

三株棒状杆菌降解环三次甲基三硝胺 (RDX) 的研究

杨彦希 王 兴 尹萍 李文忠 周培瑾

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从长期受 RDX 污染的土壤中分离到三株棒状杆菌, 在含 0.1% 的适宜有机碳源的培养基中, 1—3 天内能使 40—60mg/l 的 RDX 降解 90% 以上。该细菌降解 RDX 的最适 pH 和温度分别为 6.0—7.5 和 30°C。当培养基中加入氨态氮源时, 它们对 RDX 的降解作用受到抑制。

环三次甲基三硝胺又名黑索金, 简称 RDX, 是一种比 α -TNT 更为猛烈的炸药。对于 RDX 的毒性问题国内外均有研究^[1,2]。国外对于微生物降解 RDX 的问题进行过多年的研究未获得满意的结果^[3,4], 认为 RDX 抗微生物降解。Soli^[4]利用紫色光合细菌在含有机碳源、氮源的培养基中, 在严格厌氧和连续光照的条件下培养五天, 可使其中 20mg/l 的 RDX 消失。关于含 RDX 的废水处理, 目前国内外大多采用活性炭吸附、紫外、臭氧分解等物理、化学方法, 这些方法有成本高, 活性炭再生困难等缺点。用生化法处理 RDX 工业废水至今未见报道。

我们从长期受 RDX 污染的土壤中分离到三株棒状杆菌, 在含有机碳源的培养基中 1—3 天内能去除 40—60mg/l 的 RDX 达 90% 以上, 超过紫外光合细菌的效率。本文报道菌种的分离、培养和降解 RDX 的最适条件。

料料和方法

(一) 样品来源

取长期受 RDX 污染的土样 35 份。

(二) 培养基

富集、筛选和生理条件试验所用合成培养基如表 1 所示。

分离时采用牛肉汁蛋白胨琼脂、麦芽汁琼脂、葡萄糖蛋白胨琼脂、察氏琼脂等四种固体培养基。

(三) 培养条件

液体培养采用 250ml 三角瓶, 内装 50ml 液体培养基, 用培养 48 小时的斜面种菌接种后于 28°—30°C 摇床振荡培养。

(四) 分析方法

1. 菌量测定: 用 721 型分光光度计在 460nm 波长处测定菌液吸光度, 然后换算成细胞干重计算细胞增长量 (mg/l 干重)。

2. RDX 分析: 将培养液用 Al(OH)₃ 混悬沉淀过滤除去菌体后, 定量取样。加入 5% 的尿素 1ml 于 95°C 水浴中加热 5 分钟, 然后加入 10% 的 NaOH 1ml 于 95°C 水浴中水解 30 分钟, 冷却后用对氨基苯磺酸及 N-萘基-乙二胺盐酸盐显色, 于 721 型分光光度计 540nm 波长处比色测定。或取样 1ml, 加入浓硫酸 6ml 和 10% 的变色酸 0.5ml 于沸水浴中水解并显色 30 分钟, 于 721 型分光光度计 580nm 波长处比色测定, 按标准曲线求得 RDX 浓度, 计算去除率。

本文于 1981 年 7 月 1 日收到。

表 1 富集、筛选及生理条件试验培养基成份

Table 1 Composition of media for enrichment, screening and physiological experiments

成份 Compositions	富集培养基(%) Medium for enrichment	筛选培养基(%) Medium for screening	生理条件试验培养基(%) Medium for physiological experiments
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05	0.05	0.05
KH ₂ PO ₄	0.10	0.04	0.04
Na ₂ HPO ₄	0.05	0.06	0.03
NaCl	0.025	0.025	—
葡萄糖 Glucose	0.5	0.1—0.2	0.1
酵母膏 Yeast extract	0.02	0.02	—
RDX	60mg/l	40mg/l	40—60mg/l
pH	5.5; 7.0	5.5; 7.0	7.0

结 果

(一) 菌种的分离与筛选

将采集的样品用前述合成培养基富集两次,用四种固体培养基平皿划线分离,挑出单菌落 500 余株(包括细菌、放线菌、酵母、霉菌)经反复筛选,获得三株降解 RDX 效率较高的细菌,菌号分别为 140、128、22-1。根据形态特征、培养特征、生理特性鉴定均属棒状杆菌属。其去除 RDX 的效率见表 2。

为了进一步测定三株细菌降解 RDX 的浓度范围,于生理条件试验培养基中分别加入 40、60、74mg/l 的 RDX。表 3 表明不同浓度的 RDX 均不影响三株细菌的生长,培养三天后三株细菌均能降解 60—

70mg/l 的 RDX 达 90% 以上。

(二) 三株棒状杆菌降解 RDX 的适宜条件

1. pH: 图 1 表明三株细菌降解 RDX 的最适 pH 在 6.0—7.5,其中以 22-1 号菌对 pH 的适应范围较广,而 128 号菌对 pH 的适应范围最窄。当 pH 大于 7.5 时,对 RDX 的降解作用即迅速下降。

2. 温度: 表 4 表明三株菌的生长及降解 RDX 的最适温度均在 30℃ 左右,温度降低或升高时,其生长和降解 RDX 的效率均下降。

3. 不同碳源对菌生长及降解 RDX 的影响: 试验结果表明: 三株菌对葡萄糖、蔗糖、甘露醇、乳酸钠四种碳源利用最好,降解 RDX 的效率均在 90% 以上。而以

表 2 三株细菌降解 RDX 的效率*

Table 2 Efficiency of the three bacteria strains for degrading RDX

菌号 strain	RDX 去除率 RDX removal (%)	
	24 小时 (h)	48 小时 (h)
140	95.92	98.1
128	68.8	92.1
22-1	85	98.7

* 40mg/l RDX

表 3 不同浓度 RDX 对细菌生长及降解 RDX 的影响

Table 3 Effect of different concentrations of RDX on bacterial growth and RDX degradation

RDX 浓度 Concn. of RDX (mg/l)	140 号菌 No. 140		128 号菌 No. 128		22-1 号菌 No. 22-1	
	菌量 Biomass (mg/l)*	RDX 去除率 Removal (%)	菌量 Biomass (mg/l)	RDX 去除率 Removal (%)	菌量 Biomass (mg/l)	RDX 去除率 Removal (%)
40	393.6	97.7	360	98.4	324	100
60	393.6	100	378	100	321	100
74	402	99.3	360	100	330	97.5

* 细胞增长干重 Dry weight of cells

表 4 温度对菌生长及降解 RDX 的影响

Table 4 Effect of temperature on bacteria growth and RDX degradation

菌株 Strain	140 号菌 No. 140		128 号菌 No. 128		22-1 号菌 No. 22-1	
	菌量 Biomass (mg/l)	RDX 去除率 Removal (%)	菌量 Biomass (mg/l)	RDX 去除率 Removal (%)	菌量 Biomass (mg/l)	RDX 去除率 Removal (%)
15	61.5	77.05	73.5	88.3	91.5	77.31
30	137.2	99.57	132	92.3	180.83	98.81
37	52.5	56.95	34.5	62.3	116.75	48.5

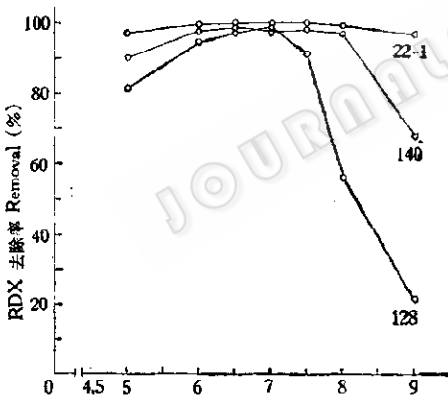


图 1 pH 值对三株细菌降解 RDX 的影响

Fig. 1 Effect of pH on RDX degradation by three bacteria strains

木糖、琥珀酸钠、玉米浆作碳源时, 三株菌生长不良, 降解 RDX 的效率亦很低; 对其他八种碳源的利用情况则因菌株不同而异。不外加碳源时, 三株菌的生长量及去除 RDX 的效率都很低。结果见表 5。

进一步测定了三株菌对葡萄糖或蔗糖

的最低需要量, 实验结果如表 6 所示。随着培养基中碳源浓度的增加, 菌量亦增加, 降解 RDX 的效率亦随之提高。降解 40mg/l 的 RDX 在培养基中至少需加入 0.1% 的适宜碳源。

4. 氮源对菌生长及降解 RDX 的影响: 从表 7 看出, 不外加氮源时三株菌降解 RDX 均可达 90% 以上, 加入 0.05% 的氨态氮源后对菌的生长均有促进作用, 但明显抑制了 RDX 的降解。

5. 不同浓度酵母膏对菌降解 RDX 的影响:

图 2 表明: 菌量随着培养基中酵母膏浓度的增加而增加, 但三株菌降解 RDX 不需要酵母膏或其他生长因素。当酵母膏浓度加大到 0.1% 时, 降解 RDX 的效率反而降低。

6. 菌的生长与降解 RDX 的关系: 如图 3 所示, 在三株菌的对数生长期 RDX 迅速下降, 培养至 48 小时 RDX 基本上降解完毕。

表 5 不同碳源对菌生长及降解 RDX 的影响

Table 5 Effect of different carbon sources on bacteria growth and RDX degradation

碳源 Carbon sources	140 号菌 No. 140		128 号菌 No. 128		22-1 号菌 No. 22-1	
	菌量 Biomass (mg/l)	RDX 去除率 removal (%)	菌量 Biomass (mg/l)	RDX 去除率 removal (%)	菌量 Biomass (mg/l)	RDX 去除率 removal (%)
葡萄糖 Glucose	630	98.5	439	97.3	522	100
乳糖 Lactose	122	56	9	16	214	33
麦芽糖 Maltose	599	52	412	53	191	30.6
山梨糖 Sorbitose	295	97	249	79	187	19
蔗糖 Sucrose	739	98.9	638	98.1	491	93.6
木糖 Xylose	384	16	48	—	230	33.3
肌醇 Inositol	358	93.8	179	24.7	204	69.8
甘露醇 Mannitol	578	98.6	368	97.7	648	96.9
醋酸钠 Sodium acetate	174	24	121	52	146	98.9
柠檬酸钠 Sodium citrate	226	53.7	228	63.8	164	66
反丁烯二酸钠 Sodium fumarate	156	81	191	49.5	215	14
乳酸钠 Sodium lactate	339	98.0	267	97	303	96.9
丙酮酸钠 Sodium pyruvate	289	74	254	65	221	6.6
琥珀酸钠 Sodium succinate	124	29	77	24	143	30
玉米浆 Corn-steep liquor	—	24	—	8.9	—	8.0
不外加碳源 No addition of carbon source	75	3.9	12.5	0	36	0.6

表 6 三株菌降解 RDX 所需的葡萄糖或蔗糖的浓度

Table 6 Concentration of glucose or sucrose needed for degrading RDX by three bacteria strains

葡萄糖或蔗糖 浓度 Glucose or sucrose (%)	140 号菌 No. 140		128 号菌 No. 128		22-1 号菌 No. 22-1	
	菌量 Biomass (mg/l)	RDX 去除率 Removal (%)	菌量 Biomass (mg/l)	RDX 去除率 Removal (%)	菌量 Biomass (mg/l)	RDX 去除率 Removal (%)
0	9	1.9	0	1.9	10	4.95
0.01	39	7.53	21	4.89	62	6.5
0.02	87	34.7	48	14.4	105	23.2
0.05	281	99	205	52.5	198	51.0
0.10	448	98.4	361	99	315	90.1
0.20	481	96.9	372	99	408	99.2

表 7 不同氮源对菌生长及降解 RDX 的影响

Table 7 Effect of different nitrogen sources on bacteria growth and RDX degradation

氮源 Nitrogen sources (0.05%)	140 号菌 No. 140		128 号菌 No. 128		22-1 号菌 No. 22-1	
	菌量 Biomass (mg/l)	RDX 去除率 Removal (%)	菌量 Biomass (mg/l)	RDX 去除率 Removal (%)	菌量 Biomass (mg/l)	RDX 去除率 Removal (%)
RDX	209.5	95.14	185.5	91.7	250	97.6
(NH ₄) ₃ PO ₄	310.5	40.2	215.5	22.4	299	41.4
NH ₄ Cl	240	26.5	233	10.1	288.5	41.1
(NH ₄) ₂ SO ₄	231	31.5	235.5	27.4	264.5	46.2
尿素 Urea	287.5	6.5	259	7.2	308.5	18.1

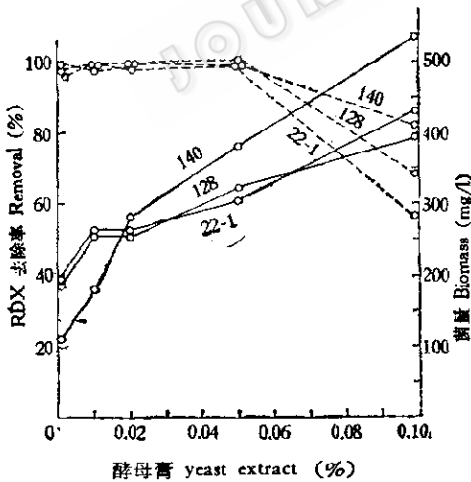


图 2 不同浓度酵母膏对菌生长及降解 RDX 的影响
Fig. 2 Effect of different concentration of yeast extract on bacteria growth and RDX degradation

○—○ 菌量 Biomass
○—○ RDX 去除率 Removal

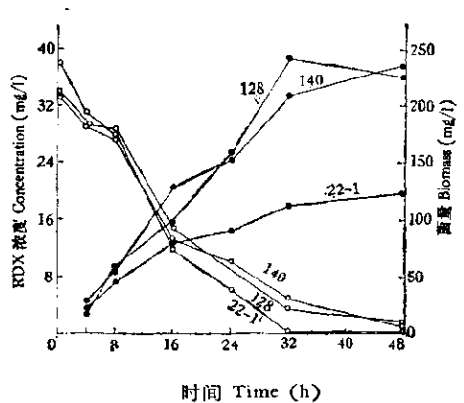


图 3 菌的生长与降解 RDX 的关系
Fig. 3 Relation between bacteria growth and RDX degradation

●—● 菌量 Biomass
○—○ RDX 浓度 Concentration

讨 论

长期以来,人们认为 RDX 结构稳定,难以被微生物降解。虽然目前我们从自然界中分离的降解 RDX 的细菌类群极少,但试验结果说明微生物降解 RDX 是有可能的。

三株棒状杆菌降解 RDX 时,必须在培养基中加入一定量的适宜有机碳源,但不需要加入其他氮源,当加入氨盐或过量(0.1%)的酵母膏时,反而抑制细菌降解

RDX 的效率,其原因尚需进一步探讨。

关于三株菌降解 RDX 的机理以及它们在含 RDX 工业废水生化处理方面应用的可能性等问题,有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Kaplan, A. S. et al. *Arch. Environ. Health*, 10: 877—883, 1965.
- [2] Patty, F. A.: *Industrial Hygiene and Toxicology*, 1: 2097—2099, 1962.
- [3] Osmon, J. L. and R. E. Klausmier; *Dev. Ind. Microbiol.*, 14: 247—252, 1972.
- [4] Soli: AD 762751, 1973.

STUDIES ON THREE STRAINS OF *CORYNEBACTERIUM* DEGRADING CYCLOTRIMETHYLENE-TRINITROAMINE(RDX)

Yang Yanxi Wang Xing Yin Ping Li Wenzhong Zhou Peijin

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Three strains of *Corynebacterium* were isolated from soil long polluted by RDX. These bacteria can degrade more than 90% of 40—60 mg/l RDX in the medium containing 0.1% organic carbon source within

1—3 days. The optimum pH and temperature for degrading RDX are 6—7.5 and 30° C respectively. The degradation of RDX is inhibited in the medium containing ammoniacal nitrogen.