

全氟辛酸和雌二醇对黄孢原毛平革菌 过氧化物酶活性的影响

周莉娜, 毛 晖, 曲 东*

(西北农林科技大学资源环境学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要:选取典型的持久性有机污染物全氟辛酸(PFOA)和雌二醇(E2),采用 Kirk 液体培养基对黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*, 简称 PC 菌)纯培养的方式,以分光光度法测定了该体系中菌液总酶活性的变化规律,研究了 PFOA 和 E2 对其胞外过氧化物酶活性的影响。结果表明:(1)以“2,2-联氨基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐”(ABTS)为底物,在 pH 为 3 的柠檬酸盐缓冲液中,依次加入 ABTS、H₂O₂、MnSO₄ 和菌液,在 470 nm 处测定 60 s 内反应的酶活性是其最大值,包含木质素过氧化物酶(LiP)、锰过氧化物酶(MnP)和漆酶(Lac)等胞外酶的总活性。(2)该培养体系中,PC 菌分泌的胞外酶以 LiP 和 MnP 两种过氧化物酶为主,Lac 活性极低;总酶活性随着培养时间的增加而增加,在第 20~30 d 之间出现一次小高峰,50~60 d 之间出现一次大高峰,随后活性下降。(3)0.01 mmol·L⁻¹ 的全氟辛酸(PFOA)对这两种过氧化物酶(LiP 和 MnP)活性及菌液总酶活性的影响是一致的,表现为“先抑制,后促进”的作用;0.1 μmol·L⁻¹ 的雌二醇(E2)对其影响也是一致的,均表现为抑制作用。

关键词:黄孢原毛平革菌;纯培养;过氧化物酶活性;全氟辛酸;雌二醇

中图分类号:X172 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2013)06-1134-09 doi:10.11654/jaes.2013.06.008

Effects of Perfluorooctanoic Acid and Estradiol on the Peroxidase Enzyme Activity of *Phanerochaete chrysosporium*

ZHOU Li-na, MAO Hui, QU Dong*

(College of Resources and Environment, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: *Phanerochaete chrysosporium* (PC) was pure cultured with Kirk liquid medium, two typical persistent organic pollutants perfluorooctanoic acid (PFOA) and estradiol (E2) were chosen, the effects of PFOA and E2 on PC extracellular peroxidase activity and total enzyme activities were studied. The results showed that 2, 2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) was used as the substrate, and ABTS, H₂O₂, MnSO₄, fungi solution were added in turn to citrate buffer with pH 3 to form a solution. The maximum bacterium activity was measured at 470 nm within 60 s reaction, which contained total activity of extracellular enzymes including lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP), laccase (Lac) and so on. LiP and MnP were two main extracellular enzymes secreted by PC in the culture system, while Lac enzyme activity was very low. Total enzyme activity increased with incubation time of PC. A small peak was observed between 20~30 days, while a big peak appeared between 50~60 days, and which decreased thereafter. Effects on activities of the two peroxidases (LiP and MnP) and total enzymes activities of broth were the same with addition of 0.01 mmol·L⁻¹ PFOA, which was inhibited at beginning and promoted later. Effects with addition of 0.1 mmol·L⁻¹ E2 on activities of the two peroxidases (LiP and MnP) and total enzyme activities of broth were the same, which executed consistent inhibition effects.

Keywords: *Phanerochaete chrysosporium*; pure culture; activity of peroxides enzyme; PFOA; E2

收稿日期:2012-10-09

基金项目:国家自然科学基金项目(41201280);2013年西北农林科技大学基本科研业务费专项资金项目(QN2013072)

作者简介:周莉娜(1977—),女,陕西富平人,讲师,主要从事农业环境科学方面研究。E-mail:zhoulina@nwsuaf.edu.cn

*通信作者:曲 东 E-mail:dongqu@nwsuaf.edu.cn

全氟辛酸(PFOA)和雌二醇(E2)是目前研究人员最为关心的两类持久性有机污染物。PFOA是全氟类化合物中重要的一种,由于被广泛用于食品包装、纺织、润滑剂、表面活性剂和灭火泡沫等领域^[1-2],因此在全球各个地区众多环境样品中,例如大气、水体、土壤、鱼类、鸟类、哺乳动物等动物组织和人体组织中均可检测出^[3-6]。美国环境保护局(USEPA)2003年研究提出,PFOA及其盐的暴露对人体健康存在不利影响,其在人体内可存在4年至半生的时间,已被列入美国有毒物质控制法(US TSCA)的禁止类,不能超过 $3\text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ (人体重量)。毒理性试验表明PFOA具有发育毒性、神经毒性、遗传毒性、内分泌干扰和生物蓄积性等,非常稳定难降解而成为继多氯联苯、有机氯农药和二噁英之后被人们关注的一个重要持久性有机污染物^[7-9]。虽然已经有了用电化学法、微波法等有效去除PFOA的方法^[10-11],但是目前看来这些方法更适合实验室理论研究,从废水等自然环境中降解PFOA还需要更为可行的生物方法。Colosi等用辣根过氧化物酶(HRP)处理PFOA的研究给出了一个初步的探索,为进一步采取生物方法降解PFOA提供了一个思路^[12]。E2能在极低浓度下($\sim\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)引发荷尔蒙反应,作为一种内分泌干扰化合物对环境和人体健康,特别是生育、生长和发育,具有极大影响,已经成为公众和科学界特别关注的一类重要污染物^[13-16]。其包含的天然雌激素、雌甾酮、 17β -雌二醇、雌三醇和合成雌激素都可能成为内分泌干扰剂,是内分泌干扰化学污染物的主要来源^[14,16-17]。畜禽养殖业日渐成为各类环境体中雌激素污染物的主要来源,其危害日益凸显。畜禽粪便用于农用地也是天然荷尔蒙进入土壤的主要途径。Caron等对一块已经接受牛粪长达35年的土地进行研究,发现E2被强烈地吸收,而且吸附作用随着土壤有机碳含量和年施入牛粪比率的增加而增加^[18]。生物法去除环境中的E2仍然是一种具有普遍可行、经济适用特性的方法^[19-22]。大多研究酶催化法有很好的效果,但酶的价格和降解产物限制了其大规模应用于环境治理。

白腐真菌(*White rotfungi*)是引起木质白色腐烂的一类真菌,而黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*,简称PC菌)是白腐真菌的模式菌种,对多种有机污染物有很好的降解效果^[23-26],研究认为主要是其胞外木质素降解酶系统的作用^[27-29],但同时对于有机物降解过程中酶活性的变化却较少报道。黄孢原毛平革菌主要分泌木质素过氧化物酶(LiP)、锰过

氧化物酶(MnP)和漆酶(Lac)^[30]。LiP和MnP属于过氧化物酶,需要过氧化氢(H_2O_2)参与反应,而MnP的作用还必须依赖于锰离子(Mn^{2+});另外,还存在不依赖于锰离子(Mn^{2+})的锰过氧化物酶(MiP),Lac的氧化作用则不需要 H_2O_2 而需要氧(O_2)的存在^[31]。大多数研究认为黄孢原毛平革菌几乎不分泌Lac或者活性太低而无法测出^[32]。过氧化物酶LiP和MnP的特性又有很多相似性,其酶活性的表现也相互关联,主要表现在对锰离子(Mn^{2+})和过氧化氢(H_2O_2)的依赖关系上^[33-35]。当利用黄孢原毛平革菌对有机物进行降解时,整个培养体系的总酶活性以及体系总酶活性对有机物降解的影响相比某种单酶的活性而言更加重要。

PC菌极具降解PFOA和E2的研究前景,本研究旨在通过研究PFOA和E2降解体系中黄孢原毛平革菌分泌的胞外过氧化物酶活性的变化,找到一种能够准确而不重复或损失地测定该体系总酶活性的方法。该结果既对研究PC菌对PFOA和E2的降解具有指导意义,也为全氟类和雌激素类化合物对自然界微生物尤其是真菌的影响研究提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

选择黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*,简称PC菌)为供试菌种,该菌种是由美国农业部森林真菌研究发展计划的北中心研究站(USDA Center for Forest Mycology Research Program Northern Research Station)提供的*P. chrysosporium* BKM-F-1767系,菌种保存于实验室低温冷冻冰箱中,定期进行传代。

1.2 供试有机污染物

全氟辛酸(Perfluorooctanoic acid,简称PFOA)含量 $\geq 96\%$,指 $\text{C}_7\text{F}_{15}\text{COOH}$ 及其衍生物,分子式 $\text{C}_8\text{HF}_{15}\text{O}_2$,分子量 $414.07\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。雌二醇(β -Estradiol,简称E2)含量 $\geq 98\%$,是最重要的一种雌激素,分子式 $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_2$,分子量272.38。底物2,2-联氮基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS, $\geq 98\%$),所用试剂购自美国Sigma公司。

1.3 PC菌培养

在500 mL灭菌三角瓶中,配制100 mL Kirk液体培养基,接种200 μL 均匀的PC菌孢子液,每日通氧气10 min(自制的有进气出气口的瓶塞),39 $^{\circ}\text{C}$ 暗光静置培养(培养过程中用称重法补充每天因蒸发而损失的水分)。Kirk培养基的组成^[36],每100 mL培养基中含有:10 mL基础培养基(Basal III Medium),采用

滤器除菌;10 mL 10%葡萄糖,高温灭菌;10 mL 0.1 mol·L⁻¹ 丁二酸二甲酯(2,2-Dimethylsuccinate),高温灭菌;6 mL 微量元素溶液^[36],采用滤器除菌;2.5 mL 8 g·L⁻¹ 酒石酸钠,高温灭菌;0.1 mL 1 g·L⁻¹ 硫胺素(维生素 B1)采用滤器除菌;0.1 mL 40 mmol·L⁻¹ 藜芦醇(Veratryl Alcohol,简称 VA),采用滤器除菌;灭菌水补足至 100 mL。

1.4 PC 菌纯培养菌液总酶活性的测定

1.4.1 测定 pH 的选择

在 40 μmol·L⁻¹ VA、40 mmol·L⁻¹ VA 和不加 VA 的 Kirk 液体培养基中培养 PC 菌,培养 10 d 左右加入不同浓度的 PFOA,继续培养到 20 d 后测定菌液的 pH,以不接种的处理为对照,确定 PC 菌纯培养条件下菌液的 pH 变化规律和范围。

在得到菌液的 pH 范围内,通过试验确定总酶活性测定的最佳 pH。将 PC 菌培养至不加 VA 的 Kirk 液体培养基中,培养 3 d 左右培养基表面形成一层菌丝垫,至 5~6 d 开始能测出菌液中的酶活性。在 pH 为 6、4.5、3.5、3 的柠檬酸盐缓冲液,分别依次加入等量的 ABTS、H₂O₂、MnSO₄ 溶液以及相同的菌液,常温下反应,在 405 nm 处测定 ABTS 氧化产物(ABTS 自由基,蓝绿色)的吸光值,计算该菌液的酶活性,计算结果中最大酶活性所对应的 pH 作为总酶活性测定的最佳 pH。

1.4.2 酶促反应时间选择

在最佳 pH 条件下测定菌液酶活性,分别读取 0~300 s 内的吸光值,计算不同反应时间对应的吸光值变化率计算酶活性,计算结果中最大酶活性所对应的反应时间作为酶促反应时间。

1.4.3 酶活性测定指标体系

以 ABTS 作为试验底物,设置 3 个处理,在最佳 pH 缓冲液中分别依次加入 ABTS、ABTS+H₂O₂、ABTS+H₂O₂+MnSO₄ 和 200 μL 相同的 PC 菌菌液,测定它们分别代表的酶活性,不同处理的试剂加入量如表 1 所示。

酶活性测定采用分光光度法。体系混匀后,迅速在 405 nm 下测定吸光度(显色产物为蓝绿色的 ABTS 自由基),以 60 s 内的吸光值来计算酶活。为了避免 ABTS 的自氧化,整个测定过程尽量在暗光条件下完成。

ABTS 的吸光系数为 18.6 L·mmol⁻¹·cm⁻¹,系统总体积为 2.7 mL,菌液体积为 0.2 mL,酶活性计算公式如下:

表 1 测定总酶活指标体系的试剂组成

Table 1 Composition of indicators systems in enzyme activity determination

试剂 Reagents	加入量 Dose		
	ABTS+H ₂ O ₂ +MnSO ₄	ABTS+H ₂ O ₂	ABTS
12.5 mmol·L ⁻¹ citric buffer, pH 3	2 mL	2.2 mL	2.4 mL
1.28 mmol·L ⁻¹ H ₂ O ₂	200 μL	200 μL	0
10 mmol·L ⁻¹ MnSO ₄	200 μL	0	0
20 mmol·L ⁻¹ ABTS, pH 6	100 μL	100 μL	100 μL
Fungi solution	200 μL	200 μL	200 μL

$$\text{酶活性}(\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}) = (\text{吸光度值}/\text{min}) \times 0.725 \text{ 8}^{[37]}$$

另外,以 DMP 替代只加 ABTS 的反应测定酶活性。依次加入 2 mL pH 3 的柠檬酸盐缓冲液,然后加入 0.5 mL 10 mmol·L⁻¹ DMP,加入 200 μL 菌液后摇匀,反应产物为橙色的 DMP 二聚物(显红棕色),于 470 nm 处测定其 60 s 内的吸光度值。DMP 二聚物的吸光系数为 49.6 L·mmol⁻¹·cm⁻¹,其酶活性计算公式为:

$$\text{酶活性}(\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}) = (\text{吸光值}/\text{min}) \times 0.272 \text{ 2}^{[38]}$$

1.5 添加 PFOA 和 E2 的试验

研究添加 PFOA 和 E2 对于 PC 菌纯培养过程中菌液酶活性的影响。将 PFOA 和 E2 分别溶解在色谱纯的甲醇溶液中,在 PC 菌培养 10 d 时向 100 mL 培养体系中分别加入 100 μL 高浓度的 PFOA(10 mmol·L⁻¹)或 E2(0.1 mmol·L⁻¹)贮备液,加入后轻轻摇匀,尽量减少对菌丝垫的扰动,最终菌液中是 PFOA 浓度为 0.01 mmol·L⁻¹ 或 E2 浓度为 0.1 μmol·L⁻¹。不加 PFOA 或 E2 的加入等量相同的甲醇溶剂作为对照,定期测定培养体系中菌液酶活性的变化。

2 结果与分析

2.1 酶活测定体系中 pH 值的确定

试验测定了培养 20 d 左右的 Kirk 培养体系中 PC 菌液和对照的 pH,结果如表 2 所示。从表 2 可以看出,培养 20 d 后,对于各个不同的处理,pH 的变化表现出了相同的变化趋势,即对照的 pH 从 4.5 下降到 3~4,而菌液的 pH 下降到 2~3,说明该菌培养时间越长,菌液酸性越大。LiP 和 MnP 催化反应的最佳 pH 都约为 2.5~3,对有机物降解也是最有利的。虽然这两种酶的最佳反应 pH 在 3 以下,但是过酸的环境下,它们非常不稳定,所以一般 LiP 活性测定的 pH 在 3~4.5, MnP 活性测定的 pH 在 4.0~4.5^[30]。

为了确定该培养体系最大的总酶活性,对测定用的柠檬酸盐缓冲液在 pH 3 设置 4 个处理分别进行试

表 2 不同处理条件下菌液的 pH 值
Table 2 pH of control and fungi solution with different treatments

处理 Treatment	1	2	3	4
	40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ VA	2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PFOA 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ VA	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PFOA 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ VA	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PFOA 40 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ VA
对照 CK/Control	3.22±0.02	3.14±0.03	3.10±0.03	3.08±0.01
接 PC 菌/Inoculation	2.02±0.01	2.37±0.05	2.12±0.02	2.03±0.01

验,测定结果如图 1 所示。当 pH 3 时测到的总酶活性最高,分别是 pH 3.5 时的 2.01 倍、pH 4.5 时的 9.01 倍及 pH 6 时的 138.1 倍,pH 6 时已经几乎测不到酶活性。这说明,该体系总酶活性随着测定所用缓冲液酸性的增加而增加,在 pH 3 时显著高于其他处理。因此,最终确定选用 pH 3 的柠檬酸盐缓冲液来测定 Kirk 培养基中 PC 菌菌液中的总酶活性。

2.2 酶活性测定中酶促反应时间的确定

通常酶活性的单位可用单位时间内酶催化底物生成 1 μmol 产物来定义。酶促反应时间会对酶活性的测定结果产生影响,以 ABTS 为底物测定酶活性时,ABTS 被氧化后产生蓝绿色的终端产物 ABTS 自由基(ABTS^+),产物的浓度变化可用在 405 nm 波长下测定的吸光度值表示^[39-40]。不同酶促反应时间下测定的吸光度值变化如图 2 所示。在 0~300 s 内吸光值的平均变化率为 0.001 2·s⁻¹,其中 0~60 s 中的吸光值变化率可达到 0.002 1·s⁻¹,而 60~300 s 的变化率仅为 0.001 1·s⁻¹,可以看出 0~60 s 内的吸光值变化率较大,说明其灵敏度高。因此,实验中可确定 60 s 为酶促反应时间,并依据其吸光值变化率计算总酶活性。

2.3 总酶活测定指标体系的建立

LiP 和 MnP 是过氧化物酶,测定过程需要加入 H₂O₂,MnP 活性的体现需要 Mn²⁺的存在;而 Lac 仅以 ABTS 作为底物,不需要添加其他物质就可以体现活

性。我们以 ABTS 作为试验底物,在 PC 菌菌液中分别依次加入 ABTS、ABTS+H₂O₂、ABTS+H₂O₂+MnSO₄ 作为 3 个处理,研究它们分别代表的酶活性的变化规律,结果如图 3 所示。PC 菌菌液酶活性随时间变化有很大差异,其中培养 11 d 时 3 个处理的酶活性差异不显著,但培养到 15 d 时不同处理间的酶活性变化剧烈,加入 H₂O₂ 和 MnSO₄ 可以显著增加测得的酶活性。上述结果同时说明,菌液中可能存在多种酶的活性,其活性可以通过是否在 ABTS 的缓冲液中加入 H₂O₂ 或 MnSO₄ 分别进行分类测定。从图 3 的结果可以看出,ABTS+H₂O₂+MnSO₄ 条件下测定的酶活性总是最大

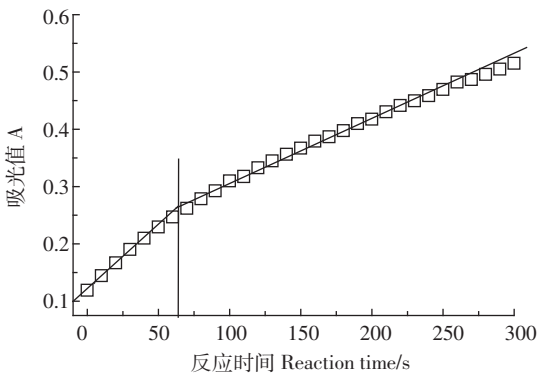


图 2 吸光值与反应时间的关系

Figure 2 The relationship between absorbance and reaction time

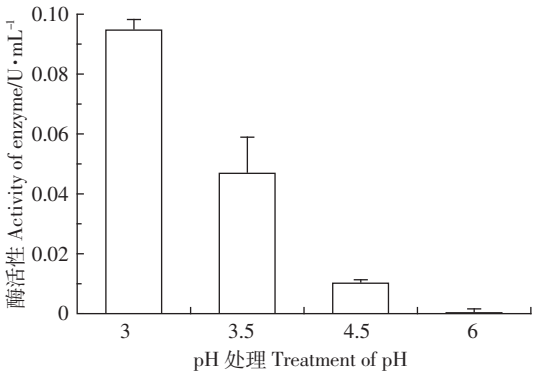


图 1 不同 pH 条件下过氧化物酶活性比较

Figure 1 The total activity of enzyme with different pH

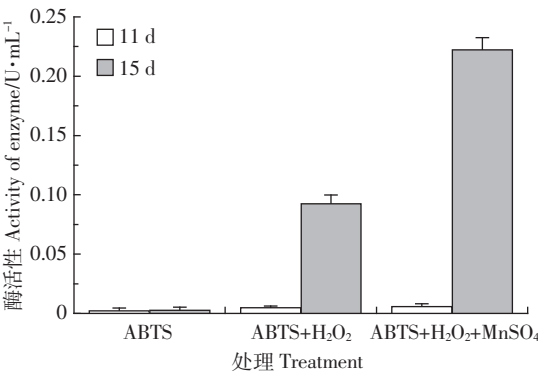


图 3 总酶活测定的不同培养时间和测定方法的比较

Figure 3 Comparison of different incubation time and methods in total activity of enzyme

的,它可以代表该体系培养条件下菌液的总酶活性。

根据测定结果对菌液中可能存在的酶对该体系总酶活性的贡献分析如下:(1)只加入“ABTS”测定的主要是 Lac 的活性,记作 a;(2)加入 ABTS 和 H_2O_2 测得的酶活主要是 LiP 的活性,记作 b,理论上 b 等于 a 加上 LiP 的活性;(3)是否加入 $MnSO_4$ 得到的酶活的差异主要是 MnP 的活性,记作 c,理论上 c 等于 b 加上 MnP 的活性。

2.4 总酶活性随时间的变化

Kirk 液体培养基中 PC 菌菌液总酶活性的测定结果如图 4 所示。从图 4A 可以看出,该培养体系酶活性随培养时间的增加而增加,显著增加出现在 40 d 以后,在第 50 d 左右各处理都达到最高值,其后酶活性出现下降趋势。总的来说,在 45~60 d 之间是该体系酶活性的一个高峰。通过比较可以看出,在 40 d 以前各处理的酶活性均较低,但其后 b (加入 ABTS+ H_2O_2)和 c (加入 ABTS+ H_2O_2 + $MnSO_4$)处理的酶活性都显著增加。第 57 d 时的“MnP 活性”是“LiP 活性”的 0.84 倍。放大 30 d 之内的酶活性变化趋势(图 4B)可以看出,尽管总体上酶活性较低,但从一开始,这三个处理所测定的酶活性就存在明显差异:加入 H_2O_2 的两个处理 b 和 c 的酶活性均显著高于没有加 H_2O_2 的处理 a;在培养 25~30 d 之间,c (加入 H_2O_2 + $MnSO_4$)处理的酶活性也会出现一个小的峰值,其小高峰(第 27 d)的“MnP 活性”是“LiP 活性”的 1.41 倍。这些都说明,该体系中过氧化氢酶占主导优势,主要是 LiP 和 MnP 的活性。在培养 20 d 后,加入 $MnSO_4$ 的 c 处理的总酶活性显著增加,说明培养体系中 MnP 的量显著增加。以往多数报道^[33-35]中指出,LiP 的活性与 Mn^{2+} 浓度成反比,而 MnP 的活性与 Mn^{2+} 浓度成正比,也就是说 Mn^{2+} 的存在抑制了 LiP 活性而促进了 MnP 活性。

因此,这部分增加的酶活性不可能是 LiP 的,也不可能是 Lac 的,可以推定为 MnP 的活性。

在培养 20 d 以后还观察到真菌菌垫表层出现明显的红棕色变化,从最初浅红棕色到深红棕色近乎于黑色,到后来这个红棕色又逐渐退去。这个变化过程也表征了培养体系中锰酶活性和锰离子反应的变化过程。只加了 H_2O_2 没有加 $MnSO_4$ 的处理 b,其酶活性就主要是 LiP 的活性;既没有加 H_2O_2 也没有加 $MnSO_4$ 的处理 a 的酶活性很低,这部分是 Lac 的活性。这部分试验结果再次说明了该培养体系总酶活性可以用处理 c (加入 ABTS+ H_2O_2 + $MnSO_4$)来测定。

上述结果说明 Kirk 液体培养基培养 PC 菌,主要是分泌 LiP 和 MnP 两种胞外过氧化物酶。培养初期(培养 20 d 以前),LiP 的活性占主导,培养中后期(培养 20 d 以后的大部分时间),MnP 的活性明显增加并可能占主导。非过氧化物酶 Lac 的活性在培养的 15~25 d,大概 10 d 的时间里可以测到,但活性很低,而其他时间几乎测不出来,说明 PC 菌分泌的 Lac 含量非常少。

2.5 加入 PFOA 对 PC 菌菌液酶活性的影响

加入 PFOA 处理的菌液总酶活性的变化如图 5 所示,其中图 5A 是对照,图 5B 表示加入 PFOA 后酶活性的变化。比较可以看出,加入 PFOA 前后菌液酶活性与对照没有明显差别,但是从第 13 d 开始可以看到,加入 PFOA 的处理酶活性与对照相比略有下降,随后一直到第 24 d 都没有明显增加,而对照则从第 16 d 开始,过氧化物酶的两个处理都显著呈上升趋势,对照的酶活性显著高于加入 PFOA 处理的一倍以上,说明加入 PFOA 后对菌生长和酶的分泌有一定的抑制作用。但是到第 25 d 以后,加入 PFOA 的处理中过氧化物酶的两个处理都同时增加并逐渐超过对

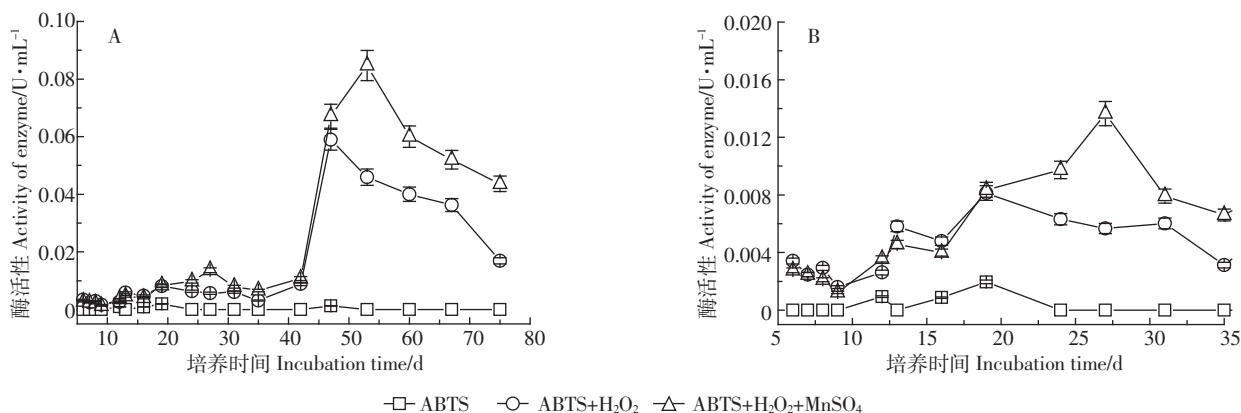


图 4 培养 75 d 的总酶活的测定结果

Figure 4 The variation of total enzyme activity with 75 days' incubation period

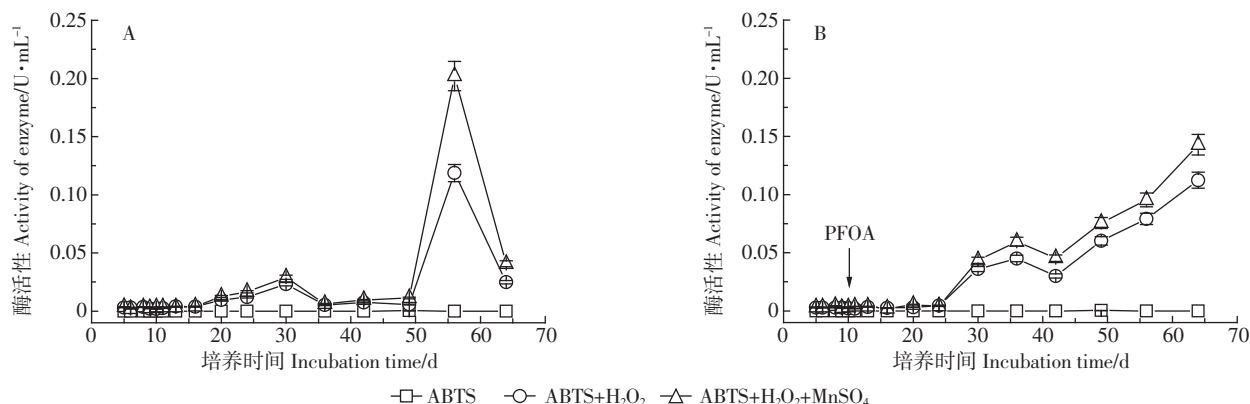


图 5 加入 PFOA 对真菌体系中菌液酶活性的影响

Figure 5 Effects of PFOA on enzyme activities in the fungal system

照,在第 30 d 的时候大于对照酶活性一倍左右,非过氧化物酶活性则和对照一样,一直很低,几乎没有变化,说明 PFOA 虽然对该体系过氧化物酶活性有短暂的抑制作用,但是随着培养时间的延长,这种抑制作用不但未持续,反而促进了其酶活性的增加。说明 $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PFOA 并不会长期影响 PC 菌的生长,在一定的条件下还可能促进菌体生长或代谢进程。

另外可以看出,在第 25 d 之后加入 PFOA 的 b 和 c 处理一直高于对照,直到第 50 d 以后,对照才逐渐增加,并在第 60 d 左右达到或超过了加入 PFOA 的处理。同时,处理 a(Lac 的活性)始终很小,几乎测不出。从这个结果可以看出,PFOA 的加入在一定时间内改变了体系中真菌的产酶机制和产酶量,对白腐真菌体系的过氧化物酶的种类和活性产生了显著的影响。

总的来说,PFOA 的加入在初期使 PC 菌分泌的胞外酶活性受到抑制,没有随着培养时间的增加而增加,但到后期其酶活性逐渐增加反而超过了对照,说明 PFOA 的降解和转化促进了酶活的产生。究其原因很可能是因为 PFOA 改变了 PC 的产酶机制,或是 PFOA 在 PC 中的降解产物对体系 LiP 和 MnP 的分泌产生了明显的促进作用,当大部分 PFOA 消耗完后,其对产酶促进作用也逐渐消失。从变化趋势来看,PFOA 对 LiP 和 MnP 的影响也没有显著的选择性差异,也就是说如果用它们对 PFOA 进行降解处理,其作用效果可能相似。

2.6 加入 E2 对 PC 菌液酶活性的影响

加入 E2 对菌液总酶活性的变化如图 6 所示。通过比较可以看出,加入 E2 后菌液酶活性变化呈现出了与加入 PFOA 相似的趋势。从第 10 d 加入直到第 17 d,其酶活性与对照相比都没有什么差异;第 17 d

以后,E2 处理和对照的酶活性都在增加,对照增加显著,它们都在第 23 d 时达到最大,但 E2 处理的总酶活性比对照小了 2 倍左右,说明 E2 的加入对真菌正常生长和酶的产生有明显的抑制作用;而且在第 17 d 以后,处理和对照都表现出了相同的增加和减少的趋势,变化点也在相同的时间,只是对照的值始终高于相应的酶活 2 倍左右。非过氧化物酶活性(处理 a)和对照一样,一直很低,几乎测不出。从变化趋势来看,E2 对 LiP 和 MnP 的影响也没有显著的选择性差异,同理如果用它们对 E2 进行降解处理,其作用效果可能相似。

总的来说,PFOA 和 E2 加入后 PC 菌液酶活性的变化趋势基本相同,PFOA 和 E2 的加入都抑制了 PC 菌的生长和过氧化物酶的分泌。相对于对照,加入了 PFOA 和 E2 的培养体系总酶活性低于对照酶活 1~2 倍。但是由于 PFOA 更稳定(在另外 PFOA 降解研究中发现需要时间更长),我们测定的酶活时间也较长,发现在 25 d 时其酶活性反而大于对照,并在后来的 25 d 里一直大于对照。由于 E2 测定时间只在 30 d 内(在另外 E2 的降解研究中发现需要时间较短),没有发现它在以后的时间里是否有促进酶活性的作用。我们可以确定的是,在加入 PFOA 和 E2 的短期内,它们对体系的总酶活性是有抑制作用的,但其抑制的机理还需进一步研究。

3 讨论

通常采用经典的 Kirk 液体培养基培养黄孢原毛平革菌,该培养基本身含有微量的锰离子,菌培养过程中自身次生代谢分泌微量的过氧化氢,同时黄孢原毛平革菌是好氧菌,培养过程需每日通氧气,所以该培养体系始终存在对这三种酶的微量消耗,这也对在

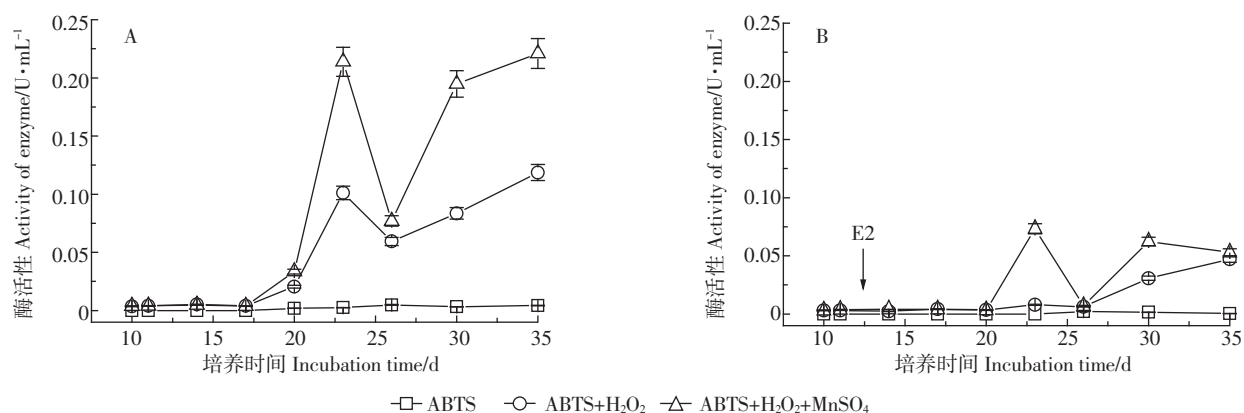


图6 加入E2对真菌体系中菌液酶活性的影响

Figure 6 Effects of E2 on enzyme activities in the fungal system

该体系中测定 LiP、MnP 和 Lac 3 种酶的活性产生了干扰和测定误差,因此需要测定该培养体系菌液的总酶活性。

从 PFOA 和 E2 对 PC 菌液酶活性的不同影响可以看出,PFOA 在短期抑制后可以转化为 PC 菌的底物促进菌分泌酶,促进作用一直持续了 40 d 左右,而 E2 加入后一直是抑制体系的酶活,这说明 PFOA 和 E2 作用于 PC 菌的酶的机理有所不同。根据上述的试验结果,无法看出 PFOA 或 E2 对 LiP 或 MnP 中的哪一种酶的活性表达有特殊影响,所以反而言之,LiP 和 MnP 都可能被用于研究 PFOA 和 E2 的降解,并且已有试验表明 LiP 和 MnP 都对 E2 的降解有效果^[41-42]。

PFOA 是含有 8 个 C 的长链有机物,它的 C-F 键结构异常稳定,PFOA 可以在长达约 40 d 时间内都对 PC 菌液酶活性产生促进作用,可以大胆推测 PFOA 可以作为 PC 菌的缓释底物,也就是说 PC 菌可以长期缓慢去除和降解 PFOA 这种极为稳定的含氟有机物,以后的研究中会报道这部分内容。

4 结论

(1)确定了该体系总酶活性的测定方法:以 ABTS 为底物在 pH 3 的柠檬酸盐缓冲液中,分别依次加入 ABTS、ABTS+H₂O₂、ABTS+H₂O₂+MnSO₄,以分光光度法在 470 nm 处测定 60 s 内反应的酶活性。只加入 ABTS 测定的主要是 Lac 的活性,记作 a;加入 ABTS 和 H₂O₂ 测得的酶活主要是 LiP 的活性,记作 b,理论上 b=a+LiP 的活性;是否加入 MnSO₄ 得到的酶活的差异主要是 MnP 的活性,记作 c,理论上 c=b+MnP 的活性,也是该培养体系菌液的最大总酶活性。

(2)该培养体系中,PC 菌分泌的胞外酶以 LiP 和

MnP 两种过氧化物酶为主,而 Lac 含量极低;总酶活性随着培养时间的增加而增加,在 20~30 d 之间出现一次小高峰,在 50~60 d 之间出现一次大高峰,随后活性下降。

(3)0.01 mmol·L⁻¹ 的 PFOA 对该菌液中胞外过氧化物酶活性的影响表现为“先抑制,后促进”;0.1 μmol·L⁻¹ 的 E2 则只表现为“抑制”作用。

参考文献:

- [1] Gulkowska A, Jiang Q, So M K, et al. Persistent perfluorinated acids in seafood collected from two cities of China[J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(12):3736-3741.
- [2] Shoeib M, Harner T, Wilford B H, et al. Perfluorinated sulfonamides in indoor and outdoor air and indoor dust: Occurrence, partitioning, and human exposure[J]. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39(17): 6599-6606.
- [3] Olivero-Verbel J, Tao L, Johnson-Restrepo B, et al. Perfluorooctane sulfonate and related fluorochemicals in biological samples from the north coast of Colombia[M]. Kidlington, ROYAUME-UNI: Elsevier, 2006:6.
- [4] Kannan K, Franson J C, Bowerman W W, et al. Perfluorooctane sulfonate in fish-eating water birds including bald eagles and albatrosses[J]. *Environmental Science & Technology*, 2001, 35(15):3065-3070.
- [5] Moody C A, Martin J W, Kwan W C, et al. Monitoring perfluorinated surfactants in biota and surface water samples following an accidental release of fire-fighting foam into etobicoke creek[J]. *Environmental Science & Technology*, 2001, 36(4):545-551.
- [6] So M K, Taniyasu S, Yamashita N, et al. Perfluorinated compounds in coastal waters of Hong Kong, South China, and Korea[J]. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38(15):4056-4063.
- [7] Beach S, Newsted J, Coady K, et al. Ecotoxicological evaluation of perfluorooctanesulfonate(pfos) reviews of environmental contamination and toxicology[M]//Springer, New York, 2006:133-174.
- [8] Lau C, Butenhoff J L, Rogers J M. The developmental toxicity of perfluor-

- roalkyl acids and their derivatives[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2004, 198(2):231-241.
- [9] Olsen G W, Butenhoff J L, Zobel L R. Perfluoroalkyl chemicals and human fetal development: An epidemiologic review with clinical and toxicological perspectives[J]. *Reproductive Toxicology*, 2009, 27(3-4):212-230.
- [10] Hori H, Hayakawa E, Einaga H, et al. Decomposition of environmentally persistent perfluorooctanoic acid in water by photochemical approaches[J]. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38(22):6118-6124.
- [11] Hori H, Yamamoto A, Hayakawa E, et al. Efficient decomposition of environmentally persistent perfluorocarboxylic acids by use of persulfate as a photochemical oxidant[J]. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39(7):2383-2388.
- [12] Colosi L M, Pinto R A, Huang Q, et al. Peroxidase-mediated degradation of perfluorooctanoic acid[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2009, 28(2):264-271.
- [13] Colosi L M, Huang Q, Weber W J. Quantitative structure activity relationship based quantification of the impacts of enzyme substrate binding on rates of peroxidase-mediated reactions of estrogenic phenolic chemicals[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(12):4041-4047.
- [14] Fan D, Qiu S, Overton C D, et al. Impaired secretion of apolipoprotein E2 from macrophages[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(18):13746-13753.
- [15] Purdom C E, Hardiman P A, Bye V V J, et al. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works[J]. *Chemistry and Ecology*, 1994, 8(4):275-285.
- [16] Suzuki K, Hirai H, Murata H, et al. Removal of estrogenic activities of 17 β -estradiol and ethinylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi[J]. *Water Research*, 2003, 37(8):1972-1975.
- [17] Auriol M, Filali-Meknassi Y, Tyagi R D, et al. Laccase-catalyzed conversion of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater[J]. *Water Research*, 2007, 41(15):3281-3288.
- [18] Caron E, Lafrance P, Auclair J C. Temporal evolution of atrazine and metolachlor concentrations exported in runoff and subsurface water with vegetated filter strips[J]. *Agronomy for Sustainable Development*, 2012:1-9.
- [19] Auriol M, Filali-Meknassi Y, Adams C D, et al. Natural and synthetic hormone removal using the horseradish peroxidase enzyme: Temperature and pH effects[J]. *Water Research*, 2006, 40(15):2847-2856.
- [20] Johnson A C, Belfroid A, Di Corcia A. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent[J]. *Science of the Total Environment*, 2000, 256(2-3):163-173.
- [21] Karam J, Nicell J A. Potential applications of enzymes in waste treatment[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 1997, 69(2):141-153.
- [22] Zhao Y, Hu J, Jin W. Transformation of oxidation products and reduction of estrogenic activity of 17 β -estradiol by a heterogeneous photo-fenton reaction[J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(14):5277-5284.
- [23] 田 蕾, 陈小云, 胡 森, 等. 蚯蚓及蚓粪对白腐真菌降解土壤中菲的动态影响[J]. *农业环境科学学报*, 2008, 27(1):221-225.
- TIAN Lei, CHEN Xiao-yun, HU Miao, et al. Effect of earthworms and earthworm casts on the degradation of phenanthrene in artificially contaminated soil by white-rot fungi (*P. chrysosporium*) [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 27(1):221-225.
- [24] 郭书海, 张海荣, 张春桂. 陈化石油污染物降解菌的筛选[J]. *农业环境科学学报*, 2005, 24(1):161-164.
- GUO Shu-hai, ZHANG Hai-rong, ZHANG Chun-gui. Screening for degradation fungi of persistent petroleum hydrocarbon[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2005, 24(1):161-164.
- [25] 黄 俊, 余 刚, 成 捷, 等. 白腐真菌生物降解五氯苯酚的动力学研究[J]. *农业环境科学学报*, 2004, 23(1):167-169.
- HUANG Jun, YU Gang, CHENG Jie, et al. Kinetic analysis for biodegradation process of pentachlorophenol in the presence of white rot fungus[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2004, 23(1):167-169.
- [26] 侯树宇, 张清敏, 多 森, 等. 白腐真菌和细菌对芘的协同生物降解研究[J]. *农业环境科学学报*, 2005, 24(2):318-321.
- HOU Shu-yu, ZHANG Qing-min, DUO Miao, et al. Coordinated biodegradation of pyrene by a consortium of white rot fungus and bacteria[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2005, 24(2):318-321.
- [27] Dehorter B, Blondeau R. Extracellular enzyme activities during humic acid degradation by the white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1992, 94(3):209-215.
- [28] Ferapontova E E, Castillo J, Gorton L. Bioelectrocatalytic properties of lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in reactions with phenols, catechols and lignin-model compounds[J]. *Biochimica et Biophysica Acta(BBA) - General Subjects*, 2006, 1760(9):1343-1354.
- [29] Yuan H S, Dai Y C, Steffen K. Screening and evaluation of white rot fungi to decolourise synthetic dyes, with particular reference to *Antrodia albocinnamomea*[J]. *Mycology*, 2012, 3(2):100-108.
- [30] 李慧蓉. 白腐真菌生物学和生物技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005:25-26.
- LI Hui-rong. White rot fungi biology and biotechnology[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005:25-26.
- [31] Srinivasan C, Dsouza T M, Boominathan K, et al. Demonstration of laccase in the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(12):4274-4277.
- [32] Kaal E E J, Field J A, Joyce T W. Increasing ligninolytic enzyme activities in several white-rot basidiomycetes by nitrogen-sufficient media[J]. *Bioresource Technology*, 1995, 53(2):133-139.
- [33] Perez J, Jeffries T W. Roles of manganese and organic acid chelators in regulating lignin degradation and biosynthesis of peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(8):2402-2409.
- [34] Paszczyński A, Huynh V, Crawford R. Comparison of ligninase-I and peroxidase-M2 from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysospori-*

- um[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1986, 244(2):750–765.
- [35] Bonnamy P, Jeffries T W. Mn(II) regulation of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(1):210–217.
- [36] Tien M, Kirk T K. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* [M]/Willis A. Wood S T K. *Methods in Enzymology*, Academic Press, 1988:238–249.
- [37] Apitz A, van Pée K H. Isolation and characterization of a thermostable intracellular enzyme with peroxidase activity from *Bacillus sphaericus* [J]. *Archives of Microbiology*, 2001, 175(6):405–412.
- [38] Hirai H, Shibata H, Kawai S, et al. Role of 1-hydroxybenzotriazole in oxidation by laccase from *Trametes versicolor*. Kinetic analysis of the laccase-1-hydroxybenzotriazole couple[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 265(1):56–59.
- [39] Heinzkill M, Bech L, Halkier T, et al. Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family *Coprinaceae*) [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(5):1601–1606.
- [40] Mester T, Field J A. Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera species* strain BOS55 in the absence of manganese[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(25):15412–15417.
- [41] Mao L, Huang Q, Lu J, et al. Ligninase-mediated removal of natural and synthetic estrogens from water: I. Reaction behaviors [J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 43(2):374–379.
- [42] Mao L, Lu J, Gao S, et al. Transformation of 17 β -estradiol mediated by lignin peroxidase: The role of veratryl alcohol[J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2010, 59(1):13–19.