

原毛平革菌堆肥处理有害废弃物的可行性*

马 瑛 张甲耀* * 管筱武 罗宇焯

(武汉大学环境科学系, 武汉 430072 E-mail: envir@whu.edu.cn)

摘要 原毛平革菌等白腐真菌对多环芳烃具有一定的降解能力. 本研究以花园土、玉米芯加入蕈配成模拟含蕈废弃物, 接入培养好的原毛平革菌后投入反应器, 保持温度 20℃, 通气量 0.1m³/h 的条件作堆肥处理. 经 42d 处理, 蕈含量从 5800mg/kg 降到 1967.36mg/kg, 去除率为 66.08%. 表明原毛平革菌可有效用于有害废弃物的堆肥处理.

关键词 原毛平革菌, 堆肥化, 有害废弃物.

Preliminary Study on the Application of *Phanerochaete chrysosporium* in Composting of Hazardous Waste

Ma Ying Zhang Jiayao Guan Xiaowu Luo Yuxuan

(Department of Environmental Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China E-mail: envir@whu.edu.cn)

Abstract It is known that the white rot fungus such as *Phanerochaete chrysosporium* have the ability to degrade polycyclic aromatic hydrocarbons. The simulative solid waste which containing garden soil, corncob and anthracene was prepared, then put it into composting reactor after inoculating well growth *phanerochaete chrysosporium*. The conditions of composting process were temperature 20℃, and aeration content 0.1m³/h. After 42 days of treatment anthracene content reduced from 5800mg/kg to 1967.36mg/kg and 66.08% removal of anthracene was observed. The results indicated that *P. chrysosporium* could be applied effectively to the composting of hazardous waste.

Keywords *Phanerochaete chrysosporium*, composting, hazardous waste.

堆肥过程最常用的接种方式, 一种是加入上次堆肥反应后的保留堆料, 另一种是接入纯的商业菌株^[1]. 很多研究表明, 白腐真菌可成功地降解土壤基质中的多环芳烃^[2~4]. 本实验以原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)作接种物, 采用装置式堆肥技术(in vessel composting), 研究白腐真菌处理有害废弃物的能力.

1 材料与方法

取 2.0kg 花园土, 加入 10.0g 蕈(用苯溶解), 配成一定浓度的模拟含蕈废弃物, 加入 1.0kg 玉米芯(粒径 0.5cm)作为共代谢底物, 提供基本生长碳源并调节堆料孔隙度(平行 2 份)堆料体积约 4.5L. 各堆料均保持低 N 水平, 不作任何营养调节, pH 自然, 其中 A 号堆

料接入原毛平革菌, B 号堆料作为对照, 不接入菌种. 将混匀后的堆料分别投入 2 个反应器, 保持堆温在 20℃左右, 黑暗避光, 通气量 0.1m³/h, 处理时间 42d.

1.1 实验材料及设备

实验用土壤采自武汉大学校内花坛, 为肥沃的花园土, 使用前风干过 20 目筛. 蕈为化学纯(徐行化工厂). 原毛平革菌(*P. chrysosporium* BKMF-1767)为美国农业部森林产品实验室赠送, 使用之前用麦芽汁斜面低温保存, 每 30d~60d 移种 1 次. 实验用圆柱状反应器同文献[5], 筒长与直径比约为

* 湖北省自然科学基金课题

* * 联系人

作者简介: 马瑛(1974~), 女, 理学硕士

收稿日期: 1998-12-08

2.2.1, 体积 12.5L.

1.2 实验方法

(1) CO_2 产量的测定^[6-8] 用 2mol/L 的 NaOH 溶液吸收反应器中排出的 CO_2 气体, 7d 后用 1mol/L HCl 滴定吸收液至终点, 1% 酚酞乙醇溶液作指示剂. 根据吸收 CO_2 所消耗的 NaOH 量换算成释放的 CO_2 量(g), 吸收液每 7d 更换 1 次, 具体通气过程如图 1 所示.

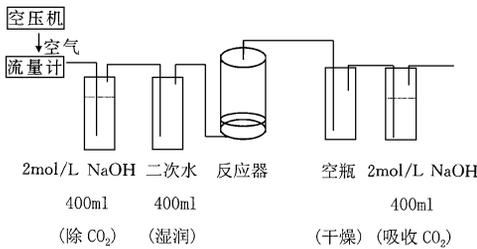


图 1 CO_2 产量测定过程示意图

(2) 堆肥样品的预处理及样品中葱的测定^[9, 10] 先将样品去除玉米芯于 50℃ 烘干, 磨碎, 过 60 目筛, 称 1.000g 干重的样品(平行 3 份)于 10ml 离心管中, 加入 5ml 甲醇(分析纯), 混匀后超声提取 5min, 然后再混匀, 再提取 5min, 共重复 4 次后, 以 4000r/min 离心 15min, 取上清液于 1ml 微量管中, 备 HPLC 测定.

测定仪器采用美国 Waters 280 型 HPLC 仪. 色谱柱: YWG-C18 (200 × 4mm, 10 μ); 991PDA 检测器; U6k 进样阀, 510 泵; 数据处理设备: Waters 色谱工作站; 流动相: 甲醇 水 = 80 : 20, 流速 0.8ml/min; 检测波长: 254nm; 柱温: 20℃. 以保留时间和峰高定性定量测定葱的含量(外标法).

(3) 原毛平革菌的计数 采用平板菌落法(马丁氏培养基)^[11].

(4) 原毛平革菌的培养 从斜面上取一环菌苔, 接种于 500ml 培养液中, 于 30℃ 恒温摇床培养 (120r/min), 至菌液明显混浊后(大约 7d), 以平板计数法计得原毛平革菌的数量约为 5.20×10^5 cfu/ml, 然后将 500ml 菌液倾倒入 A 号堆料上, 搅拌均匀后投入反应器, 定期测定原

毛平革菌数量的动态变化.

培养液成分^[12]: 葡萄糖 20g, 乙酸铵 0.20g, NaH_2PO_4 0.20g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, 微量元素营养液 1%, 吐温 80 0.05%, 蒸馏水 1000ml, pH6.0. 121.3℃ 灭菌 20s 后使用.

A 堆料每 7d 取样分析 CO_2 产量、原毛平革菌数量变化及葱含量变化. B 堆料检测原毛平革菌、 CO_2 产量以及在反应前后葱含量的变化. 堆肥反应时间 42d.

2 结果与分析

2.1 原毛平革菌在堆肥过程中数量的动态变化及 CO_2 产量分析

结果如图 2 所示. 图 2 表明, 在堆肥前 21d 内, A 堆料原毛平革菌数量略有下降, 随即大幅上升, 然后一直维持比较稳定的增长趋势. 说明

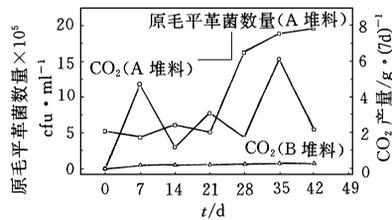


图 2 堆料中原毛平革菌数量及 CO_2 产量的过程变化

在堆肥反应中原毛平革菌有一适应过程. 而在 B 堆料中未检出原毛平革菌. B 堆料中 CO_2 产量较 A 堆料少得多, 而且始终维持在低水平, A 堆料 CO_2 产量曲线波动较大, 这是由不同时期原毛平革菌的活性变化所致. 原毛平革菌是一种能有效共代谢 PAH 的白腐真菌^[13, 14], 它以木质素为基本碳源, 分泌一组胞外过氧化物酶(木质素过氧化物酶 LiP 和锰依赖过氧化物酶 MnP), 此酶一旦活化, 即可氧化许多有机化合物, 包括污染物. 适宜的酶底物是藜芦基醇 (Veratryl alcohol), 它在细胞的二次生长时分泌, 藜芦基醇氧化的结果是产生藜芦基醇自由基离子, 这一活性介质可有效催化其它有机物的氧化^[15]. 玉米芯的作用是提供基本碳源和能源供原毛平革菌利用, 此外, 它还是一种良好的增量剂, 可提高通气效率. 因此, 图中 CO_2 产量

的波动可能与原毛平革菌在不同时期适应及利用的碳源变化有关. 需要注意的是, 胞外过氧化物酶必须在氮缺乏时才会产生. 许多研究证实, 在 N 限制条件下 PAHs 可被有效降解^[16, 17, 18]. N 含量大概是正常要求的 1/10 左右^[19].

2.2 葱的降解

葱是一种三环的 PAH, 分子式: $C_{14}H_{10}$, 水溶性为 0.07mg/L , 分配系数 $\log K_{ow}$ 为 4.5. 用 HPLC 法分析葱标准液, 测定波长 254nm , 葱的响应时间为 15.5min . 因实验用葱为化学纯, 故图谱中有微小的杂质峰.

堆肥反应过程 A 堆料中葱的残留率相对于取样时间的变化如图 3 所示.

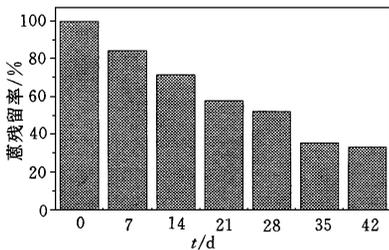


图 3 A 堆料堆肥过程中葱残留率的变化

经 42d 处理 A 堆料中葱从初始的 5800mg/kg 下降到 1967.36mg/kg , 降解率为 66.08%, 而 B 堆料作为对照, 葱含量在堆肥前后并无明显变化(堆肥前为 5800mg/kg , 堆肥后为 5506.5mg/kg), 其降解率仅为 5.06%. 因为堆料的营养水平低(低 N、低 P, 未加任何营养), 且仅以玉米芯和葱作为可利用碳源, 所以堆料中细菌的降解作用比较微弱. A、B 堆料中葱降解率的差异说明原毛平革菌对葱具有较强的降解能力, 且高于混合微生物在相同的处理时间内所获得的 55.25% 的降解率*. 尽管自然土壤环境中并不存在白腐真菌, 但只要土壤被适当培养并保持最适条件, 白腐真菌可成功地降解土壤基质中复杂的有机复合物^[20]. 本实验结束时发现残存 A 堆料中有大量白色真菌的菌丝, 这也说明了实验过程中葱的降解主要是依靠真菌的作用.

基质中葱与土壤的强烈吸附性及其极弱的

水溶性限制了葱的微生物可利用性^[21, 22], 从而直接影响到葱的生物降解. 原毛平革菌可分泌胞外过氧化物酶, 产生自由基离子. 藜芦基醇自由基离子能氧化并不直接在酶活力范围内的有机复合物^[23]; 游离的活性自由基离子的优越性在于它们能直接使距微生物细胞有效距离内的有机污染物发生大范围降解, 而不需要通过污染物与微生物的直接接触及污染物进入细胞膜这一过程来实现^[24]. 因此, 原毛平革菌经适当的培养, 其对葱的降解率会高于细菌(放线菌)对葱的降解率.

3 结论

原毛平革菌在适当的培养条件下, 其对葱的降解效率高于最适条件下混合微生物群对葱的降解效率, 说明此菌株可有效降解葱. 同时由于降解过程要求能耗小(无需外源加热)、营养条件低(低 N, 木质素作第一碳源), 因此培养这类真菌用于难降解有害废弃物的处理是一项极具应用前景的技术.

参 考 文 献

- 1 Kiyohiko Nakasaki et al. Effect of Seeding on Thermophilic Composting of Tofu Refuse. J. Environ. Qual., 1992, 21(4): 715 ~ 719
- 2 Glaser J A. Hazardous Waste Degradation by Wood Degrading Fungi, in Biotechnology and Biodegradation. Advances in Applied Biotechnology Series, Vol. 4, Ed. by D. Kamely et al., Houston, TX: Gulf Publishing Company, 1990
- 3 Gold M H et al. Degradation of Chlorinated Phenols and Chlorinated Dibenzo-P-Dioxins by *phanerochaete chrysosporium*, in Bioremediation of Chlorinated and PAH compound, Proceedings of the 2nd International Symposium of On-Site and In-Site Bioremediation. Ed. by R. Hinchee, Columbus, OH: Battelle Press, 1993
- 4 Lamar R T and D M. Dioetrich. In Situ Depletion of Pentachlorophenol from Comtaminated Soil by *Phanerochaete* spp. Appl. Environ. Microbiol., 1990, 56(10):

* 马瑛. 堆肥生物修复技术处理有害废弃物的研究. 硕士学位论文, 1998

- 3093 ~ 3100
- 5 马瑛等. 堆肥化生物修复技术处理有毒有害废弃物的模拟研究. *环境科学*, 1997, **18**(4): 65 ~ 69
 - 6 Mohammed Yusuf et al. Detoxification of Contaminated Sludge via in Vessel Composting. *Hazardous and Industrial Wastes*, 1990, 247 ~ 258
 - 7 许光辉, 郑洪元. *土壤微生物学分析方法手册*. 北京: 农业出版社, 1986. 226 ~ 228
 - 8 Frederick C Michel et al. Microbial Degradation and Humification of the Lawn Care pesticide 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid During the Composting of Yard Trimmings. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, **61**(7): 2566 ~ 2571
 - 9 何耀武等. 多环芳烃化合物在土壤上的吸附. *应用生态学报*, 1995, **6**(4): 423 ~ 427
 - 10 中国环境监测总站等译. *固体废弃物试验分析评价手册*. 北京: 中国环境科学出版社, 1992. 167 ~ 170
 - 11 范秀容等编. *微生物学实验*. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 1989. 261 ~ 262
 - 12 Tudor Fernandi et al. Biodegradation of TNT by *Phanerochaete Chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, **56**(6): 1666 ~ 1671
 - 13 Haemmerli S D et al. Oxidation of Benzo(a)pyrene by Extracellular Ligninase of *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.*, 1986, **261**: 6900 ~ 6903
 - 14 Sanglard D et al. Role of Extracellular Ligninases in Biodegradation of Benzo(a)pyrene by *Phanerochaete Chrysosporium*. *Enzyme Microb. Technol.*, 1986, **8**: 209 ~ 212
 - 15 Farland M J Mc et al. Remediation of Petroleum Impacted Soils in Fungal Compost Bioreactor. *Wat. Sci. Tech.*, 1992, **25**(3): 197 ~ 206
 - 16 Kenneth Hammel et al. Oxidative Degradation of Phenanthrene by the Ligninolytic Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, **58**(6): 1832 ~ 1838
 - 17 John A Bumps. Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, **55**(1): 154 ~ 158
 - 18 Jim A Field et al. Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by New Isolates of White Rot Fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, **58**(7): 2219 ~ 2226
 - 19 Lewandowski G A et al. Reactor Design for Hazardous Waste Treatment Using a White Rot Fungus. *Water Res.*, 1990, **24**(1): 75 ~ 82
 - 20 Haimann R A. Fungal Technologies for the Treatment of Hazardous Waste. *Environ. Prog.*, 1995, **14**(3): 201 ~ 203
 - 21 Manilal V B and M Alexander. Factors Affecting the Microbial Degradation of Phenanthrene in Soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1991, **35**: 401 ~ 405
 - 22 Weissenfels E D et al. Adsorption of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) by Soil Particles: Influence on Biodegradability and Biototoxicity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1992, **36**: 689 ~ 696
 - 23 Harvey P J et al. Veratryl Alcohol as a Mediator and the Role of Radical Cations in Lignin Biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*, 1986, **195**(1/2): 242 ~ 246
 - 24 Palmer J M et al. The Role of Peroxidases, Radical Cations, and Oxygen in the Degradation of Lignin. *Phil. Trans. R. Soc.*, 1987, (321): 495 ~ 505