

4种菌根真菌对五氯酚耐受性及其生理基础研究

刘文科^{1,2}, 冯 固¹, 李晓林¹

(1. 中国农业大学资源与环境学院植物营养系, 农业部植物营养学重点实验室, 教育部植物-土壤相互作用重点实验室, 北京 100094; 2. 中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所, 北京 100081)

摘要:通过纯培养的方法,研究了4种外生菌根真菌——美味牛肝菌(*Boletus edulis*)、褐环乳牛肝菌(*Suillus luteus*)、丝膜菌(*Cortinarius russus*)和厚环粘盖乳牛肝菌(*Suillus grevillei*)的生长效应、对五氯酚的耐受性,并采用点试方法对真菌氧化还原酶的产生情况进行了检测。结果表明,4种外生菌根真菌在MM培养基上的生长速率显著高于MMN培养基。4种外生菌根真菌对五氯酚均有一定的耐受性,厚环粘盖乳牛肝菌(*Suillus grevillei*)耐受性最高,其生长抑制率显著低于其它真菌。酶测试结果表明,厚环粘盖乳牛肝菌是4种真菌中氧化还原酶活性较强且酶种类多样的菌株,它表现出很高的过氧化物酶、多酚氧化酶和漆酶活性,是一种具有高效降解芳环结构污染物潜力的菌根真菌。4种真菌在生物量和“酸化效应”方面差异较大。厚环粘盖乳牛肝菌(*Suillus grevillei*)对五氯酚的高耐受性可能与其产酶特性和“酸化效应”有关。

关键词:外生菌根真菌; 五氯酚; 氧化还原酶; pH; 点试

中图分类号:X172 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2004)04-0801-05

Tolerance to Pentachlorophenol and Their Related Physiological Properties of Four Ectomycorrhizal Fungi

LIU Wen-ke^{1,2}, FENG Gu¹, LI Xiao-lin¹

(1. Department of Plant Nutrition, China Agricultural University; Key Laboratory of Plant Nutrition, MOA; Key Laboratory of Plant-Soil Interactions, MOE, Beijing 100094; 2. Institute of Agricultural Environmental and Sustainable Development Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences Beijing 100081)

Abstract: Ectomycorrhizal fungi has ability to degrade many organic substances in nature, so more and more attention had focused on how to use these type fungi to accelerate decomposition of pollutants. In our experiment, the mycelium biomass or colony diameter of four ectomycorrhizal fungi growing on cultural media with or without pentachlorophenol were measured as well as pH value, oxidoreductase activities of ectomycorrhizal fungi *Boletus edulis*, *Suillus luteus*, *Cortinarius russus* and *Suillus grevillei*. The enzyme activity was detected by spot test. The results indicated that the four fungi grew better on MM medium than MMN medium. *Suillus grevillei* could grow on the medium contained 17.6 mg · L⁻¹ pentachlorophenol. At 8.8 mg · L⁻¹ and 17.6 mg · L⁻¹ pentachlorophenol levels, the inhibiting ratio of *Suillus grevillei* growth was significantly lower than other fungi. *Suillus grevillei* is the most promising fungus that will be used in bioremediation soil polluted by organic chemicals with phenyl group for its strong oxidoreductase activity produced during its growth process. In addition, after culture without pollutant, the pH value of medium dropped significantly, and this effect may play important role in its tolerance and degradation of Pentachlorophenol. There are significant different either in biomass or in lowering pH of cultural solution among fungi. The high tolerant capability to pentachlorophenol may related to their oxidoreductase activities and acidification effect.

Keywords: ectomycorrhizal fungi; pentachlorophenol; oxidoreductase activity; pH value; spot test.

五氯酚是一种在工农业生产中应用广泛的芳香结构化合物,可作为木材防腐剂、除草剂、杀菌剂等,现今的使用量很大。由于此种物质的使用方式是直接

进入环境,常滞留于环境介质中。它具有很高的毒性,且结构复杂、不易被降解,最终累积在土壤介质中,造成严重的环境污染,进而可通过食物链传递、放大,从而危及处于高位营养级的生物,甚至人类的健康。现今,五氯酚的污染很严重,仅美国较大的PCP污染点就有500多个^[1]。鉴于此,通过人为干预的方式加速

收稿日期:2003-12-10

作者简介:刘文科(1974—),男,回族,博士生,主要从事菌根真菌的生物多样性和生态适应性的研究。E-mail: liuwke@163.com

此种有机污染物的清除和降解过程,恢复环境介质(特别是土壤介质)的生态功能成为人类必然的选择,也是当今环境科学和土壤科学工作者关注的焦点问题。

外生菌根真菌具有一定的腐生特性,在森林生态系统物质转化和循环中起分解者的作用。这种腐生性特征主要表现在能够分泌酶类^[2, 3],加速枯枝落叶的分解。能否利用外生菌根真菌的腐生特性修复被有机物污染的土壤引起了人们的重视。有报道认为此类菌根能加速油类的降解^[4]。

世界范围内有超过6000种外生菌根真菌资源^[5],且在生态和生理表现上差异较大,因此具有很大的筛选潜力和必要性。本研究在纯培养条件下,以五氯酚为研究物质,对4种外生菌根真菌对五氯酚的耐受性和生长效应进行了研究。以期筛选出对五氯酚具有一定降解潜力的外生菌根真菌菌株,并了解其生理特征。

1 材料与方法

1.1 外生菌根真菌

选用4种外生菌根真菌菌株,即美味牛肝菌(*Boletus edulis*)、褐环乳牛肝菌(*Suillus luteus*)、丝膜菌(*Cortinarius russus*)和厚环粘盖乳牛肝菌(*Suillus grevillei*)用于试验。

1.2 培养基种类

培养基1:MMN培养基(Modified Melin - Norkrans Medium):10 g 葡萄糖,0.25 g 磷酸氢二铵,0.5 g 磷酸二氢钾,0.15 g 七水硫酸镁,55 mg 二水氯化钙,25 mg 氯化钠,20 mg 六氯化铁,VB₁0.1 mg,生物素0.025 mg,琼脂15 g,蒸馏水1 L。

培养基2:MM培养基(Modified Moser Medium):10 g 葡萄糖,5 g 麦芽浸粉,0.1 g 酵母浸粉,0.25 g 磷酸氢二铵,0.5 g 磷酸二氢钾,0.5 g MgSO₄·7H₂O,0.01 g FeCl₃,琼脂15 g,蒸馏水1 L。

两培养基的pH均为5.5。

1.3 试验设计

1.3.1 培养基的选择与酶活性的点试

把2种培养基灭菌后倒入培养皿。在超净工作台上,用打孔器从4种菌株接种菌落中打取直径6 mm的菌落块接种到平皿的中心位置,在培养箱中25℃黑暗培养,定期用直尺测定菌落直径(测定2个垂直方向直径,取其平均值),直至有真菌即长满培养皿。选择真菌生长活力较大的培养基,接种(按上述步

骤)。当有真菌即长满培养皿时,在菌落边缘进行酶点试试验。

1.3.2 对五氯酚耐受性

在灭菌后尚未冷却的MM培养基(40℃)中注入五氯酚,使其浓度分别为0、4、8、17.6 mg·kg⁻¹。倒平板后,接种真菌培养,方法同上,进行平板培养。定期用直尺测定菌落直径(方法同上)。

1.3.3 摇床培养试验

经固体培养试验,确认MM为摇床液体培养基。采用300 mL的三角瓶,内装入50 mL培养液,灭菌后用打孔器从接种菌落中打取直径6 mm的菌落块接种,并用封瓶膜封好瓶口。接种操作在超净工作台上进行。摇床中,在25℃、120 r·min⁻¹条件下培养8 d,培养液经离心后,分离出真菌组织,测定真菌的生物量和培养液pH。

上述试验,每个处理重复3次。

1.4 测定方法

1.4.1 氧化还原酶的点试

采用文献[2]方法。酶点试试剂如下。

漆酶:滴加0.1 mol·L⁻¹的1-萘酚的乙醇溶液,颜色变为紫罗兰色;

多酚氧化酶:滴加0.5%焦酚水溶液,呈褐色;

过氧化物酶:滴加0.2% H₂O₂和0.5%焦酚水溶液,形成褐色。

滴加操作在超净工作台上进行。观察点试位置颜色出现的时间及强度变化。

1.4.2 用pH计测定菌液的pH值

把菌丝放在烘干称重后的滤纸上,在65℃烘24 h,称量其菌丝量。

2 结果与讨论

2.1 2种培养基上4种真菌的生长状况

由图1~图4可知,4种外生菌根真菌在MM培养基上的生长速度显著高于MMN培养基。厚环粘盖乳牛肝菌在5~8 d 4个时期表现为在MM培养基上的菌落直径显著高于MMN培养基上的;而其它3种真菌,却表现为除接种当天外,其余5个时期的菌落直径均是在MM培养基上的显著高于MMN培养基。这说明供试的4种外生菌根真菌在MM培养基上的生长快于MMN培养基。因此,选择MM培养基种子培养基,用于试验。

在MM培养基上,4种真菌的生长速率也存在很大差别。丝膜菌和厚环粘盖乳牛肝菌在MM培养基上

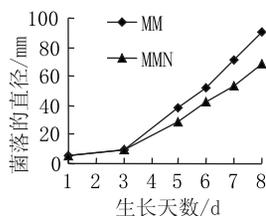


图 1 厚环粘盖乳牛肝菌在两种培养基上的生长曲线

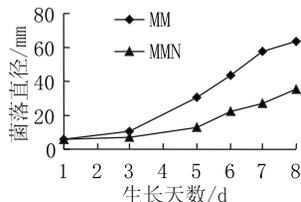
Figure 1 The growth line of *Suillus grevillei* on MM and MMN media

图 2 褐环乳牛肝菌在 MM 和 MMN 培养基上的生长曲线

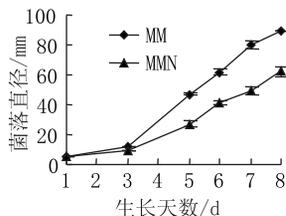
Figure 2 The growth line of *Suillus luteus* on MM and MMN media

图 3 丝膜菌在 MM 和 MMN 培养基上的生长曲线

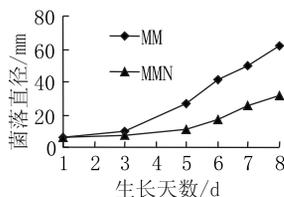
Figure 3 The growth line of *Cortinarius russus* on MM and MMN media

图 4 美味牛肝菌在 MM 和 MMN 培养基上生长曲线

Figure 4 The growth line of *Boletus edulis* on MM and MMN media

培养到第 8 d 时长满培养皿, 而美味牛肝菌、褐环乳牛肝菌两菌株只生长到 62.3 mm 和 63.7 mm。在生长过程中, 4 种真菌均有一个大约 3 d 的生长迟滞期, 在接种后 3 d 内菌落直径只增加了 3 mm ~ 5.5 mm。在随后的生长期 (7 ~ 8 d), 美味牛肝菌、厚环粘盖乳牛肝菌表现出较一致的生长速率, 而丝膜菌和褐环乳牛肝菌在 7 d 后却表现出生长速率降低的趋势。这表明前两种菌的生长活性期较长, 而后两者较短。

2.2 4 种真菌对五氯酚的耐受性

由图 5 ~ 图 8 可知, 4 种菌根真菌对五氯酚均有一定的耐受性, 但厚环粘盖乳牛肝菌表现最好。在

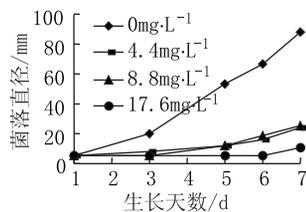


图 5 不同五氯酚浓度下厚环粘盖乳牛肝菌的生长曲线

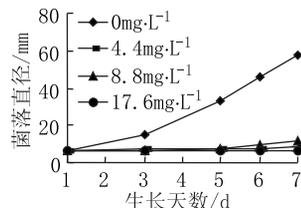
Figure 5 Growth line of *Suillus granulatus* on MM medium added with pentachlorophenol

图 6 不同五氯酚浓度下褐环乳牛肝菌生长曲线

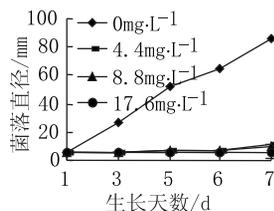
Figure 6 Growth line of *Suillus luteus* on MM medium added with sodium pentachlorophenol

图 7 不同五氯酚浓度下丝膜菌的生长曲线

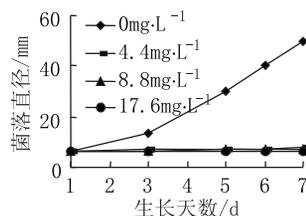
Figure 7 Growth line of *Cortinarius russus* on MM medium added with sodium pentachlorophenol

图 8 不同五氯酚浓度下美味牛肝菌生长状况

Figure 8 Growth of *Boletus edulis* on MM medium added with sodium pentachlorophenol

浓度为 17.6 mg · L 的条件下, 仍表现出较强的生长活性, 培养到第 7 d 菌落直径延伸到 26 mm。丝膜菌在耐受性上次于厚环粘盖乳牛肝菌, 只生长到 11.17 mm, 但好于其他 2 种真菌。

真菌的耐受性差异明显地表现在五氯酚对其生长的抑制率上。由表 1 可知, 在不同的五氯酚浓度和不同生长时期, 厚环粘盖乳牛肝菌的生长抑制率显著低于其他 3 种真菌 (4 种真菌抑制率均为 100% 时除

外)。在 $17.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的五氯酚浓度下,只有厚环粘盖乳牛肝菌保持着生长活性,其他3种真菌的生长完全停止。这表明,厚环粘盖乳牛肝菌不仅能在耐受临界浓度上高于其他3种真菌,并且在不同浓度的生长速率上也高于其他真菌。

表1 4种真菌在不同五氯酚浓度下的生长抑制率(%)

Table 1 The inhibiting ratio of fungi colonies grown on media spiked with pentachlorophenol (%)

五氯酚浓度 /mg · L ⁻¹	真菌 种类	培养时间 /d				
		1	3	5	6	7
4.4	S. l	100a	89.09b	96.34a	95.83a	95.06ab
	G. g	100a	84.86c	88.46b	83.24b	78.54c
	B. e	100a	86.96bc	95.13a	95.83a	96.18a
	C. r	100a	97.46a	94.47a	93.54b	8.8
8.8	S. l	100a	100a	93.89a	92.08b	89.42b
	G. g	100a	100a	86.72b	78.04c	75.71c
	B. e	100a	100a	95.83a	97.09a	97.71a
	C. r	100a	100a	97.11a	97.30a	96.00
17.6	S. l	100a	100a	100a	100a	100a
	G. g	100a	100a	100a	100a	94.33b
	B. e	100a	100a	100a	100a	100a
	C. r	100a	100a	100a	100a	100a

注:抑制率(%)=(无五氯酚条件下的真菌菌落直径-五氯酚条件下的真菌菌落直径)/无五氯酚条件下的真菌菌落直径×100

2.3 酶点试结果

酶点试结果见图9。结果表明,4种外生菌根真菌产生的氧化还原酶的种类和活性差异较大。4种真菌均能产生过氧化物酶,但厚环粘盖乳牛肝菌在过氧化物酶的活性明显高于美味牛肝菌、褐环乳牛肝菌和丝膜菌。此外,厚环粘盖乳牛肝菌还表现出多酚氧化酶和较强的漆酶活性。虽然丝膜菌也具有3种酶活性,并且在出现时间上与厚环粘盖乳牛肝菌相似,但其活性强度明显低于厚环粘盖乳牛肝菌。其它2种真菌未检测出多酚氧化酶和较强的漆酶活性。这表明,厚环

粘盖乳牛肝菌不仅在产酶种类上具有多样性,并且在酶活性上也显著高于其他真菌,是一种可能具有降解芳环结构污染物潜力的菌根真菌。

众所周知,能直接降解有机污染物的酶类主要为:脱卤酶、硝基还原酶、过氧化物酶、漆酶和胍水解酶等^[6]。研究表明,在纯培养条件下,外生菌根真菌可以产生多种胞外氧化还原酶,其中的漆酶、过氧化物酶、锰过氧化物酶与芳环结构的多环芳烃类物质(PAHs)的转化存在显著的相关性^[7]。本试验中,厚环粘盖乳牛肝菌表现出多种酶活性,尤其是过氧化物酶活性较高,表明这种真菌有可能在共生条件下发挥出高产酶效应,促进菌根际土壤中芳环有机污染物的降解。

2.4 MM培养基中真菌生物量和培养液的酸度

由图10、11可以看出,4种菌根真菌的生长效应存在显著差异。生物量从大到小的顺序为:美味牛肝菌>褐环乳牛肝菌>丝膜菌>厚环粘盖乳牛肝菌。pH值大小排序为:褐环乳牛肝菌>美味牛肝菌>丝膜菌>厚环粘盖乳牛肝菌。

培养液的初始pH值为5.5,经8d的培养后,各真菌的培养液pH值均有不同程度的下降。以厚环粘盖乳牛肝菌下降幅度最大,达1.69个pH单位,显著低于其他3种真菌的pH值。单位菌物量引起的pH

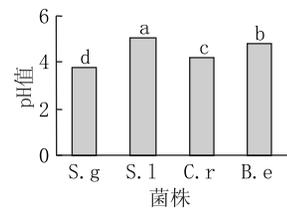
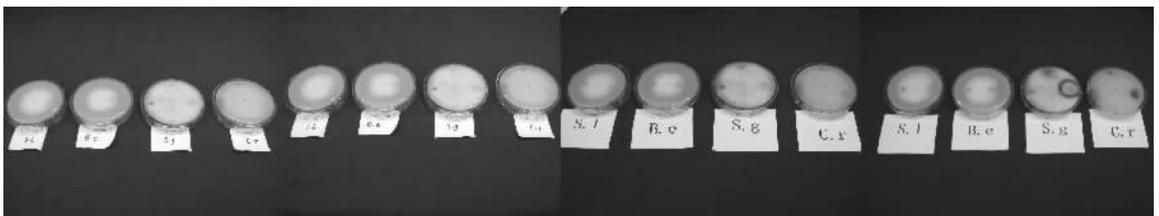


图10 四种外生菌根培养液的pH值

Figure 10 The pH value of cultural liquid of four ectomycorrhizal fungi



图中由左到右分别是滴加试剂后0.5h、1.0h、3.0h和24h的酶反应情况。图中S. l、B. e、S. g和C. r分别表示褐环乳牛肝菌,美味牛肝菌,厚环粘盖乳牛肝菌和丝膜菌。菌落上的点位由左至右顺时针分别为:过氧化物酶、多酚氧化酶和漆酶

图9 4种外生菌根真菌多酚氧化酶、过氧化物酶和漆酶活性的点试效果

Figure 9 The results of four ectomycorrhizal fungi treated with reagents to indicating the polyphenol oxidase, peroxidase and laccase activities after 0.5h, 1.0h, 3.0h and 24h. In figures, the S. l, B. e, S. g and C. r represent *Suillus grevillei*, *Suillus luteu*, *Cortinarius russus*, *Boletus edulis* respectively. The test spots in dishes clockwise from left to right are peroxidase, polyphenol oxidase and laccase.

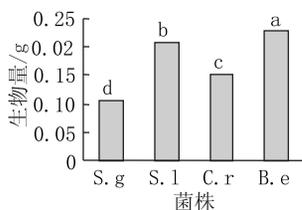


图 11 四种外生菌根真菌生物量

Figure 11 The biomass of four ectomycorrhizal fungi tested in the present study

值变值以厚环粘盖乳牛肝菌最大, 达 16.25 个 pH 单位每克生物量; 其次是丝膜菌, 为 8.47 个 pH 单位每克生物量。美味牛肝菌为 3.21 个 pH 单位每克生物量, 居第 3 位。而褐环乳牛肝菌最小, 为 2.12 个 pH 单位每克生物量。

pH 值是影响土壤养分有效性的因子之一, 某些植物必需的营养元素如磷、锌、铜、铁、锰等的有效性随土壤 pH 值的下降而增加^[8]。研究表明, 外生菌根际土壤 pH 值比非菌根际土壤 pH 值低出 0.5 个 pH 单位^[9]。这种酸化效应主要是由于菌根真菌菌丝分泌质子和有机酸所致。外生菌根际的酸化可以促进土壤矿物的分解, 增加土壤 K^+ 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的有效性^[10], 改善植物的养分供给, 促进植物的生长发育, 对共生的菌根真菌产生有益的影响, 提高其代谢活力, 从而促进根际降解过程的进行。

此外, pH 值是影响酶促反应效率的重要因素。土壤中的酶促生化反应需要一定的 pH 值环境才能高效进行。大多数氧化还原酶在酸性条件下的反应活性较高, 如漆酶在 pH 值为 4.5 时活性高于 pH 为 7.0 时^[4]。外生菌根真菌这种“酸化效应”可能为真菌的氧化还原酶提供合理的酸度环境, 促进其催化过程的高速率进行。本试验中厚环粘盖乳牛肝菌具有高的酸化效应, 有可能具有较强的调节土壤 pH 值的能力, 能推动酶促反应的进行。这需要在共生条件下作进一步的研究论证。

3 结论

(1) 4 种外生菌根真菌——美味牛肝菌、褐环乳牛肝菌、丝膜菌和厚环粘盖乳牛肝菌在 MM 培养基上

的生长速率显著高于 MMN 培养基。

(2) 厚环粘盖乳牛肝菌是 4 种真菌中耐受五氯酚能力最强的真菌, 其降解五氯酚的能力有待进一步研究。

(3) 4 种外生菌根真菌在生长过程中可使培养液的 pH 值降低。降低顺序为: 厚环粘盖乳牛肝菌 > 丝膜菌 > 美味牛肝菌 > 褐环乳牛肝菌。而生物量的降低顺序为: 美味牛肝菌 > 褐环乳牛肝菌 > 丝膜菌 > 厚环粘盖乳牛肝菌。

参考文献:

- [1] 徐向阳, 冯孝善, 苏来月, 等. 受污染环境生物修复技术原理与应用现状[J]. 环境科学进展, 1998, 增刊: 38-51.
- [2] Gramss G, Günther TH, Fritsche W. Spot tests for oxidative enzymes in ectomycorrhizal, wood- and litter decaying fungi[J]. *Mycological Research*, 1998, 102(1): 67-72.
- [3] Gramss G. Activity of oxidative enzymes in fungal mycelia from grassland and forest soils[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 1997, 37: 407-423.
- [4] 程国玲, 李培军, 王凤友, 等. 几种纯培养外生菌根真菌对矿物油的降解效果[J]. 中国环境科学, 2003, 23(1): 74-76.
- [5] Molina R, Massicotte H, Trappe JM. Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community-ecological consequences and practical implications[A]. In: Allen MF (Ed.). *Mycorrhizal Functioning*[C]. Chapman and hall. London, 1992. 357-423.
- [6] Schoor JL, Light LA, McCutcheon S C, Wolfe N Let al. Phytoremediation of organic and nutrient contaminants[J]. *Environmental Science Technology*, 1995, 29: 318A-323A.
- [7] Gramss G, Kirsche B, Voigt KD. 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(8): 1009-1018.
- [8] Sarkar AN, Wynjones RG. Effects of rhizosphere pH on the availability and uptake of Fe, Mn, Zn[J]. *Plant and Soil*, 1982, 66: 361-372.
- [9] Arocena JM, Glowa K R. Mineral weathering in ectomycorrhizosphere of subalpine fir (*Abies lasiocarpa* (Hook.) Nutt.) as revealed by soil solution composition[J]. *Forest Ecology and Management*, 2000, 133(1-2): 61-70.
- [10] Arocena J M, Glowa K R, Massicotte H B, et al. Chemical and mineral composition of ectomycorrhizosphere soils of subalpine fir (*Abies lasiocarpa* (Hook.) Nutt.) in the Ae horizon of a Luvisol[J]. *Canadian Journal of Soil Science*, 1999, 79(1): 25-35.