

# 产漆酶真菌筛选及其对 PAHs 污染土壤 修复的初步研究\*

潘 澄<sup>1,2</sup> 茆 婷<sup>1</sup> 吴宇澄<sup>2</sup> 申卫收<sup>1</sup> 钟文辉<sup>1†</sup>

(1 南京师范大学环境科学与工程系, 南京 210097)

(2 中国科学院土壤环境与污染修复重点实验室(南京土壤研究所), 南京 210008)

**摘 要** 真菌漆酶可以高效转化多环芳烃 (PAHs), 因此, 产漆酶真菌在 PAHs 污染土壤修复中极具应用前景。根据漆酶可将愈创木酚氧化为红色物质的特性, 成功从土壤中筛选出一株能够分泌漆酶的真菌菌株 F-1, 初步鉴定该菌为疣孢漆斑菌 (*Myrothecium verrucaria*)。通过 Plackett-Burman 试验对菌株 F-1 的产酶能力进行了分析, 发现特定培养条件组合可将其酶活提高近 300 倍, 达  $5\ 628\ \text{U}\ \text{L}^{-1}$ , 表明 F-1 的漆酶活性受到环境条件的显著影响。应用菌株 F-1 对 PAHs 污染土壤进行了初步修复研究, 结果表明, 接种 F-1 对菲、荧蒽、芘、苯并 (a) 蒽、屈、苯并 (b) 荧蒽、苯并 (k) 荧蒽、苯并 (a) 芘、二苯并 (a,h) 蒽、苯并 (g,h,i) 芘、茚芘 (1,2,3-cd) 芘等 11 种 PAHs 均有不同程度的降解, 提示产漆酶真菌在 PAHs 污染土壤修复中的应用潜力。

**关键词** 多环芳烃 (PAHs); 土壤污染; 真菌修复; 漆酶

**中图分类号** X53 **文献标识码** A

多环芳烃 (Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 是一类由两个及两个以上苯环稠合形成的有机化合物, 广泛分布于全球范围的土壤中。在我国环渤海、长江三角洲、珠江三角洲等经济快速发展地区土壤中, 普遍存在着 PAHs 类污染物, 其含量在某些情况下可以高达  $1\ 000\sim 10\ 000\ \text{ppb}$  以上<sup>[1-3]</sup>。PAHs 尤其是高分子量的 PAHs 能造成 DNA 损伤, 产生“三致”效应。PAHs 进入自然环境后, 在各环境介质内发生迁移, 通过生物吸收或食物链进入动植物体内, 导致生态及健康风险<sup>[4]</sup>。

PAHs 污染土壤的真菌修复越来越受到重视。真菌可分泌胞外木质素氧化酶 (包括 LiP、MnP 和漆酶等), 对 PAHs 往往具有高效的降解以及转化能力。研究较多的真菌有白囊耙齿菌<sup>[5]</sup>、虎皮香菇<sup>[6]</sup>、头孢霉属、曲霉属、镰孢霉属<sup>[7]</sup>、青霉属、毛霉属<sup>[8]</sup>等, 其中多数为担子菌和子囊菌等高等真菌, 可以转化从二环到五环的多种 PAHs<sup>[9]</sup>。但与极为多样的土壤真菌资源相比, 目前已经分离的 PAHs 降解真菌的数量还非常有限, 对 PAHs 降解真菌的分离筛选仍然是真菌修复的中心环节。

在 PAHs 降解真菌的筛选方法上, 传统方法是以 PAHs 作为唯一碳源进行筛选, 该方法针对性强, 但工作量大, 时间较长, 效率不高, 且操作过程中需使用 PAHs, 对于环境以及人体健康均有一定安全风险。资料表明<sup>[10]</sup>, 通过分离筛选具有漆酶活性真菌, 可以高效、安全地获得对 PAHs 具有一定降解能力的真菌菌株。漆酶 (benzenediol: oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2) 属于一组催化中心含铜原子的多酚氧化酶<sup>[11]</sup>, 对 PAHs 的转化能力也已得到了广泛证实<sup>[12]</sup>, 且应用中无需加入过氧化氢。本研究即采用从土壤中分离筛选产漆酶真菌的策略, 利用漆酶可将愈创木酚氧化为红色物质的特性, 进行菌种的快速筛选, 通过培养条件优化提高其产酶活力。此外, 通过进行土壤微域修复实验, 初

\* 国际科学基金项目 (IFS No. C/4471-1) 及南京师范大学“211 工程”重点学科建设项目 (1843203623) 资助

† 通讯作者, E-mail: zhongwenhui@njnu.edu.cn

作者简介: 潘 澄 (1986—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为污染土壤生物修复。Email: paazz10c@163.com

收稿日期: 2010-05-25; 收到修改稿日期: 2010-09-27

步确定所得菌株对土壤中 PAHs 的降解能力和修复条件,为今后进行 PAHs 污染土壤较大规模的生物修复提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 培养基

产漆酶真菌筛选培养基: 含 0.01% 愈创木酚的 PDA 培养基。

液体产(漆)酶培养基: 新鲜马铃薯浸汁 200 g, 蔗糖 20 g,  $K_2HPO_4$  3 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.5 g, 蒸馏水 1 000 ml, pH 自然。

### 1.2 土壤产漆酶真菌的筛选与鉴定

真菌筛选所用土壤采自南京紫金山, 采样时先除去上层落叶层, 取表层 0~5 cm 深的土壤。将土壤悬浊液涂布于含 0.01% 愈创木酚的 PDA 培养基平板上, 28℃ 培养。如生长菌落处的培养基由乳白色变为铁红色, 即为具有漆酶活性的真菌菌株<sup>[13-14]</sup>。挑取单菌落进行菌种纯化, 将纯化的菌株接种于不含愈创木酚的 PDA 平板上培养, 观察菌落周围的培养基是否出现颜色变化, 以确认颜色变化是否为菌落本身的颜色而非分泌漆酶所致。

采用 DNA 提取试剂盒 (SK1375, 上海生工) 提取真菌 DNA, 采用通用引物 NS1 (GTAGTCATATGCTTGTCTC) /NS8 (TCCGCAGGTTACCTACGGA)<sup>[15]</sup>, PCR 扩增长约 1.6 kb 的真菌 18S rDNA 基因。PCR 反应参数为: 94℃ 变性 45 s, 55℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 30 轮循环。PCR 产物经过柱纯化, 委托上海英潍捷基公司测序, DNA 序列经 BLAST 比对后, 根据 Genbank 中最接近的记录进行菌株的系统分类地位推断。

### 1.3 漆酶活性的测定

将产漆酶真菌接种于 50 ml 产漆酶液体培养基中, 28℃、140 r min<sup>-1</sup> 摇瓶培养。采用 ABTS-分光光度计测定培养液中漆酶活性<sup>[16]</sup>, 确定产酶高峰期以及最高产酶活性。漆酶活性的计算公式: 漆酶活性 (U L<sup>-1</sup>) = ( $\Delta A_{420}/36\ 000$ )  $\times 20 \times 10^6$ , 式中,  $\Delta A_{420}$  指 420 nm 处吸光值每分钟的变化值。1U 漆酶定义为每分钟转化 1  $\mu$ mol 底物所需的酶量。

### 1.4 产酶条件的优化

挑取一环真菌菌株接种于 50 ml 液体培养基中, 28℃、140 r min<sup>-1</sup> 摇瓶培养 5 d 左右。无菌条件下将培养液连同菌体倒入玻璃匀浆器中, 反复研磨, 制得匀浆菌丝体。

1.4.1 不同碳、氮源的分析 进行碳源分析时, 液体产酶培养基中碳源分别选用葡萄糖、乳糖、蔗糖、可溶性淀粉、羧甲基纤维素钠 (CMC-Na), 浓度均为 20 g L<sup>-1</sup>, 装液量为 50 ml (150 ml 三角烧瓶), 各瓶中分别加入 2 ml 匀浆菌丝体, 28℃、140 r min<sup>-1</sup> 摇瓶培养, 测定其最高酶活性并进行比较。进行氮源分析时, 分别选用大豆粉、蛋白胨、尿素、 $(NH_4)_2SO_4$ 、牛肉膏等作氮源, 浓度均为 5 g L<sup>-1</sup>, 培养方法同上。

1.4.2 多因素影响的析因分析 采用 Plackett-Burman 的部分析因方法筛选漆酶活性影响因子。该方法主要针对因子数较多, 且未确定众因子相对于响应变量的显著性而采用的实验设计方法。通过对每个因子取两水平来进行分析, 通过比较各个因子两水平的差异与整体的差异来确定因子的显著性。并结合计算机统计软件的应用, 在不牺牲主因子效应的前提下, 有计划地选择因子组合。因此通过选取对产酶具有潜在影响的因子, 设计一系列培养基组合, 以各组培养条件下最高酶活性作为响应变量进行分析, 对影响菌种产酶的条件进行筛选。

### 1.5 土壤微域修复

供修复用土壤采自江苏无锡某地 PAHs 污染较重的农业土壤表层土 (0~20 cm), 土壤经风干、磨细后, 过 2 mm 筛, 于暗处 4℃ 贮存。

微域设置：每个微域用 100 g 土壤（以干重计），设置生物强化/生物刺激、生物强化、生物刺激与对照 4 种处理。生物强化/生物刺激（记为 AS）：将 5 ml 产漆酶菌株培养物匀浆后与 5 g 玉米粉混匀，加入至土壤中并拌匀；生物强化（记为 A）：土壤中仅加入 5 ml 产漆酶菌株匀浆体，不加入玉米粉；生物刺激（记为 S）：土壤中仅加入 5 g 玉米粉，不加产漆酶菌株匀浆体；对照（记为 CK）：土壤中不添加任何营养物质与微生物。每个处理设 5 个重复。

调节微域土壤水分含量为 25%~30%（即每个微域加 30 ml 水），并注意维持水分含量基本不变，于 30℃ 暗处培养 30 d。将土壤风干、磨细，过 0.9 mm 筛，4℃ 保存，待进一步 PAHs 的提取以及含量测定。

### 1.6 土壤中 PAHs 的提取与含量测定

采用索氏提取方法提取土壤中的 PAHs<sup>[17]</sup>。取 2.0 g 冷冻干燥土壤，用 60 ml 二氯甲烷提取 24 h，提取物旋转蒸干后用 2.00 ml 环己烷溶解，取 0.50 ml 过硅胶柱，用正己烷-二氯甲烷（体积比为 1:1）混合溶液洗脱，弃去前 1 ml 洗脱液后开始收集，收集 2.00 ml 洗脱液，高纯氮气吹干。测定前用适量乙腈溶解。

使用安捷伦 LC-1100 型高效液相色谱仪测定 PAHs 含量。分离柱为 Zorbax ODS C18（4.6×250 mm，安捷伦），柱温 30℃，流动相为乙腈和水（体积比为 80%:20%），流速 1.5 ml min<sup>-1</sup>，紫外检测波长 254 nm，荧光检测 Ex280 nm，Em428 nm。

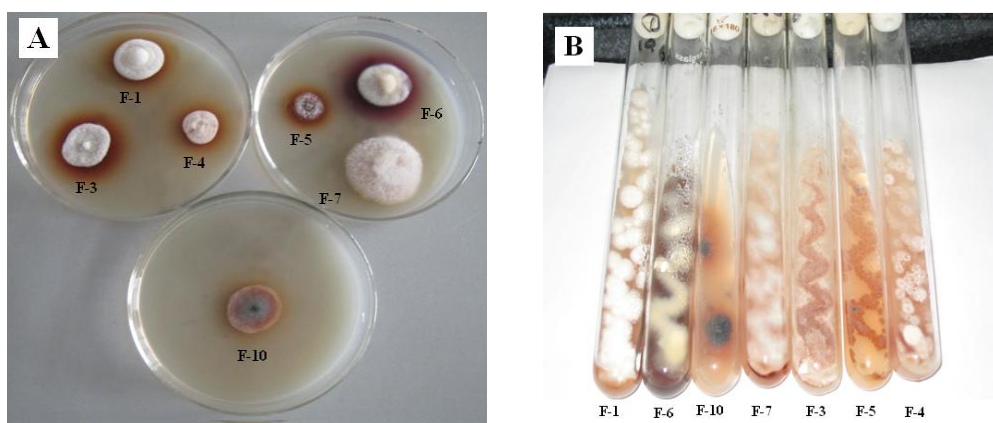
### 1.7 数据处理方法

采用 SPSS 13.0 以及 Minitab 14 统计软件对实验数据进行显著性分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 产漆酶真菌的筛选及鉴定

漆酶可催化愈创木酚形成铁红色聚合物。在筛选用培养基中加入愈创木酚，菌落周围可形成铁红色氧化圈，通过直接观察培养基颜色变化即可将土壤中的产漆酶真菌筛选出来，方法较简便可行，减少了筛选工作量，提高了筛选的效率。采用这一方法，在供筛选森林土壤中获得了 7 株产漆酶的真菌菌株（图 1），其中真菌菌株 F-1 在液体培养基中表现出最高的漆酶活性，因此选取进行后续的研究。



A: 平板上菌落形态； B: 试管斜面上菌落形态 A: On the petri dish; B: On the incline

图 1 具有漆酶活性的真菌菌株

Fig. 1 Fungi strains showing laccase activity

对真菌菌株 F-1 18S rRNA 基因的 PCR 扩增获得一段 1 662 bp DNA 片段（Genbank 序列号 HQ260599）。经 BLAST 比对，该序列与疣孢漆斑菌（*Myrothecium verrucaria* ATCC 9095）的相似性

程度达 100%。疣孢漆斑菌是常见的土壤真菌，可能具有漆酶活性<sup>[18]</sup>，但是迄今还未见其在 PAHs 污染土壤修复中的应用。

## 2.2 菌株 F-1 产酶条件的优化

**2.2.1 碳源与氮源的分析** 用不同碳源（葡萄糖、乳糖、蔗糖、可溶性淀粉、CMC-Na）和氮源（大豆粉、蛋白胨、尿素、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、牛肉膏）培养菌株 F-1，分别测定漆酶的最高酶活性，结果见表 1。由于影响真菌产酶活性的因子较多，因此需要对各因子的相互综合影响做进一步的分析，考虑到所选因子的代表性以及酶活测定操作时的简便性，选取 CMC-Na 和蛋白胨分别作为后续分析中所采用的碳、氮源。

表 1 不同碳、氮源对漆酶活性的影响

Table 1 Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase production

碳源 Carbon source	漆酶活性 Laccase activity ( $\text{U L}^{-1}$ )	氮源 Nitrogen source	漆酶活性 Laccase activity ( $\text{U L}^{-1}$ )
葡萄糖 Glucose	54.1b	大豆粉 Sybean powder	169c
乳糖 Lactose	24.0d	蛋白胨 Peptone	389b
蔗糖 Sucrose	26.4d	尿素 Urea	177c
可溶性淀粉 Soluble starch	38.6c	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.69d
CMC-Na	261a	牛肉膏 Beef extract	3781a

**2.2.2 析因分析** 影响真菌漆酶活性的因素众多，有碳源、氮源<sup>[19]</sup>、金属离子（如  $\text{Cu}^{2+}$ <sup>[20]</sup>和  $\text{Mn}^{2+}$ ）、小分子酚类物质（如愈创木酚和藜芦醇）<sup>[19]</sup>、乙醇<sup>[21]</sup>、氧气<sup>[22]</sup>、表面活性剂等。如果采用单因素方法等传统方法分析因子效应及菌株产酶活性，人力、物力、时间消耗巨大。Plackett-Burman 是一种部分析因方法，可以用较少的处理，对多个因子的产酶效应进行估计。本研究主要应用 P-B 方法评估菌株 F-1 的产漆酶活性。结合上述碳、氮源的分析结果，选取对产酶具有潜在影响的碳源（CMC-Na）、氮源（蛋白胨）、 $\text{Cu}^{2+}$ 、酚类（愈创木酚）、乙醇、表面活性剂（吐温 80）、氧气等 7 个因子，设计一系列 16 个培养基组合，接种 F-1 并检测酶活性变化。16 个培养基组分以及各组合最高酶活数据如表 2 所示。

表 2 培养基组合以及相应酶活数值

Table 2 Combination of media and respective laccase activities

组合 Combination	CMC-Na ( $\text{g L}^{-1}$ )	蛋白胨 Peptone ( $\text{g L}^{-1}$ )	$\text{CuSO}_4$ ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	愈创木酚 Guaiacol ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	乙醇 Ethanol (%)	吐温 80 Tween 80 ( $\text{g L}^{-1}$ )	氧 Oxygen	漆酶活性 Laccase activity ( $\text{U L}^{-1}$ )
1	5	10	1.0	0.1	0.5	0	1	592
2	5	5	1.0	0.5	2.0	0	0	55
3	10	5	1.0	0.1	0.5	1	0	100
4	10	10	1.0	0.1	2.0	0	0	96
5	10	5	0.2	0.1	2.0	0	1	3 997
6	10	5	0.2	0.5	2.0	1	0	137
7	10	10	0.2	0.1	0.5	1	1	306
8	5	10	0.2	0.1	2.0	1	0	32

9	10	10	0.2	0.5	0.5	0	0	31
10	10	5	1.0	0.5	0.5	0	1	1 226
11	5	10	1.0	0.5	0.5	1	0	19
12	5	5	0.2	0.1	0.5	0	0	101
13	5	5	1.0	0.1	2.0	1	1	1 389
14	10	10	1.0	0.5	2.0	1	1	5 628
15	5	5	0.2	0.5	0.5	1	1	2 811
16	5	10	0.2	0.5	2.0	0	1	622

注：表中“氧”一栏，0 代表静置培养，1 代表振荡培养 Note: In the column of “oxygen”, “0” representing stillness in incubation, “1” representing shaking in incubation

由结果可见，对于不同培养基组合，漆酶活性有明显的差异（表 2）。最高（5628 U L<sup>-1</sup>）较最低（19 U L<sup>-1</sup>）高两个数量级以上，表明 F-1 的漆酶活性受到环境条件的强烈影响。

比较相关文献<sup>[23]</sup>，当所分泌漆酶酶活处于 1 000~10 000 U L<sup>-1</sup> 时，即属于酶活较高的产漆酶菌株品种，因此本菌株 F-1 所产漆酶酶活处于相对较高的水平。同时可知对于实验用菌株 F-1，适量添加碳源与乙醇刺激，以及一定的酚类诱导与足够的供氧条件，有利于其产漆酶活性的提高，从而能在一定程度上增强对 PAHs 的转化效果。另外，过多氮源的添加反而可能对产酶有不利影响。

### 2.3 土壤微域的修复效果

不同处理条件下的土壤微域经 30 d 连续培养，测定土壤中残留的 PAHs 含量，结果见表 3 所示。

4 种不同微域处理中，AS、A 处理的 PAHs 含量以及降解率与其余两种处理存在明显差异，可见添加真菌可以促进土壤中 PAHs 的降解。而 AS 与 A 两种处理之间差异则不明显，表明接种真菌 F-1 是导致土壤 PAHs 降解的主要原因。此外，由于供试土壤为长期污染的老化土壤，因此存在一定具有降解功能的土著微生物，而通过添加营养物质可以在一定程度上刺激并强化其降解功能，使土壤中 PAHs 含量与对照处理相比也有所下降（表 4）。

另一方面，菌株 F-1 可降解菲、荧蒹、芘、苯并（a）蒽、屈、苯并（b）荧蒹、苯并（k）荧蒹、苯并（a）芘、二苯并（a,h）蒽、苯并（g,h,i）芘、茚苯（1,2,3-cd）芘共计 11 种 PAHs。作用的 PAHs 范围较为广泛，从低分子量至高分子量的 PAHs 均有覆盖，说明该株产漆酶真菌具有良好的广谱降解作用。

在污染土壤中，高分子量 PAHs 较低分子量 PAHs 具有更强的疏水性及毒性，生物可降解性较弱，因此尽管土壤中低分子量 PAHs 降解菌较为普遍<sup>[24]</sup>，但对于高分子量 PAHs，尤其是毒性效应最为显著的苯并[a]芘，可用于降解的生物资源有限，导致其自然降解缓慢，从而在环境中持久存在。而本研究中的菌株 F-1 对于高分子量 PAHs，尤其是对苯并[a]芘的降解效果明显高于低分子量 PAHs（表 3）。因此，该菌株在今后的土壤修复中，特别是对于高分子量 PAHs 污染的土壤，具有良好的应用前景。此外，迄今还未见有关疣孢漆斑菌用于土壤修复的报道。鉴于土壤真菌的高度多样性，从土壤中筛选具有漆酶活性的真菌菌株，是 PAHs 污染土壤修复的潜在生物资源。

表 3 不同处理微域土壤中的 PAHs 含量和降解率

Table 3 PAHs concentration and degradation rate in different microcosms

PAHs	初始浓度 Initial concentration ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	生物强化+生物刺激		生物强化		生物刺激		对照	
		Bioaugmentation/Biostimulation		Bioaugmentation		Biostimulation		Control	
		AS		A		S		CK	
		浓度 Concentration ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	降解率 Degradation (%)	浓度 Concentration ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	降解率 Degradation (%)	浓度 Concentration ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	降解率 Degradation (%)	浓度 Concentration ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	降解率 Degradation (%)
菲 Phe	245±16a	211±10ab	13.9±1.5	195±15b	20.3±0.9	191±12b	22.1±0.2	228±21ab	6.9±2.5
荧蒹 FluA	1 444±29a	1261±31b	12.7±0.5	1 249±19b	13.5±0.4	1 324±48ab	8.3±1.5	1 393±37a	3.6±0.6
芘 Pyr	1 423±203a	1 185±99bc	16.7±5.0	1 028±59c	27.8±6.3	1 213±26b	14.8±1.3	1 192±124bc	16.2±3.3
苯并 (a)蒽+屈 BaA/Chr	745±2a	632±7c	15.2±0.7	610±16c	18.1±1.9	647±9bc	13.2±1.0	692±23b	7.1±2.8
苯并 (b) 荧蒹 BbF	1 238±65a	1 154±26ab	6.9±2.8	1 066±50b	13.9±0.5	1 166±31ab	5.8±2.4	1 150±16ab	7.2±3.6
苯并 (k) 荧蒹 BkF	564±4a	485±19b	14.1±2.8	504±37ab	10.6±5.9	489±13b	13.3±1.7	497±22ab	11.6±3.3
苯并 (a) 芘 BaP	1 128±10a	908±15ab	19.6±0.6	848±49b	24.9±3.7	980±105ab	13.2±8.5	1 043±61ab	7.6±4.6
二苯并 (a,h) 蒽 DbA	901±24a	736±33cd	18.3±1.5	661±21d	26.6±0.4	780±28bc	13.5±0.8	837±17ab	7.0±0.6
苯并 (ghi) 芘+ 茚苯 (1,2,3-cd) 芘 BghiP and In[1,2,3-cd]P	940±56a	704±41b	25.2±0.1	674±13b	28.3±2.9	752±34ab	20.0±1.2	748±36ab	20.5±0.9
总计 Total	8 628±196a	7276±88b	15.7±2.4	6 835±49b	20.8±3.1	7 542±38ab	12.6±1.9	7 780±64ab	9.8±2.9

### 3 结 论

利用漆酶转化愈创木酚生成红色物质, 通过直接观察培养基颜色变化从土壤中筛选产漆酶真菌而获得 PAHs 降解真菌, 即将筛选 PAHs 高效降解真菌简化为筛选具有高漆酶活性的真菌, 方法简便可行。利用该方法, 成功从土壤中筛选出一株能够分泌漆酶、降解 PAHs 的真菌菌株 F-1, 初步鉴定该菌为疣孢漆斑菌。通过析因实验, 对真菌菌株 F-1 产漆酶条件进行了优化。在一系列培养基组合中, 漆酶活性可相差两个数量级以上, 表明 F-1 的产酶活性受到培养条件的强烈影响, 提示在土壤修复中调节环境条件的重要性。对受污染土壤的初步修复试验显示, 本研究中获得菌株 F-1 对土壤中的多种 PAHs (尤其是高分子量的 PAHs) 均有作用, 特别对于苯并 (a) 芘的降解率达 24.9%, 明显高于低分子量 PAHs, 提示真菌生物强化方法在 PAHs 污染土壤修复中的潜在应用。

### 参 考 文 献

- [1] 汤莉莉, 唐翔宇, 朱永官, 等. 北京地区土壤中多环芳烃的分布特征. 解放军理工大学学报: 自然科学版, 2004, 5(2): 95-99. Tang L L, Tang X Y, Zhu Y G, et al. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil of Beijing (In Chinese). Journal of PLA University of Science and Technology: Natural Science Edition, 2004, 5(2): 95-99
- [2] 章海波, 骆永明, 黄铭洪, 等. 香港土壤研究 III. 土壤中多环芳烃的含量及其来源初探. 土壤学报, 2005, 42(6): 936-941. Zhang H B, Luo Y M, Wong M H, et al. Hong Kong soil researches III. PAHs contents in soils and their origins (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2005, 42(6): 936-941
- [3] Wang Z, Chen J W, Yang P, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Dalian soils: Distribution and toxicity assessment. Journal of Environmental Monitoring, 2007, 9(2): 199-204
- [4] 岳敏, 谷学新, 邹洪等. 多环芳烃的危害与防治. 首都师范大学学报: 自然科学版, 2003, 24(3): 40-44. Yue M, Gu X X, Zou H, et al. Killer of health: Polycyclic aromatic hydrocarbons (In Chinese). Journal of Capital Normal University: Natural Science Edition, 2003, 24(3): 40-44
- [5] Cajthaml T, Erbanova P, Sasek V, et al. Breakdown products on metabolic pathway of degradation of benzo[a]anthracene by a ligninolytic fungus. Chemosphere, 2006, 64(4): 560-564
- [6] Valentin L, Feijoo G, Moreira M T, et al. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in forest and salt marsh soils by white-rot fungi. International Biodeterioration and Biodegradation, 2006, 58(1): 15-21
- [7] Song X Y, Song Y F, Sun T H, et al. Adaptability of microbial inoculators and their contribution to degradation of mineral oil and PAHs. Journal of Environmental Sciences-China, 2006, 18(2): 310-317
- [8] Salvo V S, Gallizia I, Moreno M, et al. Fungal communities in PAH-impacted sediments of Genoa-Voltri harbour (NW Mediterranean, Italy). Marine Pollution Bulletin, 2005, 50(5): 553-559
- [9] Juhasz A L, Naidu R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: A review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. International Biodeterioration and Biodegradation, 2000, 45(1/2): 57-88
- [10] Pickard M A, Roman R, Tinoco R, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 laccase. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(9): 3 805-3 809
- [11] Baldrian P. Fungal laccases-occurrence and properties. FEMS Microbiology Reviews, 2006, 30(2): 215-242
- [12] Majcherczyk A, Johannes C, Huttermann A. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. Enzyme and Microbial Technology, 1998, 22(5): 335-341
- [13] 王宜磊, 朱陶, 邓振旭. 愈创木酚法快速筛选漆酶产生菌. 生物技术, 2007, 17(2):40-42. Wang Y L, Zhu T, Deng Z X. Using O-methoxyphenol to fast screen laccase produced fungus (In Chinese). Biotechnology, 2007, 17(2): 40-42

- [14] Coll P M, Fernandez-Abalos J M, Villanueva J R, et al. Purification and characterization of a phenoloxidase (laccase) from the lignin-degrading basidiomycete PM1 (CECT 2971). *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(8): 2 607-2 613
- [15] McErlean C, Marchant R, Banat I M. An evaluation of soil colonisation potential of selected fungi and their production of ligninolytic enzymes for use in soil bioremediation applications. *Antonie Van Leeuwenhoek Int J Gen Mol Microbiol*, 2006, 90(2): 147-158
- [16] Thomas B, Miguel A, Volker S, et al. Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(2): 987-995
- [17] 钱薇, 倪进治, 骆永明, 等. 高效液相色谱-荧光检测法测定土壤中的多环芳烃. *色谱*, 2007, 25(2): 221-225. Qian W, Ni J Z, Luo Y M, et al. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by high performance liquid chromatography with fluorescence detection (In Chinese). *Chinese Journal of Chromatography*, 2007, 25(2): 221-225
- [18] Woro T S, Jun O, Hiromi T, et al. Characterization of alkaliphilic laccase activity in the culture supernatant of *Myrothecium verrucaria* 24G-4 in comparison with bilirubin oxidase. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 230: 209-214
- [19] Arora D S, Gill P K. Laccase production by some white rot fungi under different nutritional conditions. *Bioresource Technology*, 2000, 73: 283-285
- [20] Palmieri G, Giardina P, Bianco C, et al. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(3): 920-924
- [21] Lomascolo A, Record E, Herpoel-Gimbert I, et al. Overproduction of laccase by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* using ethanol as inducer. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 94: 618-624
- [22] Dekker R F, Barbosa A M. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, 2001, 28: 81-88
- [23] 韩晓磊, 严莲荷, 周申范. 漆酶分泌及其活性影响因素综述. *化学与生物工程*, 2005, 7: 10-13. Han X L, Yan L H, Zhou S F. The influences on the production and activity of laccase: A review (In Chinese). *Chemistry and Bioengineering*, 2005, 7: 10-13
- [24] Juhasz A L, Naidu R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: A review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2000, 45(1/2): 57-88

## Screening for laccase-producing fungus and its potential in remediation of PAHs-contaminated soil

Pan Cheng<sup>1,2</sup> Mao Ting<sup>1</sup> Wu Yucheng<sup>2</sup> Shen Weishou<sup>1</sup> Zhong Wenhui<sup>1†</sup>

(1 Department of Environmental Science and Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

(2 Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation, Institute of Soil Science, CAS, Nanjing 210008, China)

**Abstract** Fungal laccase can efficiently oxidize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), suggesting the potential of laccase-producing fungi for application to remediation of PAHs-contaminated soil. Based on its feature of being capable of oxidizing guaiacol into something red, a strain of laccase-producing fungus, F-1, was isolated from soil. According the BLAST alignment of near full-length 18S rRNA gene sequence, this strain is closely related to *Myrothecium verrucaria*. Both single factor and Plackett-Burman experiments were performed to assess F-1's laccase-producing capacity. The laccase activity was found to be greatly increased by 2 orders of magnitude in specific culture medium, suggesting the significant effect of environment factors on laccase activity of F-1. Soil microcosms were set up with or without inoculation of F-1, and the PAHs contents were determined after 30-days of incubation. Results show that PhA, FluA, Pyr, BaA, Chr, BbF, BkF, BaP, DbA, BghiP and In[1,2,3-cd]P were degraded to varying extent in fungus inoculated microcosms, confirming the remedial potential of F-1 in PAHs-contaminated soil.

**Key words** Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs); Soil pollution; Fungal remediation; Laccase