

# 微生物降解水体中硝基苯的研究进展

李瑶瑶, 王延刚, 徐成斌\*, 马溪平, 包坤, 牟安毅 (辽宁大学环境学院, 辽宁沈阳 110036)

**摘要** 从降解菌的种类、降解途径和机理、培养基优化、固定化和趋化性角度, 介绍了生物降解硝基苯的最新研究进展。

**关键词** 硝基苯; 生物降解; 培养基优化; 固定化

**中图分类号** S273.5 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)01-00249-03

## Research Advances of Nitrobenzene in Microbial Degradation Water

LI Yao-yao et al (Environment Institute of Liaoning University, Shenyang, Liaoning 110036)

**Abstract** The research advances of microbial degradation of nitrobenzene were introduced from angles of degrading microbial types, degradation pathways and mechanism, medium optimization, immobilization and chemotaxis.

**Key words** Nitrobenzene; Biodegradation; Medium optimization; Immobilization

硝基苯作为重要的化工原料, 应用于医药、燃料、农药、染料、炸药等行业, 尤其广泛地用于生产苯胺。因此大量硝基苯、苯胺等有机污染物通过行业废水排放或者事故泄漏等途径进入环境中, 且难于被生物降解<sup>[1]</sup>。硝基苯是淡黄色、带苦杏仁味的剧毒物质, 对人体和生物具有高毒性, 吸入、摄入或皮肤吸收均可引起中毒, 典型症状是气短、眩晕、恶心、昏厥、神志不清、皮肤发蓝, 最后会因呼吸衰竭而死亡<sup>[2]</sup>。

目前, 国内外硝基苯废水的处理方法主要有物理法、化学法和生物法三大类。而生物处理法以其低耗、操作简单及无二次污染等优点, 被认为是处理硝基苯废水的理想方法。由于较多菌株降解能力有限, 且限制因素较多, 进而影响有机污染环境的微生物修复, 因此国内外对于修复硝基苯污染水体的研究报道较少<sup>[3-6]</sup>。所以对于硝基苯降解菌的研究具有非常重大及实际意义。

### 1 硝基苯降解菌的种类

自然界经长期演化使得原本不能利用硝基苯的微生物通过产生诱导酶来利用硝基苯作为碳源、氮源或能源, 进行生长、繁殖, 从而使硝基苯得以降解或转化<sup>[7]</sup>。目前, 处理硝基苯类废水的菌种可以分为细菌和真菌两大类, 其中细菌较多。部分硝基苯类降解菌株有芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、假单胞杆菌属(*Planococcus Migula*)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)、丛毛单胞菌(*Comamonassp.* 765)、棒状杆菌(*Colynebacterium*)、葡萄球菌(*Staphylococcus sp.*)、链球菌(*Streptococcus*)、动性球菌属(*Pseudomonas Migul*)、不动杆菌(*Aeinetobacter*)、屎拟杆菌(*Bacteroides merdae*)、白腐菌(*White rot fungus Trametes trogii*)等<sup>[8-10]</sup>。

目前, 研究较多的处理硝基苯废水的方法主要是好氧生物法、厌氧生物法和厌氧-好氧联合处理法。尽管硝基苯易

厌氧降解为苯胺, 但实际废水处理中, 厌氧过程不能将硝基苯化合物完全无害化, 并且由于水力学特征等原因, 厌氧-好氧联合工艺中的好氧阶段始终存在着不同浓度的硝基苯类化合物, 给废水处理的彻底性带来了困难; 另有研究, 硝基苯好氧条件下也可以降解为苯胺<sup>[11]</sup>。因此, 更环保、更经济的好氧生物降解受到了广泛的关注。王竞等<sup>[12]</sup>分离筛选出一株在好氧条件下以硝基苯为唯一碳、氮、能源的细菌: *Pseudomonass P. Jx165*。该菌对硝基苯的最大耐受浓度为 800 mg/L, 当硝基苯初始浓度为 200 mg/L 时, 60 h 硝基苯可被完全降解; 该菌最佳生长条件为 pH 6.0~7.0, 温度 30~35 °C。李铁等<sup>[13]</sup>从被硝基苯污染的河流底泥中分离出能在低温下生长并能以硝基苯为唯一碳源的恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)。2.5~35 °C 时可矿化 20 mg/L 的硝基苯, 最适生长温度为 25 °C; 当培养温度为 5 °C 时, 该菌株在 pH 为 6~9 范围内可以快速降解 20 mg/L 硝基苯, 偏碱性的条件比酸性条件更适合其生长; 不超过 100 mg/L 的硝基苯可以被该细菌完全降解。马会强等<sup>[14]</sup>从某硝基苯生产工厂排污管线底泥和污水处理厂曝气池活性污泥中分离出一组能够降解硝基苯的低温优势混合菌, 在低温(10 °C), pH 为 5.0~7.0 时, 混合菌能够以硝基苯为唯一碳、氮源生长, 且在 48 h 内可将 382 mg/L 的硝基苯完全降解。马溪平等<sup>[15]</sup>以东北制药总厂曝气池和氯霉素废水集水池污泥为菌源, 分离出耐低温硝基苯降解菌株鲍曼不动杆菌, 最适生长温度为 15 °C, 当硝基苯初始浓度为 200 mg/L 时, 菌株 48 h 降解率达 66.84%。

### 2 硝基苯的生物降解途径及机理

降解途径是微生物降解代谢硝基苯研究的重要方面, 不同菌株存在着不同的降解途径, 其主要差异在于硝基和苯环的变化。目前, 比较公认的硝基苯降解途径主要有两种好氧途径和一种厌氧途径。

**2.1 硝基苯微生物降解的好氧途径** 在好氧条件下, 微生物降解硝基苯存在着氧化途径和还原途径, 微生物采用那种途径主要取决于它来自的环境。Nishino 等<sup>[5]</sup>利用 *Comanonas sp. Strain JS765* 降解初始浓度为 20 mg/L 的硝基苯, 经氧化途径 2 h 可完全矿化硝基苯, 并释放出亚硝酸盐, 同时研究了

**基金项目** 国家十二五科技重大专项(2012ZX07505-003); 2011 年辽宁省科学技术计划项目(2011230009); 辽宁大学环境学院重点学科资助项目。

**作者简介** 李瑶瑶(1987-), 女, 辽宁盘锦人, 硕士研究生, 研究方向: 环境工程微生物, E-mail: 489078427@qq.com。\* 通讯作者, 副教授, 从事水污染控制研究, E-mail: xuchengbin80@163.com。

**收稿日期** 2012-10-29

菌株对硝基苯的氧化降解过程,第一步反应为氧化反应,硝基苯在双加氧酶的催化下生成邻苯二酚,硝基从苯环上脱除,邻苯二酚再在邻苯二酚 2,3-双加氧酶的催化下发生间位开环,降解产物为 2-羟基-己二烯二酸-6-半醛,进一步被氧化成 2-羟基-己二烯二酸,后经草酰巴豆酸互变异构酶、4-草酰巴豆酸脱梭酶、2-氧代-4-戊烯酸水合酶和 4-羟基-2-氧代-戊酸醛缩酶等代谢生成乙醛和丙酮酸<sup>[16]</sup>。

关于好氧条件下微生物采用还原途径降解硝基苯,Nishino SF 等<sup>[5]</sup>在研究了来源于缺氧环境中的 155 株硝基苯降解菌后,发现绝大多数菌株都采用还原途径降解,原因是菌株对环境的适应性。而 Claudia Vorbeck<sup>[17]</sup>认为是其自身的高度缺电子性造成的。但总的来说,好氧条件下微生物对硝基苯的还原途径降解更为普遍。好氧条件下的还原途径以 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45 为代表菌,该菌株能以硝基苯为唯一碳、氮能源矿化硝基苯。首先,硝基苯在硝基苯硝基还原酶的作用下转化为不稳定的羟氨基苯,在羟氨基苯异构酶的作用下,发生 Bamberger-like 重排反应,生成 2-氨基酚;随后,在 2-氨基酚 1,6-双加氧酶的催化下苯环发生间位开环生成 2-氨基粘康酸半缩醛,在脱氢酶的作用下进一步生成 2-氨基粘康酸,再在脱氨酶催化下脱除氨基,逐步被完全矿化;同时,2-氨基粘康酸不稳定,易发生分子内缩合反应失去 1 分子水生成非酶催化的副产物吡啶甲酸,但在脱氢酶和脱氨酶等存在下该反应不会发生。而 Park H. S. 等在对菌株 *Pseudomonas putida* HS12 降解硝基苯的研究中,也发现了相同的降解途径,说明这个降解途径不是特殊的,具有一定的普遍性<sup>[18]</sup>。

**2.2 硝基苯微生物降解的厌氧途径** 厌氧条件下,微生物降解硝基苯主要是还原途径,将硝基苯还原为苯胺<sup>[19]</sup>,然后进入苯胺的好氧降解过程,在双加氧酶的作用下,转化为邻苯二酚或氨基邻苯二酚,进一步苯环开环降解,最终被矿化。中间产物为亚硝基苯和羟基苯胺,其中还原性辅酶Ⅱ(NADPH),在特殊酶的作用下将其上的 H 转移到辅酶Ⅱ(NADP<sup>+</sup>)上,辅酶Ⅱ主要作为脱氢酶的辅酶,在反应中作为单递氢体。硝基苯能于含水层厌氧带部分还原,生成易于生物降解的还原产物苯胺。苯胺与土壤腐殖质发生不可逆结合,并吸附于土壤,可被好氧微生物迅速降解<sup>[20]</sup>。

Kwan 等研究了假单孢菌厌氧降解硝基苯的途径,即硝基苯在甲苯双氧化酶的作用下脱去硝基,生成邻苯二酚;其在邻苯二酚 2,3-加双氧酶的作用下通过间位降解途径降解,实现硝基苯的完全矿化<sup>[21]</sup>。最近,有些研究还发现,除了加双氧酶外,一些微生物的加单氧酶也可通过攻击硝基苯的 2、3 或 4 位而降解硝基苯。

### 3 硝基苯降解菌的培养基优化

培养基优化,指面对特定的微生物,通过试验手段配比找到一种最适合其生长及发酵的培养基,提高发酵产物的产量,以期达到生产最大发酵产物的目的。培养基的优化在微生物产业化生产中举足轻重,是从实验室到工业生产的必要环节。发酵过程机理复杂,涉及许多相互影响的因素,菌种

的生理生化特性及工艺确定后,适宜的培养基配方成为发酵水平、原料成本高低决定因素。但一般的培养基种类繁多,各成分间的相互作用复杂。因而,微生物培养基的优化工作显得尤为重要。目前有一些比较成熟的方法,如单因素法、正交设计试验法及响应面分析法,还有一些应用相对较少的方法,如均匀设计法、二次回归旋转组合法、遗传算法等。在利用正交试验考查硝基苯降解菌的影响因素及混合菌的最佳配比等方面都有了较多的研究,减少了试验次数的同时也降低了操作者的毒害风险。

如王松等<sup>[22]</sup>从污染现场筛选驯化出 8 株硝基苯降解菌,进行无空列重复 1 次的正交试验,研究硝基苯初始浓度、pH、重金属和 NaCl 浓度对硝基苯微生物降解的影响。结果表明,硝基苯初始浓度、pH、重金属和 NaCl 浓度均对硝基苯降解率有极显著影响,其影响程度依次为硝基苯初始浓度 > pH > NaCl 浓度 > 重金属。硝基苯降解优化试验显著促进了硝基苯的微生物降解,提高污染物的降解效率。王静等<sup>[10]</sup>通过正交试验,得出 3 株硝基苯高效降解菌混合的最佳配比为 1:3:3,在此基础上构建了混合菌,具有较强的耐盐性。

### 4 硝基苯降解菌的固定化

微生物固定化是生物工程中的一项新兴技术,在废水处理,尤其是在特种工业废水处理领域中具有广阔的应用前景<sup>[23]</sup>。微生物固定化技术通过物理或化学手段,将特选的微生物固定在限定的区域,使其高度密集并保持其活性,且可反复利用的过程。固定化方法有:吸附法、交联法、自身固定化(自絮凝)、包埋法等。其中,包埋固定法操作简单,对微生物细胞活性影响较小,制作的固定化微球强度高,是制备固定化微生物最常用、研究最广泛的方法。但包埋材料会在一定程度上阻碍底物和氧的扩散,对大分子底物不适用<sup>[24]</sup>。微生物固定化的理想载体应该具备以下特性:①固定化过程及固定化后对微生物无毒;②传质性能好,可以使菌体与底物充分接触,制作过程简单易行;③性质稳定,抗微生物分解,有一定的强度;④寿命长,可以反复利用;⑤来源广泛,价格低廉<sup>[25]</sup>。

申运栓等<sup>[26]</sup>利用复合微生物菌群 BCP35 固定自制的大孔功能化载体 FPU,与厌氧生物滤池和好氧生物滤池联用处理含高浓度硝基苯和苯胺的废水。结果表明,固定化微生物强化生物滤池工艺有很好的去除效果,对硝基苯和苯胺的降解率可分别高达 99.8% 和 99.9%;同时还对污染物浓度变化具有较强的抗冲击负荷能力;与游离态微生物相比,固定化微生物在去除 COD、硝基苯、苯胺等方面更具优势;生物滤池内的微生物浓度较高,可达到 38 g/L。王晨等<sup>[27]</sup>用固定化生物活性炭(IBAC)工艺处理含硝基苯污水,结果表明,IBAC 启动速度快,净化效能较高;对硝基苯的去除效果更好,在遭遇冲击负荷时,恢复净化能力的时间较短;炭柱进水中硝基苯控制在 26 μg/L 以下时可保证出水检测不出硝基苯。

### 5 降解菌的趋化性

趋化性是最基本的细胞生理反应之一。细菌的趋化性是指运动细菌趋向某些化学吸引剂或避开某些化学驱斥剂

的移动行为,这对细菌寻找食物(如葡萄糖)十分重要,细菌以此趋近有较高食物分子浓度的地方,或远离有毒(如硝基苯)的地方。在多细胞生物中,趋化性对其发展和其他正常功能一样不可或缺。正趋化性指趋向较高化学物质浓度的运动,而负趋化性则相反。细菌的这种现象是 Engelmann<sup>[28]</sup>首先发现的,微生物的正向趋化反应在污染物的生物降解方面具有重要作用。由于微生物降解污染物的前提是降解细菌与底物的直接接触,因此可以借助趋化反应使远离底物的细菌主动向底物靠近, *Pseudomonas* sp. ZWL73 菌株对将近 12 种化合物均表现出趋化性,而这些化合物大多能被用作菌株 ZWL73 的生长底物,并且趋化性是由降解质粒所控制的。Parales<sup>[29]</sup>研究发现,3 种假单胞菌菌株对硝基苯甲酸盐和氨基苯甲酸盐产生趋化性。Sanmata 等<sup>[30]</sup>研究表明, *Ralstonia* sp. SJ98 只对能降解的硝基芳香族化合物 NACs 有趋化性,而对不能降解的 NACs 无趋化性。目前,硝基苯类化合物的趋化性研究较少,主要是研究趋化性、降解性和质粒之间的关系,今后应进一步研究如何提高微生物的正向趋化能力,以便增强低浓度有机污染物污染环境的修复效果。

#### 参考文献

- [1] OCONNOR O A, YOUNG L Y. Toxicity and anaerobic biodegradability of substituted phenols under methanogenic conditions[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1989, 8(10): 853-862.
- [2] 杨海洋, 李轶, 胡洪营, 等. 恶臭假单胞菌对硝基苯污染河水的修复研究[J]. *安全与环境工程*, 2008, 15(1): 54-61.
- [3] HAIGLER B E, SPAIN J C. Biotransformation of nitrobenzene by bacteria containing toluene degradative pathways[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57(11): 3156-3162.
- [4] NISHINO S F, SPAIN J C. Degradation of nitrobenzene by a *Pseudomonas pseudoalcaligenes* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(8): 2520-2525.
- [5] NISHINO S F, SPAIN J C. Oxidative pathway for the biodegradation of nitrobenzene by *Comamonas* sp. Strain JS765 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(6): 2308-2313.
- [6] HE Z Q, SPAIN J C. Studies of the catabolic pathway of degradation of nitrobenzene by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45; removal of the amino group from 2-aminomuconic semialdehyde [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(12): 4839-4843.
- [7] 郑春莉. *R. mucilaginosa*, *S. albidoflavus* 和 *M. luteus* 对硝基苯的好氧生物降解[D]. 大连: 大连理工大学, 2007: 4-28.
- [8] 董迁迁. 固定化黄孢原毛平革菌-活性污泥联合处理硝基苯废水的研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2011: 4-7.
- [9] 杨峰田. 地下水、土环境硝基苯生物降解实验研究[D]. 长春: 吉林大学, 2007: 10-14.
- [10] 王静. 混合菌的构建及其对硝基苯的好氧生物降解[D]. 大连: 大连理

工大学, 2007: 46-57.

- [11] 侯轶. 硝基苯好氧降解菌筛选及其降解特性[J]. *环境科学研究*, 1999, 12(6): 25-28.
- [12] 王竞, 周集体, 张劲松, 等. 假单胞菌 JX765 及其完整细胞对硝基苯的好氧降解[J]. *中国环境科学*, 2001, 21(2): 144-147.
- [13] 李轶, 胡洪营, 吴乾元, 等. 低温硝基苯降解菌的筛选及降解特性研究[J]. *环境科学*, 2007, 28(4): 902-906.
- [14] 马会强, 张兰英, 李爽. 低温混合菌降解硝基苯的研究[J]. *环境科学与技术*, 2007, 30(12): 5-7.
- [15] 马溪平, 李银萍, 徐成斌. 低温条件下硝基苯降解菌的筛选及鉴定[J]. *环境科学学报*, 2010, 30(9): 1793-1797.
- [16] 胡华. *Pandora* sp. BD-33 硝基苯硝基还原酶的克隆、表达及其酶性质研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2011: 2-10.
- [17] CLAUDIA VORBECK. Initial reductive reaction in aerobic microbial metabolism of 2,4,6, -trinitrotoluene [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(1): 246-252.
- [18] 刘春. 硝基苯降解菌 *Pseudomonas* XN-1 细胞质粒的提取和特性研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2002: 5-15.
- [19] DIECKEL O, HAUG W, KNACKLNUSS H J. Biodegradation of nitrobenzene by a sequential anaerobic-aerobic process[J]. *Biodegradation*, 1993, 4(3): 187-194.
- [20] DONLON B A, RAZO-FLORES E, LETTINGA G, et al. Continuous detoxification, transformation and degradation of nitrophenols in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1996, 51(4): 439-449.
- [21] 郑金来, 李君文, 晃福豪. 苯胺、硝基苯和三硝基甲苯生物降解研究进展[J]. *微生物学通报*, 2001, 28(5): 85-88.
- [22] 王松, 孙铁珩, 孙丽娜, 等. 硝基苯微生物降解的优化条件研究[J]. *安全与环境学报*, 2008, 8(6): 5-8.
- [23] SHIMAO M, SAIMOTO H, KALO N, et al. Properties and role of bacterial symbioma of polyvinyl alcohol-Ullifing mixed cultures[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1983, 46(3): 605-610.
- [24] 吴崑. 固定化黄孢原毛平革菌处理硝基苯废水的研究[D]. 南京: 南京理工大学, 2008: 1-10.
- [25] 刘蕾, 李杰, 王亚斌. 生物固定化技术中的包埋材料[J]. *净水技术*, 2005, 24(1): 40-42.
- [26] 申运栓, 王中友, 叶正芳, 等. 固定化微生物强化生物滤池处理硝基苯和苯胺废水[J]. *中国给水排水*, 2009, 25(21): 65-68.
- [27] 王晨, 马放, 山丹. 固定化生物活性炭处理含硝基苯微污染水的可行性研究[J]. *环境科学*, 2007, 28(7): 1490-1495.
- [28] ENGELMANN T W. Bacterium photometricum: Einbeitrag zur vergleichenden physiologie des licht-und farbensinnes[J]. *Pflügers Archiv für die Gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, 1983, 30: 95-124.
- [29] PARALES R E. Nitrobenzoates and aminobenzoates are chemoattractants for *Pseudomonas* strains [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(1): 285-292.
- [30] SAMANTA S K, BHUSHAN B, CHAUHAN A, et al. Chemotaxis of a *Ralstonia* sp. SJ98 toward different nitroaromatic compounds and their degradation[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 269(1): 117-123.

(上接第 248 页)

- [5] 马住校, 段敏, 李岚. 西安市郊区蔬菜中重金属污染分析与评价[J]. *农业环境保护*, 2000, 19(2): 96-98.
- [6] 罗晓梅, 张义容, 杨定清. 成都地区蔬菜中重金属污染分析与评价[J]. *四川环境*, 2003, 22(2): 49-51.
- [7] 秦文淑, 邹晓锦, 仇荣亮. 广州市蔬菜重金属污染现状及对人体健康风险分析[J]. *农业环境科学学报*, 2008, 27(4): 1638-1642.
- [8] 刘晓洁. 沈阳郊区蔬菜、土壤重金属含量状况的检测[J]. *农业科技通讯*, 2011(5): 168-169.
- [9] 姚春霞, 陈振楼, 张菊, 等. 上海浦东部分蔬菜重金属污染评价[J]. *农业环境科学学报*, 2005, 24(4): 761-765.
- [10] 李传红, 朱文转, 谭镇. 广东省惠州市蔬菜重金属污染状况研究[J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(5): 1448-1449.

- [11] 李明德, 汤海涛, 汤睿, 等. 长沙市郊蔬菜土壤和蔬菜重金属污染状况调查及评价[J]. *湖南农业科学*, 2005(3): 34-36.
- [12] 王辉, 王宜娟, 黎星辉, 等. 洛阳市蔬菜基地土壤重金属含量对蔬菜安全性的影响[J]. *食品科学*, 2010, 31(21): 369-372.
- [13] 王凌, 张国印, 张小龙, 等. 蔬菜土壤重金属生物有效性及有效态与全量相关性研究[J]. *华北农学报*, 2011(S1): 85-88.
- [14] LIU P, WEI J L, YU S F, et al. Analysis and evaluation of heavy metal environmental quality of irrigation water in vegetable farmlands of Shandong Province [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2010, 11(5): 165-167.
- [15] 吕艳侠, 陈发扬, 王立. 铜陵市老洲乡蔬菜基地重金属污染现状评价[J]. *园艺与种苗*, 2012(8): 54-56.