

生物淋洗法修复 2,4-DNT-3-SA 污染土壤

张天宇¹ 赵泉林¹ 张振中² 姜振明² 苏宏平² 高学文² 叶正芳^{1,†}

1. 水沙科学教育部重点实验室, 北京大学环境科学与工程学院, 北京 100871; 2. 甘肃银光化学工业集团有限公司, 兰州 730090; † 通信作者, E-mail: yezhengfang@iee.pku.edu.cn

摘要 采用静态生物淋洗法处理含 2,4-二硝基甲苯-3-磺酸钠(2,4-DNT-3-SA)的土壤。考察供氧条件、土水比及温度对 2,4-DNT-3-SA 去除效果的影响, 结果表明, 在好氧、37°C、土水比为 10:5 的条件下, 2,4-DNT-3-SA 去除率最高, 达到 98.75%。采用高通量测序法分析土壤中微生物菌落结构及多样性, 结果表明, 土壤中的优势菌属主要为假单胞菌属、鞘脂菌属和芽孢乳杆菌属。

关键词 生物淋洗; 2,4-DNT-3-SA; 土壤; 高通量测序

中图分类号 X53

Treatment of 2,4-DNT-3-SA Contaminated Soil by a Biological Leaching Method

ZHANG Tianyu¹, ZHAO Quanlin¹, ZHANG Zhenzhong², JIANG Zhenming², SU Hongping²,
GAO Xuewen², YE Zhengfang^{1,†}

1. The Key Laboratory of Water and Sediment Science (MOE), Department of Environmental Engineering, Peking University, Beijing 100871; 2. Gansu Yinguang Chemical Industry Group Co., LTD, Lanzhou 730090;
† Corresponding author, E-mail: yezhengfang@iee.pku.edu.cn

Abstract A static biological leaching method was used to treat the 2,4-DNT-3-SA contaminated soil. The effects of oxygen conditions, soil to water ratio and temperature on the removal efficiency of 2,4-DNT-3-SA were evaluated. The result suggested that under the aerobic and 37°C conditions, the removal efficiency of 2,4-DNT-3-SA reached more than 98% when the ratio of soil to water was 10:5. High-throughput sequencing results indicated that the dominant bacteria in the soil were Genus *Pseudomonas*, *Sphingobium* and *Sporolactobacillus*.

Key words biological leaching; 2,4-DNT-3-SA; soil; high-throughput sequencing

2,4,6-三硝基甲苯(TNT)是最常见的炸药^[1], 在其生产过程中会产生一种“红水”。这种废水主要含有 4%~6%的 2,4-二硝基甲苯-3-磺酸钠(2,4-DNT-3-SA)和 2,4-二硝基甲苯-5-磺酸钠(2,4-DNT-5-SA)^[2-3]等硝基化合物, 在其排放和蒸发晾干的过程中对土壤造成污染。2,4-DNT-3-SA 对人体有致癌、致畸和致突变风险, 并损害人体肝脏、影响遗传等^[4-6], 对地下水和地表水具有巨大的环境风险。因此, 对硝基化合物污染土壤进行无害化处理是十分必要的。

炸药污染土壤的修复方法主要有物理法、化学法和生物法。物理法主要包括填埋法、填海法以及吸附法^[7], 其本质是将污染物迁移, 未从根本上解决污染问题。化学法主要包括化学淋洗^[8]、臭氧氧化^[9]、亚临界水氧化^[10]、Fenton 氧化^[11]以及金属还原法^[12], 这些方法对污染物的破坏彻底, 操作简便, 但成本高, 同时容易造成二次污染。生物法因污染物降解彻底且成本低廉而被广泛应用。Clark 等^[13]采用生物泥浆法和土壤耕作法对美国路易斯安那州

的炸药污染土壤进行修复,均取得了良好的效果。Anasonye 等^[14]发现真菌 *P. velutina*, 用其修复 TNT 含量高达 1000 mg/kg 的土壤, TNT 的去除率达 70%。Khan 等^[15]采用 16 rRNA 测序手段,确定了一系列新型的可高效去除环三亚甲基三硝胺(RDX)的固氮菌。

此前的研究大多偏向 TNT、1,3,5,7-四硝基-1,3,5,7-四氮杂环辛烷(HMX)和 RDX 等常见炸药污染物,对 2,4-DNT-3-SA 的去除方法鲜有研究。本实验采用静态生物淋洗法,考察土水比、供氧条件及温度对土壤中 2,4-DNT-3-SA 去除效果的影响,从而确定去除 2,4-DNT-3-SA 的最佳工艺参数,并采用高通量测序法分析和明确土壤中的微生物群落特性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

污染土壤来自甘肃省某化工集团,土壤中 2,4-DNT-3-SA 的含量约为 2400 mg/kg,过 1 mm 孔径筛备用, B925 微生物由北京丰泽绿源环境技术有限公司提供,微生物土壤试剂盒购自 OMEGA 公司。

1.2 微生物培养基配制

富集培养基:将 1 g 葡萄糖, 2 g K_2HPO_4 , 2 g NaCl, 1 g NH_4Cl , 10 mg $FeCl_3$, 10 mg $CaCl_2$, 20 mg $MgSO_4$ 和 5 mg $ZnSO_4$ 加入 1 L 蒸馏水中,调整 pH 为 7, 121°C 灭菌锅中灭菌 20 分钟。

降解培养基:配制浓度为 100 mg/L 的 2,4-DNT-3-SA 水溶液,加入 2 g K_2HPO_4 , 2 g NaCl, 1 g NH_4Cl , 10 mg $FeCl_3$, 10 mg $CaCl_2$, 20 mg $MgSO_4$ 和 5 mg $ZnSO_4$, 调整 pH 为 7, 121°C 灭菌锅中灭菌 20 分钟。

菌液配制:取 20 g B925 冻干粉微生物置于富集培养基中,于 30°C, 150 r/min 摇床中富集培养 5 天,取 100 mL 富集菌液加入降解培养基中,于同样的摇床条件下驯化培养 7 天,将培养基稀释使用。

1.3 实验方法

好氧实验:取 100 g 污染土壤加入 150 mL 锥形瓶中,加入一定量的菌液配制成土水比(w/v)分别为 10:3, 10:5 和 10:7 的混合匀浆,用带孔封口膜封口,分别置于 30°C 和 37°C 的恒温培养箱中。每隔一定时间,取土样测定 2,4-DNT-3-SA 含量。每个样品设置 3 组重复。

厌氧实验:混合匀浆配置方法同好氧实验。对配好的混合匀浆,采用氮气曝气装置充氮 30 分钟,

将瓶中氧气排干后迅速盖上玻璃塞,分别置于 30°C 和 37°C 恒温培养箱中,定期取样检测,每次取样后重复排气操作。每组设 3 个重复,反应装置见图 1。

确定最佳的反应土水比和温度后,在相应的条件下,每隔 6 天分别从好氧和厌氧反应装置中取土样,提取微生物 DNA 进行测序,共取得 4 组样品,好氧装置样品命名为 A,厌氧装置样品命名为 B。A1, A2, A3 和 A4 以及 B1, B2, B3 和 B4 分别代表不同时间的 4 组好氧和厌氧样品。

1.4 分析方法

1.4.1 土壤中 2,4-DNT-3-SA 含量分析方法

土壤中 2,4-DNT-3-SA 含量测定采用高效液相色谱法^[16]。将土样置于冷冻干燥机中干燥 24 小时,取 2 g 冷干后的土样,加入 10 mL 水涡旋震荡 30 秒,然后在恒温超声萃取仪中超声 18 小时,离心取上清液,过 0.45 μm 滤膜,测定滤液中 2,4-DNT-3-SA 浓度。

1.4.2 土壤中微生物群落测定方法

采用高通量测序法,对土壤中微生物群落结构与多样性进行检测与分析。高通量测序操作由北京诺禾致源生物信息科技有限公司完成,基于 Illumina HiSeq 测序平台,首先利用双末端测序(Paired-End)方法,构建小片段文库进行双末端测序,通过对 Reads 拼接过滤,基于不同水平对微生物的门、纲、目、科、属进行物种注释及丰度分析,揭示样品的物种构成,并通过进一步的 α 多样性分析(alpha diversity)揭示样品之间的差异。

2 结果分析

2.1 反应条件对去除效果的影响

2.1.1 好氧条件下土水比对去除效果的影响

在 30°C、好氧条件下,考察土水比对 2,4-DNT-

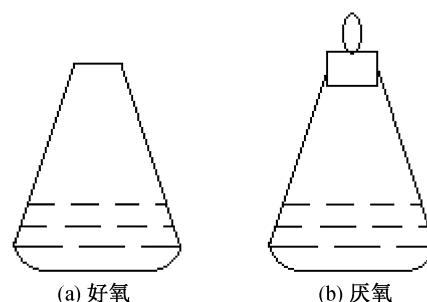


图 1 好氧/厌氧实验装置

Fig. 1 Experimental facilities under aerobic and anaerobic conditions

3-SA 去除的影响, 实验结果如图 2 所示。从图 2 可知, 随着修复时间变长, 2,4-DNT-3-SA 的浓度明显下降。经过 25 天的修复后, 在 10:3, 10:5 和 10:7 的土水比下, 2,4-DNT-3-SA 浓度从 2400 mg/kg 分别下降到 112.83, 60.16 和 108.53 mg/kg, 去除率分别为 95.3%, 97.5%和 95.5%, 这与辛宝平等^[17]的研究结果类似。随着土水比上升, 2,4-DNT-3-SA 去除速率明显升高, 可能是因为水含量的增加导致泥浆中土壤、微生物与营养物质三者之间的传质速度加快。前 15 天, 土壤中 2,4-DNT-3-SA 呈线性下降趋势, 之后下降速度开始逐渐变慢。这是因为在反应前期, 使用的菌液经过降解培养基的驯化, 富集了大量可降解 2,4-DNT-3-SA 的菌种, 在这些菌种的作用下, 2,4-DNT-3-SA 含量呈线性下降, 之后由于土壤中营养物质消耗, 微生物代谢减缓, 2,4-DNT-3-SA 降解速率也逐渐变慢。

2.1.2 厌氧条件下土水比对去除效果的影响

在 30℃ 条件下, 厌氧反应装置中 2,4-DNT-3-SA 浓度随时间的变化如图 3 所示。从图 3 可知, 厌氧条件下, 2,4-DNT-3-SA 的去除趋势与好氧条件下基本上一致, 随着土水比的升高, 2,4-DNT-3-SA 的去除速率也越来越高。经过 25 天的修复后, 3 组样品中 2,4-DNT-3-SA 的去除率分别为 90.45%, 93.55%和 91.33%, 均低于对应的好氧样品去除率。这可能是因为降解过程中产生的亚硝酸盐等中间产物积累在土壤中, 对微生物生长有抑制作用, 导致去除率降低^[18]。

2.1.3 温度对去除效果的影响

上述研究结果显示: 随着土水比的增大, 2,4-DNT-3-SA 的去除速率增大, 但在降解后期, 水土

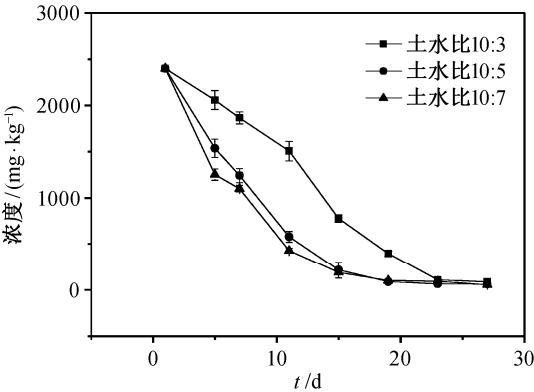


图 2 好氧条件下土水比对 2,4-DNT-3-SA 去除效果的影响
Fig. 2 Effect of the ratio of soil to water on the removal of 2,4-DNT-3-SA under aerobic condition

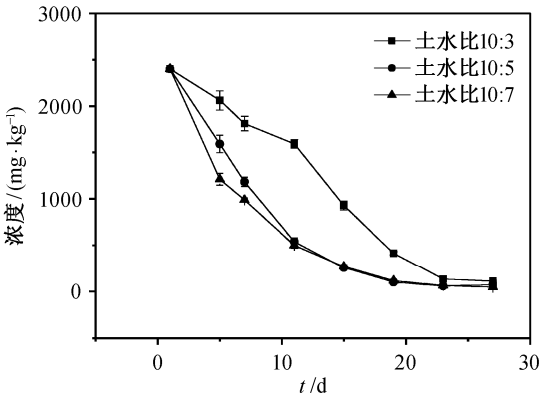


图 3 厌氧条件下土水比对 2,4-DNT-3-SA 去除效果的影响
Fig. 3 Effect of the ratio of soil to water on the removal of 2,4-DNT-3-SA under anaerobic condition

比为 10:5 与 10:7 的样品中 2,4-DNT-3-SA 的去除速率基本上一致, 所以采用 10:5 的土水比, 对比好氧与厌氧装置中温度对去除效果的影响, 结果如图 4 所示。从图 4 可以看出, 4 种情况下, 2,4-DNT-3-SA 最终的去除率相差不大, 但随着温度升高, 去除速率明显变快, 37℃ 时好氧及厌氧条件下经 15 天修复的土壤中 2,4-DNT-3-SA 的去除率均已达到 90%, 而 30℃ 条件下要 20 天左右才能达到相同的去除率。这是因为适当升高温度可以促进微生物的生长繁殖, 37℃ 条件下微生物的活性更强^[19], 同时温度升高可以促进土壤颗粒上有机物的解吸^[20-21], 所以降解效率更高。

2.2 好氧/厌氧条件下最佳反应条件的确定

经过 25 天的修复, 不同反应条件下, 2,4-DNT-3-SA 的最终去除率如图 5 所示。从图 5 可知, 在 12 种反应条件下, 2,4-DNT-3-SA 的去除率均达到 90% 以上, 说明生物淋洗法修复 2,4-DNT-3-SA 污

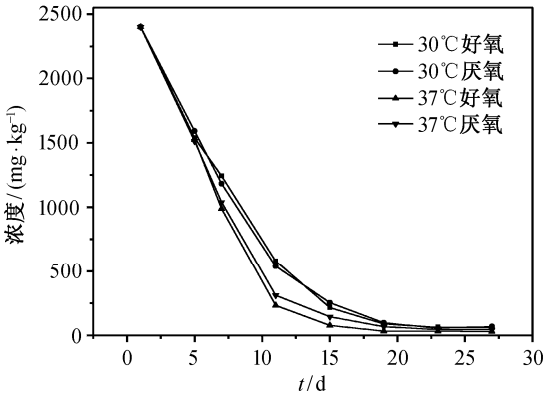


图 4 温度对 2,4-DNT-3-SA 去除效果的影响
Fig. 4 Effect of temperature on the removal of 2,4-DNT-3-SA

染土壤具有很强的适应性。根据以上试验结果可知,好氧和厌氧降解的最佳反应条件均为土水比 10:5, 37°C。后续的微生物测序研究在上述最佳反应条件下进行。

2.3 高通量测序结果

高通量测序是一种新型的分子生物学技术,相比此前常用的 DGGE (变形梯度凝胶电泳)和 TGGE (温度梯度凝胶电泳)^[22-23]技术,高通量测序具有成本低和错误率低等优点,所以越来越多地应用于土壤和废水生物处理领域^[24]。

2.3.1 微生物多样性分析

Shannon 和 Simpson 指数是用来表示微生物 α 多样性的指数^[25-26],计算公式如下:

$$H' = -\sum_{i=1}^S P_i \ln P_i, \quad (1)$$

$$D = 1 - \sum_{i=1}^S P_i^2, \quad (2)$$

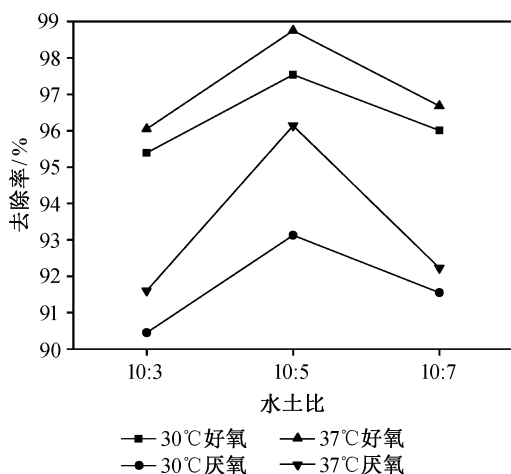
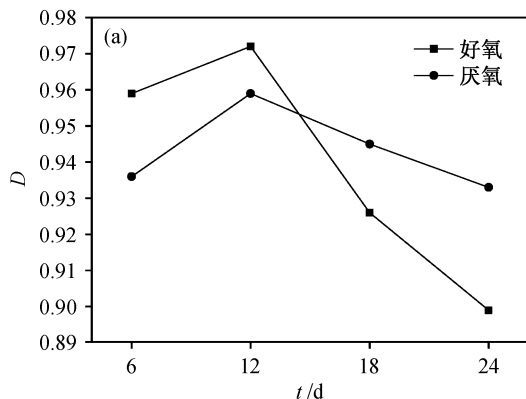


图 5 不同反应条件的 2,4-DNT-3-SA 最终去除率
Fig. 5 Removal of 2,4-DNT-3-SA under different condition



其中, H' 和 D 分别代表 Shannon 指数和 Simpson 指数, S 为种数, P_i 为样品中属于第 i 种个体的比例。

各个样品的指数分布情况如图 6 所示,可以看出,土壤中微生物的 Simpson 和 Shannon 指数随时间变化呈明显的先上升、后下降趋势。这可能是因为反应开始阶段,土壤中含有丰富的腐殖质,可以作为微生物的营养源,多种微生物可以共存;在培养后期,随着腐殖质等营养的消耗,微生物之间的竞争越来越激烈,生存环境逐渐恶化,部分竞争力不足的微生物逐渐被淘汰,导致多样性指数下降。

2.3.2 基于门水平的细菌群落结构分析

反应装置中,基于门水平的微生物群落结构分析见表 1。由表 1 可知,采用高通量测序法检测到的土壤微生物丰富性极高,可以全面地反映土壤中微生物的构成。其中,土壤中优势菌门主要为变形菌门(Proteobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes),两者合计占全部微生物比例达 90% 左右,其余如放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、绿弯菌门(Chloroflexi)及芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)等也占据一定的优势地位。

2.3.3 基于属水平的细菌群落结构分析

对平均相对比例占总数 0.1% 以上的微生物菌属进行筛选分析,结果显示,好氧和厌氧反应装置中菌属差异明显,说明不同的生存环境和供氧条件对细菌群落结构的影响很大。优势菌属主要包括 *Sporolactobacillus* (芽孢乳杆菌属)、*Sphingobium* (鞘脂菌属)、*Pseudomonas* (假单胞菌属)、*Lactococcus* (乳球菌属)、*Clostridium* (梭菌属)、*Citrobacter* (柠檬酸杆菌属)、*Cellulomonas* (纤维菌属)和 *Azospirillum* (固氮螺菌属)。其中,好氧反应装置中主要包含假单胞菌属,厌氧反应装置中含量最高的

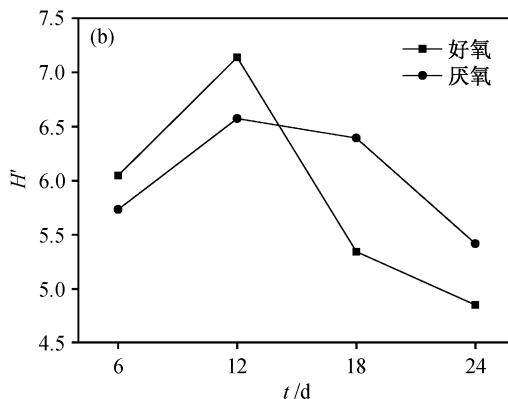


图 6 Simpson 指数(a)和 Shannon 指数(b)随时间变化

Fig. 6 Variation of Simpson index (a) and Shannon index (b) along with the change of time

表 1 土壤中微生物优势菌门相对丰度
Table1 Relative abundance of dominant bacteria at the phyla level in the soil

门	相对丰度/%							
	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	B4
Proteobacteria	60.64	78.03	34.95	40.39	56.64	38.64	87.65	27.86
Firmicutes	26.83	15.50	28.09	46.81	35.74	36.93	5.81	59.32
Actinobacteria	8.68	3.11	29.87	9.14	4.77	18.98	5.24	9.86
Bacteroidetes	3.10	2.04	0.78	1.82	1.70	4.21	0.27	1.95
Chloroflexi	0.11	0.22	4.29	0.67	0.46	0.56	0.25	0.44
Gemmatimonadetes	0.02	0.09	0.61	0.27	0.06	0.09	0.13	0.07
Verrucomicrobia	0.01	0.41	0	0.09	0	0	0.39	0.01
Cyanobacteria	0.02	0	0	0.24	0.06	0.08	0.01	0
Thermotogae	0	0	0.22	0	0.03	0	0	0.12
Crenarchaeota	0	0	0	0	0	0	0.07	0

表 2 土壤中优势菌属的相对丰度
Table 2 Relative abundance of dominant bacteria at the genus level in the soil

属	相对丰度/%							
	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	B4
<i>Sporolactobacillus</i>	1.88	8.96	8.45	9.67	1.51	3.71	3.80	16.1
<i>Sphingobium</i>	4.00	4.88	4.76	11.08	24.87	16.87	16.69	15.15
<i>Pseudomonas</i>	20.51	16.68	26.59	26.31	9.49	10.09	12.22	7.63
<i>Lactococcus</i>	7.89	5.78	2.29	0.08	4.05	4.24	5.72	0.90
<i>Clostridium</i>	1.82	4.15	6.15	0.27	2.16	4.00	3.02	7.29
<i>Halomonas</i>	0.13	0.35	0.49	0	0.09	0.85	0.60	0.49
<i>Staphylococcus</i>	0	0.09	0	2.62	0	0.50	0.08	3.33
<i>Citrobacter</i>	2.3	1.64	10.64	3.73	1.95	3.58	4.43	5.39
<i>Cellulomonas</i>	4.38	0.69	0.50	0.20	0.28	0.46	1.48	4.13
<i>Azospirillum</i>	0.46	0.39	0.23	0.76	0.70	0.88	0.34	3.12

为鞘脂菌属。从表 2 可以看出，不同样本中优势菌属的相对丰度差别明显，说明土壤中污染物浓度对微生物群落结构与分布均匀程度有很大影响^[27]。

3 结论

本研究采用生物淋洗法修复 2,4-DNT-3-SA 污染土壤，考察了供氧条件、土水比及温度对去除效果的影响，得到如下结论。

1) 生物淋洗法对土壤中 2,4-DNT-3-SA 有很好的去除效果，在不同温度、土水比和供氧条件下，2,4-DNT-3-SA 的去除率均可达 90% 以上。提高温度、土水比，可以加快 2,4-DNT-3-SA 的去除速率，但对去除率影响不大。

2) 2,4-DNT-3-SA 的最佳去除条件为好氧、37℃、土水比 10:5。在此条件下，系统反应 15 天，2,4-DNT-3-SA 的去除率即可达到 90%，最终去除率在 98% 以上。

3) 在降解 2,4-DNT-3-SA 的系统中，主要的优势菌属为假单胞菌属、鞘脂菌属和芽孢乳杆菌属。

参考文献

[1] Anasonye F, Festus E, Winquist K T, et al. Bioremediation of TNT contaminated soil with fungi under laboratory and pilot scale conditions. International Biodeterioration & Biodegradation, 2015, 105: 7–12

[2] 徐文杰, 张振中, 赵泉林, 等. 物化法修复火炸药污染土壤研究进展. 环境科学与技术, 2015, 38(6): 294–298

[3] Tognetti V B, monti M R, Valle E M, et al. Detoxification of 2,4-dinitrotoluene by transgenic tobacco plants expressing a bacterial flavodoxin. Environment Science & Technology, 2007, 41(41): 4071–4076

[4] Wen Donghui, Li Guozheng, Xing Rui, et al. 2,4-DNT

- removal in intimately coupled photobiocatalysis: the roles of adsorption, photolysis, photocatalysis, and biotransformation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 95(1): 263–272
- [5] Wintz H, Yoo L J, Loguinov A, et al. Gene expression profiles in fathead minnow exposed to 2,4-DNT. *Toxicological Sciences*, 2006, 94(1): 71–82
- [6] Gong P, Kuperman R G, Sunahar G I. Genotoxicity of 2,4- and 2,6-dinitrotoluene as measured by the Tradescantia micronucleus (Trad-MCN) bioassay. *Mutation Research/Genetic Toxicology & Environmental Mutagenesis*, 2003, 538(1/2): 13–18
- [7] 譙华. TNT 污染土壤的生物泥浆反应器修复机理研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2011: 18–19
- [8] 巩宗强, 李培军, 台培东, 等. 污染土壤的淋洗法修复研究进展. *环境污染治理技术与设备*, 2002, 3(7): 45–50
- [9] Cassidy D, Northup A, Hampton D. The effect of three chemical oxidants on subsequent biodegradation of 2,4 -dinitro-toluene (DNT) in batch slurry reactors. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2009, 84(6): 820–826
- [10] Kalderis D, Hawthorne S B, Clifford A A, et al. Interaction of soil, water and TNT during degradation of TNT on contaminated soil using SB critical water. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 159(2): 329–334
- [11] Bier E L, Singh J, Li Zhengming, et al. Remediating hexahydro-1,3,5-tribitro-1,2,5-triazine-contaminated water and soil by Fenton oxidation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1999, 18(6): 1078–1084
- [12] Ge H, Jensen P D, Batstone D J. Increased temperature in the thermophilic stage in temperature phased anaerobic digestion (TPAD) improves degradability of waste activated sludge. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 187: 355–361
- [13] Clark B, Boopathy R. Evaluation of bioremediation methods for the treatment of soil contaminated with explosives in Louisiana Army Ammunition Plant, Minden, Louisiana. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 143(3): 643–648
- [14] Anasonye F, Winquist E, Räsänen M, et al. Bioremediation of TNT contaminated soil with fungi under laboratory and pilot scale conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2015, 105: 7–12
- [15] Khan M I, Yang J, Yoo B, et al. Improved RDX detoxification with starch addition using a novel nitrogen-fixing aerobic microbial consortium from soil contaminated with explosives. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, 287(6): 243–251
- [16] Preiss A, Bauer A, Berstermann H M, et al. Advanced high-performance liquid chromatography method for highly polar nitroaromatic compounds in ground water samples from ammunition waste sites. *Journal of Chromatography*, 2009, 1216(25): 4968–4975
- [17] 辛宝平, 卢佳新, 李是坤, 等. 泥浆体系中的 TNT 生物降解研究. *北京理工大学学报(自然科学版)*, 2008, 28(7): 638–642
- [18] Boopathy R, Manning J, Kulpa C F. Biotransformation of explosives by anaerobic consortia in liquid culture and in soil slurry. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1998, 41(1): 67–74
- [19] 譙华, 沈东升, 王何灵, 等. 生物泥浆反应器修复炸药污染土壤的影响因素. *科技通报*, 2009, 25(2): 238–242
- [20] Singh S. Sensors — an effective approach for the detection of explosives. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 144(s1/s2): 15–28
- [21] Okuda T, Alcántara-Garduño E, Suzuk M, et al. Enhancement of biodegradation of oil adsorbed on fine soils in a bioslurry reactor. *Chemosphere*, 2007, 68(2): 281–286
- [22] Muyzer G, Wall E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59: 695–700
- [23] 肖勇, 杨朝晖, 曾光明, 等. DEEG 研究出来垃圾渗滤液序批式生物膜反应器(SBBR)中的细菌多样性. *环境科学*, 2007, 28(5): 1095–1101
- [24] 王洁. 高通量测序等分子生物学技术研究研究填埋场生物反应器脱氮微生物群落变化[D]. 上海: 华东师范大学, 2014
- [25] Whittaker R H. Evolution and measurement of species diversity. *Taxon*, 1972, 21(2/3): 213–251
- [26] Bitetti M S D. The distribution of grooming among female primates: testing hypotheses with the Shannon-Wiener diversity index. *Behaviour*, 2000, 137(11): 1517–1540
- [27] 杨萌青, 李立明, 李川, 等. 石油污染土壤微生物群落结构与分布特性研究. *环境科学*, 2013, 34(2): 789–794