

文章编号:1006-9941(2009)05-0630-05

USBC 对 TNT 的降解特性研究

林鸿雁, 林玉满, 温焯明, 甘 莉, 陈祖亮

(福建师范大学环境科学与工程学院, 福建 福州 350007)

摘要:从福安化工厂废水排放地的土壤中筛选到一株对 TNT 有良好降解能力的菌株,16S rDNA 序列分析表明,该菌株为 Uncultured soil bacterium clone UD3(简称为 USBC)。研究了该菌株对 TNT 废水的降解特性,结果表明:菌株 USBC 降解 TNT 的最优条件为葡萄糖 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、蛋白胨 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、细菌浓度(干重法) $0.02 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 7、温度 $30 \text{ }^\circ\text{C}$; 在最优条件下反应 24 h 后,该菌株对 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TNT 的降解率为 97.2%; 菌株 USBC 对 TNT 的降解反应为一级动力学反应。

关键词:环境工程; TNT; 生化降解; 降解特性; 动力学

中图分类号:TJ55; X703

文献标识码:A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-9941.2009.05.030

1 引 言

TNT 炸药废水进入水体后,可通过多种途径危害人类及水生动植物。降解 TNT 常用的方法有物理法、化学法和生化法^[1-3]。生化法是利用微生物的生命活动对有机物进行降解,具有安全可靠,运行管理费用低,且处理效果显著等优点。目前,厌氧生物处理技术在炸药废水处理中已经得到一定的应用^[4-5],利用好氧微生物对 TNT 污染过的环境进行生物修复^[4,6]也引起了国内外研究人员的关注。近年来,生化法处理炸药废水的新兴研究方向包括探索新型微生物和现有微生物的降解能力以及微生物降解炸药废水的机理和动力学过程,而与此相关的报道较少。

本课题组从福安化工厂废水排放地的土壤中驯化分离得到对 TNT 有良好降解效果的菌株 USBC,研究其对 TNT 的降解特性以及降解动力学,为炸药废水的处理提供依据。

2 材料与方 法

2.1 材 料

菌种:从福安化工厂废水排放地的土壤中驯化分离得到。

TNT:淡黄色粉末,工业品,福安化工厂提供。

培养基:液体培养基 K_2HPO_4 2 g, NaH_2PO_4 1 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20 mg, CaCl_2

5 mg, ZnSO_4 1 mg, 葡萄糖 1 g, 蛋白胨 1 g, TNT 100 mg, 蒸馏水 1000 mL。

固体生长培养基:液体培养基中加入 2% 琼脂。

2.2 主要仪器

722N 型可见光光度计(上海精密科学仪器有限公司); 洁净工作台(YXQ-LS-50SII 型,上海博迅实业有限公司医疗设备厂); 不锈钢手提式灭菌器(DSX-28013 型,上海申溢医疗器械厂); 生化培养箱(SPX-2508-Z 型,上海博迅实业有限公司医疗设备厂); 立式双层恒温培养摇床(SKY-2102 型,上海苏坤实业有限公司)。

2.3 方 法

2.3.1 菌种的筛选及分离纯化

称取 2.5 g 土样置于 TNT 浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的液体培养基中,于 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的恒温摇床中培养数日,取样测定 TNT 的含量。待浓度降低后,取 0.1 mL 培养液于新培养液中,待 TNT 降解率趋于稳定后逐步加大培养液中 TNT 的含量,反复进行上述步骤,直至 TNT 浓度达到 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。取 1 mL 菌液用无菌水稀释 10^6 倍,取 0.1 mL 均匀地涂布于固体生长培养基上,置于 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 的恒温培养箱中培养 2 d 后,挑取不同菌落,经过数次平板划线分离得到单菌株。

2.3.2 菌株鉴定

以细菌总 DNA 为模板,以 16S rDNA 的通用引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492 R: 5'-TA CCTTGTACGACTT-3' 进行扩增。反应液为 20 μL , 含有 $1 \times \text{PCR Bufer}$, 200 μmolL^{-1} dNTP, 1.5 mmolL^{-1} MgCl_2 , 10 pmolL^{-1} 引物,0.25U rTaq 酶。

收稿日期:2009-03-10;修回日期:2009-05-15

基金项目:福建师范大学闽江学者人才引进基金

作者简介:林鸿雁(1985-),女,硕士研究生,主要研究方向为废水处理。

通讯联系人:林玉满,e-mail: ymlin@fjnu.edu.cn

PCR 反应条件为: 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 90 s, 此步骤进行 35 个循环, 最后于 72 °C 保温 30 min^[7-9]。得到的 PCR 产物由北京奥科生物科技公司进行测序。测序的仪器为 ABI 3730 automated sequencer (Invitrogen, Shanghai, China), 数据库为 NCBI database。

TNT 的测定: 采用 GB/ T13903 - 92 测定。

细菌生长量的测定: 以波长 600 nm 处的光密度 OD₆₀₀ 表示。

降解条件的研究: 通过单因素实验确定葡萄糖(外加碳源)浓度、蛋白胨(外加氮源)浓度、细菌浓度、pH 以及温度对 TNT 降解率的影响^[10]。

TNT 降解试验: 将菌株接种于 100 mL 液体培养基中振荡培养 12 h, 离心分离(10000 r · min⁻¹) 5 min 后收集菌体, 用无菌水将菌体稀释成一定浓度的菌悬液, 投加到液体培养基中, 在最优条件下于 150 r · min⁻¹ 恒温摇床中培养, 每隔 3 h 取样测定 TNT 浓度。

3 结果与讨论

3.1 菌株的分离和鉴定

经筛选、分离和纯化后, 共得到 3 株可在 TNT 浓度为 100 mg · L⁻¹ 的固体生长培养基上生长的菌株, 分别命名为 L1, L2, L3, 选择其中降解能力最强的菌株 L1。L1 的形态特征(见图 1): G⁻(革兰氏阴性)、短杆状、菌落乳白色、形状为圆形、中间凸起、边缘平整、有光泽、易挑起、生长良好。

菌株经 16S rDNA 扩增后, 将 16S rDNA 序列与 NCBI GenBank 数据库中 BLASTn 程序进行比对^[4-6], 发现该菌株与 Uncultured soil bacterium clone UD3 的相似度达 99%。

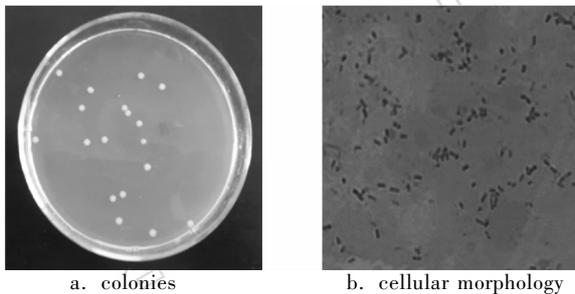


图 1 菌落与显微镜下细胞形态

Fig. 1 The colonies and cellular morphology through microscope

3.2 生长曲线的测定

将菌株 USBC 接种于液体培养基中, 于 150 r · min⁻¹ 恒温摇床中连续震荡培养, 每隔 3 h 取样测定细菌生长

量, 结果如图 2 所示。

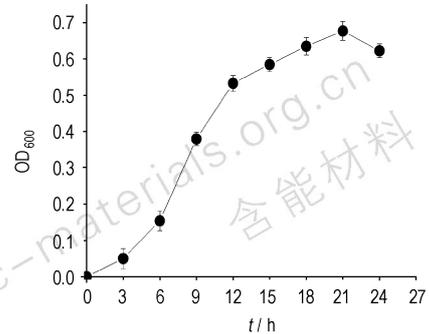


图 2 细菌生长曲线

Fig. 2 Curve of bacterial growth

由图 2 可以看出, 菌株 USBC 在 6 ~ 21 h 内增殖速度较快, 至 21 h 达到最大生长量。此阶段菌体活性最大, 为菌株的生长对数期。继续培养, 则细菌数略有下降, 初步推测有两个原因: 一是由于后期能源物不足, 细菌自身氧化作用增强而产生自溶现象; 二是由于部分菌体粘结成菌胶团而沉积在培养瓶底部。

3.3 葡萄糖浓度对 TNT 降解率的影响

将菌株 USBC 分别接种于葡萄糖浓度不同的液体培养基中, 于 30 °C、150 r · min⁻¹ 恒温摇床培养 24 h 后, 取样测定 TNT 含量, 结果见图 3(图中 r_D 表示降解率)。

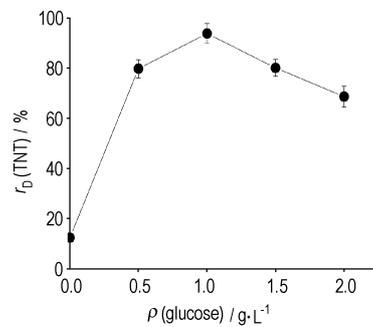


图 3 葡萄糖浓度对 TNT 降解率的影响

Fig. 3 Effect of glucose concentration on TNT degradation

由图 3 可以看出, 葡萄糖浓度为 1 g · L⁻¹ 时, TNT 的降解率达到最大值 93.8%, 继续增大其浓度, 则降解效率有所下降。当葡萄糖浓度为零时, TNT 降解率为 12.4%。说明菌株 USBC 可以利用 TNT 作为唯一碳源, 但其降解率很低。这可能是由于 TNT 作为一种难降解有机物, 其可利用程度低, 在无外加碳源条件下, 基质中可利用的碳源不足, 导致降解率很低; 但当葡萄糖浓度过高时, 菌株优先利用葡萄糖, 因此导致 TNT 的降解率又有所降低。

3.4 蛋白胨浓度对 TNT 降解率的影响

将菌株 USBC 分别接种于蛋白胨浓度不同的液体培养基中,于 30 ℃、150 r·min⁻¹ 恒温摇床培养 24 h 后,取样测定 TNT 含量,结果见图 4。

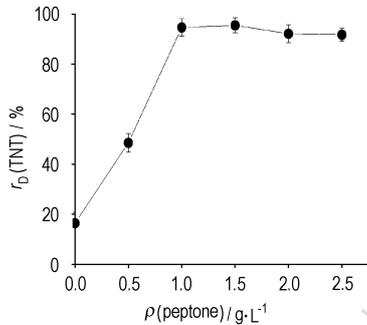


图 4 蛋白胨浓度对 TNT 降解率的影响

Fig. 4 Effect of peptone concentration on TNT degradation

图 4 表明:蛋白胨浓度为 1 g·L⁻¹ 时,TNT 的降解率达到 94.7%,继续增大其浓度,降解效果并没有显著提高。因此,选择蛋白胨浓度为 1 g·L⁻¹。亦可以看出,当蛋白胨浓度为零时,TNT 降解率为 16.4%,说明菌株 USBC 可以利用 TNT 作为唯一氮源,TNT 的可利用性低,但高于将 TNT 作为唯一碳源的利用率。

3.5 细菌浓度对 TNT 降解率的影响

将菌株 USBC 活化后接种到降解培养基中富集,离心收集到的菌体用无菌水稀释成不同浓度的菌悬液,分别加入到液体培养基中,于 30 ℃、150 r·min⁻¹ 恒温摇床培养 24 h 后取样测定 TNT 含量,结果见图 5。

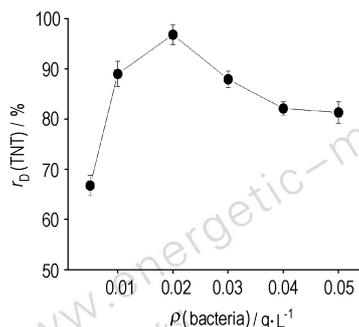


图 5 细菌浓度对 TNT 降解率的影响

Fig. 5 Effect of bacterial concentration on TNT degradation

由图 5 可以看出,细菌浓度对 TNT 降解率的影响显著。当细菌浓度为 0.02 g·L⁻¹ 时,TNT 的降解率达到最大值 96.8%,但细菌浓度过高或过低时,降解率明显下降。这可能是由于当细菌浓度过低时,细菌数量不足,因此对 TNT 的降解率不高;当细菌浓度过高时,细菌数量过多而能源物有限,细菌生长受到抑制,

因此降解率也有所下降。

3.6 pH 值对 TNT 降解率的影响

将菌株 USBC 分别接种于 pH 不同的液体培养基中,于 30 ℃、150 r·min⁻¹ 恒温摇床培养 24 h 后,取样测定 TNT 含量,结果见图 6。

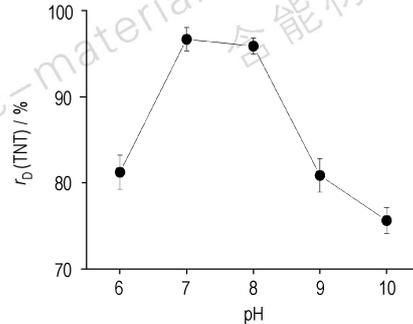


图 6 pH 值对 TNT 降解率的影响

Fig. 6 Effect of pH value on TNT degradation

图 6 表明,菌株 USBC 降解 TNT 的最适 pH 范围为 7~8。该菌株对 pH 具有一定的耐受性,但在酸性或碱性条件下,其降解 TNT 的能力有所降低。

3.7 温度对 TNT 降解率的影响

将菌株 USBC 接种于液体培养基中,于不同温度下,150 r·min⁻¹ 恒温摇床培养 24 h 后,取样测定 TNT 含量,结果见图 7。

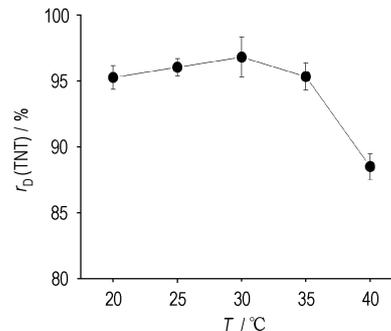


图 7 温度对 TNT 降解率的影响

Fig. 7 Effect of temperature on TNT degradation

图 7 表明,在温度为 20~35 ℃ 范围内,菌株 USBC 对 TNT 均有良好的降解效果。当温度为 40 ℃ 时降解率有所降低但仍可达到 88.5%。因此可以看出该菌株对温度也具有一定的耐受性。

3.8 菌株 USBC 降解 TNT 的动态过程

在最优条件下将菌株 USBC 接种于液体培养基中,于 150 r·min⁻¹ 恒温摇床中连续震荡培养,每隔 3 h 取样测定 TNT 浓度,结果如图 8 所示。

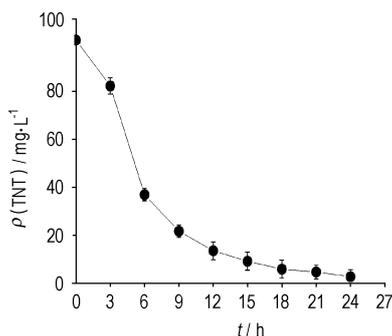


图8 TNT降解曲线

Fig. 8 Curve of TNT biodegradation

由图8可以看出,在降解初期,菌株USBC对TNT的降解率较高,在起初12 h内,TNT降解率已经达到了最终降解率的89.1%。12 h以后,TNT降解率虽然有所增大,但相对于降解初期,降解速率则变得相对缓慢。24 h后,TNT降解率达97.2%,剩余浓度为 $2.81 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($< 3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),可达到TNT废水排放标准(GB14470.3-2002)。

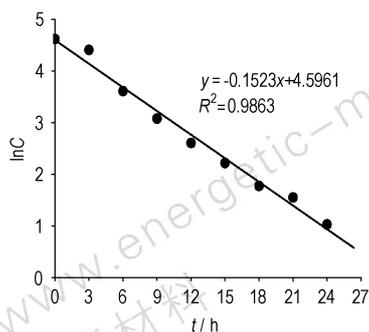
3.9 USBC对TNT的降解动力学研究

已知一级反应动力学方程为:

$$\ln C = -kt + A \quad (1)$$

式中, C 为某时刻TNT的浓度, $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; k 为TNT降解速率的动力学常数; t 为生物降解时间,h。

为了研究反应底物和降解速率之间的动力学关系,对图8中的某时刻TNT浓度的数据进行处理,得到各时刻TNT浓度相应的对数值 $\ln C$ 。分别以时间 t 和 $\ln C$ 为横、纵坐标作图,如图9所示。

图9 $\ln C$ 与时间 t 的关系Fig. 9 Curve of $\ln C$ vs time t

由图9可以看出, $\ln C$ 与降解时间 t 之间存在着良好的线性相关性,表明菌株USBC对TNT的降解符合一级动力学特征,其降解TNT的一级动力学方程为 $\ln C = -0.1523t + 4.5961$,半寿期为4.49 h。

4 小结

(1) 从福安化工厂废水排放地土壤中筛选出一株对TNT有良好降解能力的菌株L1。经鉴定该菌为Uncultured soil bacterium clone UD3(USBC)。

(2) 通过单因素实验确定菌株USBC降解TNT的最优条件为:葡萄糖 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、蛋白胨 $11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、投菌量为 $0.021 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 7、温度 $30 \text{ }^\circ\text{C}$,在该条件下培养24 h后对TNT的降解率为97.2%,可达标排放。

(3) 菌株USBC可以以TNT为唯一氮源或碳源,但无外加碳源和氮源时对TNT的利用率较差,TNT作为氮源的可利用程度比作为碳源的可利用程度高。

(4) 菌株USBC对pH和温度具有一定的耐受性,在pH为6~10和温度为 $20 \sim 40 \text{ }^\circ\text{C}$ 的范围内均保持较高的降解率。

(5) 菌株USBC降解TNT的生物反应过程符合一级降解动力学过程,半寿期为4.49 h,是一株高效TNT降解菌。

参考文献:

- [1] Rodgers J D, Bunce N J. Treatment methods for the remediation of nitroaromatic explosive[J]. *Water Research*, 2001, 35(9): 2101 - 2111.
- [2] Judith C P, James M B. Environmental fate of explosives[J]. *Thermochimica Acta*, 2002, 384: 163 - 172.
- [3] Juan L R, M Mar Gonzalez-Perez, Antonio Caballero. Bioremediation of polynitrated aromatic compounds: plants and microbes put up a fight[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2005, 16: 275 - 281.
- [4] 周军,郭新超,金奇践,等. 生化法处理炸药废水研究进展[J]. 中国给水排水, 2000, 16(9): 50 - 52.
ZHOU Jun, GUO Xin-chao, JIN Qi-jian, et al. Research progress on biochemical treatment of explosive wastewater[J]. *China Water and Wastewater*, 2000, 16(9): 50 - 52.
- [5] 刁金祥,刘有智,王贺,等. 2,4,6-三硝基甲苯废水处理技术研究进展[J]. 化学工业与工程技术, 2007, 28(2): 21 - 24.
DIAO Jin-xiang, LIU You-zhi, WANG He, et al. Research progress on treatment technique of TNT wastewater[J]. *Journal of Chemical Industry and Engineering*, 2007, 28(2): 21 - 24.
- [6] 刘渝,游青,王晓川. 火炸药工业废水处理技术研究进展[J]. 工业安全与环保, 2008, 34(7): 25 - 27.
LIU Yu, YOU Qing, WANG Xiao-chuan. Development of treatment for wastewater contaminated by powder and explosives[J]. *Industrial Safety and Environmental Protection*, 2008, 34(7): 25 - 27.
- [7] CAI B, HAN Y, LIU B, et al. Isolation and characterization of an atrazine-degrading bacterium from industrial wastewater in China[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2003, 36(5): 272 - 276.
- [8] Altschul S F, Madden T L, Schäffer A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs

- [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(17): 3389 – 3402.
- [9] Soo-Jin Kim, Chang-Muk Lee, Bo-Ram Han, et al. Characterization of a gene encoding cellulase from uncultured soil bacteria[J]. *Research Letter*, 2008, 282: 44 – 51.
- [10] Chulhwan Parkk, Tak-Hyun Kim, Sangyong Kim. Optimization for biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *pseudomonas putida*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2003, 95(6): 567 – 571.
- [11] 迟恒, 李健, 王吉桥, 等. 水环境中低浓度溴氰菊酯的降解规律及其动力学研究[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(5): 1725 – 1728.
- CHI Heng, LI Jian, WANG Ji-qiao, et al. Residual elimination and kinetics of low concentration of deltamethr in water[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(5): 1725 – 1728.
- [12] 苏丹, 李培军, 鞠京丽. 六株真菌对土壤中芘和苯并芘的降解及其动力学[J]. 中国环境科学, 2006, 26(2): 188 – 191.
- SU Dan, LI Pei-jun, JU Jing-li. Degradation of pyrene and benzo[a]pyrene in soil by six strains of fungi and its kinetics[J]. *China Environmental Science*, 2006, 26(2): 188 – 191.
- [13] Chulhwan Park, Tak-Hyun Kim, Sangyong Kim, et al. Biokinetic parameter estimation for degradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) with *pseudomonas putida* KP-T201[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2002, 94(1): 57 – 61.
- [14] Thomas J F, Karen C W, Jim C S, et al. Anaerobic transformation of 2,4,6-TNT by bovine ruminal microbes [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 314: 957 – 963.

Degradation of TNT in Aqueous Solution by Uncultured Soil Bacterium Clone UD3

LIN Hong-yan, LIN Yu-man, WEN Ye-ming, GAN Li, CHEN Zu-liang

(College of Environment Science and Engineering, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China)

Abstract: A strain isolated from a chemical plant discharge soil was used for the degradation of TNT with a high degrading efficiency. The strain was identified as uncultured soil bacterium clone UD3 (USBC) by PCR technique. Degradation of TNT in aqueous solution by the strain was studied. Results show that the optimum conditions are as follows: glucose concentration is $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; peptone concentration is $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; bacteria concentration is $0.02 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; pH value is 7; temperature is $30 \text{ }^\circ\text{C}$; reaction time is 24 h; 97.2% TNT is biodegraded by the strain when TNT concentration is $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; the degradation of TNT by USBC can be described by first-order dynamic equation.

Key words: environmental engineering; TNT; biodegradation; degrading characteristic; dynamics



《含能材料》编辑部开通远程稿件处理系统

本刊自 2009 年 1 月起正式开通远程稿件处理系统,欢迎大家登陆本刊网站(www.energetic-materials.org.cn)进行在线投稿,今后本刊将不再接受纸版打印稿和 E-mail 电子版投稿。对于 2008 年尚未发表的稿件本刊将继续采用电子邮件的方式与作者联系。

目前,系统还处于试运行阶段,如您在投稿或审稿过程中遇到任何问题请及时与编辑部联系(E-mail: hnc101@caep.ac.cn; Tel: 0816 – 2485362),以便系统更好地为您提供服务。本刊同时欢迎广大作者、读者注册后通过系统的互动管理或电子邮件、电话对本系统提出意见与建议。