

一株偏二甲肼降解菌的筛选及其降解特性研究

夏本立^{1,2}, 范春华^{1,2}, 王焯军¹

1. 第二炮兵工程学院 503 室, 西安 710025
2. 总装备部后勤部防疫大队, 北京 100101

摘要 从驯化的活性污泥中筛选得到降解偏二甲肼 (UDMH) 的目标菌株。目标菌株纯化后通过 Biolog 微生物鉴定系统鉴定为 *Stenotrophomonas*。该菌对数生长期是 12—18h, 能在以偏二甲肼为唯一碳源、氮源的培养基中生长。考察了温度、pH 值、外加碳源、初始偏二甲肼质量浓度对降解效果的影响。结果表明, 降解偏二甲肼的最适生长温度为 30—35℃, 最适 pH 值为 7.2—8.0, 添加葡萄糖能够促进偏二甲肼的降解, 偏二甲肼最适初始质量浓度为 50—80mg/L。最适条件下, 偏二甲肼 72h 累计降解率最高可达 96.19%。

关键词 高效菌; 偏二甲肼; 生物降解

中图分类号 TJ55, TQ85+.4

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2012.08.010

Isolation and Identification of a UDMH Degrading Strain and Its UDMH Degrading Characteristics

XIA Benli^{1,2}, FAN Chunhua^{1,2}, WANG Xuanjun¹

1. The Second Artillery Engineering College, Xi'an 710025, China
2. Epidemic Prevention Team, Logistics Department, General Armament Department, Beijing 100101, China

Abstract Unsymmetrical dimethylhydrazine is a high toxic substance, and the UDMH wastewater has always been an issue. A strain of bacteria was isolated to be used to degrade the UDMH wastewater. The strain of bacteria was screened from the activated sludge, that had been acclimated with the UDMH, and it could grow well in the medium with the UDMH as the only carbon and nitrogen source. It was identified to be *Stenotrophomonas* by the Biolog microbial identification system after the purification. Its logarithmic phase was from the 12th to the 18th hour in broth. The influencing factors include the temperature, the pH value, the initial UDMH concentration and the added different carbon sources, and their effects on the degradation were investigated. The results show that the optimal temperature and pH value for the strain growth were 30 to 35℃ and 7.2 to 8.0, respectively, and the optimal initial concentration of the UDMH was 50 to 80mg/L. And the addition of glucose could promote the degradation of the UDMH. Under the temperature of 35℃, the medium pH value of 7.2, the initial UDMH concentration of 80mg/L, and the inoculation of 1%, the highest degradation rate of the UDMH was 96.19% in 72h. When the initial UDMH concentration was changed to 120mg/L, the degradation rate of the UDMH was 71.87%, which shows that the strain of bacteria has a certain tolerance to the UDMH.

Keywords efficient bacteria; UDMH; biodegradation

0 引言

偏二甲肼(UDMH)分子式为 $(\text{CH}_3)_2\text{NNH}_2$, 是一种易燃、易挥发、具有强烈刺激性鱼腥臭味的无色或微黄色透明液体, 是目前被广泛应用的液体推进剂。偏二甲肼属于高毒物质,

易通过吸入、接触和误食等引起中毒。长期接触低浓度偏二甲肼, 会出现注意力不集中、记忆力减退、食欲不振、肝功能异常等症状^[1-3]。在偏二甲肼的生产使用过程中会产生大量的废水, 废水中偏二甲肼的质量浓度最低时有 0.1mg/L, 最高时

收稿日期: 2011-11-24; 修回日期: 2012-03-10

基金项目: 总装备部后勤部 2009 年度课题 (ZH2009045)

作者简介: 夏本立, 副主任技师, 研究方向为推进剂防护、检测与特种污染治理, 电子信箱: chunhua.fan@163.com

可达到 2105mg/L。偏二甲胂废水成分复杂,降解过程中还会产生一些毒性和稳定性比偏二甲胂强的二次污染物,例如偏胂、甲醛、二甲胺和亚硝基二甲胺等^[4-5]。

偏二甲胂废水的传统处理方法,如活性炭吸附法、离子交换法、化学焚烧法、臭氧氧化法、氯化法等,存在能耗高、运行成本高、安全系数低等问题。近年来的一些新方法,如光催化氧化法、超临界水处理法、Fenton 试剂氧化法等,在应用上技术尚不成熟^[6]。生物法投资小成本低,但处理效率低。高效菌能有效提高生物法的处理效率,是生物处理方法的有效补充和强化。高效菌技术在焦化、印染等行业废水的处理中已有成功的先例^[7-9]。

本研究从驯化的活性污泥中筛选出了能以偏二甲胂为唯一碳源的菌株,并对其降解特性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 培养基

分离培养基:蛋白胨 5.0g, 酵母膏 5.0g, KH_2PO_4 1.0g, KH_2PO_4 1.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, CaCl_2 0.01g, UDMH 40—50mg, 去离子水 1000mL, 矿物质元素适量, pH 值为 7.2—7.4。

肉汤培养基:蛋白胨 10.0g, 牛肉浸出粉 3.0g, NaCl 5.0g, pH 值为 7.2—7.4。

含偏二甲胂培养基: NaCl 5.0g, K_2HPO_4 1.0g, KH_2PO_4 1.0g, MgSO_4 0.2g, CaCl_2 0.01g, UDMH 30—120mg, 水 1000mL, 矿物质元素适量, pH 值为 7.2—7.4。

分离培养基用于细菌的分离纯化;普通肉汤培养基用于生长曲线的测定;含偏二甲胂液体培养基用于细菌的筛选和偏二甲胂的降解实验。

1.2 菌株的筛选、分离、鉴定和生长曲线的测定

以偏二甲胂为唯一碳源、氮源分离出混合菌。富集后反复平板划线分离,得到纯种菌。对分离到的菌株进行形态观察,再根据 Biolog 微生物鉴定系统鉴定至属。

将纯化后的菌株接入普通肉汤培养基中,30℃摇床空气浴振荡培养,测其 OD_{600} 值。摇床转速是影响溶解氧浓度的主要因素,根据文献选择摇床转速为 140r/min,监测溶解氧的质量浓度为 2.5mg/L 左右^[7-9]。

1.3 菌株最适培养条件的研究

细菌处于对数生长期时,生命力旺盛,代谢活跃,对新环境适应力强,接种后能迅速生长,因此根据生长曲线确定菌的对数生长期。实验用菌液采用处于对数生长期的活化液,接种量为 1%。

将活化后的菌株接入含偏二甲胂培养基中,分别于 20,25,30,35,40℃,在摇床转速为 140r/min 条件下振荡培养 3d,检测偏二甲胂质量浓度,评价培养温度对菌体降解偏二甲胂的影响。

将活化后的菌株接入 pH 值分别为 5.6,6.4,7.2,8.0,8.8 的含偏二甲胂培养基中,在摇床转速为 140r/min 条件下振荡

培养 3d,检测偏二甲胂质量浓度,评价培养基 pH 值对菌体降解偏二甲胂的影响。

将活化后的菌株接入偏二甲胂质量浓度分别为 30,50,80,100,120mg/L 的培养基中,在摇床转速为 140r/min 条件下振荡培养 3d,检测偏二甲胂浓度,评价偏二甲胂初始质量浓度对菌体降解偏二甲胂的影响。

将活化后的菌株接种于添加 0.1% 的不同碳源的培养基中,在 35℃、摇床转速为 140r/min 条件下振荡培养 3d,检测偏二甲胂质量浓度,评价不同外加碳源对菌体降解偏二甲胂的影响^[10]。因偏二甲胂是氮源的唯一来源,外加碳源的加入只是改变 C/N,并不会引起菌种退化。

以偏二甲胂的降解率作为评价指标,计算公式为

$$P = (1 - \frac{S_t}{S_0}) \times 100\%$$

其中, P 为 UDMH 降解率; S_0 为 UDMH 初始质量浓度, mg/L; S_t 为 t 时刻 UDMH 质量浓度, mg/L。

1.4 菌株降解能力研究

将驯化后的菌液接入含偏二甲胂培养基中,振荡培养,测其偏二甲胂含量。计算偏二甲胂降解率。

2 结果与讨论

2.1 菌种分离与鉴定

降解菌经驯化、分离纯化后,取单菌落进行镜检,如图 1 所示,荧光显微镜下观察细胞为球菌。本实验菌株经 Biolog 微生物自动鉴定系统鉴定^[11]。结果表明其首选属种为 *Stenotrophomonas*, 相似度 (SIM 值) 为 0.98, 可信度高。

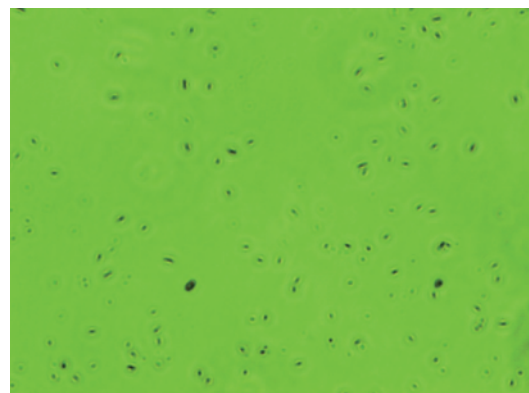


图 1 *Stenotrophomonas* 荧光显微照片
Fig. 1 Microscope photo of *Stenotrophomonas*

2.2 菌体的生长曲线

细菌处于对数生长期时,生命力旺盛,代谢活跃,对新环境适应力强,接种后能迅速生长,因此根据菌株 OD_{600} 值随时间的变化情况绘制出生长曲线(图 2)。由图 2 可以看出,菌体 12h 后进入对数生长期,18h 进入稳定期。因此确定采用菌龄为 18h 的菌株进行接种, OD_{600} 值在 2.0 左右。

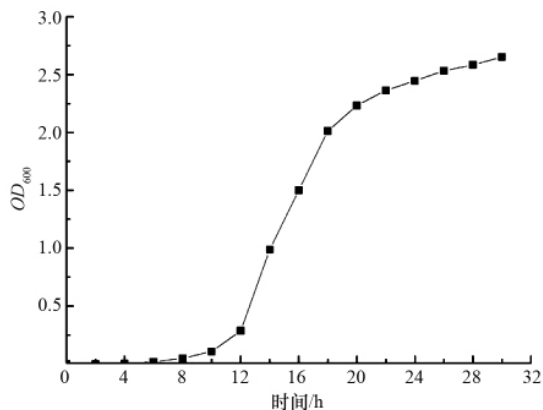


图2 菌体生长曲线
Fig.2 Growth of bacterial strain

2.3 菌株最适培养条件的研究

2.3.1 温度对菌体生长的影响

为了确定降解菌在实验体系中的最佳降解条件,在初始偏二甲胂质量浓度为 50mg/L,在不同温度下,测定偏二甲胂的降解率。

如图 3 所示,在 35℃时,偏二甲胂降解效果最好,72h 偏二甲胂降解率达到 86.33%。在低温 20℃时,偏二甲胂的降解率较低,这是因为低温时酶的活性较低,细菌代谢缓慢。在 30—35℃时,细菌对偏二甲胂的降解率差别并不明显,在 40℃时,72h 偏二甲胂的降解率也到达了 83.56%,说明细菌对高温有一定的耐受性。本研究中实验菌株的最佳培养温度为 30—35℃。

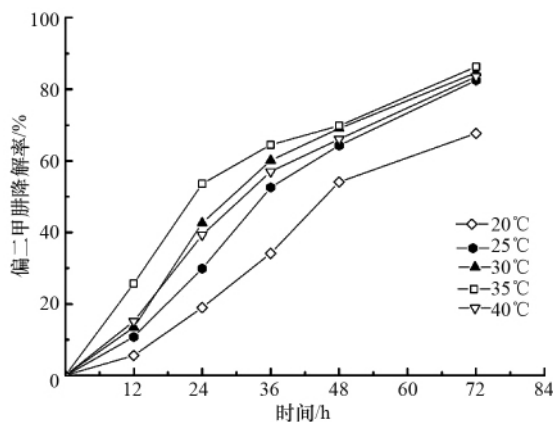


图3 不同温度下偏二甲胂降解率变化曲线
Fig.3 Removal rates of UDMH under different temperature

2.3.2 pH 值对菌体生长的影响

将菌液接入到初始偏二甲胂质量浓度为 50mg/L,且不同 pH 值的培养基中,35℃空气浴振荡培养,分别测定偏二甲胂降解率。

如图 4 所示,培养基 pH 值变化对菌株降解偏二甲胂影响明显,酸度、碱度较大时,菌株对偏二甲胂降解率较低。pH

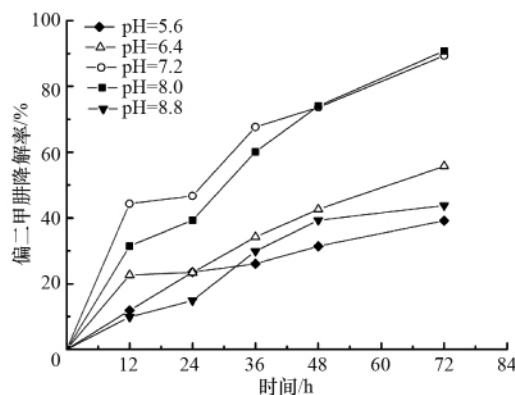


图4 不同 pH 值下偏二甲胂降解率变化曲线
Fig.4 Removal rates of UDMH under different pH values

值为 7.2—8.0 时菌株降解偏二甲胂较好,72h 偏二甲胂降解率为 90%左右。弱碱性条件更适合本实验菌株生长。本实验菌株的最适 pH 值为 7.2—8.0。

2.3.3 不同偏二甲胂质量浓度对菌体生长的影响

在 35℃,pH 值为 7.2,空气浴振荡培养条件下,测定菌株在偏二甲胂的初始质量浓度分别为 30,50,80,100,120mg/L 时的降解能力,结果见图 5。菌株在偏二甲胂初始质量浓度为 30mg/L 时,72h 偏二甲胂降解率为 83.77%。随着偏二甲胂初始质量浓度的不断上升,72h 累计降解率先上升后下降。初始偏二甲胂质量浓度为 80mg/L 时,72h 降解率最高,为 89.04%。偏二甲胂质量浓度低时,碳源、氮源短缺,不能满足细菌新陈代谢和增殖需要,出现自氧化现象,不利于偏二甲胂的降解;随着偏二甲胂质量浓度的升高,毒性增强,偏二甲胂降解率降低。当初始偏二甲胂质量浓度为 120mg/L 时,偏二甲胂 72h 降解率仍然达到了 71.87%。这说明,本实验菌株对偏二甲胂一定的耐受性,有进一步研究的价值。

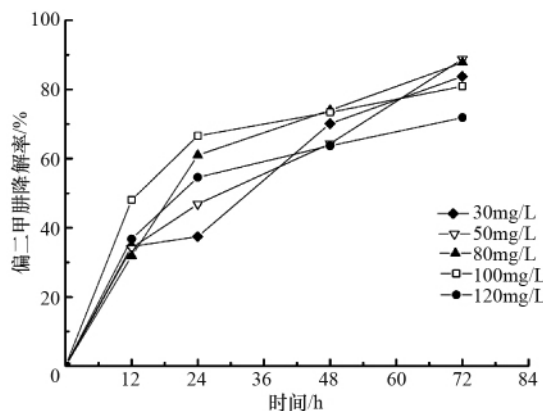


图5 不同偏二甲胂质量浓度对其降解率的影响
Fig.5 Effect of different UDMH-content on removal rates

2.3.4 不同外加碳源对偏二甲胂降解率的影响

在含偏二甲胂培养基中分别加入 0.1%乳糖、葡萄糖、蔗糖,接入菌液,在 35℃,pH 值为 7.2,偏二甲胂初始质量浓度

为 80mg/L, 空气浴振荡培养条件下, 测定偏二甲肼降解率。

从图 6 中可以看出, 外加葡萄糖时偏二甲肼的降解率最高, 但不同外加碳源之间差别并不明显。对比无外加碳源条件下, 外加碳源偏二甲肼的降解率提高了 6%。推测原因, 可能是在有外加碳源的条件下, 细菌易于增殖, 代谢旺盛, 促进了偏二甲肼的降解。

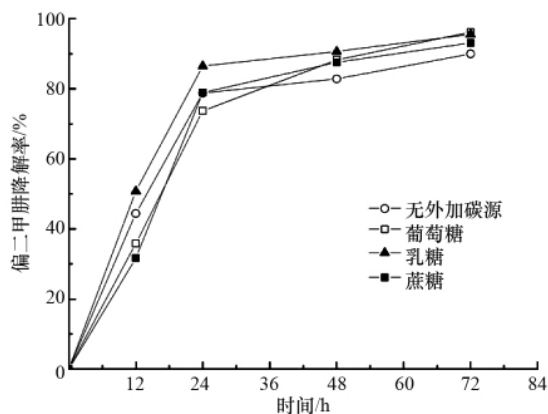


图 6 不同外加碳源对偏二甲肼降解率影响

Fig. 6 Removal rates of UDMH for different carbon sources

2.4 菌株降解偏二甲肼能力研究

通过以上实验取得菌株的最适培养条件为: 温度为 30—35℃、pH 值为 7.2—8.0, 偏二甲肼初始质量浓度为 50—80 mg/L, 外加葡萄糖碳源时效果最好。

在温度为 35℃, pH 值为 7.2, 摇床转速为 140r/min, 接种量 1%, 偏二甲肼初始质量浓度为 50mg/L 条件下, 进行降解实验; 因偏二甲肼有一定的还原性, 在空气中能被缓慢氧化, 因此同条件下设置空白作对照, 以更好说明菌对偏二甲肼的降解效果。如图 7 所示, 最适培养条件下偏二甲肼的降解率达到 96.19%, 比空白对照高出近 45%, 菌的降解效果明显。

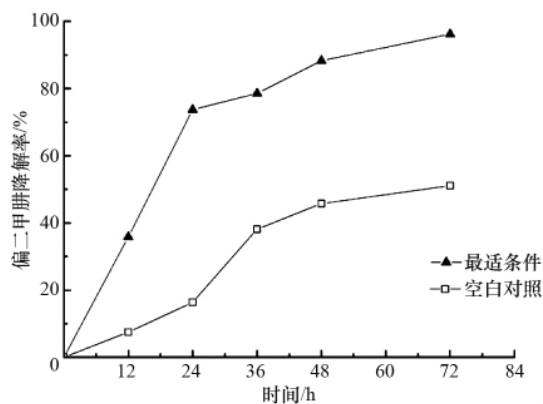


图 7 最适条件下偏二甲肼的降解率

Fig. 7 Removal rate of UDMH by bacterial strain under the optimal condition

3 结论

(1) 本实验分离出一株偏二甲肼降解菌, 经鉴定为

Stenotrophomonas。

(2) 该菌能以偏二甲肼为唯一碳源、氮源生长, 对数生长期是 12—18h。本实验菌株的最适生长温度为 30—35℃, 最适生长 pH 值为 7.2—8.0, 偏二甲肼最适初始质量浓度为 50—80mg/L。在实验体系中添加乳糖、葡萄糖、蔗糖 3 种碳源, 发现外加营养物质对降解明显有促进作用, 其中葡萄糖效果最好。在最适的培养条件下, 72h 偏二甲肼降解率最高可达 96.19%。

(3) 菌株在偏二甲肼的初始质量浓度低于 80mg/L 时, 72h 偏二甲肼降解率可达 96.19%。随着偏二甲肼质量浓度上升到 120mg/L, 72h 偏二甲肼降解率仍可达 71.87%。说明本菌株对偏二甲肼有一定的耐受性, 对治理偏二甲肼废水问题具有重要的应用价值。如何进一步提高菌株的降解能力并进行实际应用是今后的研究方向。

(4) 偏二甲肼氧化产物成分复杂, 会产生一些毒性和稳定性比偏二甲肼强的二次污染物例如偏脞、甲醛、二甲胺和亚硝基二甲胺等。实验未对降解产物进行检测, 后续实验将对偏二甲肼的降解产物做进一步的分析检测, 以检验该方法的有效性。

参考文献 (References)

- [1] Hung Y C, Sava V M, Blagodarsky V A, et al. Protection of tea melanin on hydrazine-induced liver injury[J]. *Life Science*, 2003, 72(9): 1061-1071.
- [2] Hussain S M, Frazier J M. Involvement of apoptosis in hydrazine induced toxicity in rat primary hepatocytes[J]. *Toxicol in Vitro*, 2003, 17(3): 343-355.
- [3] Anilakumar K R, Nagaraj N S, Santhanam K. Protective effects of amla on oxidative stress and toxicity in rats challenged with dimethylhydrazine [J]. *Nutrition Res*, 2004, 24(4): 313-319.
- [4] Fedorov L A. Liquid missile propellants in the former Soviet Union[J]. *Environmental Pollution*, 1999, 105(2): 157-161.
- [5] Milap A M, Harry H S. Oxidation of 1, 1-Dimethylhydrazine by oxygen [J]. *Inorg Chem*, 1981, 20(2): 426-429.
- [6] 王力, 张光友, 谭世语, 等. 偏二甲肼污水的处理技术现状与发展趋势 [J]. *导弹与航天运载技术*, 2006(1): 38-43.
Wang Li, Zhang Guangyou, Tan Shiyu, et al. *Missile and Space Vehicle*, 2006(1): 38-43.
- [7] Maranon E, Vazquez I, Rodriguez J, et al. Treatment of cokewastewater in a sequential batch reactor (SBR) at pilot plant scale [J]. *Bioresour Technol*, 2008, 99: 4192-4198.
- [8] Bielefeldt A B. *Water treatment industrial* [M]. Boulder: University of Colorado-Boulder, 2009.
- [9] Mojtaba T, Mozafar S, Somayeh B. Utilization of textile wastewater as carbon source by newly isolated *Haloarcula* sp IRU1: Optimization of conditions by Taguchi methodology [J]. *Clean Techn Environ Policy*, 2011, 13(3): 535-538.
- [10] Saito T, Brdjanovic D, Van Loosdrecht M C M. Effects of nitrite on phosphate uptake by phosphate accumulating organisms [J]. *Wat Res*, 2004, 38(17): 3760-3768.
- [11] Preston-Mafham J, Boddy L, Randerson P F. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilization profiles—a critique[J]. *FEMS Microb Ecol*, 2002, 42(1): 1-14.

(责任编辑 张军, 岳臣)