染;Tien则致力于该菌对煤和石油的脱硫工作,并已取得了肯定性成果。在水污染治理方面,白腐菌凭着非特异性的降解性能,能有效降解废水生化处理过程中很难被降解的多氯联苯^[7]、多环芳烃、DDT、染料、炸药和

其它化合物如氯化物、叠氮化合物等。白腐菌用于纸浆漂白废水处理已经取得了很大进展,有人利用固定化菌丝技术,经过 3~4d 的处理后, COD 和 BOD 降低 60% 以上,氯代有机物可减少 45%。王庆生等采用正交实验法,利用白腐菌对硝基苯类化工废水进行了好氧生化处理实验研究,在常温 (25℃), pH 为 7, 进水 COD_{Cr} 为 2,000 mg/L, 硝基苯类进水质量浓度为 100mg/L, 停留时间为 60h 的条件下, COD_{Cr} 去除率达到 99%。白腐菌还能有效处理含 DDT 的污水, 研究表明^[8], 在外加营养物木质素和葡萄糖作用下, 在 20d 内白腐菌对 DDT 的降解率达 91.7%。另外白腐菌能较好的处理染料废水, Pointing^[9] 等用亚热带担子菌加上白腐菌降解含氯三苯甲烷和杂环聚合染料; Nigam^[10] 等用 3 种农业废物麦杆、木屑和玉米捣碎物吸附单一和混合染料, 吸附后的残渣是白腐菌的良好底物; Miyata^[11] 等人发现白腐菌 *Coriolus hirsutus* 在不添加氮源的培养基中能降解类黑精, 添加 Mn (II) 能激活锰独立过氧化物酶和锰过氧化物酶活性, 提高降解效率。在固体污染治理方面, 目前, 各国许多公司、研究机构利用白腐菌对污染物堆积地及受农药侵蚀的土壤进行生物修复研究。Yateen^[12] 等根据不同的土壤及其受石油烃污染的程度, 白腐真菌所显示出较强的降解能力, 在 12 个月内, 使土壤中的总石油烃由 32g/kg 下降到 7g/kg, 降解率高达 80%, 且随接种浓度的增加而提高。英国 Biotal 公司利用白腐菌处理被二氧芑和多氯联苯污染的土壤, 投资 52.2 万美元, 处理后土壤中的 PCB5 浓度从 200mg/kg 降到 1mg/kg 以下; 美国洛根的 Intech One-Eighty Corp 用于对 TNT, DDT 等引起的土壤污染进行治理, 以实现生物修复。

1.4 白腐菌所产酶的基因研究进展

目前国内外已对白腐菌所产的一些重要酶的 cDNA 进行了克隆与测序, 并开始采用重组技术研究 Lip、Mnp 的同质、异质表达及调控机制。Stewart 等^[13] 已指出木质素过氧化物酶的基因家族由 10 个基因组成, 并建立了关于木质素过氧化物酶基因在染色体上组成的详细的物理图谱。Reddy 等通过实验证明, 胞内次级信号分子 cAMP 的浓度在进入次生代谢时骤然升高, Lip 酶活性也伴随上升。而锰过氧化物酶基因则含有 6 或 7 个内含子, 6 个内含子的位置是保守的, mRNA 位点也是保守的, 遵循 GA-TG 法则。在同源表达的研究中, Mayfield 将 Mnp 的 cDNA 融合, 在 gpd 启动下构建同源转化质粒, 实现了同源表达。另外, 已研究的漆酶基因却含有 10 个左右的内含子, 这些内含子在活性域位置上有较高的保守性。Collins 等利用 RT-PCR 分析了铜离子浓度和氮源对漆酶基因在转录水平上的调控表达, 证明常用的诱导物 2, 5-xylidine 在转录水平上有增强漆酶基因的作用。Scheel 等^[14] 则从几种白腐菌中克隆出漆酶的基因碎片。至今, 陆续已有约二十种漆酶基因得到克隆, 且一些基因在不同受体中得到了表达^[15]。通过这些酶基因研究工作的不断深入, 可对白腐菌施行更优的遗传操作。

2 白腐菌的应用展望

随着白腐真菌制品生产与生物补救技术走向市场, 且趋于商业化, 各国都对白腐菌真菌技术表现出了关注, 关于白腐菌的研究甚至深入分子水平进入基因工程阶段, 白腐菌于固、液环境下均能生长, 使得其有望成为固体污染治理的奇兵, 从查阅的大量文献来看, 将白腐菌应用于堆肥化过程以影响腐熟速度的研究几乎还是一片空白, 国外此方面的研究也不多见, 值得广大生物学家、环境科学家等认真思考, 其应用于堆肥是大有前景的。

一般废物常因含有大量木质纤维素而致使堆肥效果不佳,加强木质纤维转化为腐殖质便成为堆肥充分腐熟的关键,近几十年来,国内外学者一直在寻找降解木质纤维素的最佳途径,但利用微生物降解木质素等国内研究报道不多,特别是在木质纤维作为堆肥原料,其生物可降解性方面的研究则更少,这便为白腐菌在堆肥中的应用找到了立足点,今后结合经济可行性考虑,白腐菌技术在城市垃圾堆肥化中的应用可以从以下几个方面开展研究:(1)培养参数的改良:不同的堆肥原料有其不同的最佳控制参数,白腐菌接种于城市垃圾堆肥中,培养温度、通气状况, pH 值及各种营养因素(主要是 N)及底物浓度等都将影响木质素降解酶产生,从而需建立一个这样的关系模型,找到最佳的培养条件。(2)突变品系的筛选:采取紫外光诱变或 He-Ne 激光诱变等方法选育出更有效的菌种。(3)与其它微生物的联合利用:探索与其它生物类群生态系统关系,借鉴 EM 技术,开发出新的混合菌剂加速堆肥腐熟,并使其产业化,降低生产成本。(4)在可能被农药或其他难降解的异生物质污染的城市垃圾堆肥过程中接种白腐菌,以有效降解这些有毒有害物质。

参考文献

- [1] 岑沛霖, 蔡 谨. 工业微生物学. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [2] 李慧蓉. 环境科学进展, 1996, 4 (6): 69 ~ 77.
- [3] Andre F, Jaime R, Juanita F, *et al.* World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2001, 17: 31 ~ 34.
- [4] David M C, Andrew F S, Taylor, R M, *et al.* New Phytologist, 2001, 152 (1): 151 ~ 155.
- [5] Pavel K, Alena K, Jaroslav V, *et al.* World Journal of Microbiology & Biotechnology, 1999, 15: 269 ~ 276.
- [6] Argyropoulos, D S, Menachem S B. Lignin. In: Eriksson K E L. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, 1997, 57: 127 ~ 158.
- [7] Cenek N, Pavla E. Biodegradation, 1999, 10: 159 ~ 168.
- [8] Arisoy M. Bull Environ Contam Toxicol, 1998, 60: 872 ~ 876.
- [9] Pointing S B, Bucher V V C, Vrijmoed L L P. World Journal of Microbiology, 2000, 16 (2): 199 ~ 205.
- [10] Nigam p, Armour C, Banat I M, *et al.* Bioresources Technology, 2000, 72 (3): 219 ~ 226.
- [11] Miyata. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000, 89 (20): 145 ~ 150.
- [12] Yateen A. Environ Internat, 1998, 24 (1/2): 181 ~ 187.
- [13] Stewart P, Cullen D. J Bacterial, 1999, 3427 ~ 3432.
- [14] Scheel T, Holker U, Ludwig S, *et al.* Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 52 (1): 66 ~ 69.
- [15] Giardina P, Palmieri G, Scaloni A, *et al.* Biochem J, 1999, 341: 655 ~ 663.