

降解三硝基甲苯的酵母和类酵母菌的研究

尹 萍 白逢彦 周培瑾

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 从受三硝基甲苯(TNT)严重污染的土壤和废水中分离筛选到 17 株可降解 TNT 的酵母菌和白地霉。其中 6 株为克鲁斯假丝酵母(*Candida krusei*), 4 株为橡树假丝酵母(*C. quercitrusa*), 一株为无名假丝酵母(*C. famata*), 一株为伯杰汉逊酵母(*Hansenula beijerinckii*), 一株为亚膜汉逊酵母(*H. subpelliculosa*), 4 株为白地霉(*Geotrichum candidum*)。对其中 6 株菌进行了降解 TNT 的条件实验, 发现降解 TNT 的适宜 pH 为 7, 温度为 37~40℃。在含 75~80 mg / L TNT 的培养基中, 40 h 内能降解 TNT 56~74 mg / L, 去除率达 71%~93%。在培养基中加入 0.01%~0.05% 的葡萄糖作碳源, 或加入 0.01%~0.1% 的酵母膏对 6 株菌降解 TNT 的能力略有促进作用。加入铵盐作为氮源则明显抑制这些菌对 TNT 的降解。

关键词 三硝基甲苯(TNT), 降解, 酵母菌, 白地霉

分类号 X172

2, 4, 6-三硝基甲苯(TNT)是广泛应用的炸药, 具有高毒性和致变性, 对水体和土壤环境的污染早已受到重视。关于细菌降解 TNT, 国内外早有研究^[1~4], 并已成功应用于处理含 TNT 的废水^[5]及进行了有关代谢机理的研究^[6~9]。近年来国外报道真菌 *Phanerochaete chrysosporium* 降解 TNT 的研究结果^[10~12]。但关于酵母菌降解 TNT 的研究迄今未见报道。Klausmeier 曾测定 TNT 对土壤微生物的影响^[13], 结果表明 TNT 超过 50 mg / L 即严重地限制酵母菌的生长。由于含 TNT 的酸性废水更难处理, 为了探索生化处理含 TNT 酸性废水的可能性, 我们从受 TNT 严重污染的土壤中分离筛选获得一批降解 TNT 的酵母及白地霉。本文报道菌种分离、筛选、鉴定及部分菌株降解 TNT 的条件试验。

1 材料和方法

1.1 菌种来源

从受 TNT 污染的土壤及工业废水中取样分离。

1.2 培养基

富集培养基成分(W / V): KH_2PO_4 0.1%, Na_2HPO_4 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03%, NaCl 0.05%, 酵母膏 0.05%, TNT 70~80 mg / L, pH 6.0。在筛选及温度、pH 条件试验中加入 0.05% 葡萄糖。分离采用麦芽汁固体培养基中加入 70 mg / L TNT。

1.3 菌体生长

540 nm 波长测定比浊, 以培养后增加的光密度 OD_{540} 表示菌体生长。

1.4 TNT 测定

培养 40 h后,培养液离心去菌体,定量取样,用乙醇和 NaOH 显色,460 nm 比色测定^[4]。

1.5 菌种鉴定

酵母菌按文献 [14] 所叙述的方法进行鉴定,白地霉鉴定参考文献 [15]。

2 结果和讨论

2.1 菌种分离、筛选和鉴定

将样品接种于含 70~80mg / L TNT的液体培养基中富集培养两次,分离出酵母和白地霉 51 株。经用含 70~80mg / L TNT的培养液多次筛选获得 TNT 去除率 70% 以上的酵母菌和白地霉 17 株。经鉴定,6 株为克鲁斯假丝酵母 (*Candida krusei*), 4 株为橡树假丝酵母 (*C. quercitrusa*), 1 株为无名假丝酵母 (*C. famata*), 1 株为伯杰汉逊酵母 (*Hansenula, beijerneckii*), 1 株为亚膜汉逊酵母 (*H. subpelliculosa*), 4 株为白地霉 (*Geotrichum candidum*)。结果见表 1。

表1 降解TNT的酵母及类酵母菌筛选结果

Table 1 The strains of yeasts and yeast-like fungi degrading TNT

菌种名 Species	菌株号 Strain No.	超始TNT浓度 Original TNT concentration (mg/ L)	剩余TNT浓度 TNT concentratin after cultivation (mg/ L)	TNT降解量 Amount of TNT degraded (mg/ L)	去除率 Percentage of TNT degraded (%)
克鲁斯假丝酵母 <i>Candida krusei</i>	m2-4	78.77	9.18	69.59	88.34
	m3-2	78.77	11.95	66.82	84.82
	m3-16	78.77	9.34	69.43	88.14
	m3-17	78.77	7.79	70.98	90.11
	m4-11	78.77	7.54	71.23	90.43
	m4-12	75.22	9.89	65.33	86.85
橡树假丝酵母 <i>Candida quereitrusa</i>	rtB1	75.22	15.01	60.21	80.04
	rtB2	75.22	15.44	69.78	79.47
	rt127	78.71	14.21	64.5	81.94
	r70	74.00	17.50	56.5	76.35
无名假丝酵母 <i>Candida famata</i>	r305	78.71	21.93	56.78	72.13
伯杰汉逊酵母 <i>Hansenula berjeriuckii</i>	rt124	78.71	14.33	64.38	81.79
亚膜汉逊酵母 <i>Hansenula subpelliculosa</i>	r303	76.35	19.22	57.13	71.24
白地霉 <i>Geotrichum Candidum</i>	rtA2	76.60	8.50	68.10	88.90
	r278	76.60	13.30	63.30	82.63
	r297	80.33	6.16	74.17	92.33
	r391	80.33	5.50	74.83	93.15

2.2 酵母菌和白地霉降解 TNT 的适宜条件

选择了 6 株菌包括假丝酵母 m2-4、m3-16、rt127、r70, 汉逊酵母 rt124 和白地霉 r297 进

行试验。

2.2.1 pH的影响:从图1看出6株酵母菌在 pH3.0 的酸性条件下都能降解 TNT, 培养液含 80 mg / L TNT 时去除率在 66%~83% 之间。降解 TNT 的最适值都为 pH7.0, 高于 pH8.0 则呈下降趋势。

2.2.2 温度的影响:从图2可看出, m2-4、r70 降解 TNT 的最适温度为 37℃, rt124 和 rt127 在 37~40℃ 之间, m3-16 则随温度升高, 去除 TNT 的效果提高, 最高达 50℃。rt124 对温度最敏感, 在 15℃ 及 50℃ 时对 TNT 的去除率下降到 26%。

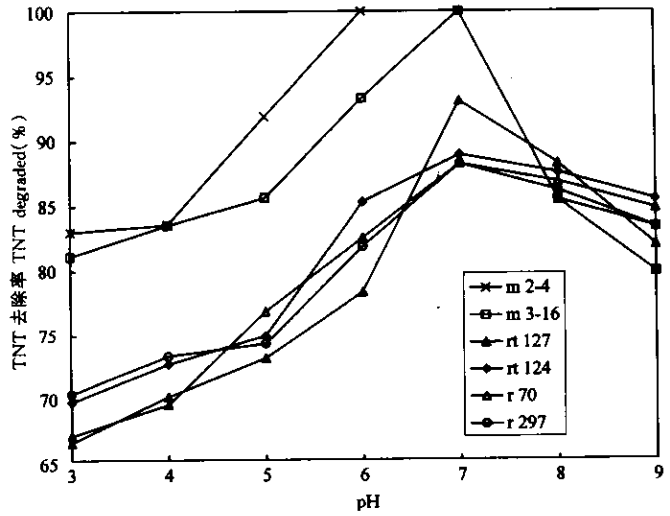


图1 pH值对6株菌降解TNT的影响
Fig. 1 The effects of pH on TNT degradation by the six yeast and yeast-like strains

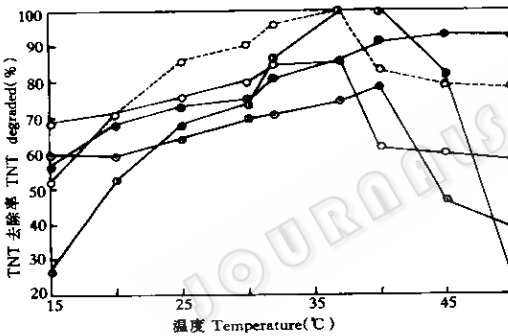


图2 温度对五株酵母菌降解 TNT 的影响
Fig.2 The effects of temperature on TNT degradation by the five yeast strains

—○— m2-4; —●— m3-16; —○— rt127;
—●— rt124; ---○--- r70.

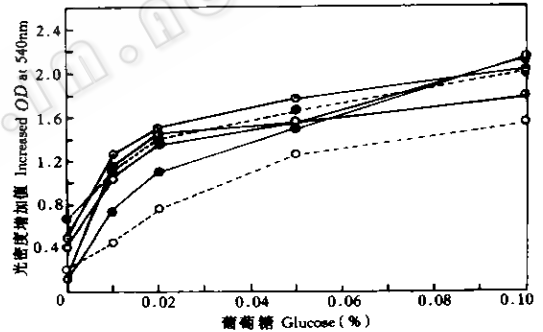


图3 葡萄糖对6株酵母和类酵母菌生长的影响
Fig.3 The effects of glucose on the growth of the six yeast and yeast-like strains

—○— m2-4; —●— m3-16; —○— rt127; —●— rt124;
---○--- r70; ---●--- r297.

2.2.3 碳源的影响:在培养基中加入不同浓度的葡萄糖, 测定其对6菌株的生长与降解 TNT 的影响(图3, 图4)。不加碳源, 这些菌也能生长并降解 TNT, 随着葡萄糖浓度的增加, 明显促进菌体生长。不加碳源时该6菌株也能去除培养基中 80mg/ L 的 TNT 达 73%~87%, 加入 0.01%~0.02% 的葡萄糖对6菌株去除 TNT 的能力都有促进作用, 但葡萄糖浓度增加至 0.1% 时, 除菌株 r70 外其它5株菌对 TNT 的去除率则呈下降趋势。

2.2.4 酵母膏对6株菌降解 TNT 的影响:培养基中分别加入不同浓度的酵母膏, 使6株菌对 TNT 的去除率都略有提高。但当酵母膏浓度达到 0.1% 时, 菌株 m2-4 和 r297 对 TNT 的

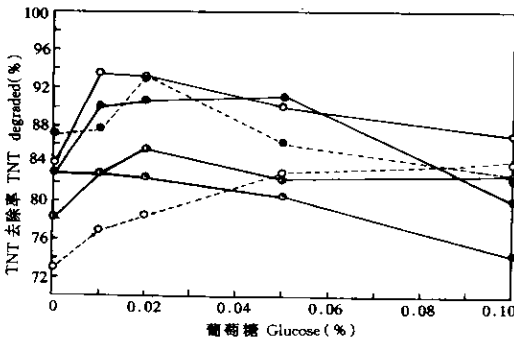


图4 葡萄糖对6株酵母和类酵母菌降解 TNT 的影响

Fig.4 The effects of glucose on TNT degradation by the 6 yeast and yeast-like strains

—○— m2-4; —●— m3-16; —○— rt127; —●— rt124;
---○--- r70; ---●--- r297.

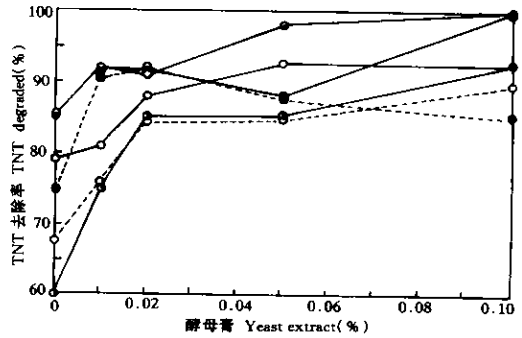


图5 酵母膏对6株菌降解 TNT 的影响

Fig.5 The effects of yeast extract on TNT degradation by the six yeast and yeast-like strains

—○— m2-4; —●— m3-16; —○— rt127; —●— rt124;
---○--- r70; ---●--- r297.

去除率有下降趋势。其余4株菌随酵母膏浓度增加,对TNT的去除率提高(图5)。

2.2.5 含氮物质对6株菌降解 TNT 的影响: 选择 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4Cl 和尿素3种常用的微生物氮源,以0.05%的浓度分别加入培养基中,与不加入氮源的对照试验比较其对TNT的去除效果,结果见表2。

表2 含氮化合物对6株酵母和类酵母菌降解TNT的影响

Table 2 The effects of nitrogenous compounds on TNT degradation by the 6 yeast and yeast-like strains

菌株号 Strain No.	TNT去除率(%) Percentage of TNT degraded*			
	TNT为唯一氮源 TNT as the only nitrogen source	加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Addition of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ **	加入 NH_4Cl Addition of NH_4Cl **	加入尿素 Addition of urea**
m2-4	84.37	31.25	70.63	81.87
m3-16	83.13	32.50	66.25	91.87
rt127	85.00	22.50	68.13	81.62
rt124	83.13	21.87	68.75	83.75
r70	80.00	20.00	63.75	78.75
r297	80.00	15.00	70.63	77.50

* The original TNT concentration was 80mg/L. ** The concentration was 0.05%.

酵母菌和白地霉降解 TNT 的研究尚属首次报道,这些菌在偏酸性(pH3)条件下仍可降解 TNT,因此有可能被用来处理含 TNT 的酸性废水。略加碳源(0.02%)及酵母膏对这类酵母和类酵母菌降解 TNT 的能力略有促进作用,铵盐则明显抑制其对 TNT 的降解。故应用该类菌处理含 TNT 的废水时可略加碳源,不必外加氮源。

致谢 本文承杨彦希先生协助,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Traxler R W, Wood E, Delaney J M. *Dev Ind Microbiol*, 1974, 16:71~76.
- [2] Won W D. *Appl Microbiol*, 1974, 27:513~516.
- [3] McCormick N G. *Appl Environ Microbiol*, 1976, 31:949~958.
- [4] 杨彦希, 尹 萍, 李文忠等. 微生物学报, 1979, 19:408~415.
- [5] TNT 污水生化处理实验组. 环境科学学报, 1981, 1:258~264.
- [6] 李文忠, 尹 萍, 杨彦希. 微生物学报, 1987, 27:257~263.
- [7] Boopathy R, Kulpa C F, Wilson M. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1993, 39:270~275.
- [8] Boopathy R, Manning, J, Montemagno C et al. *Curr Microbiol*, 1994, 28:131~137.
- [9] Vanderberg L A, Perry J J, Unkefer P J. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995, 43:937~945.
- [10] Fernado T, Bumpus J A, Aust S D. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56:1666~1671.
- [11] Walker J E, Kaplan D L. *Biodegradation*, 1992, 3:369~385.
- [12] Stahi D J, Aust S D. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 192:477~482.
- [13] Klausmeier R E, Osmon J L, Walls D R. *Dev Ind Microbiol*, 1973, 15:309.
- [14] Van der Walt J P, Yarrow D. Methods for Isolation, Maintenance, Classification and Identification of yeasts. In: Kreger-van Rij N J W ed. The Yeasts, a Taxonomic Study, 3rd ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V., 1984, 45~104.
- [15] 方心芳, 严自正, 乐静珠. 微生物学报, 1966, 12:64~73.

STUDIES ON THE YEASTS AND YEAST-LIKE FUNGI
DEGRADING TRINITROTOLUENE

Yin Ping Bai Fengyan Zhou Peijin

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract Seventeen strains of yeasts and yeast-like fungi were isolated from soil and waste water samples polluted by trinitrotoluene (TNT). These strains can degrade 71%~93% TNT when growing in the medium originally containing 70~80mg/L TNT within 40 h. They were identified. Among them, six strains are *Candida krusei*, four are *C. quercitrusa*, one is *C. famata*, one is *Hansenula beijerinckii*, one is *H. subpelliculosa*, and four are *Geotrichum candidum*. Six strains were selected for further studies on the conditions effecting TNT degradation by them. The optimum pH and temperature are pH 7 and 37~40°C, respectively. TNT Degradation ability of the strains can be promoted by adding 0.01%~0.05% glucose or 0.01%~0.1% yeast extract into the medium. Addition of 0.05% (NH₄)₂SO₄ or NH₄Cl to the medium can evidently inhibit the degradation of TNT by the strains.

Key words Trinitrotoluene (TNT), Degradation, Yeasts, *Geotrichum candidum*