

氯苯化合物的微生物降解探索试验

马瑞霞 栾冰 赵倩雪 薛茂杰

(中国科学院环境化学研究所)

氯苯系化合物广泛存在于染料、制药、农药、油漆等工业废水中,严重污染环境。此类化合物损害人体肝脏、肾脏,抑制神经中枢。水中二氯苯含量达 0.25 毫克/升时,鱼体出现有异味^[1]。我国地面水的最大允许浓度为 0.02 毫克/升。

关于氯苯系化合物的微生物降解,在国外进行过不少工作。我们看到对聚氯联二苯^[2]、氯化苯、氯化酚、一氯、二氯、三氯化衍生物及六氯苯的微生物降解都曾有过报导。1977 年国外报导 *Pseudomonas* (假单胞菌属) 在 92 小时内能将对-二氯苯 100% 打开苯环^[3]。

我们从天津化工厂总污水池附近土壤中,分离筛选出代号 441 菌株。经培养能将对-二氯苯 100% 去除,重复五次效果良好。最佳一次为 72 小时内将对-二氯苯全部去除。此细菌经分离,分离出 441a, 441b 两株菌。经鉴定分别为邻单胞菌 (*Plesiomonas*) 和蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)。

一、菌种的分离和筛选

1. 样品来源: 1977 年取自天津化工厂总污水沉淀池附近土壤。

2. 分离方法

(1) 富集培养: 富集培养液成分为葡萄糖 0.1%, 磷酸二氢铵 0.1%, 磷酸二氢钾 0.1%, 硫酸镁 0.02%, 氯化钠 0.5%。pH: 7.4。在 250 毫升三角瓶中, 装入上述培养液 30 毫升。15 磅 20 分钟灭菌。冷却后接种样品 3 克, 同时加入四种氯苯混合液 (一氯苯, 对-

二氯苯, 间-二氯苯, 邻-二氯苯)。加入量为 300 毫克/升。30±1℃ 往复摇床振荡培养, 振幅 6—7 厘米, 频率为 96 次/分钟。培养 48 小时进行平板分离。

(2) 平板分离: 培养基成分: 葡萄糖 1 克/升, 磷酸二氢铵 1 克/升, 磷酸二氢钾 1 克/升, 硫酸镁 0.2 克/升, 氯化钠 5 克/升, 琼脂 20 克/升。pH: 7.4。

将富集培养 48 小时的培养液, 用划线法接种于上述琼脂平板上, 30℃ 恒温培养, 出现不同菌落时分别挑入斜面。斜面培养基成分为: 葡萄糖 1%, 蛋白胨 1.5%, 磷酸二氢钾 0.1%, 琼脂 1.6%。pH: 7.4。

3. 菌种的筛选

(1) 种子培养液成分: 葡萄糖 2%, 牛肉膏 0.5%, 蛋白胨 0.5%, 酵母膏 0.5%, 磷酸二氢钾 0.1%。pH: 7.4。

(2) 处理液成分: 葡萄糖 0.05%, 磷酸二氢钾 0.05%。pH: 7.2—7.4。

二、处理方法

500 毫升三角瓶中装种子培养液 50 毫升。灭菌后接入 441 菌种一环, 29±1℃, 振荡培养 (摇床振幅, 频率同前), 24 小时后转入灭菌的离心管中, 离心 (3000 转/分钟) 10 分钟, 倾去上清液。在无菌室内称取菌体 0.8 克 (湿重) 移入 250 毫升三角瓶, 装液量为 30 毫升的灭菌水中, 进行摇床振荡处理。24 小时后, 将处理的菌体再经离心, 取出转入磨口三角瓶的灭菌处理液中。在 250 毫升磨口三角瓶内装处理液 30 毫升, 磨口塞塞紧, 外面

再用牛皮纸复盖扎紧。于 $29 \pm 1^\circ\text{C}$ 摇床振荡处理。在接入菌体的同时，加上述四种氯苯混合液。加入量为 192 毫克/升。其中一氯苯 133.4 毫克/升，对-二氯苯 13.4 毫克/升，间-二氯苯 13.4 毫克/升，邻-二氯苯 31.2 毫克/升。另设不加菌体的对照，以了解氯苯物在同样条件下的挥发及其它损耗。

三、试验效果

以气相色谱测定各氯苯残留量，以峰值高低确定其去除效果（见图 1）。

对 140 株细菌进行了测定，其中以 264 号菌株以及 172 号等五株混合一起进行测定时，均出现不同程度的去除效果。但以 441

效果显著而稳定。进行五次重复，对-二氯苯的去除效果均达 100%（见图 1，表 1）。

去除率（%）计算方法，系以每批对照的色谱峰高与同批处理的峰高相减，再与对照峰高相比所得。以第四批试验为例列表说明（见表 2）。

在筛选过程中，也发现有的菌株对邻-二氯苯，间-二氯苯均有不同程度的去除效果。

四、菌种鉴定

1. 441_a 的鉴定

（1）形态特征：在牛肉膏琼脂平板上菌落透明，圆形，光滑，边缘整齐有光泽，浅黄色。在平板及斜面上菌苔略薄。菌体短杆状，

表 1 441 菌株去除对-二氯苯的重复试验

重复	菌株	去除率(%)		对-二氯苯	间-二氯苯	邻-二氯苯	备注
		处 理	时间(天)				
1	441 等五株混合	1	—	—	—	—	供试 10 组
		3	—	—	—	—	
		5	100	—	—	—	
		7	100	23	31.5	—	
2	441 等 5 株混合	1	9	—	9	供试 2 组	
		3	87	—	9		
		5	100	20	80		
		7	100	—	—		
	441	1	37	18	19	供试 10 株	
		3	100	48	54		
		5	100	48	50		
		7	100	40	44		
3	441 264	3	—	—	—		
		5	80	—	—		
		7	93	6.6	7.5		
		9	93	—	8.0		
4	441	3	50	—	—	供试 2 株	
		5	93	—	—		
		7	94	—	22		
		9	100	20	25		
5	441	1				供试 4 株在 11天以前因无 高氮气而未测 定	
		3					
		5					
		7					
		9					
		11	100	—	—		

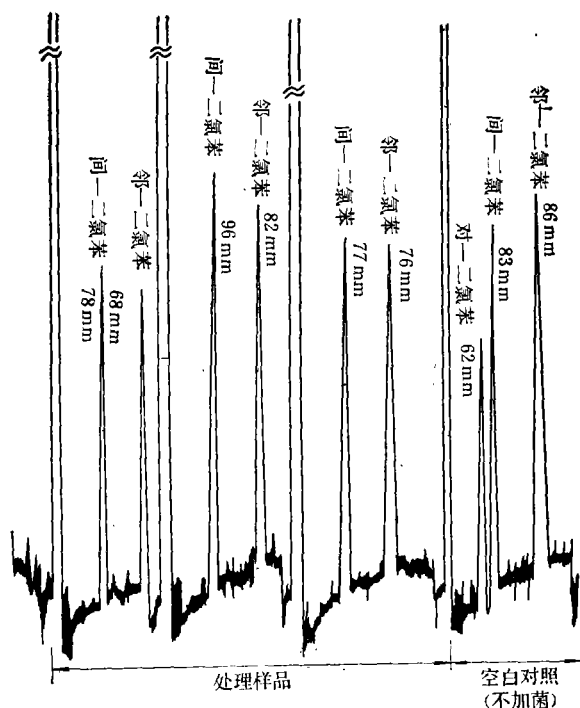


图1 441菌株降解对-二氯苯色谱图

表2 441菌株第四批重复试验各处理与对照峰高比较:

菌株	处理时间(天)	对-二氯苯		间-二氯苯		邻-二氯苯	
		峰高(毫米)	去除率(%)	峰高(毫米)	去除率(%)	峰高(毫米)	去除率(%)
441	3	72.8	15.2	128	0	122	0
	5	3.5	93.0	104.8	0	67.4	18.4
	9	0	100	81.0	20	73.0	25.5
对照	3	86		115		115	
	5	63		90		95	
	9	79		102		98	

注: 1.表中数据为每重复三瓶的平均值。

2.一氯苯峰值在对照及各处理中都很低,未进行测量。

革兰氏阴性,鞭毛1—3根,极生或亚极生。

(2) 培养特征: ①葡萄糖发酵产酸不产气; ②分解肌醇,发酵产酸不产气; ③氧化酶反应阳性; ④不水解淀粉; ⑤明胶穿刺17天后出现凹窝状,未液化; ⑥兼性厌氧; ⑦最适生长温度30℃,最高39—41℃,超过41℃不生长。

参照 Bergey 手册第八版和“一般细菌常用鉴定方法”^[3], 441a 菌株初步定为邻单孢菌 (*Plesiomonas*)。

2. 441b 的鉴定

革兰氏阳性,生芽孢,芽孢囊不膨大。菌体宽度0.9微米以上,菌体着色不均匀。葡萄糖发酵产酸。初步定为蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)

441a 和 441b 是否有协同作用以及它们降解对-二氯苯的机制问题,有待今后研究。

细菌鉴定工作在中国科学院微生物所王大耜先生的热情指导下进行,在此表示衷心的感谢。

参 考 文 献

- [1] Verschuere, Karel, Handbook of Environmental DATA on Organic Chemicals, P. 224 New York, Van Nostrand Reinhold Co. 1977.
- [2] Ahmed, M., Focht, D. D., Canadian Journal of Microbiology, 19 (1), 42—52 (1973).
- [3] 中国科学院微生物研究所细菌分类组编著, 一般细菌常用鉴定方法, 65—66 页, 科学出版社, 1978 年。