

转化三硝基甲苯 (α -TNT) 的细菌及其应用

杨彦希 尹 萍 李文忠 周培瑾

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从长期被 TNT 粉尘及废水污染的土壤及生活污水中, 分离筛选出 93 株好氧、厌氧及兼性好氧细菌。它们能将浓度为 100—130 毫克/升的 TNT 90% 以上转化。其中部分菌株能利用 TNT 作为生长的唯一碳源和氮源。我们对 47 株好氧及兼性好氧细菌进行了鉴定, 分别属于柠檬杆菌属 (*Citrobacter*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、克氏杆菌属 (*Klebsiella*)、埃希氏杆菌属 (*Escherichia*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*)。各属选一代表菌株进行培养试验, 考察它们转化 TNT 的生理条件及转化 TNT 的速度。从其中选出 10 株菌应用于 TNT 废水生化处理小型试验, 取得较好效果。出水的 TNT、BOD、COD 等项指标均低于国家的排放标准。

TNT 是一种普遍使用的炸药其毒性已有报道^[1,2]。当浓度大于 2 毫克/升时即对某些鱼类有毒害^[3,4]。早在四十年代国外已开始探索装药及制药厂 TNT 废水生化处理的可能性, 研究结果表明 TNT 在自然界中难以生物降解和自净^[5,6]。以后由于分离、筛选出能转化和降解 TNT 的微生物, 使该项研究取得进展。Osmon, J. L. 等^[3] 和 Won, W. D. 等^[2] 分别报道了, 假单胞菌属在含葡萄糖和酵母膏的丰富营养培养基中能转化 TNT; Traxler, R. W.^[7] 分离到一株能利用 TNT 作为唯一碳、氮源的似假单胞菌属的菌。McCormick, N. G. 等^[8] 报道 *Veillonella alkalalesceus* 的无细胞萃提物能还原 TNT 及其它硝基芳香族化合物。但目前尚未见到这些菌株应用于 TNT 废水生化处理的报道。

本文报道转化 TNT 的各种微生物的分离、筛选, 比较其生长及转化 TNT 所需要的生理条件, 选择转化 TNT 效率高而又适应性广的微生物应用于装药厂 TNT 废水的生化处理。

材料与方 法

(一) 样品来源

从长期被 TNT 粉尘及废水污染的土壤及生活污水中取 58 个样品。

(二) 培养基

1. 好氧细菌富集分离、筛选所用的合成培养基: 配方如表 1 所示。

表 1 好氧细菌富集、分离、筛选用的合成培养基

成 份	富集、分离培养基	筛选培养基
$K_2H_2PO_4$	1.0 克	1.0 克
Na_2HPO_4	0.5 克	0.5 克
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5 克	0.5 克
NaCl	0.25 克	0.25 克
酵母膏	5.0 克	0.2—2.0 克
葡萄糖	5.0 克	0.2—2.0 克
TNT	75 毫克	100—150 毫克
pH	7.0—7.2	7.0—7.2
蒸馏水	1000 毫升	1000 毫升

分离时除用合成固体培养基外, 还用牛肉汁蛋白胨琼脂、麦芽汁琼脂、葡萄糖蛋白胨琼脂等三

本文于 1978 年 11 月 8 日收到。

种固体培养基。

2. 厌氧细菌富集、分离、筛选所用的培养基如表 2 所示。

表 2 厌氧细菌富集、分离、筛选培养基配方

成份	A	B
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 克	0.5 克
Na ₂ HPO ₄	0.35 克	0.35 克
KH ₂ PO ₄	0.28 克	0.28 克
FeSO ₄	0.05 克	0.05 克
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.05 克	0.05 克
NH ₄ Cl	1.0 克	
葡萄糖	10.0 克	10 克
TNT	130 毫克	130 毫克
pH	7.0—7.2	7.0—7.2
蒸馏水	1000 毫升	1000 毫升

3. 生理条件试验所用的培养基: 采用好氧菌筛选培养基, 但将酵母膏和葡萄糖浓度均降为 0.02%。在不同碳源实验中加入的碳源物质浓度为 0.2%。在不同氮源实验中加入的氮源物质浓度为 0.1%, 不加碳源。在不同酵母膏浓度实验中, 不加碳、氮源。

(三) 培养条件

好氧菌于 28℃, 摇床培养 20—24 小时; 厌氧菌于 28℃ 静止培养三天。

(四) 分析方法

1. 菌量增长的测定: 取培养前、后菌液于 72 型分光光度计上用 540 毫微米波长进行比浊, 然后换算成细胞干重。

2. TNT 测定法: 将菌培养液用混凝沉淀法除去菌体后, 定量取样, 再用无水乙醇和 NaOH 显色 10 分钟左右, 于 72 型分光光度计上 450 毫微米波长进行比色测定。

结 果

(一) 菌种的分离、筛选和鉴定

样品于含 TNT 的合成培养基中, 在有氧及厌氧条件下富集二次, 共分离出好氧

及厌氧菌 500 株以上。经重复筛选获得转化 TNT 达 90% 以上的好氧、兼性好氧及厌氧菌 93 株。对其中 47 株菌按 Bergey 细菌鉴定手册第八版及 N. 冈查洛夫 (1973) 异养菌鉴定检索方法鉴定, 47 株细菌属于六个属。

对鉴定过的 47 株细菌进一步测定其利用 TNT 作生长唯一碳、氮源的能力。发现除假单胞菌属的菌株外, 其它五个属的大部分菌株在含 0.02% 酵母膏的上述无机盐合成培养基中, 不加入其它碳、氮源, 也可以生长良好并转化 TNT, 但转化率略低, 其结果见表 3、图 1。

表 3 以 TNT 为唯一碳、氮源菌量增长情况

属 名	株 数	细胞干重增加 (毫克/升)
柠檬杆菌属	3	85—161
肠杆菌属	6	233—290
克氏杆菌属	4	122—178
埃希氏大肠杆菌属	25	166—310
假单胞菌属	8	0—37
芽孢杆菌属	1	261

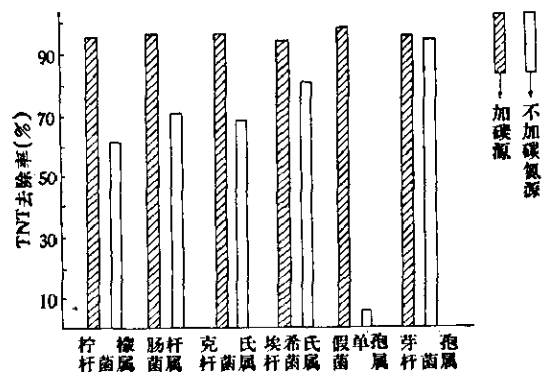


图 1 47 株细菌转化 TNT 的效率

(二) 六个属的代表菌株的生长及转化 TNT 生理条件的研究

1. pH 六株菌对 pH 的适应能力都较广泛, 在 pH 5—9 范围内都能生长并转化 TNT, 生长的最适 pH 在 7—8 之间, 不同属的菌略有差异。转化 TNT 在中性和偏

碱性条件比在偏酸性条件好, 结果见图 2 和图 3。

2. 不同碳、氮源的利用及对转化 TNT 的影响: 通过测定转化 TNT 的情况和菌量增长情况来比较菌的特性。结果见表 4、表 5。

由表 4、表 5 可以看出, 六个属的菌株生长及转化 TNT 所要求的营养条件不同。以芽孢杆菌属的适应性最广, 在不加其它

碳、氮源的 TNT 培养基中生长良好, 转化 TNT 的效率达 90% 以上。大多数情况下, 加入不同碳源或氮源以后, 都可提高转化 TNT 的效率。

假单胞菌属对营养条件要求严格, 适应性最差。在低浓度酵母膏的培养基中, 加入任何一种碳源都生长不好, 转化 TNT 的效率亦低, 只有在含玉米浆的培养基中转化 TNT 的效率可达 100%, 说明假单胞

表 4 六种菌在不同碳源培养基中的生长情况及转化 TNT 的效率

碳源		柠檬酸	丙酮酸	乙酸	甲酸	葡萄糖	蔗糖	乳糖	木糖	松三糖	淀粉	乙醇	石蜡	对照*
增长细胞干重 (毫克/升)	柠檬杆菌属	452	400	330	244	161	339	251	291	216	438	—	79	185
	肠杆菌属	387	350	268	161	256	351	206	325	185	270	254	72	190
	埃希氏杆菌属	218	243	189	155	58	212	170	155	104	202	98	0	140
	克氏杆菌属	211	463	182	184	151	159	301	268	256	480	332	59	118
	芽孢杆菌属	256	391	418	212	209	229	353	389	216	353	219	108	261
	假单胞菌属	80	109	150	29	138	95	40	29	38	70	38	50	48
	TNT 去除率(%)	柠檬杆菌属	74.6	95.5	96.2	59.0	92.2	70.9	61.1	94.7	76.2	82.4	—	88.1
肠杆菌属	96	94.3	85.6	63.2	83.9	81.0	72.4	85.1	70.1	89.1	93.1	62.1	62.1	
埃希氏杆菌属	94	91.7	94	83.9	86.9	91.7	100	86.9	91.7	96.4	83.9	84.4	60.9	
克氏杆菌属	69.5	100	40.8	51.5	87	92.2	83	98	62.8	97.9	83.6	30	38	
芽孢杆菌属	100	100	100	100	—	100	92.9	86.7	100	97.2	100	97	94.5	
假单胞菌属	38.6	42.3	24.3	6.7	21.7	14.3	14.3	9.5	41.8	14.3	4.8	9.5	39.2	

* 对照: 以 TNT 为碳源, 不加其它碳源。

表 5 六种菌在不同氮源培养基中的生长情况及转化 TNT 的效率

氮源		硝酸铵	氯化铵	硫酸铵	尿素	玉米浆	对照*
增长细胞干重 (毫克/升)	柠檬杆菌属	234	238	242	222	318	228
	肠杆菌属	184	170	159	208	309	153
	埃希氏杆菌属	78	141	144	163	246	149
	克氏杆菌属	402	381	379	650	—	312
	芽孢杆菌属	238	235	258	198	319	238
	假单胞菌属	151	168	139	139	254	108
	TNT 去除率(%)	柠檬杆菌属	94.1	94	94.1	95.4	95.4
肠杆菌属	85.2	92.8	93.3	86.9	95	85.3	
埃希氏杆菌属	100	100	100	100	100	89	
克氏杆菌属	90.2	93.8	90.2	92.2	—	91.4	
芽孢杆菌属	100	96	100	100	100	92	
假单胞菌属	85	79.5	71.0	74	100	78.8	

* 对照: 以 TNT 为氮源, 不加其它氮源。

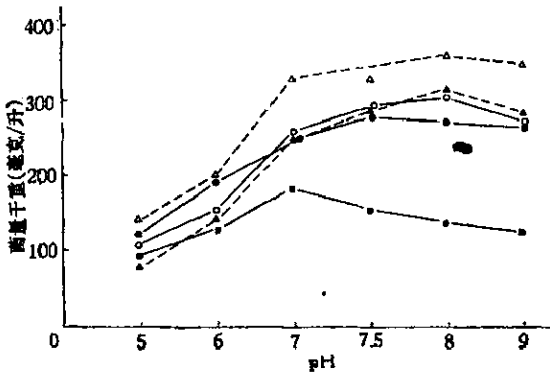


图2 不同 pH 对菌生长的影响

- △——△ 芽孢杆菌属
- ▲——▲ 埃希氏杆菌属
- 肠杆菌属
- 假单胞菌属
- 柠檬杆菌属

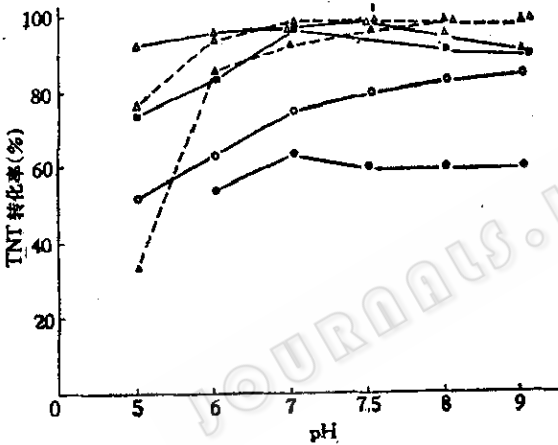


图3 不同 pH 对菌转化 TNT 的影响

- △——△ 克氏杆菌属其余同图2

菌属在转化 TNT 的过程中碳源不起主要作用,而是需要丰富的生长因子。

肠杆菌科四个属的菌也能利用 TNT 作为碳、氮源,但转化 TNT 的效率差异较大,从 38—95.9%。在碳源中柠檬酸、丙酮酸、淀粉、蔗糖、乳糖、木糖等对菌的生长均有利;石蜡最难被利用,且有抑制作用。十二种碳源中丙酮酸对五种菌(假单胞菌属以外)转化 TNT 普遍适宜,其它碳源则因菌而异,很难找出一致的规律。

菌量的增长与转化 TNT 效率之间的关系,大致是菌生长的好,则转化 TNT 的

效率也高,但两者之间并没有一定的直线关系,在生长最好的碳源中,转化 TNT 的效率不一定最高,相反地,有的菌如芽孢杆菌和柠檬杆菌在含石蜡的培养基中生长不好,但转化 TNT 的效率仍然很高。

3. 对生长因素的要求: Won, W. D. 等人的报道^[2,3] 及我们的工作都发现细菌转化 TNT 要求酵母膏。从图 4、图 5 看出,

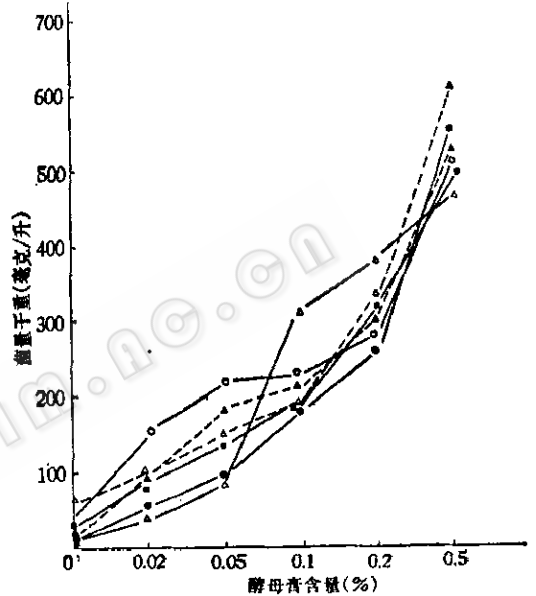


图4 六株菌在不同浓度酵母膏培养基中的生长情况 图例同图3

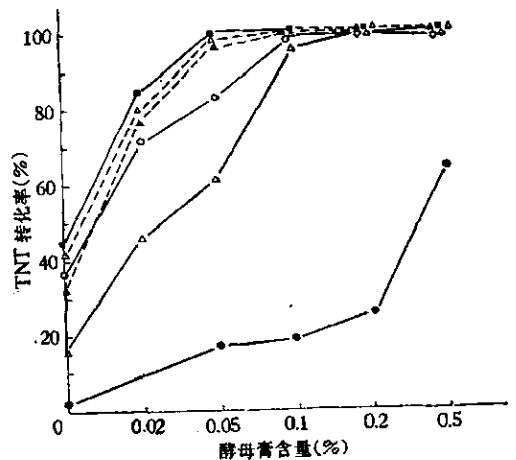


图5 六株菌在不同浓度酵母膏培养基中转化 TNT 的能力 图例同图3

随着酵母膏浓度的增加而加速菌的生长并提高转化 TNT 的效率,但不同菌转化 TNT 所需酵母膏的最低浓度不同,柠檬杆菌,芽孢杆菌、埃希氏杆菌和肠杆菌只需 0.02%, 转化 TNT 可达 70% 以上; 而假单胞菌则需要 0.5% 才能明显提高 TNT 的转化率。

4. TNT 浓度与菌株转化 TNT 的关系

Won, W. D. 等人报道^[2,3] 微生物转化 TNT 的浓度均在 100 毫克/升左右, 我们测定了从 50 毫克/升至 150 毫克/升浓度范围的 TNT 对五株菌(除假单胞菌外)转化 TNT 的影响。

表 6 不同浓度 TNT 对五株菌转化 TNT 能力的影响

转化率 菌名	不同浓度 TNT 转化率(%)				
	50 毫克/升	72 毫克/升	137 毫克/升	142 毫克/升	147 毫克/升
芽孢杆菌	100	100	98.72	100	100
柠檬杆菌	85.2	94.8	100	100	97.6
肠杆菌	100	100	98.4	100	100
克氏杆菌	90.6	93.3	97.6	99.7	95.9
埃希氏杆菌	85.7	100	100	98.2	100

结果表明: 在 50—150 毫克/升 TNT 浓度范围内, 菌株对 TNT 的转化率没有明显的影响, 均在 90% 以上。

综上所述, 可以看出除假单胞菌属外其它五个属的菌转化 TNT 的效率都较稳定, 对营养条件要求不高, 适应范围也较广。

(三) 六株菌转化 TNT 的速度

在含 100 毫克/升 TNT 的普通牛肉汁培养基中富集菌体, 用 10,000 转/分, 离心 20 分钟收集细胞, 活细胞用 pH 7.0 磷酸缓冲液洗涤两次, 再接种于 100 毫克/升 TNT 的 pH 7.0 磷酸缓冲液或培养基中, 接种量为 0.5%, 28℃ 摇床振荡培养, 在不同时间测定 TNT 的转化效率和速度。结果如图

6 所示。

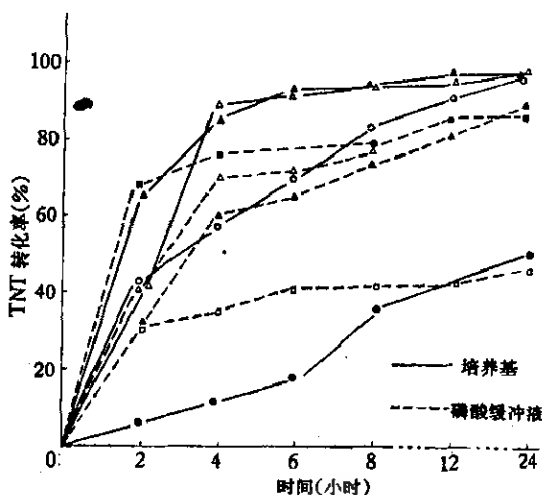


图 6 六株菌在培养基中和磷酸缓冲液中转化 TNT 的速度

▲—▲ 柠檬杆菌属 △—△ 克氏杆菌属
●—● 假单胞菌属 ○—○ 芽孢杆菌属
■—■ 埃希氏菌属 □—□ 肠杆菌属
—— 在培养基中 - - - 在磷酸缓冲液中

从图 6 可以看出, 柠檬杆菌属, 克氏杆菌属, 肠杆菌属转化 TNT 最快, 在磷酸缓冲液中 4 小时达 60% 以上, 8 小时达 75%; 在培养基中, 6 小时可达 90% 以上。

芽孢杆菌在培养基中转化 TNT 较快, 8 小时达 85%, 但在磷酸缓冲液中由于液体变红, 无法测定。

埃希氏肠杆菌属在磷酸缓冲液中随时间延长而变红, 影响数值测定, 效果偏低。

假单胞菌转化 TNT 最慢, 在培养基中 24 小时转化 TNT 只有 50%, 而在磷酸缓冲液中则完全不能转化。

转化 TNT 的有效菌在处理 TNT 装药厂废水试验中的应用

(一) 试验菌株

利用上述五个属(除去克氏杆菌属)的 10 株菌。

(二) 生化处理试验的构筑物

选用两个容量相等的接触生物氧化滤池, 池中填料体积各约 14 立升, 滤料为粒度直径约 3 厘米的焦炭。两个滤池同时运转, 除投加的少量营养物质有不同外, 其它运转条件及接种情况完全一致。

(三) 方法与结果

A 池: 标准营养成份(%) : 0.02 葡萄糖, 0.01 酵母膏; 0.0017 磷。

B 池: 代用营养成份: 2% 粮食加工作坊污水。

人工配制 TNT 工业废水的 TNT 浓度为 50 毫克/升。

用纯菌种经扩大培养后, 在滤料上接种挂膜, 24 小时后, 即向构筑物投配 TNT 废水, 控制流量。水力负荷为 90—100

米³/米³滤料·天, TNT 负荷为 330 克/米³滤料·天, COD 负荷为 3.8 公斤/米³滤料·天。A、B 滤池处理结果如图 7、8、9:

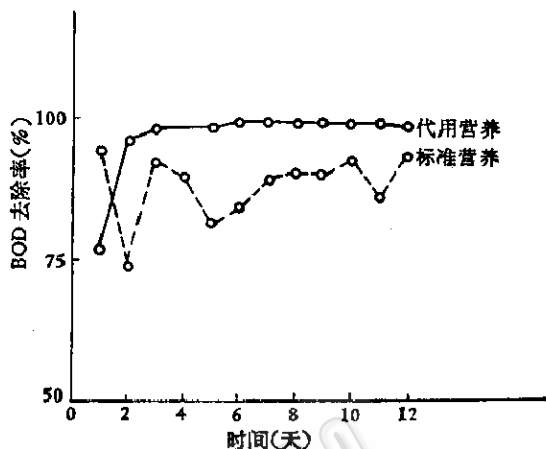


图 9 两种营养物质对 BOD 去除率的影响

经生化处理后的出水:

A 池: TNT 1.2 毫克/升 COD 80 毫克/升 BOD 19 毫克/升。

B 池: TNT 0.3—0.5 毫克/升 COD 60 毫克/升 BOD 8 毫克/升。

试验结果表明, 投加少量粮食作坊废水为代用营养的 B 池, 比用标准营养的 A 池处理效果好。生化出水所有毒物指标均低于国家规定的排放标准, 而且处理工艺简单, 管理方便, 成本较低, 有推广使用的价值。

讨 论

关于转化 TNT 的微生物, 已报道的细菌有假单胞菌、费氏球菌等属的菌。我们分离和筛选得到的肠杆菌科中四个属几十株菌和芽孢杆菌亦有转化 TNT 的能力, 而且转化率比假单胞菌稳定。Klausmeier, R. E. 等^[1]报道 TNT 在浓度大于 50 毫克/升时, 严重地限制大多数真菌、酵母、放线菌和革兰氏阳性菌的生长, 而大多数革兰氏阴性菌在 100 毫克/升 TNT 浓度时仍能

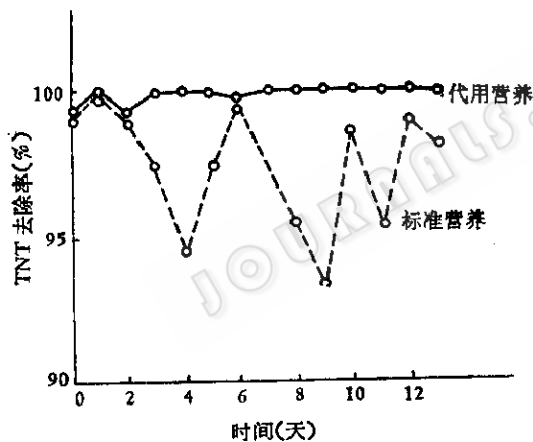


图 7 两种营养条件对 TNT 转化率的影响

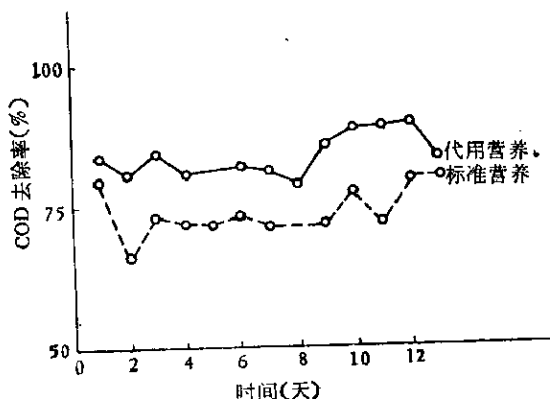


图 8 两种营养条件对 COD 去除率的影响

生长。本文报道的 47 株细菌均为革兰氏阴性杆菌，与以往报道的一致。但试验的 TNT 浓度已超过 100 毫克/升。1977 年 Frederick, W. Parrish^[10] 报道了 98 个属的 190 株真菌在含 100 毫克/升的 0.5% 葡萄糖培养基中转化 TNT。我们在试验中也筛选到有酵母和霉菌，在含 0.02% 葡萄糖中，转化 100 毫克/升 TNT 达 70% 以上。

在已报道的文章中，大多数认为细菌转化 TNT 需要丰富的有机营养。而在我们试验中发现，除假单胞菌以外，五个属的大部分菌株在含少量酵母膏作生长因子的无机盐培养基中(有的菌在磷酸缓冲液中)即可转化 TNT，并且效果都较稳定。现场生化处理 TNT 废水试验中采用粮食加工作坊排出水为代用营养，处理 TNT 效果很好，这就为选用高效菌株应用于生化处理 TNT 废水提供了有利条件。

关于本试验用细菌转化 TNT 的方式和中间代谢产物等问题，尚待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Bridge, J. E. et al.: *Proc. R. Soc. Med.*, **35**: 553—560, 1942.
 [2] Won, W. D. et al.: *Appl. Microbiol.*, **27**: 513—516, 1974.
 [3] Osmon, J. L. and R. E. Klausmeier: *Dev. Ind. Microbiol.*, **14**: 247—252, 1972.
 [4] Nay, M. W. Jr.: *J. Water Pollut. Control Fed.*, **46**: 485—497, 1974.
 [5] Stuart schott, C. C., Ruehhoft and Stephen Megregian: *Ind. Eng. Chem.*, **35**: 1122—1127, 1943.
 [6] Ruehhoft, C. C.: *Ind. Eng. Chem.*, **37**: 937—943, 1945.
 [7] Traxler, R. W.: *Dev. Ind. Microbiol.*, **16**: 71—76, 1974.
 [8] McCormick, N. G.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**: 949—958, 1976.
 [9] Klausmeier, R. E.: *Dev. Ind. Microbiol.*, **15**: 309—317, 1974.
 [10] Frederick, W. P.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**: 232—233, 1977.

1979年19卷3期补遗(正文见第265—279页)

赵继鼎等：中国灵芝亚科的分类研究

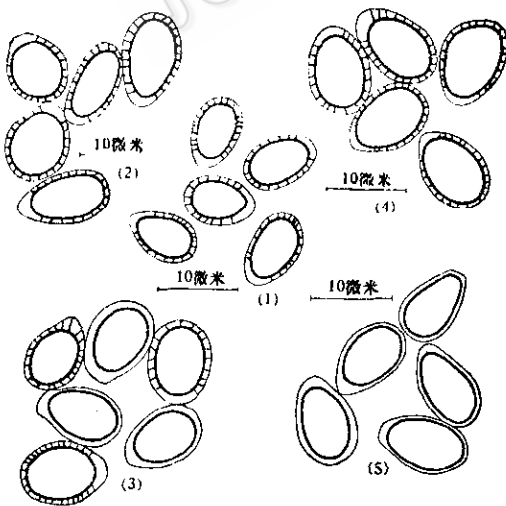


图 1 (1)大圆灵芝孢子 (2)黑灵芝孢子
(3)海南灵芝孢子 (4)喜热灵芝孢子
(5)密纹薄芝孢子

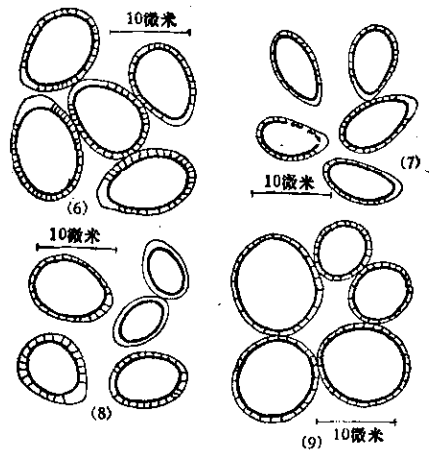


图 2 (6)紫芝孢子 (7)闽南灵芝孢子
(8)黄边灵芝孢子 (9)福建假芝孢子

THE BACTERIA TRANSFORMING 2,4,6-TRINITROLUENE (α -TNT) AND THEIR APPLICATION

Yang Yan-xi Yin Ping Li Wen-zhong Zhou Pei-jin

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Ninety three strains of bacteria were isolated from soil long polluted by TNT powder and from domestic sewage. Three strains can transform TNT more than 90% in the medium containing 100—130 mg/l TNT within 6—24 hours. Many of them can utilize TNT as sole source of carbon and nitrogen for growth. Some even transform TNT in phosphate buffer. Among them 47 strains were identified according to morphology, cultural characteristics and physiological properties. They belong to *Citrobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia* and *Pseudomonas*. One strain from each

of these genera was selected for studying the physiological conditions and the velocity of transforming TNT. The adequate pH for transforming TNT is pH 7—8. Increasing the concentration of TNT to 150 mg/l has no inhibitory effect on the transforming efficiency of bacteria. Ten strains were selected for small scale test in biochemical treatment of wastewater containing TNT. Promising results were obtained. The main indices such as TNT, BOD and COD are satisfied according to the national discharging standards.