

Phân lập chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy trinitrotoluene (TNT) từ nguồn đất, nước ô nhiễm

Nghiêm Ngọc Hoa*, Nguyễn Hà Trung, Nguyễn Thị Tâm Thư, Phạm Kiên Cường

Viện Công nghệ mới, Viện Khoa học và Công nghệ quân sự.

*Email: nghiemnngochoa@gmail.com.

Nhận bài ngày 10/8/2021; Hoàn thiện ngày 30/10/2021; Chấp nhận đăng ngày 10/4/2022.

DOI: <https://doi.org/10.54939/1859-1043.j.mst.78.2022.132-139>

TÓM TẮT

TNT (2,4,6 trinitrotoluen) là loại thuốc nổ quan trọng có độ bền hóa học cao, tuy nhiên, nó cũng là hóa chất có độc tính cao. TNT có thể được phân hủy bằng các con đường khác nhau, trong đó có con đường phân hủy sinh học. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập các chủng vi sinh vật từ nguồn đất, nước bị ô nhiễm TNT và khảo sát khả năng phân hủy TNT của chúng. Hàm lượng TNT còn lại được đo bằng phương pháp quang phổ và được phân tích bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC). Theo kết quả phân tích đã thực hiện, hai chủng TN1 và Z121 có khả năng phân hủy TNT ở nồng độ ban đầu 50 mg/L với hiệu suất lần lượt là 50,24% và 65,28% sau 5 ngày nuôi cấy. Hai chủng này được giải trình tự thông qua phản ứng PCR với cặp mồi rARN 16S. Kết quả giải trình tự và so sánh trình tự trên ngân hàng gen chủng TN1 thuộc chi *Pseudomonas*, chủng Z121 thuộc chi *Klebsiella* với mã số đăng ký trên GenBank tương ứng là MZ165355.1 và MZ165349.1.

Từ khóa: Vi sinh vật; Phân lập; TNT.

1. MỞ ĐẦU

Việt Nam là một trong những quốc gia bị ô nhiễm bom mìn lớn nhất và chịu hậu quả nặng nề nhất trên thế giới. Những loại bom mìn khi chôn vùi dưới lòng đất hàng chục năm sẽ có nguy cơ lớn về việc rò rỉ thuốc nổ, trong đó thành phần chính là TNT (trinitrotoluene), RDX (hexogen), NG (nitroglycerin), DNT (dinitrotoluene),... TNT (2,4,6 trinitrotoluen) là loại thuốc nổ quan trọng có độ bền hóa học cao, tuy nhiên, nó cũng là hóa chất có độc tính cao. Hiện nay trên thế giới, có các phương pháp xử lý TNT bao gồm các phương pháp hóa học, phương pháp vật lý và phương pháp sinh học [3, 5-7]. Các quá trình phân giải TNT bằng con đường vật lý và hóa học như đốt, hấp phụ, hay thông qua quá trình oxy hóa nâng cao đã được nghiên cứu. Tuy nhiên, các phương pháp trên thường tạo ra một số sản phẩm trung gian có độc tính, xử lý kiểu ex situ (lấy chất ô nhiễm ở vùng ô nhiễm ban đầu, và xử lý ở nơi khác) và có chi phí đắt đỏ [4]. Xử lý TNT bằng cách đốt là phương pháp đem lại hiệu quả cao và được sử dụng rộng rãi nhất, nhưng đòi hỏi nhiên liệu giá thành cao và thường sinh ra môi trường các sản phẩm trung gian có độc tính. Oxy hóa nâng cao yêu cầu điều kiện phản ứng rất chặt chẽ. Xử lý TNT bằng biện pháp hấp phụ gặp khó khăn ở sự lưu giữ lại các hợp chất hữu cơ khác trên các hạt carbon hoạt tính, đưa đến sự hấp phụ TNT không hoàn toàn. Vì vậy, trong những năm gần đây người ta chú trọng đến việc xử lý TNT bằng con đường phân hủy sinh học. Sự phân hủy sinh học nói chung là một trong những giải pháp thân thiện với môi trường để xử lý các vấn đề ô nhiễm môi trường. Phân hủy sinh học có thể thực hiện in situ (xử lý ô nhiễm tại chỗ), giá rẻ, không đòi hỏi kỹ thuật hiện đại, do đó, có ưu thế hơn so với các phương pháp truyền thống. Phương pháp này sử dụng hệ vi sinh vật tự nhiên, thường là vi sinh vật, thực vật, và sản phẩm sinh ra từ chúng hoặc kết hợp các yếu tố trên nhằm tăng khả năng phân hủy các chất độc trong môi trường. Trong đó, vi sinh vật được ưu tiên sử dụng do khả năng trao đổi chất rất đa dạng của chúng, ... TNT có thể được phân hủy bằng cả con đường hiếu khí và kỵ khí theo con đường sinh học bằng nhiều loại vi sinh vật khác nhau như nấm (*Phanerochaete*), vi khuẩn hiếu khí (như *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Achromobacter*), vi khuẩn kỵ khí hoàn toàn (như *Clostridium*, *Desulfovibrio*).

Năm 2013, Mercimek và cộng sự đã phân lập thành công *Bacillus cereus* có khả năng phân hủy TNT từ nguồn đất ô nhiễm thuốc nổ. Chủng vi khuẩn này có khả năng chuyển hóa TNT ở nồng độ 50 mg/L và 75 mg/L với hiệu suất tương ứng đạt 68% và 77% trong 96 h [3]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập các chủng vi sinh vật từ nguồn đất, nước bị ô nhiễm TNT và khảo sát khả năng phân hủy TNT của chúng. Hàm lượng TNT còn lại được đo bằng phương pháp quang phổ và được phân tích bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC). Các chủng vi sinh vật có hiệu quả phân hủy TNT cao được giải trình tự thông qua phản ứng PCR với cặp mồi 27F/1492R.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu và hóa chất

Nguồn đất và nước ô nhiễm được lấy từ nhà máy Z121, Viện thuốc phóng thuốc nổ; cặp mồi 27F/1492R của công ty Phũ Sa, dNTP, Taq DNA polymerase, Taq Buffer 10x, dH₂O của Sigma; TNT của Merck, benzene, acetone, NaOH của Merck, và một số hóa chất cần thiết khác dùng trong nghiên cứu được mua từ các hãng hóa chất uy tín trên thế giới.

2.2. Thiết bị

Tủ ấm nuôi cấy vi khuẩn, máy lắc ổn nhiệt, thiết bị điện di đứng, máy PCR, hệ thống lưu trữ và phân tích hình ảnh, máy ly tâm 5417 R, máy đo quang phổ kế, máy Nanodrop. Hệ thống sắc ký lỏng cao áp (HPLC) Model Agilent 1100.

2.3. Phương pháp, kĩ thuật nghiên cứu

2.3.1. Phân lập vi sinh vật có khả năng phân hủy TNT [4]

Pha môi trường khoáng phân lập vi sinh vật: KH₂PO₄: 0,4 g; (NH₄)₂SO₄: 0,6 g; MgSO₄.7H₂O: 0,06 g; CaCl₂: 0,08 g; FeSO₄: 0,01 g; Nước cất 1 lít; pH 7. Khử trùng môi trường ở 121°C trong 20 phút. TNT được hòa tan hoàn toàn trong acetone và bổ sung vào môi trường nuôi cấy với nồng độ 10 mg/L là nguồn cacbon duy nhất.

Các mẫu đất, nước được bổ sung vào môi trường nuôi cấy với tỉ lệ 5% (w/v với mẫu đất, v/v với mẫu nước). Sau 7 ngày nuôi trên máy lắc với tốc độ 200 vòng/phút ở nhiệt độ phòng (25 ÷ 30 °C), những bình có vi sinh vật phát triển tốt (môi trường đục) được lấy làm giống để cấy lặp lại như trên. Sau 3 vòng lặp, bình có môi trường đục nhất sẽ được lấy mẫu phân lập khuẩn lạc trên môi trường thạch LB (Luria Broth). Các chủng vi sinh vật thuần khiết được giữ trên môi trường thạch nghiêng thích hợp ở 4 °C và được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

2.3.2. Ảnh hưởng của nồng độ TNT đến khả năng chuyển hóa của vi sinh vật [4]

Pha môi trường (1): K₂HPO₄: 6,18 g; KH₂PO₄: 1,93 g; Cao nấm men: 1 g; Nước cất 1 lít; pH 7,2. Khử trùng môi trường ở 121°C trong 20 phút [5].

Các chủng vi sinh vật được nuôi lỏng trong môi trường (1) có bổ sung TNT ở các nồng độ khác nhau (50, 100 mg/L). Các chủng vi sinh vật được nuôi lỏng ở nhiệt độ phòng, tốc độ lắc 200 vòng/phút trong 5 ngày. Thí nghiệm được thực hiện tương tự với mẫu đối chứng không bổ sung vi sinh vật. Hàm lượng TNT còn lại được xác định sơ bộ bằng phương pháp quang phổ (mục 2.3.3).

2.3.3. Phân tích nồng độ TNT bằng phương pháp quang phổ [4]

Sau 5 ngày, từ mỗi bình nuôi cấy (theo mục 2.3.2) thu 10 ml dịch, ly tâm với tốc độ 800 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ phòng; thu dịch trong. Bổ sung 4 ml benzene, lắc đều, để lắng, chiết 2 lần. Phần dung môi có hòa tan TNT được giữ lại, cho bay hơi hết benzene. Bổ sung 5 ml acetone hòa tan TNT; thêm 1 ml NaOH 40% cho phản ứng có màu, lắc đều, để trong tối 10 phút. Sự biến đổi màu sắc được đo bằng máy quang phổ ở bước sóng 510 nm.

Thang chuẩn có hàm lượng TNT ở các nồng độ: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 mg/L được thực hiện tương tự (hòa tan trong acetone và lên màu bằng NaOH 40%).

2.3.4. Phân tích nồng độ TNT bằng phương pháp HPLC [1]

Nồng độ TNT còn lại trong dịch nuôi cấy được xác định chính xác bằng phương pháp phân tích HPLC sử dụng hệ thống thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao Model Agilent 1100 với detector chuỗi (DAD) dải đo 190 ÷ 1100 nm. Điều kiện chạy HPLC với: Tỷ lệ pha động H₂O:Acetonitril = 30:70 (v/v); Tốc độ dòng 0,5 mL/phút; Áp suất 50 bar; Thời gian đo mẫu: 10 phút/mẫu; Thể tích mẫu phân tích: 5 µL; Thời gian lưu mẫu: 5,27 phút.

2.3.5. Xác định hình thái và các đặc điểm sinh hóa của các chủng phân hủy TNT

Sử dụng phương pháp nhuộm Gram để nhận biết ban đầu về hình thái và phân loại các chủng vi khuẩn [9]. Sử dụng kit API (bioMérieux, Pháp) để xác định các đặc điểm hóa sinh.

2.3.6. Tách genome của vi sinh vật có hiệu quả phân hủy TNT cao

Chủng vi sinh vật được nuôi cấy trên môi trường lỏng thích hợp để đạt được mật độ tế bào cao. Sử dụng 2 ÷ 3 ml dịch nuôi cấy để tách chiết DNA tổng số của vi sinh vật bằng bộ kit ANAPURE Bacterial DNA mini Kit.

2.3.7. Khuếch đại gen [10]

Genome sau khi tách được khuếch đại trình tự 16S rRNA bằng phản ứng PCR với cặp mồi có trình tự như sau: 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3').

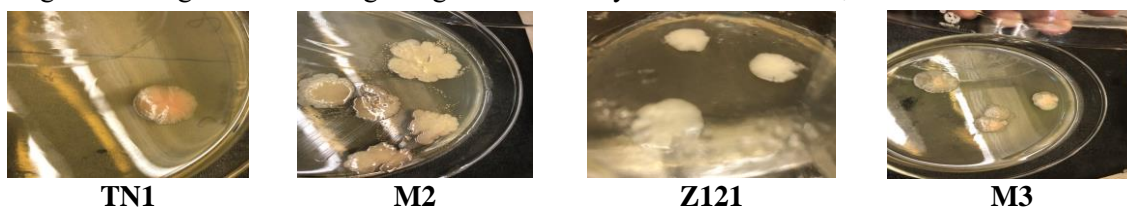
Một phản ứng PCR chứa 1xTaq polymerase buffer, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, và 2,5 đơn vị Taq polymerase với tổng thể tích cuối là 25 µl. Quá trình nhân bản được tiến hành bởi máy GeneAmp PCR System 9700 với 1 vòng ở 95 °C trong 5 phút để khởi động nóng, tiếp theo là 35 chu kỳ gồm 30 s ở 95 °C, 45 s ở 45 °C, và 2 phút ở 72 °C, tiếp theo là kéo dài ở 72 °C trong 7 phút và bảo quản ở 4 °C cho đến khi sử dụng.

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1%. Sau đó, sản phẩm này được làm sạch và gửi đi giải trình tự. Các trình tự nucleotide hoàn chỉnh được so sánh với ngân hàng dữ liệu gen của NCBI bằng cách sử dụng công cụ BLAST.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng sinh trưởng trên môi trường có TNT

Từ các mẫu đất, nước thu thập được chúng tôi đã phân lập được bốn chủng vi sinh vật có khả năng sinh trưởng trên môi trường có nguồn cacbon duy nhất là TNT với đặc điểm hình thái như sau:



Hình 1. Hình thái các chủng vi sinh vật trên đĩa thạch:

TN1: Tròn, lồi, nhầy, màu hồng; M2: Nhẵn, mép răng cưa, nhầy, màu nâu kem;

Z121: Tròn, lồi, nhầy, màu kem sữa; M3: Tròn, nhầy, màu hồng, có viền kem.

Các chủng này được sử dụng để khảo sát khả năng phân hủy TNT ở các nồng độ khác nhau.

3.2. Nghiên cứu khả năng phân hủy TNT của các chủng vi sinh vật đã phân lập được

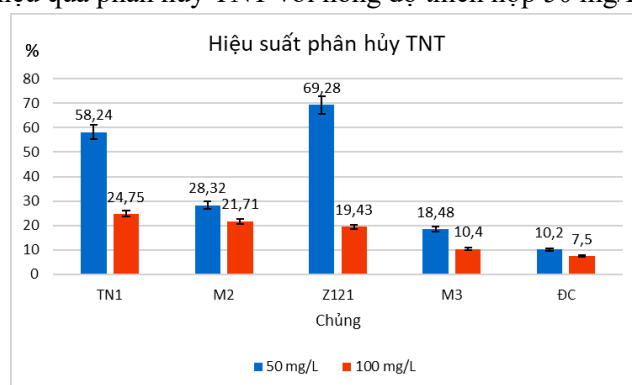
Chúng tôi đã xây dựng được phương trình bậc 1 từ thang chuẩn TNT (theo mục 2.3.2) như sau:

$$y = 0,0373x + 0,0213; R^2 = 0,997 \quad (1)$$

Trong đó: y là hệ số hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 510nm; x là nồng độ TNT tương ứng (mg/L).

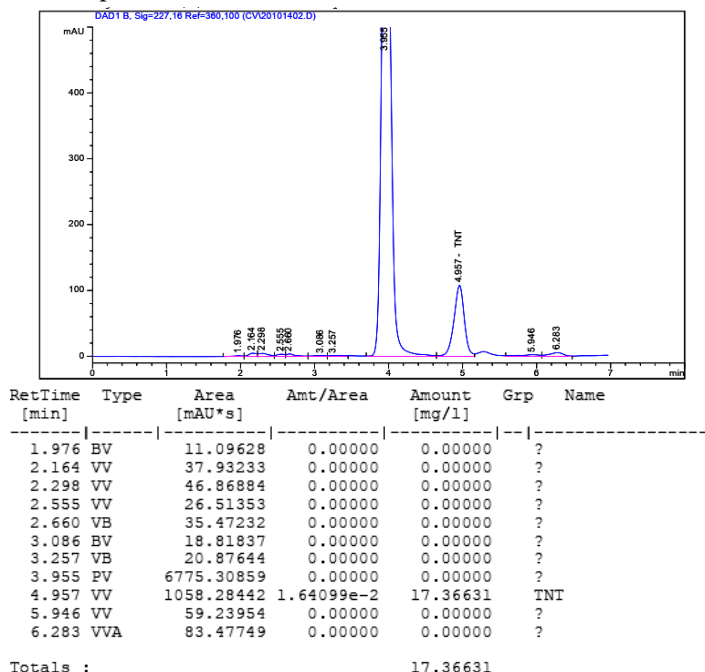
Dựa vào công thức của phương trình (1), chúng tôi đã xác định được nồng độ TNT tương đối còn lại trong dịch nuôi cấy của các chủng vi sinh vật khác nhau (theo mục 2.3.2).

Hiệu suất phân hủy TNT được thể hiện trên hình 2. Biểu đồ cho thấy trong bốn chủng vi sinh vật phân lập được có hai chủng TN1 và Z121 cho hiệu suất phân hủy TNT cao ở nồng độ 50 mg/L (đạt 58,24 % với chủng TN1 và 69,28 % đối với chủng Z121). Hiệu quả phân hủy TNT tại nồng độ 100 mg/L ở tất cả các chủng phân lập được đều thấp; tương đương so với sự tự phân hủy ở mẫu đối chứng (ĐC). Điều này có thể được lý giải TNT ở nồng độ 100 mg/L gây ức chế sự sinh trưởng, phát triển của tế bào vi sinh vật. Thực tế, TNT có thể được biến đổi hóa học trong môi trường với tốc độ rất chậm. Điều này là phù hợp với nghiên cứu của Mercimek và cộng sự [5]. Nhóm tác giả này đã phân lập được chủng *Bacillus cereus* có khả năng phân hủy TNT ở nồng độ 50 mg/L với hiệu suất đạt 68% sau 96 h nuôi cấy; sự phân hủy hóa học của TNT trong môi trường đạt 16%. Do đó, hai chủng TN1 và Z121 sẽ được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo trong xác định hiệu quả phân hủy TNT với nồng độ thích hợp 50 mg/L.

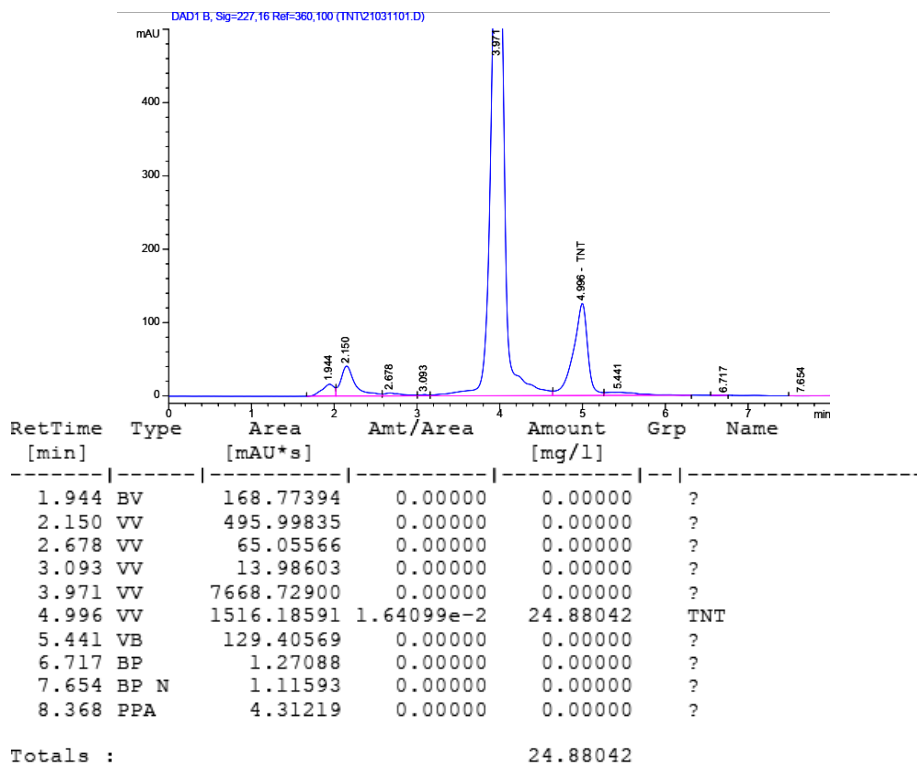


Hình 2. Hiệu suất phân hủy TNT của các chủng vi sinh vật tương ứng.

Để khẳng định lại hiệu quả phân hủy TNT ở nồng độ 50 mg/L của hai chủng TN1 và Z121; lượng TNT còn lại trong môi trường nuôi cấy (theo mục 2.3.2) được phân tích chính xác bằng phương pháp HPLC. Kết quả được thể hiện trên hình 3 và hình 4.



Hình 3. Sắc ký đồ nồng độ TNT còn lại trong dịch nuôi cấy chủng Z121.



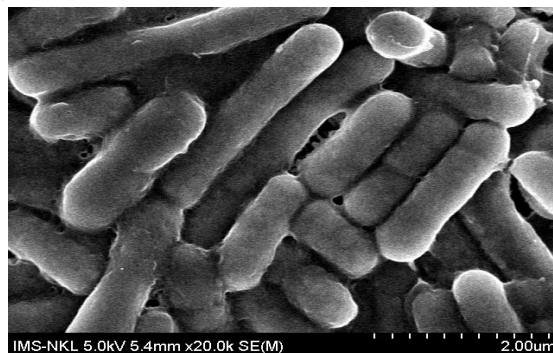
Hình 4. Sắc ký đồ nồng độ TNT còn lại trong dịch nuôi cấy chủng TN1.

Từ sắc ký đồ trên hình 3, hình 4 cho thấy nồng độ TNT còn lại trong dịch nuôi cấy của chủng TN1 và Z121 tương ứng là 24,88 mg/L và 17,37 mg/L; tương đương với hiệu suất phân hủy TNT ở nồng độ ban đầu 50 mg/L đạt 50,24% (chủng TN1) và 65,28% (chủng Z121). Kết quả này phù hợp với kết quả xác định hiệu suất phân hủy TNT ở nồng độ ban đầu 50 mg/L bằng phương pháp quang phổ (mục 3.2).

Từ các kết quả đã đạt được, hai chủng TN1 và Z121 được lựa chọn để nghiên cứu tiếp về đặc điểm hình thái, sinh hóa và giải trình tự gen.

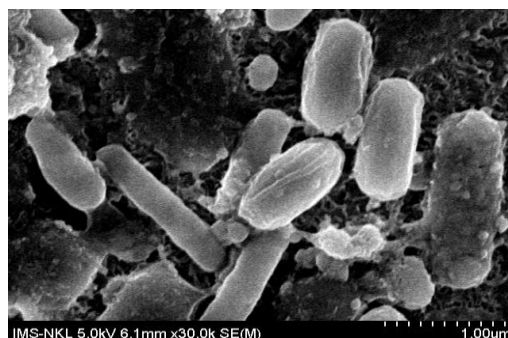
3.3. Một số đặc điểm hình thái, sinh hóa của chủng TN1 và Z121

Nghiên cứu đặc điểm hình thái của chủng TN1 cho thấy tế bào chủng TN1 có dạng trực khuẩn, các tế bào có thể được sắp xếp riêng lẻ hoặc theo cặp, theo chuỗi; khuẩn lạc bóng nhày và là chủng Gram âm (hình 5).



Hình 5. Hình thái tế bào chủng TN1 dưới kính hiển vi điện tử.

Nghiên cứu đặc điểm hình thái của chủng Z121 cho thấy tế bào chủng Z121 có dạng hình que ngắn, khuẩn lạc bóng hơi nhày và là chủng Gram âm (hình 6).



Hình 6. Hình thái tế bào chủng Z121 dưới kính hiển vi điện tử.

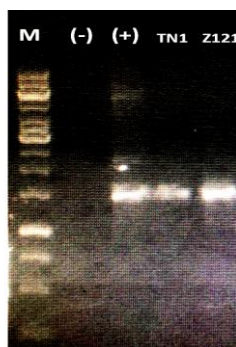
Các đặc điểm về sinh lý sinh hóa của hai chủng TN1 và Z121 được trình bày trong bảng 1. Kết quả cho thấy, hai chủng vi khuẩn này có hoạt tính của các enzyme thủy phân phân giải các chất như cellulose, protease, catalase. Cả hai chủng đều có khả năng sử dụng đa dạng nhiều nguồn cacbon khác nhau từ glucose đến maltose hoặc N-acetyl-glucosamine.

Bảng 1. Đặc điểm sinh hóa của hai chủng TN1, Z121.

TT	Chủng TN1	Chủng Z121
Hoạt tính protease	+	+
Hoạt tính catalase	+	+
Hoạt tính cellulase	+	+
Hoạt tính oxodase	+	+
Lên men (glucose)	-	-
<i>Khả năng sử dụng cơ chất</i>		
Glucose	+	+
Mannose	+	+
Manitol	+	+
N-acetyl-glucosamine	+	+
Maltose	+	+

3.4. Kết quả khuếch đại gen bằng cặp mồi 27F/1492R

Hai chủng TN1, Z121 được lựa chọn tách genome và PCR khuếch đại đoạn gen rARN 16S với cặp mồi 27F/1492R. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1% (hình 7).



Hình 7. Kết quả PCR bằng cặp mồi 27F/1492R:

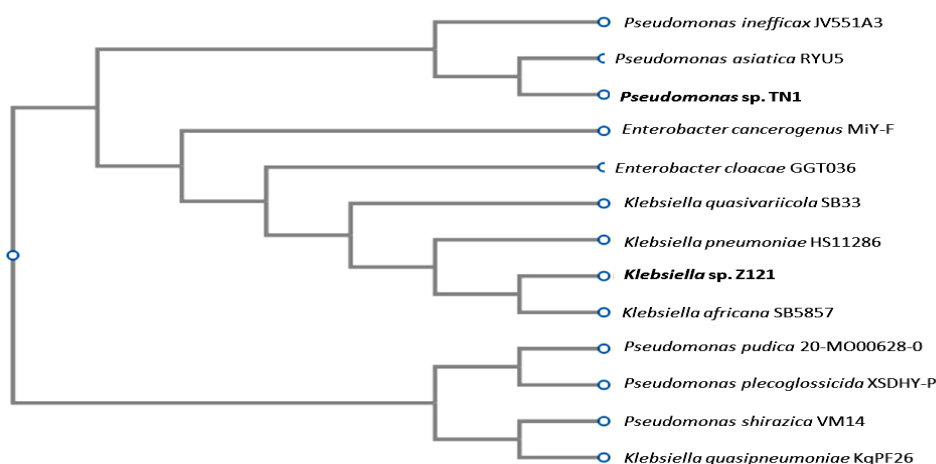
M: Marker DNA 1kb; (-) Đối chứng âm; (+) Đối chứng dương;

TN1, Z121 lần lượt là sản phẩm PCR của ADN tổng số của các chủng TN1, Z121.

Kết quả trên hình 7 xuất hiện một băng duy nhất có kích thước 1,5 kb cho thấy chúng tôi đã thành công trong việc khuếch đại gen rARN 16S bằng cặp mồi 27F/1492R.

Sản phẩm PCR được làm sạch và giải trình tự. Kết quả giải trình tự và so sánh trình tự trên ngân hàng gen cho thấy chủng TN1 thuộc chi *Pseudomonas*, có trình tự 16S rARN tương đồng 98,4% với các chủng *Pseudomonas putida* HN2013, HN2010; *Pseudomonas* sp. AOZ, *Pseudomonas monteilii* YW08-97. Chủng này được đặt tên là *Pseudomonas* sp. TN1 và đã được đăng ký mã số trên GenBank là MZ165355.1. Chủng Z121 thuộc chi *Klebsiella*, có trình tự 16S rARN tương đồng 99,9% với các chủng *Klebsiella pneumoniae* D16KP 0042, 295-a blue, NCTC 9171. Chủng này được đặt tên là *Klebsiella* sp. Z121 và đã được đăng ký mã số trên GenBank là MZ165349.1. Đã có một số công bố về khả năng phân hủy TNT của các chủng thuộc chi này [2, 3, 8].

Cây phát sinh chủng loại cho hai loài *Pseudomonas* sp. TN1; *Klebsiella* sp. Z121 và các chủng liên quan được trình bày trên hình 8.



Hình 8. Cây phát sinh chủng loại của hai chủng *Pseudomonas* sp. TN1 và *Klebsiella* sp. Z121.

4. KẾT LUẬN

Đã phân lập, tuyển chọn, định danh được hai chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy TNT từ nguồn đất, nước ô nhiễm. Hai chủng vi sinh vật này có khả năng phân hủy TNT ở nồng độ 50 mg/L với hiệu suất lần lượt là 50,24% và 65,28%. Chủng TN1 thuộc chi *Pseudomonas* và được đặt tên là *Pseudomonas* sp. TN1 với mã số đăng ký trên GenBank là MZ165355.1; chủng Z121 thuộc chi *Klebsiella* và được đặt tên là *Klebsiella* sp. Z121 với mã số đăng ký trên GenBank là MZ165349.1.

Lời cảm ơn: Kết quả nghiên cứu của bài báo được hỗ trợ về kinh phí của đề tài cấp Viện Công nghệ mới năm 2021 “Nghiên cứu thu nhận enzyme ngoại bào từ một số chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy TNT (trinitrotoluene)”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Jeong W., Kyle L., Daniel R. “Transformation of 2,4,6 trinitrotoluene by purified xenobiotic reductase B from *Pseudomonas fluorescens* I-C”, Applied and Environmental microbiology, p. 4742-4750 Vol.66, No.11, 2000.
- [2]. G. Gök, Z. Inal, M. Yiğitoğlu, Mustafa. Effect of Temperature and pH on Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by *Raoultella* sp. isolated from TNT-contaminated soil. (2015).
- [3]. Gumuscu B, Erdogan Z, Guler MO, Tekinay T. “Highly sensitive determination of 2,4,6-trinitrotoluene and related byproducts using a diol functionalized column for high performance liquid chromatography”. PLoS One. Published 2014 Jun 6.
- [4]. Lê Thị Đức. “Nghiên cứu sử dụng enzyme ngoại bào của vi sinh vật để xử lý nước thải chứa TNT từ các cơ sở sản xuất quốc phòng”. Báo cáo đề tài cấp phân viện công nghệ mới và bảo vệ môi trường.
- [5]. Mercimek HA, Dincer S, Guzeldag G, Ozsavli A, Matyar F. “Aerobic biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by *Bacillus cereus* isolated from contaminated soil”. Microb Ecol,66(3):512-21.

- [6]. Nyanhongo G., Marc S., Georg M. “*Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT): An enzymatic perspective*” *Biocatalysis and Biotransformation*, March/April 2005; 23(2): 53/69, 2009.
- [7]. Zehra G., Murat I., Mustafa Y. “*Biodegradation of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) with Bacteria Isolated from TNT-polluted Waste Pink Water*”. Department of Bioengineering, 2019.
- [8]. Serrano M^o, Chandra R, Castillo-Zacarias C, Robledo-Padilla F, Rostro- Alanis MdJ, Parra-Saldivar R. “*Biotransformation and degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by microbial metabolism and their interaction*”. Defence Technology, 2018.
- [9]. Vũ Thị Minh Đức. “*Thực hành Vi sinh vật*”. Nhà xuất bản ĐHQG HN, 2001.
- [10]. Widmer F, Seidler RJ, Gillevet PM, Watrud LS, Di Giovanni GD. “*A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus Pseudomonas (sensu stricto) in environmental samples*”. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(7):2545-2553. doi:10.1128/AEM.64.7.2545-2553.1998.

ABSTRACT

Isolation of microorganisms capable of degrading trinitrotoluene (TNT) from contaminated soil and water

TNT (2,4,6 trinitrotoluene) is an important explosive with a highly chemical durability, but it is also a highly toxic compound. TNT can be degraded by different pathways, one of which is biodegradation. In this study, we isolated microorganisms from TNT contaminated soil and water and surveyed their TNT's disintegration capability. During degradation, treatment of TNT after 5 days of incubation was followed by a spectrophotometer and analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC). According to the results of the analysis that have done, the TN1 and Z121 strains are able to degrade TNT at an initial concentration of 50 mg/L with 50,24% and 65,28%, respectively. These isolates were identified through PCR reaction with 16 S rRNA sequence analysis method through. According to the sequence of 16S rRNA, TN1 strain belonged to Pseudomonas genus, Z121 strain belonged to Klebsiella genus with the GenBank code is MZ165355.1 and MZ165349.1, respectively.

Keywords: Microorganism; Isolation; TNT.