

2,4,6-三硝基甲苯生物降解研究进展

陈琛, 金若菲, 周集体, 柳广飞

(大连理工大学环境与生命学院工业生态与环境工程教育部重点实验室, 辽宁大连 116024)

摘要:介绍了降解 2,4,6-三硝基甲苯(TNT)的微生物及降解途径。总结了好氧氧化、厌氧还原以及厌氧和好氧过程协同作用降解 TNT 的代谢途径。指出目前生物法降解 TNT 存在的关键问题是实际应用中降解效率低,在分子水平上对相关基因、酶进行研究、多种技术的联合和生物法的实际应用是今后生物法研究的重点。

关键词:2,4,6-三硝基甲苯;微生物;生物降解

中图分类号:X703

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2009)01-0035-04

Progress in biodegradation of trinitrotoluene

CHEN Chen, JIN Ruo-fei, ZHOU Ji-ti, LIU Guang-fei

(Key Laboratory of Industrial Ecology and Environmental Engineering, MOE, School of Environmental and Life Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: Degradation pathways and microorganism species involved in the biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) are reviewed. Degradation pathways of aerobic oxidation, anaerobic reduction and sequential anaerobic-aerobic biodegradation are introduced. It is pointed out that the low efficiency of biodegradation is a major limiting factor affecting the biodegradation of TNT. Research on the related genes and enzymes, combination of various technologies and the practical application are suggested for further studies.

Key words: 2,4,6-trinitrotoluene; microorganism; biodegradation

2,4,6-三硝基甲苯(TNT)是军事与民用方面使用最广泛的含能材料,它的毒性是其他化合物毒性的 20~50 倍,在 TNT 生产过程中产生的废水引起严重的土壤和水污染并且致畸和致癌,极强的稳定性也使其很难被自然界中的微生物降解,对环境和人类健康危害巨大。物理的、化学的及生物的方法均被用于研究 TNT 的降解,其中生物方法因具备费用低、能彻底清除污染物、不会对环境造成二次污染等优势而被认为是最有前景的手段,为彻底治理 TNT 废水指明了出路。本文综述了 TNT 的生物降解研究进展。

1 降解菌株的筛选

对于单硝基取代的芳香化合物,其微生物降解途径一般是通过加氧酶的氧化作用,开环实现降解。而由于多个取代硝基的吸电子特性,造成苯环上的电子密度下降,使得 TNT 难以通过氧化途径被微生物的加氧酶进攻实现降解。国内外众多研究者通过富集培养等技术已经发现了许多能够降解 TNT 的微生物。由表 1 可见,降解 TNT 的微生物广泛分布

表 1 TNT 的降解微生物

降解菌	降解产物	参考文献
<i>Clostridium sordelii</i>	2,4,6-三氨基甲苯(TAT)	[3]
<i>Pseudomonas</i> sp. strain JLR11	TNT 作为唯一氮源和最终电子受体	[5-6]
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	氨基二硝基甲苯、羟氨基二硝基甲苯和四硝基偶氮甲苯	[7]
<i>Clitocybula dusenii</i> TMB12	42% 的 TNT 发生矿化	[8]
<i>Cladosporium resinae</i>	四硝基偶氮甲苯, TNT 未发现矿化	[9]
<i>Desulfovibrio</i> sp.	TAT 和二氨基硝基甲苯(DANT)	[10]
<i>Escherichia coli</i>	TAT	[11]
<i>Methanococcus</i> sp. strain B	DANT	[12]
<i>Veillonella alkalescens</i>	TAT	[13]
<i>Pseudomonas</i> sp. strain CBS3	DANT	[14]
<i>Staphylococcus</i> sp.	2-氨基-4-硝基甲苯	[15]
<i>Bacillus</i> sp.	2-氨基-4-硝基甲苯	[15]
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	四硝基偶氮甲苯等聚合物	[16]

收稿日期:2008-10-09

基金项目:国家自然科学基金资助项目(50808029)

作者简介:陈琛(1985-),女,硕士生;周集体(1956-),男,教授,博士生导师,主要从事环境生物工程方面的研究;金若菲(1975-),女,博士,讲师,主要从事环境生物工程方面的研究,通讯联系人,0411-84706252, jruofei@dlut.edu.cn.

于白腐真菌、革兰氏阳性菌 (*Staphylococcus*、*Bacillus* 等种属) 和革兰氏阴性菌 (*Pseudomonas*、*Escherichia* 和 *Desulfovibrio* 等种属) 等中。何德文等^[1]用白腐真菌降解纯 TNT 模拟废水, TNT 降解率达 90% 以上。尹萍等^[2]从受 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, 对其中 6 株进行了降解 TNT 的实验, 在含 75 ~ 80 mg/L TNT 的培养基中, 40 h 内 TNT 去除率达到 71% ~ 93%。Ederer 等^[3]从弹药富集反应器的土壤中分离出的 *Clostridium* 在 10 h 能完全降解 TNT, 细胞悬浮液能将 2,4-二氨基-6-硝基甲苯转化为 2,4,6-三氨基甲苯。French 等^[4]发现 *Enterobacter cloacae* 能以 TNT 为唯一氮源, 好氧条件下缓慢地实现 TNT 的降解。Esteve-Nuñez 等^[5]研究发现以 TNT 为唯一氮源, *Pseudomonas* 能够厌氧降解 TNT。

2 微生物降解 TNT 的机理

TNT 生物降解过程是一个相当复杂的过程。当条件改变时, 其降解途径也有很大差别。

2.1 TNT 的好氧生物降解

2.1.1 真菌对 TNT 的降解

国内外对白腐真菌降解 TNT 的研究较多。白腐真菌对 TNT 取得如此高的降解率, 是由其独特的降解机制所决定的。白腐菌依赖于一个主要由细胞分泌产生的酶系统所组成的胞外降解体系; 在有氧条件下, 葡萄糖等在已二醛氧化酶的作用下形成 H_2O_2 , H_2O_2 刺激木质素过氧化物酶 (LiP) 或锰过氧

化物酶 (MnP) 触发一系列的自由基链反应降解 TNT, 实现对底物无特异性的氧化分解^[17-18]。另外, 漆酶、还原酶、甲基化酶和蛋白酶等也参与组成了降解系统的主体。降解酶系通常在碳源、氮源受限的情况下才表达。藜芦醇等可促进该反应的进行。值得注意的是, 在 LiP 和 MnP 分泌之前, 依赖于质膜的氧化还原系统可将高度氧化的 TNT 还原为氨基对应物 (主要是 2-氨基二硝基甲苯和 4-氨基二硝基甲苯), 这是 TNT 生物降解的关键^[19]。图 1 所示为 Jalal Havari 等^[16]提出的白腐菌 *Phanerochaete chrysosporium* 降解 TNT 的可能途径。

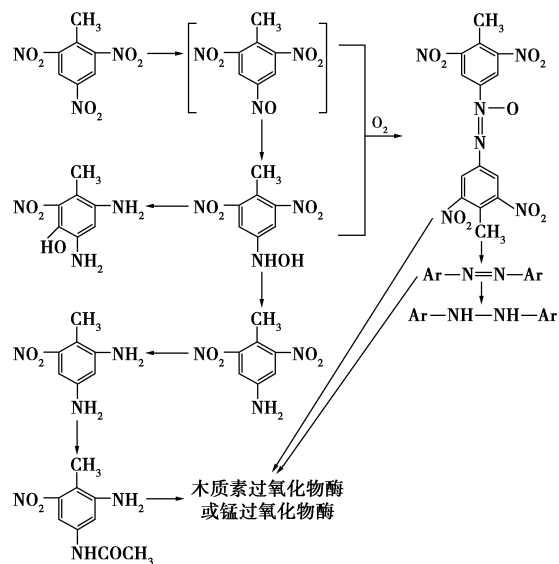


图 1 真菌降解 TNT 的途径

(上接第 34 页)

- [15] Dobrzanski L A, Drak M. Properties of composite materials with polymer matrix reinforced with Nd-Fe-B hard magnetic particles [J]. J Mater Process Tech, 2006, 175: 149 - 156.
- [16] Rada M, Kardelky S, Mazilu I, et al. Corrosion behavior of polymer-bonded NdFeB-based nanocrystalline magnets [J]. IEEE T Magn, 2004, 40(4): 2864 - 2866.
- [17] Rada M, Geberta A, Mazilu I, et al. Corrosion studies on highly textured Nd-Fe-B sintered magnets [J]. J Alloy Compd, 2006, 415(1/2): 111 - 120.
- [18] Yue M, Zhang J X, Liu W Q, et al. Chemical stability and microstructure of Nd-Fe-B magnet prepared by spark plasma sintering [J]. J Magn Mater, 2004, 271(23): 364 - 368.
- [19] Yue M, Zhang J X, Xiao Y F, et al. A new kind of NdFeB magnet prepared by spark plasma sintering [J]. IEEE T Magn, 2003, 39(6): 3551.
- [20] Mamedov V. Spark plasma sintering as advanced PM sintering method [J]. Powder Metal, 2002, 45(4): 322.
- [21] Otaigbe J U, Kim H S, Xiao J. Effect of coupling agent and filler particle size on melt rheology of polymer-bonded Nd-Fe-B magnets [J]. Polym Composite, 1999, 20: 697 - 701.
- [22] Xiao J, Otaigbe J U. Polymer-bonded magnets: Part I. Analytic thermogravimetry to determine the effect of surface modification on dispersion

of Nd-Fe-B fillers [J]. J Mater Res, 1999, 14(7): 2893 - 2897.

- [23] Otaigbe J U, Kim H S, Xiao J. Effect of coupling agent and filler particle size on melt rheology of polymer-bonded Nd-Fe-B magnets [J]. Polymer Composite, 1999, 20(5): 697 - 704.
- [24] Farris R. Prediction of the viscosity of multimodal suspensions from unimodal viscosity data [J]. J Rheol, 1968, 12: 281 - 301.
- [25] Otaigbe J U, Kim H S, Xiao J. Effect of coupling agent and filler particle size on melt rheology of polymer-bonded Nd-Fe-B magnets [J]. Polym Composite, 1999, 20(5): 697 - 704.
- [26] Otaigbe J U, Xiao J, Kim H. Influence of filler surface treatments on processability and properties of polymer-bonded Nd-Fe-B magnets [J]. J Mater Sci Lett, 1999, 18: 329 - 332.
- [27] Joshua U, Otaigbe J U, Kim H S, et al. Polymer Bonded Magnets: II. Effect of liquid crystal polymer and surface modification on magneto-mechanical properties [J]. Polym Composite, 2000, 21(2): 332 - 342.
- [28] Xiao J, Joshua U, Otaigbe J U. Polymer bonded magnets: II. Effect of liquid crystal polymer and surface modification on magneto-mechanical properties [J]. Polym Composite, 2000, 21(2): 332 - 342.
- [29] Guschl P C, Kim H S, Otaigbe J U. Effects of a Nd-Fe-B magnetic filler on the crystallization of poly(phenylene sulfide) [J]. J Appl Polym Sci, 2002, 83: 1091 - 1102. ■

2.1.2 细菌对 TNT 的降解

据报道,大多数好氧菌对 TNT 的降解是将其 1 个或 2 个硝基转化为羟氨基或者是氨基,产生氨基硝基芳香化合物的不同异构体,这些产物通常无法进一步降解。也有报道 TNT 的部分降解产物在氧气存在下相互之间发生聚合反应,形成更难降解的四硝基偶氮甲苯^[20],这种物质引起生物突变的可能性比 TNT 还要高^[21]。Traxler 等^[22]报道的用标记 TNT 进行水系统中生物降解研究,结果有 0.8% ~ 1.2% 的¹⁴C 以 CO₂ 的形式逸出。Spanggard 等^[23]提出了 TNT 生化降解中间产物 2-氨基-4,6-二硝基苯甲酸的降解途径:TNT 先氧化成三硝基苯甲醇和三硝基苯甲酸,三硝基苯甲酸还原为 2-氨基-4,6-二硝基苯甲酸,后者一部分降解为 2,4-二硝基苯甲酸,一部分降解为 2,4-二硝基苯胺,另一部分则降解为 2,4-二硝基苯酚。Kaplan 等^[24]提出了模拟堆肥系统中 TNT 生化转移的途径(图 2)。

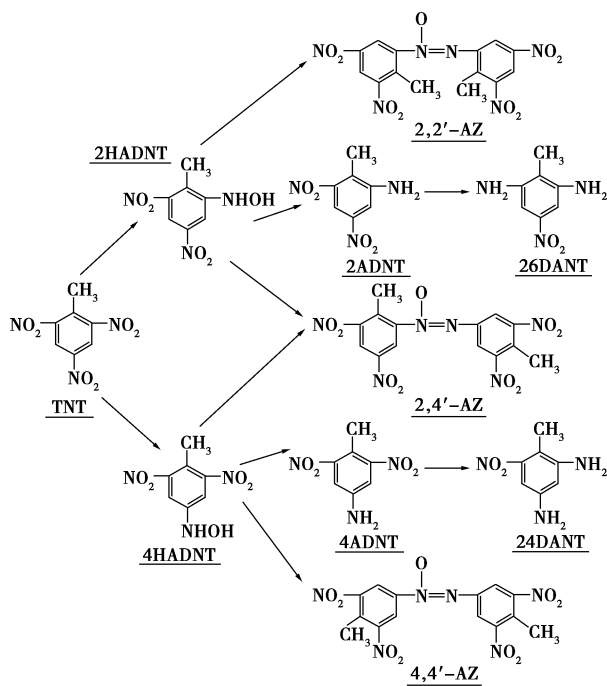


图 2 TNT 的好氧生化转移途径

2.2 TNT 的厌氧降解

TNT 的厌氧代谢最早是 McCormick 等^[25]报道的,以 H₂ 作为电子供体, *Veillonella alkalescens* 的细胞悬浮液或粗酶液将 TNT 还原为三氨基甲苯(TAT),降解途径见图 3。 *Clostridium* 和 *Desulfovibrio*

是被研究较为详细的 2 种厌氧条件下降解 TNT 的细菌种属。 *Clostridium* 属的细菌厌氧降解 TNT 是一个普遍现象,它们还原硝基产生 TAT 等产物。 Crawford 等^[26-28]报道了在含炸药土壤的生物反应器中分离出的 *Clostridium* 对 TNT 的共代谢转化,在反应体系中检测到 TAT 和对甲酚、甲基间苯三酚等不含氮的芳香化合物^[29]。

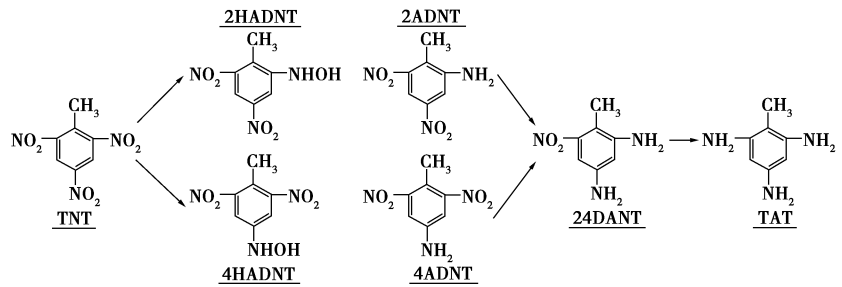


图 3 TNT 的厌氧生化转移途径

2.3 厌氧还原和好氧氧化的协同作用

Crawford 等提出两步法处理硝基芳香化合物:首先接种好氧菌或兼性菌进行发酵,而后进行厌氧消化。该方法认为发酵阶段速度快,耗尽了溶液中的氧,因而阻碍了硝基芳香化合物降解后氨基产物的氧化聚合。而硝基化合物完全降解只能在厌氧条件下发生,故这种组合方法非常有效。该方法有 2 个特点:①选择的是较普通的微生物;②廉价、快速,适用于受污染水体和面积土地处理。

3 今后的研究方向

一些化工厂已经应用降解性微生物处理废水中 TNT,并且取得了显著的效果。但是还不能完全满足实际的需要,这是因为在自然环境中散在分布的污染物不能像工业废水一样进行集中统一处理;受污染环境化合物成分变化大,pH 波动也较大,有可能抑制降解菌的生长;降解菌对环境污染物的降解速度慢,达不到实际需要的要求或经常发生变异,不能够继续降解污染物;受污染环境不能有效地维持降解菌的生物量,在实际应用降解菌时常发生降解菌在总量上的减少。基于 TNT 的生物降解研究状况,今后还需要在以下几个方面做大量工作:

(1)在分子水平上对相关细菌、酶进行研究。今后一段时间高效降解菌株的筛选及基因工程菌的构建仍是一个重要的研究工作。Nicklin 等^[4]从驯化培养的 *E. cloacae* 中发现了一种可脱除 TNT 中的硝基的季戊四醇四硝酸酯(PETN)还原酶,该酶的氨基酸序列和基因序列已被完全测定。

(2) 创建高效的技术手段, 以提高 TNT 废水和受污染土壤的处理效率并降低费用, 多种技术联合使用、优势互补将是一项富有前景的研究方向, 光降解、化学降解与生物降解的联合作用, 植物修复也将是研究热点。将 *E. cloacae* 季戊四醇四硝酸酯还原酶的编码基因 *onr* 转入烟草中, 在其叶片和根部组织都检测到该还原酶的表达。研究表明, 转基因植株能够在炸药浓缩土壤中正常生长, 而野生株的生长则被抑制^[30]。

(3) 硝基的还原是好氧、厌氧细菌和真菌中广泛存在的反应。比较而言, 厌氧生物处理技术对炸药废水中有机污染物的去除更有效, 经济性更好。但目前装置绝大部分是实验规模, 且流程均较复杂, 所以必须在扩大规模、简化流程及操作上继续研究, 尤其应注意厌氧与其他工艺的组合研究。

参考文献

- [1] 何德文, 黄俊, 周申范. 白腐真菌生化降解 TNT 废水的效果研究[J]. 环境卫生工程, 1999, 7(1): 35 - 37.
- [2] 尹萍, 白逢彦, 周培瑾. 降解三硝基甲苯的酵母和类酵母菌的研究[J]. 微生物学报, 1998, 38(4): 295 - 299.
- [3] Ederer M M, Lewis T A, Crawford R L. 2, 4, 6-Trinitrotoluene (TNT) transformation by *Clostridia* isolated from a munition-fed bioreactor: Comparison with non-adapted bacteria[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1997, 18: 82 - 88.
- [4] French C E, Nicklin S, Bruce N C. Aerobic degradation of 2, 4, 6-trinitrotoluene by *Enterobacter cloacae* PB2 and by pentaerythritol tetranitrate reductase[J]. Applied and Environment Microbiology, 1998, 64(8): 2864 - 2868.
- [5] Esteve-Nuñez, Ramos J L. Metabolism of 2, 4, 6-trinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. JLR11[J]. Environmental Science and Technology, 1998, 32: 3802 - 3808.
- [6] Esteve-Nuñez, Luchessi G, Philipps B. Respiration of 2, 4, 6-trinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. strain JLR11[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182: 1352 - 1355.
- [7] Parrish F W. Fungal transformation of 2, 4-dinitrotoluene and 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) [J]. Applied and Environment Microbiology, 1977, 34: 232 - 233.
- [8] Scheibner K, Hofrichter M, Herre A. Screening for fungi intensively mineralizing 2, 4, 6-trinitrotoluene [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1997, 47(4): 452 - 457.
- [9] Bayman P, Radkar G V. Transformation and tolerance of TNT (2, 4, 6-trinitrotoluene) by fungi [J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 1997, 39: 45 - 53.
- [10] Drzyzga O, Bruns-Nagel D, Gorontzy T. Mass balance studies with ¹⁴C-labeled 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) mediated by an anaerobic *Desulfovibrio* species and an aerobic *Serratia* species[J]. Current Microbiology, 1998, 37: 380 - 386.
- [11] Stenuit B, Eyers L, Rozenberg R, et al. Aerobic growth of *Escherichia coli* with 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) as the sole nitrogen source and evidence of TNT denitration by whole cells and cell-free extracts[J]. Applied and Environment Microbiology, 2006, 72(12): 7945 - 7948.
- [12] Boopathy R, Kulpa C F. Biotransformation of 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) by a *Methanococcus* sp. (strain B) isolated from a lake sediment [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1994, 40: 273 - 278.
- [13] McCormick N G, Feeherry F E, Levinson H S. Microbial transformation of 2, 4, 6-TNT and other nitroaromatic compounds[J]. Applied and Environment Microbiology, 1976, 31: 949 - 958.
- [14] Schackmann A, Müller R. Reduction of nitroaromatic compounds by different *Pseudomonas* species under aerobic conditions[J]. Applied and Environment Microbiology, 1991, 57: 809 - 813.
- [15] Kalafut T, Wales M E, Rastogi V K, et al. Biotransformation patterns of 2, 4, 6-trinitrotoluene by aerobic bacteria[J]. Current Microbiology, 1998, 36(1): 45 - 54.
- [16] Havari J, Halasz A, Beaudet S, et al. Biotransformation of 2, 4, 6-Trinitrotoluene with *Phanerochaete chrysosporium* in agitated cultures at pH 4.5[J]. Applied and Environment Microbiology, 1999, 65(7): 2977 - 2986.
- [17] Barr D P, Aust S D. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants[J]. Environmental Science and Technology, 1994, 28(2): 78A - 87A.
- [18] 李慧蓉. 白腐真菌的研究进展[J]. 环境科学进展, 1996, 4(6): 69 - 77.
- [19] 黄俊, 周申范. 白腐真菌生物降解 TNT 装药废水的研究[J]. 环境科学与技术, 1999(3): 17 - 19.
- [20] Haldour A, Ramos J L. Identification of products resulting from the biological reduction of 2, 4, 6-trinitrotoluene, 2, 4-dinitrotoluene and 2, 6-dinitrotoluene by *Pseudomonas* sp [J]. Environmental Science and Technology, 1996, 30(7): 2365 - 2370.
- [21] George S E, Huggins-Clark G, Brooks L R. Use of a salmonella micro-suspension bioassay to detect the mutagenicity of munitions compounds at low concentrations[J]. Mutation Research, 2001, 490(1): 45 - 56.
- [22] Traxler R W, Wood E, Delaney J M. Bacterial degradation of alpha-TNT [J]. Developmental Industrial Microbiology, 1974, 16: 71 - 76.
- [23] Spanggord R J, Mill T, Chou T, et al. Environmental fate studies on certain munition wastewater constituents: Phase IV. Lagoon model studies, ADA 138550, SRI International[C]. Menlo Park, Calif, 1983.
- [24] Kaplan D L, Kaplan A M. Separation of mixtures of 2, 4, 6-trinitrotoluene reduction products with liquid chromatography [J]. Analytica Chimica Acta, 1982, 136: 425 - 428.
- [25] McCormick N G, Feeherry F E, Levinson H S. Microbial transformation of 2, 4, 6-TNT and other nitroaromatic compounds[J]. Applied and Environment Microbiology, 1976, 31: 949 - 958.
- [26] Funk S B, Crawford D L, Crawford R L, et al. Full-scale anaerobic bioremediation of trinitrotoluene contaminated soil [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1995, 51: 625 - 633.
- [27] Lewis T A, Goszczynski S, Crawford R L, et al. Products of anaerobic 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) transformation by *Clostridium bifermentans* [J]. Applied and Environment Microbiology, 1996, 62(12): 4669 - 4674.
- [28] Regan K M, Crawford R L. Characterization of *Clostridium bifermentans* and its biotransformation of 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) and 1, 3, 5-triaza-1, 3, 5-trinitrocyclohexane (RDX) [J]. Biotechnology Letters, 1994, 16(10): 1081 - 1086.
- [29] Crawford R L. The microbiology and treatment of nitroaromatic compounds[J]. Current Opinion in Biotechnology, 1995, 6(3): 329 - 336.
- [30] French C E, Rosser S J, Davies G J, et al. Biodegradation of explosives by transgenic plants expressing pentaerythritol tetranitrate reductase [J]. Nature Biotechnology, 1999, 17: 491 - 494. ■