

外生菌根真菌 *Xerocomus chrysenteron* 对 DDT 胁迫的耐受性及酶响应研究

晁元卿, 黄艺*, 费颖恒, 杨青

(北京大学环境科学与工程学院, 北京 100871)

摘要: 在纯培养条件下, 研究了外生菌根真菌红绒盖牛肝菌(*Xerocomus chrysenteron*)对不同浓度 DDT 的生长效应、耐受性和氧化酶活性, 测定了在 DDT 浓度为 $80.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 液体培养条件下菌种生物量积累和漆酶活性随培养时间的变化。结果表明, 不同浓度 DDT 处理并不会改变被试菌种的生长模式, 所有处理组均为典型的 Logistic 增长; *Xerocomus chrysenteron* 对 DDT 胁迫有很好的耐受性, 其半抑制浓度可达 $139.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 在 $80.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 液体培养条件下, *Xerocomus chrysenteron* 生长正常, 且 36 d 后培养液中 DDT 残留率仅为初始添加量的 3.5%; 在高浓度 DDT 胁迫下, 被试菌种的漆酶和过氧化物酶活性显著增强, 但液体培养条件下漆酶从第 16 d 开始出现, 36 d 后培养液中漆酶活性和比活力分别达到 $107.24 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $61.77 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 。外生菌根真菌 *Xerocomus chrysenteron* 通过不同方式来响应 DDT 胁迫, 显示出生物降解甚至矿化 DDT 的巨大潜力。

关键词: 外生菌根真菌; *Xerocomus chrysenteron*; DDT; 生长模式; 氧化酶

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)03-0788-07

Tolerance and Enzyme Response of Ectomycorrhizal Fungi *Xerocomus chrysenteron* to DDT Stress

CHAO Yuan-qing, HUANG Yi, FEI Ying-heng, YANG Qing

(College of Environmental Science and Engineering, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: The growth effect, tolerance and oxidative enzymes activities of *Xerocomus chrysenteron* under different concentrations of DDT were studied at the condition of pure culture. The changes of biomass accumulation and laccase activity were also examined along with the liquid medium period under the DDT concentration of $80.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The results show that various DDT concentrations don't change the growth mode of the studied ectomycorrhizal fungi, which are all in the mode of classic Logistic growth. *Xerocomus chrysenteron* has a good tolerant ability to the DDT stress, whose hemi-inhibit concentration reaches $139.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Under the liquid medium of $80.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of DDT, *Xerocomus chrysenteron* grows normally and after 36 days and the residue of DDT in the liquid medium is only 3.5% of the original concentration. Under the high concentration of DDT, the laccase and peroxidase activities significantly increase. The laccase is detected since the 16th day. After 36 days' culture, the laccase activity and specific activity in liquid medium reach $107.24 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ and $61.77 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ respectively. The ectomycorrhizal fungi *Xerocomus chrysenteron* responses to the DDT stress in various ways, which suggests large potential of biodegradation or mineralization of DDT.

Key words: ectomycorrhizal fungi; *Xerocomus chrysenteron*; DDT; growth mode; oxidization enzymes

滴滴涕(dichlorodiphenyltrichloroethane, DDT)是一种有机氯杀虫剂, 其化学性质稳定, 能通过食物链在人体内蓄积从而危害人类健康。因此, 在 2001 年 DDT 被《斯德哥尔摩公约》列为在全球范围内禁止或限制使用的持久性有机污染物(persistent organic pollutants, POPs)之一^[1]。20 世纪 60~80 年代初我国曾大量使用 DDT, 共累计使用 40 多万 t, 占全世界总用量的 20%^[2]。尽管我国从 1983 年开始禁止使用 DDT, 但由于其在环境中降解缓慢, 至今在我国沿海部分地区的土壤、水体和底泥中仍维持一定的残留水平^[3]。如何能够快速降解环境中残留的 DDT 成为人们研究的热点之一, 生物降解尤其是微生物降解 DDT 则成为研究焦点。

外生菌根真菌(ectomycorrhizal fungi)是与高等植

物根系共生的一种真菌, 它与植物在长期的进化过程中形成了互利的共生体——菌根(mycorrhiza)。菌根能够改善植物对水分和营养的吸收, 增强植物对环境压力的抵抗能力^[4]。Meharg 等^[5]对当前外生菌根真菌降解 POPs 的研究进行了综述, 表明在目前研究的 42 种外生菌根真菌中, 有 33 种能够降解 1 种或者多种有机污染物, 其中粘盖牛肝菌(*Suillus variegatus*)能降解 5 类不同的 POPs, 显示了外生菌根真菌生物降解 POPs 的巨大潜力。但目前暂无研究表明外生菌根真菌能够降解 DDT。在对 DDT 生物降

收稿日期: 2007-04-17; 修订日期: 2007-06-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(20677003)

作者简介: 晁元卿(1981~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为环境生态学, E-mail: yqchao@pku.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: yhuang@pku.edu.cn

解的研究中,多以细菌和白腐真菌(*Phanerochaete chrysosporium*)为研究对象^[6]. Bumpus 等^[7]认为白腐真菌能通过木质素降解酶系(ligninolytic enzymes)来降解并矿化 DDT. 而另有研究^[5]发现,外生菌根真菌同样能产生与木质素降解有关的漆酶和过氧化物酶.

因此,本研究将在纯培养条件下,研究外生菌根真菌红绒盖牛肝菌对不同浓度(0~1 000.0 mg·L⁻¹) DDT 的生长效应、耐受性和氧化酶活性,测定在 DDT 浓度为 80.0 mg·L⁻¹液体培养条件下,菌种生物量积累和漆酶活性随培养时间的变化,探讨了外生菌根真菌对 DDT 的耐受性和降解可能性.

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

供试菌种为红绒盖牛肝菌(*Xerocomus chrysentero*),采于北京西山针阔混交林,由北京林业大学鉴定.

DDT 标样购于北京市陆桥技术有限责任公司,纯度≥99.5%. 配制浓度为5 000 mg·L⁻¹ DDT 丙酮(MOS 纯)溶液,冷藏备用.

内标物五氯硝基苯(pentachloronitrobenzene, PCNB)购于北京市百灵威化学技术有限公司. 配制浓度为 100 mg·L⁻¹ DDT 丙酮(MOS 纯)溶液,冷藏备用.

3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)试剂:3,5-二硝基水杨酸购于北京市科普佳试剂有限公司.称取 6.5 g DNS 溶于少量热蒸馏水中,溶解后移入1 000 mL 容量瓶中,加入 2 mol·L⁻¹氢氧化钠溶液 325 mL,再加入 45 g 丙三醇,摇匀,冷却后定容至1 000 mL,置于棕色瓶中冷藏备用.

2,2'-连氮-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)[2,2'-azobis(3-ethylbenzothiazole-6-sulfonic acid), ABTS]购于北京市百灵威化学技术有限公司. 用去离子水配制成 0.5 mmol·L⁻¹溶液,冷藏备用.

1.2 母菌培养

在改良的 Kottke^[8]营养液中按 18 g·L⁻¹的质量浓度加入琼脂,1.4×10⁵ Pa 下高温灭菌 20 min,冷却至 50 ℃注入灭菌培养皿及试管,制备成平板及斜面固体培养基. 接种 *X. chrysenteron* 于固体培养基上,在 25 ℃下培养 2 周,备用.

1.3 实验设计和测定方法

1.3.1 耐受性和氧化酶点试实验

实验设计:耐受性和酶点试实验均在固体培养

基中进行. 制备 DDT 浓度分别为 0.1、1.0、10.0、100.0 和1 000.0 mg·L⁻¹的 Kottke 固体培养基. 将直径为 9 mm 的菌块从母菌培养基中取出,接种至含 DDT 的培养基中,置于 25 ℃恒温箱内培养. 以不加 DDT 的培养基为对照,每个浓度和对照设 4 个重复.

菌落直径的测定:从接种时刻开始,每 3 d 准时测定 *X. chrysenteron* 的菌落直径,按垂直方向测量 2 次,取平均值.

生物量的测定:培养 24 d 后,将固体培养基加入 200 mL 去离子水加热溶解,抽滤. 而后置于烘箱内 80 ℃下烘干 24 h,干燥器内冷却恒重后测量干重.

生长模式的拟合:利用 Origin 6.1 软件,采用 Logistic 方程 $D = K/[1 + a \exp(-bt)]$ 拟合,其中 D 为 t 时刻菌落直径; K 为直径增长的极限值; a 、 b 为回归参数. 计算 *X. chrysenteron* 直径增长的 3 个关键点^[9]: $t_1 = (\ln a - 1.317)/b$ (始盛期); $t_2 = \ln a/b$ (高峰期); $t_3 = (\ln a + 1.317)/b$ (盛末期),确定 *X. chrysenteron* 渐增期(0~ t_1)、快增期($t_1 \sim t_3$)、缓增期($t_3 \sim \infty$)这 3 个生长过程和最大生长速率[将 t_2 代入 $dD/dt = Kab \exp(-bt)/(1 + a \exp(-bt))^2$ 计算求得].

半抑制浓度的计算:先用对照菌落干重和各浓度 DDT 处理下的菌落干重数据计算出相对抑制率,计算公式为:相对抑制率=(对照的菌落干重-DDT 处理下的菌落干重)/对照的菌落干重×100%. 将 *X. chrysenteron* 各 DDT 浓度下的相对抑制率及其对应的 DDT 浓度输入 TSK 软件,即可得到 DDT 对其的半抑制浓度.

氧化酶点试^[10]实验:固体培养基培养 24 d 后,在 *X. chrysenteron* 菌落上滴加质量分数为 0.5%焦酚水溶液,呈褐色为多酚氧化酶;滴加 0.1 mol·L⁻¹的 1-萘酚的乙醇溶液,颜色变为紫罗兰色为漆酶;滴加 0.1 mol·L⁻¹的对甲酚的乙醇溶液,颜色变为黄到红色为酪氨酸酶;滴加质量分数为 0.2% H₂O₂ 和 0.5%焦酚水溶液,呈褐色为过氧化物酶. 滴加后观察并记录颜色出现的时间及强度变化.

所有数据均用 Excel 和 SPSS 13.0 进行方差分析.

1.3.2 培养基中 DDT 含量和漆酶活性随时间变化实验

实验设计:该实验在液体培养基中进行. 在 25 ℃和 150 r·min⁻¹振荡条件下, *X. chrysenteron* 在加入

DDT 的 Kottle 液体培养基中培养. *X. chrysenteron* 用孢子悬液接种. 每个 100 mL 三角瓶中加入液体培养基和 DDT 丙酮溶液,使液体培养基体积为 20 mL, DDT 含量为 $80.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. 三角瓶封口培养 36 d, 每 4 d 处理 1 组样品. 对照为不接种的 DDT 培养液. 所有处理组和对照均设 3 个平行.

培养液 DDT 含量的测定:采用内标法测定 DDT 含量,内标物为 PCNB. 通过抽滤分离菌丝和培养液. 先测定菌丝干重,而后将分离的培养液用 15 mL 正己烷(色谱纯)分 3 次萃取,合并萃取液,通过无水硫酸钠脱水得到 DDT 提取液. 提取液用旋转蒸发仪浓缩,用正己烷定容至 2 mL,转移至 2 mL 小瓶,加入 PCNB,用带 5973I MSD 检测器的 Agilent 6890N GC 测定其 DDT 含量,采用 DB5-MS 毛细管柱(30 m × 0.25 mm ID, HP). 程序升温,起始温度 50 ℃,保持 1 min,以 $15\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率升至 200 ℃,保持 1 min,然后以 $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率升至 280 ℃,保持 5 min. 进样口温度 250 ℃,检测器温度 280 ℃. 所有的数据均通过回收率校正.

葡萄糖含量测定:采用 3,5-二硝基水杨酸法测定^[11].

漆酶活性测定:取适量分离菌丝后的培养液用 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤,得到胞外酶的粗酶液^[12]. 测定方法^[13]为:取 0.1 mL 粗酶液,加入 2.6 mL pH 4.5 的 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸-乙酸钠缓冲液,然后加入 0.3 mL $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABTS 启动反应,25 ℃水浴下反应 5 min,用岛津 UV-2401 型紫外-可见分光光度计于 420 nm 下测吸光度. 1 个酶活力单位(U)是指反应体系中每 min 催化 $1\text{ }\mu\text{mol}$ ABTS 氧化所需的酶量.

所有数据均用 Excel 和 SPSS 13.0 进行方差分析.

2 结果与讨论

2.1 *X. chrysenteron* 暴露在不同 DDT 浓度中的菌落生长模式

对不同的 DDT 浓度处理的固体培养基上

X. chrysenteron 菌落直径测定结果的非线性拟合见图 1.

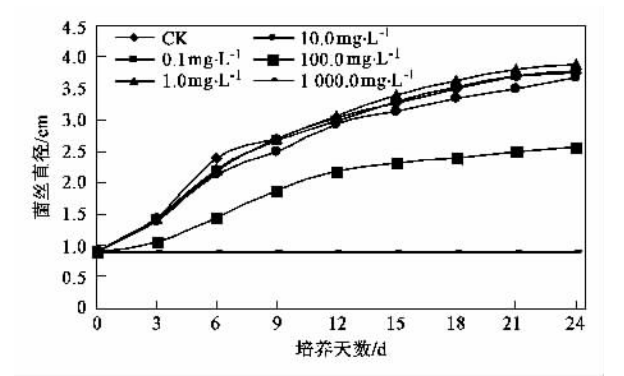


图 1 不同 DDT 浓度对 *X. chrysenteron* 菌落直径的影响
Fig.1 Effects of DDT mass concentration on the diameters of *X. chrysenteron*

培养 24 d 后,各处理组菌落直径分别为: $D_{\text{CK}} = 3.77\text{ cm}$ 、 $D_{0.1} = 3.78\text{ cm}$ 、 $D_{1.0} = 3.88\text{ cm}$ 、 $D_{10.0} = 3.68\text{ cm}$ 、 $D_{100.0} = 2.56\text{ cm}$ 、 $D_{1000.0} = 0.90\text{ cm}$. 在低浓度 DDT (0.1 , 1.0 和 $10.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理组, *X. chrysenteron* 的直径增长并没有受到显著影响,在 $100.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组,其生长则受到明显抑制($p < 0.01$),且在 $1000.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 条件下, *X. chrysenteron* 直径无增长,生长完全被抑制.

X. chrysenteron 的直径增长模式符合 Logistic 方程(见表 1). 从培养开始时,所有处理组的 *X. chrysenteron* 均加速增长,其快增期为 0 ~ 11 d,5 d 左右直径均达到最大增长速率,11 d 后进入缓增期. 经计算,不同处理组 *X. chrysenteron* 直径最大增长速率分别为: $v_{\text{CK}} = 0.21\text{ cm}\cdot\text{d}^{-1}$ 、 $v_{0.1} = 0.20\text{ cm}\cdot\text{d}^{-1}$ 、 $v_{1.0} = 0.20\text{ cm}\cdot\text{d}^{-1}$ 、 $v_{10.0} = 0.19\text{ cm}\cdot\text{d}^{-1}$ 和 $v_{100.0} = 0.12\text{ cm}\cdot\text{d}^{-1}$. 可见在低浓度下,DDT 对 *X. chrysenteron* 的生长抑制并不明显;在中高浓度 DDT 胁迫下, *X. chrysenteron* 直径增长的极限值和直径最大速率均有不同程度下降. 因此,DDT 浓度的高低只能改变 *X. chrysenteron* 的生长速度和生物量积累,并不会影响其生长模式.

表 1 *X. chrysenteron* 在不同 DDT 浓度下的生长模型

Table 1 Growth models of <i>X. chrysenteron</i> under the stress of DDT mass concentration					
DDT/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	生长模型	R^2	始盛期/d	高峰期/d	盛末期/d
CK	$D = 3.720\ 9/[1 + 2.821\ 0\exp(-0.224\ 8t)]$	0.986 1	-1.25	4.61	10.47
0.1	$D = 3.773\ 3/[1 + 2.954\ 5\exp(-0.2121t)]$	0.995 0	-1.10	5.11	11.32
1.0	$D = 3.908\ 9/[1 + 3.050\ 9\exp(-0.208\ 5t)]$	0.995 8	-0.97	5.34	11.67
10.0	$D = 3.653\ 4/[1 + 2.842\ 5\exp(-0.204\ 2t)]$	0.993 9	-1.33	5.11	11.57
100.0	$D = 2.625\ 9/[1 + 2.258\ 4\exp(-0.184\ 9t)]$	0.991 5	-2.72	4.41	11.53

Marx 等^[14]通过研究发现,生长迅速的外生菌根真菌可能通过快速的生长和代谢活动增加了对农药的吸收,所以农药在快速生长的菌落中高浓度积累,抑制作用更为明显. 黄艺等^[15]研究了 DDT 对 4 种外生菌根真菌生长的影响,结果显示生长最慢的美味牛肝菌 (*Boletus edulis*) 受 DDT 抑制程度最小. *X. chrysenteron* 比 *B. edulis* (培养 14 d 后对照处理的菌落直径达到 5.5 cm) 生长更慢,而且从结果上看 *X. chrysenteron* 对 DDT 的耐受性也更好. 说明在平板固体培养条件下,生长较慢的外生菌根真菌受 DDT 的抑制程度也相对较小. 相似的结果也出现在 Estok 等^[16]的研究中.

2.2 *X. chrysenteron* 暴露在不同 DDT 浓度中的生物量积累

如图 2 所示,在低浓度 DDT 胁迫下, *X. chrysenteron* 的生物量没有受到显著影响,但在高浓度 DDT 处理下则明显减少.

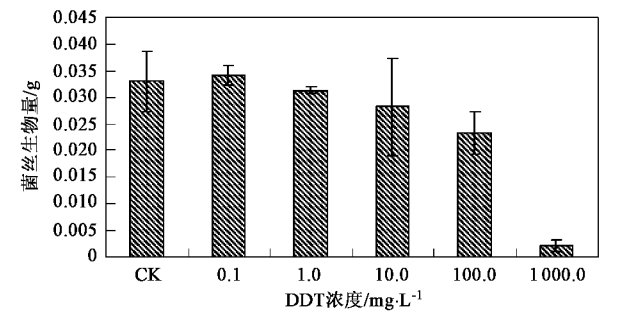


图 2 不同 DDT 浓度对 *X. chrysenteron* 菌落生物量的影响
Fig.2 Biomass increment of *X. chrysenteron* mycelia in the media of different DDT concentration

平板固体培养 24 d 后,各处理组生物量分别为: $m_{\text{CK}} = 0.033 \text{ g}$ 、 $m_{0.1} = 0.034 \text{ g}$ 、 $m_{1.0} = 0.031 \text{ g}$ 、 $m_{10.0} = 0.028 \text{ g}$ 、 $m_{100.0} = 0.023 \text{ g}$ 和 $m_{1000.0} = 0.002 \text{ g}$. 与 CK 相比,0.1、1.0 和 10.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组无显著差异. 100.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 1000.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 分别比 CK 少了 29.70% ($p < 0.05$) 和 93.71% ($p < 0.01$). 经 TSK 软件计算, *X. chrysenteron* 在平板固体培养条件下的 DDT 半抑制浓度 IC_{50} 为 139.75 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

结合菌落直径的数据,本研究发现在中高 DDT 浓度下,如 100.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组在培养 24 d 后菌落面积(通过直径算出)只有 CK 的 46% ($p < 0.01$),生物量却为 CK 的 70% ($p < 0.05$). 这说明在 100.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ DDT 浓度下,菌落单位面积生物量要高于低浓度处理组,这与在实验中观察到的现象是一致的,即 DDT 浓度越高, *X. chrysenteron* 菌落厚度越厚. 这

可能与生物的趋避性有关, *X. chrysenteron* 为趋避 DDT 胁迫,其纵向生长增强,导致菌落厚度变厚.

DDT 对 *X. chrysenteron* 生长的半抑制浓度 IC_{50} 为 139.75 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,明显高于其它外生菌根真菌^[15],说明 *X. chrysenteron* 对高浓度的 DDT 胁迫有很好的耐受性. 这可能与 DDT 是杀虫剂而菌根真菌不是其靶标生物有关. Laatikainen 等^[17]在纯培养条件下研究了 64 种外生菌根真菌对 11 种农药的耐受性,外生菌根真菌对杀虫剂和除草剂的耐受性要好于杀菌剂. Diaz 等^[18]的研究也得到类似的结果,他们在纯培养条件下研究了 6 种外生菌根真菌对 6 种杀菌剂和 3 种除草剂的耐受性,结果显示杀菌剂对外生菌根真菌具有明显抑制性,而除草剂很少抑制甚至会刺激某些真菌如松乳菇 (*Lactarius deliciosus*) 的生长.

2.3 菌丝生物量,葡萄糖含量和培养基中 DDT 含量随时间的变化

X. chrysenteron 在 DDT 浓度为 80.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的液体培养基中培养 36 d 后,测定 *X. chrysenteron* 生物量的积累和培养基中 DDT 残留率和葡萄糖剩余率随时间变化,结果如图 3.

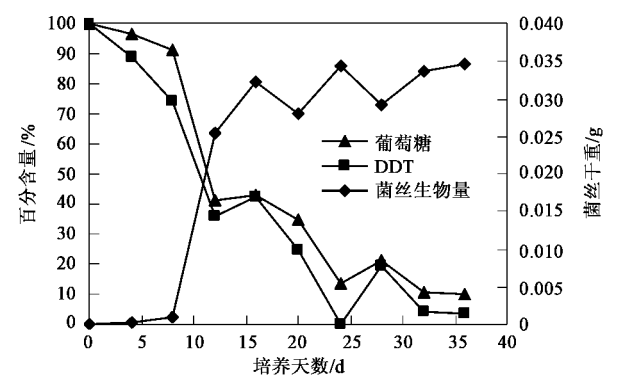


图 3 菌丝生物量,葡萄糖含量和 DDT 含量随培养时间的变化
Fig.3 Change of *X. chrysenteron* biomass, glucose concentration and DDT residua in culture solution along with the culture time

在液培体系中, *X. chrysenteron* 生物量的积累也呈现典型的 Logistic 增长. 经 Origin6.1 拟合,其方程为: $m = 0.0338 / [1 + 224678.121 \exp(-1.1187t)]$ ($R^2 = 0.9983$),其中 m 为生物量(g), t 为培养天数. 经计算,始盛期 $t_1 = 9.8 \text{ d}$,高峰期 $t_2 = 11.0 \text{ d}$,盛末期为 $t_3 = 12.2 \text{ d}$. 可知 0 ~ 9.8 d 为渐增期,9.8 ~ 12.2 d 为快增期,其最大增长速率为 $v_{\text{max}} = 9.5 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$,12.2 d 后进入缓增期,该培养体系 *X. chrysenteron* 极限生物量为 0.0338 g.

经过 36 d 培养,培养基中葡萄糖浓度下降到初

始浓度的 10.2%，其中第 8~20 d 内下降了 56%，而后 16 d 内仅下降 24%。DDT 的下降也呈类似趋势。36 d 后，培养基中 DDT 浓度为 $2.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，为初始的 3.5%。其中从第 8~20 d 内下降了近 50%，而后 16 d 内仅下降 21%。表 2 用 Logistic 方程拟合了葡萄糖利用量和 DDT 减少量，其中 u 表示葡萄糖利用量($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)， d 表示 DDT 减少量($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。结果显示，葡萄糖利用和 DDT 减少的快增期均要长于生物量的积累，分别为 7.6~16.8 d 和 5.8~17.2 d。

表 2 葡萄糖利用量和 DDT 减少量的 Logistic 拟合		
拟合指标	Logistic 拟合	R^2
葡萄糖利用量	$u = 9\,318.965\,3/[1 + 32.099\,5\exp(-0.284\,3t)]$	0.941\,3
DDT 减少量	$d = 74.635\,7/[1 + 14.145\,5\exp(-0.230\,1t)]$	0.940\,5

由图 3 可知，培养基中 DDT 的含量快速下降同 *X. chrysenteron* 的生物量积累是同步的。这可能是由于菌丝生长使得其生物吸附和吸收 DDT 量增加，从而降低了培养基中的 DDT 含量。许多研究^[19~23]都报道了微生物能够通过生物吸着(biosorption)作用有效去除环境中的有机氯农药，如 Juhasz 等^[23]研究了枝孢霉(*Cladosporium*)的 AJR³18,501 菌株在水相中对 *p*、*p*-DDT 的生物吸着作用，结果显示培养 60 min 后，溶液中的 DDT 含量就由初始的 $12.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 下降至 $2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，270 min 后溶液中仅剩 $1.6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。但是鲜见外生菌根真菌通过生物吸着作用去除环境有机污染物的报道。而外生菌根真菌是否也能通过生物吸着作用来降低环境中 DDT 以及其它 POPs 的含量，需要通过进一步研究来证实。

培养基中 DDT 的含量快速下降，也可能是由于 *X. chrysenteron* 具有生物降解甚至矿化 DDT 的能力。虽然现在暂无研究发现外生菌根真菌能够降解 DDT，但是许多研究^[24~28]表明外生菌根真菌能够降解甚至矿化许多其它类型的 POPs，如多环芳烃(PAHs)、多氯联苯(PCBs)等。这些研究预示着外生菌根真菌具有生物降解 POPs 的巨大潜力，甚至有催化 POPs 开环矿化从而彻底降解的能力。另外，DDT 含量的下降和葡萄糖的利用量也是同步的。该结果可能预示着 *X. chrysenteron* 是通过共代谢的途径降解 DDT 的。一般认为，微生物能够通过直接降解和共代谢 2 种方式降解环境中的有机污染物。Juhasz 等^[29]发现枝孢霉的 AJR³18,501 菌株能够通过共代谢方式降解土壤中的 DDT，Bumpus 等^[7,30]通过研究发现白腐真菌也能通过共代谢方式降解 DDT。但暂

未发现有能力利用 DDT 为唯一碳源并将其降解的微生物^[31]。因此，*X. chrysenteron* 是否能够降解，通过何种代谢途径降解 DDT，也需要进一步实验来研究。

2.4 培养体系中关键酶活性和比活力随时间的变化

固体培养基培养 24 d 后，进行氧化酶点试，结果表明在不同 DDT 浓度处理下，氧化还原酶的活性有很大变化。在中高 DDT 浓度($10.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $100.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)处理组中，*X. chrysenteron* 在很短时间(15 min)内就显示出很强的漆酶和过氧化物酶活性，在 72 h 内显示出中等强度的多酚氧化酶活性。但在所有处理组中没有发现酪氨酸氧化酶。

在离体液培实验中，每 4 d 测定 1 次培养液中漆酶活性，结合液培 *X. chrysenteron* 生物量数据，可计算出漆酶比活力，结果见图 4。

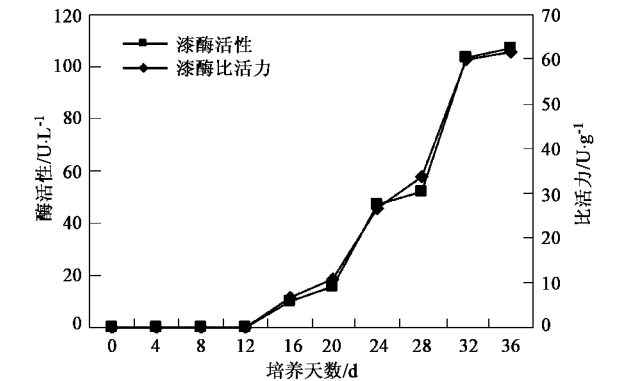


图 4 漆酶活性和比活力随培养时间的变化
Fig.4 Change of laccase enzyme activity and enzymatic compare along with the culture time

由图 4 可知，前 12 d，培养体系中没有发现漆酶。漆酶从第 16 d 开始出现，随着培养时间的增加，培养液中漆酶活性和比活力也呈增加的趋势，到第 36 d 酶活性和比活力分别达到 $107.24\text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $61.77\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶和漆酶是木质素降解酶系的主要组成部分，很多研究都报道了木质素降解酶系在有机污染物降解中所起的重要作用^[32]。Bumpus 等^[7]通过研究白腐真菌在离体限氮条件下对 DDT 的生物降解，认为白腐真菌通过木质素降解酶系能够矿化 DDT 和其它 POPs。酶点实验显示，在固体培养 24 d 后，所有处理组均显示出较强的漆酶和过氧化物酶活性。该结果表明 *X. chrysenteron* 和白腐真菌一样能够产生木质素降解酶，黄艺等^[15]通过研究也发现其它外生菌根真菌在

DDT 胁迫下也能够产生较强漆酶和过氧化物酶,这可能预示着外生菌根和白腐真菌一样能够通过木质素降解酶系来降解甚至矿化 DDT 或者其它 POPs.

从离体液培实验的结果来看,菌丝生物量从第 12 d 后增长开始趋缓并逐渐稳定,培养基中葡萄糖和 DDT 剩余量也从 16 d 和 17 d 开始进入缓慢下降时期,但漆酶从 16 d 才开始出现,这说明漆酶并不会在 DDT 下降的初期产生. 有学者在研究白腐真菌对 2,4,6-三硝基甲苯(2,4,6-trinitrofluorene, TNT)的生物降解时发现,漆酶、木质素过氧化物酶等木质素降解酶并不会在 TNT 被降解的初期出现,而是当 TNT 被降解为中间产物 2,6-二硝基-4-氨基甲苯或其同分异构体(amino-dinitrotoluenes)后才出现^[33,34]. 这可能解释了为何本研究中漆酶出现较晚的原因,也间接说明了木质素降解酶系在 *X. chrysenteron* 降解 DDT 这一过程的初期并不是主导因素,可能由于某种中间产物的出现而被诱导产生.

此外,Bumpus 等^[7,30]的研究显示,白腐真菌木质素降解酶的产生是发生在氮源或其它营养被消耗的次级代谢过程中,即在限氮条件下可刺激其木质素降解酶的合成. 但 Donnelly 等^[24,35]通过研究发现在限氮条件下,不利于外生菌根真菌降解 PCBs、阿特拉津等农药. 本研究中使用了氮源充足的 Kottke 营养液培养 *X. chrysenteron*,同样产生了活性较强的木质素降解酶. 这可能由于外生菌根真菌和白腐真菌在自然界中长期进化所形成的生长习性有所差异所致. 与白腐真菌不同,外生菌根真菌能够与植物根系形成稳定的共生体,有较为充足的碳、氮来源.

3 结论

在离体培养条件下,外生菌根真菌 *X. chrysenteron* 对 DDT 有很好的耐受性,在高浓度 DDT 胁迫下显示出比较强的漆酶和过氧化物酶活性,有较大的降解甚至矿化 DDT 的潜力. *X. chrysenteron* 是否能够降解和矿化 DDT,采用何种代谢方式和降解途径降解 DDT,以及在降解过程中关键酶起到何种作用,尚需通过进一步研究探讨.

参考文献:

[1] 谢武明,胡勇有,刘焕彬,等. 持久性有机污染物(POPs)的环境问题与研究进展[J]. 中国环境监测, 2004, 20(2): 58-61.

[2] 华小梅,单正军. 我国农药的生产、使用状况及其环境因子分析[J]. 环境科学进展, 1996, 44(2): 33-45.

[3] 王铁宇,吕永龙,张红,等. 我国持久性有机污染物状况及宏观对策[J]. 环境污染治理技术与设备, 2004, 5(11): 21-26.

[4] 刘营,孔繁翔,杨积晴. 菌根真菌对环境污染物的降解、转化能力概述[J]. 上海环境科学, 1998, 17(2): 4-6.

[5] Meharg A A, Caimet J W G. Ectomycorrhizas-extending the capabilities of rhizosphere remediation? [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2000, 32: 1475-1484.

[6] Aislabie J M, Richards N K, Boul H L. Microbial degradation of DDT and its residues: a review[J]. New Zealand Journal of Agricultural Research, 1997, 40(2): 269-282.

[7] Bumpus J A, Aust S D. Biodegradation of DDT[1,1,1-trichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl) ethane] by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1987, 53(9): 2001-2006.

[8] Kottke I, Guttentberger M, Hammpp R, et al. An in Vitro Method for Establishing Mycorrhizae on Coniferous Tree Seedlings[J]. Trees, 1987, 1: 191-194.

[9] 崔党群. Logistic 曲线方程的解析与拟合优度检测[J]. 数理统计与管理, 2005, 24(1): 112-115.

[10] Gramss G, Günther T H, Fritsche W. Spot Tests for Oxidative Enzymes in Ectomycorrhizal, Wood-, and Litter Decaying Fungi[J]. Mycological Research, 1998, 102(1): 67-72.

[11] 丛峰松. 生物化学实验[M]. 上海: 上海交通大学出版社, 2005. 91-93.

[12] Gunther T H, Pernier B, Gramss. Activities of phenol oxidizing enzymes of ectomycorrhizal fungi in axenic culture and in symbiosis with Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) [J]. Journal of Basic Microbiology, 1998, 38(3): 197-206.

[13] 刘淑珍,钱世钧. 担子菌漆酶的分离纯化及其性质研究[J]. 微生物学报, 2003, 43(1): 73-78.

[14] Marx D H, Rowan S J. Fungicides influence growth and development of sensitive specific ectomycorrhizae on loblolly pine seedlings[J]. Forest Science, 1981, 27: 167-176.

[15] 黄艺,赵曦,敖晓兰. 4 种外生菌根真菌对滴滴涕的耐受性及生理响应[J]. 环境科学研究, 2006, 19(4): 36-41.

[16] Estok D, Freedman B, Boyle D. Effects of the Herbicides 2,4-D, Glyphosate, Hexazinone, and Triclopyr on the growth of three species of ectomycorrhizal fungi [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1998, 42: 835-839.

[17] Laatikainen T, Heinonen-Tanski H. Mycorrhizal growth in pure cultures in the presence of pesticides[J]. Microbiological Research, 2002, 157(2): 127-137.

[18] Diaz G, Carrillo C, Honrubia M. Differential responses of ectomycorrhizal fungi to pesticides in pure culture[J]. Cryptogamie Mycologie, 2003, 24(3): 199-211.

[19] Benoit P, Barriuso E, Calvet R. Biosorption characterization of herbicides 2,4-D and atrazine, and two chlorophenols on fungal mycelium[J]. Chemosphere, 1998, 37(7): 1271-1282.

[20] Ju Y H, Chen T C, Liu J C. A study on the biosorption of lindane [J]. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 1997, 9(3-4): 187-196.

[21] Young E, Banks C J. The removal of lindane from aqueous solution using a fungal biosorbent: The influence of pH, temperature, biomass concentration, and culture age [J]. Environmental Technology, 1998, 19(6): 619-625.

- [22] Lievremon D, Seigle-Murandi F, Benoit-Guyod J L. Removal of PCNB from aqueous solution by a fungal adsorption process[J]. Water Research, 1998, **32**(12): 3601-3606.
- [23] Juhasz A L, Smith E, Smith J, *et al.* Biosorption of organochlorine pesticides using fungal biomass [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2002, **29**: 163-169.
- [24] Donnelly P K, Fletcher J S. PCB metabolism by ectomycorrhizal fungi[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1995, **54**(4): 507-513.
- [25] Rouillon R, Poulain C, Bastide J, *et al.* Degradation of the herbicide chlorpropham by some ectomycorrhizal fungi in pure culture [J]. Agriculture, Ecosystems and Environment, 1989, **28**: 421-424.
- [26] Gramss G, Kirsche B, Voigt K D, *et al.* Conversion rates of five polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid cultures of fifty-eight fungi and the concomitant production of oxidative enzymes[J]. Mycological Research, 1999, **103**: 1009-1018.
- [27] Green N A, Meharg A A, Till C, *et al.* Degradation of 4-fluorobiphenyl by mycorrhizal fungi as determined by ¹⁹F nuclear magnetic resonance spectroscopy and ¹⁴C radiolabelling analysis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, **65**(9): 4021-4027.
- [28] Meharg A A, Cairney J W G, Maguire N. Mineralization of 2,4-dichlorophenol by ectomycorrhizal fungi in axenic culture and in symbiosis with pine[J]. Chemosphere, 1997, **34**(12): 2495-2504.
- [29] Juhasz A L, Naidu R. Apparent degradation of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(*p*-chlorophenyl)ethane (DDT) by a *Cladosporium* sp [J]. Biotechnology Letters, 1999, **21**(11): 991-995.
- [30] Bumpus J A, Tien M, Wright D, *et al.* Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus[J]. Science, 1985, **228**: 1434-1436.
- [31] 赵曦, 黄艺, 敖晓兰. 持久性有机污染物(POPs)的生物降解与外生菌根真菌对 POPs 的降解作用[J]. 应用与环境生物学报, 2007, **13**(1): 140-144.
- [32] Pointing S B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, **57**(1-2): 20-33.
- [33] Michels J, Gottshalk G. Inhibition of lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* by hydroxylamino-dinitrotoluene, an early intermediate in the degradation of 2,4,6-trinitrotoluene[J]. Environmental Microbiology, 1994, **60**: 187-194.
- [34] Stahl J D, Aust S D. Metabolism and detoxification of TNT by *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1993, **192**: 477-482.
- [35] Donnelly P K, Entry J A, Crawford D L. Degradation of atrazine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by mycorrhizal fungi at three nitrogen concentrations in vitro [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, **59**(8): 2642-2647.