

硝基苯高效降解菌群对硝基苯好氧降解

郑春莉*, 周集体, 王 竞, 赵丽红, 丛立新

(大连理工大学 环境与生命学院, 辽宁 大连 116024)

摘要: 硝基苯为环境有毒有害物质,好氧条件下硝基苯的生物降解主要通过部分还原途径。吡啶甲酸作为副产物出现在硝基苯的部分还原途径中,生物毒性大,阻碍了硝基苯的降解。本实验分离出3株在好氧条件下以硝基苯为惟一碳、氮、能源的菌株,分别鉴定为 *Streptomyces albidoflavus*(微白黄链霉菌)、*Rhodotorula mucilaginosa*(胶红酵母)和 *Micrococcus luteus*(藤黄微球菌),并借助其完整细胞考查了由上述3株菌混合而成的菌群对硝基苯的好氧降解。结果表明:硝基苯经部分还原生成2-氨基酚,2-氨基酚再进一步开环降解。在2-氨基酚开环过程中,有吡啶甲酸生成,吡啶甲酸被矿化成二氧化碳和水。

关键词: 硝基苯; 好氧降解; 动力学

中图分类号: X172 **文献标志码:** A

0 引言

硝基苯广泛应用于医药、染料、塑料以及炸药的生产中。随着化工工业的发展,对硝基苯的需求呈明显上升趋势,因此进入环境的量也会增多^[1]。自然界原来并不存在利用硝基苯的微生物资源,经过长期演化,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。大量研究表明在好氧条件下硝基苯的降解分为两种途径:氧化途径和部分还原途径。在氧化途径中,硝基苯在双加氧酶的催化下生成邻苯二酚,开环氧化,并伴有 NO_2^- 的释放^[2,3]。在部分还原途径中硝基苯还原成为羟基苯胺,羟基苯胺重排生成2-氨基酚,2-氨基酚开环生成2-氨基粘康酸,2-氨基粘康酸再进一步降解、矿化, NH_4^+ 被释放^[4~11]。同时,由于2-氨基粘康酸不稳定,一部分发生分子内缩合反应,失去一分子水生成非酶催化的副产物吡啶甲酸,吡啶甲酸不能够被硝基苯降解细菌进一步利用,其生成阻碍了硝基苯的降解^[3]。

本文分离筛选出3株在好氧条件下以硝基苯为惟一碳、氮、能源的菌株,并借助其完整细胞考查由上述3株菌混合而成的菌群对硝基苯的好氧降解。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株分离与鉴定

以某染料厂的活性污泥为菌源,在含 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硝基苯惟一碳、氮、能源液体培养基中^[12], $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $\text{pH} 7.0$ 下富集筛选,得到以硝基苯为惟一碳、氮、能源的菌液,然后在固体培养基上分离纯化,得到降解硝基苯的3株高效纯菌株。菌株鉴定由中国科学院微生物研究所菌种保藏中心完成。

1.2 菌群在硝基苯上的生长

菌群在含 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硝基苯惟一碳、氮、能源液体培养基中, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $\text{pH} 7.0$ 下培养。定期取样,测定细胞浓度、硝基苯浓度、TOC含量、 NO_2^- 和 NH_4^+ 浓度。

1.3 完整细胞的制备

菌群在含 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硝基苯惟一碳、氮、能源液体培养基中, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $\text{pH} 7.0$ 下培养至对数增长期。在 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下离心菌液 20 min ,收集细胞,用磷酸盐缓冲液 ($0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH} 7.0$) 洗涤2次,悬浮在相同缓冲溶液中,细胞浓度以 OD_{660} 表示 ($\text{OD}_{660} = 0.2$)。

1.4 完整细胞对硝基苯的厌氧转化

反应体系:磷酸盐缓冲液 ($0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,

收稿日期: 2006-02-05; 修回日期: 2007-12-20.

基金项目: 教育部跨世纪人才基金资助项目(科技函 1992-2).

作者简介: 郑春莉* (1976-), 女, 博士; 周集体(1955-), 男, 教授, 博士生导师.

pH 7.0), 完整细胞 ($OD_{660} = 0.2$), 硝基苯 ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 厌氧培养, 无菌操作. 以等量无完整细胞悬液作对照. 3 个平行样.

1.5 完整细胞对底物的好氧降解

反应体系: 磷酸盐缓冲液 ($0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.0), 完整细胞 ($OD_{660} = 0.2$), 底物 ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 摇床培养, 无菌操作. 以等量灭菌完整细胞 ($120 \text{ }^\circ\text{C}$, 20 min) 悬液作生物吸附对照, 以等量无完整细胞悬液作底物自氧化对照. 3 个平行样.

1.6 2-氨基酚降解过程中的中间产物制备

反应体系: 超纯水 (pH 7.0), 完整细胞 ($OD_{660} = 0.2$), 2-氨基酚 ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 摇床 4 h, 无菌操作. $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下将反应体系离心 20 min, 收集上清液, $0.22 \text{ } \mu\text{m}$ 膜过滤 3 次, Millipore 超滤器超滤, Heto Maxi Dry Lyo 冷冻浓缩.

1.7 完整细胞对硝基苯、2-氨基酚、吡啶甲酸的降解速率

采用初速度法. 反应体系: 磷酸盐缓冲液 ($0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.0), 完整细胞 ($OD_{660} = 0.2$), 不同初始浓度的底物 (硝基苯、2-氨基酚、吡啶甲酸、6-羟基吡啶甲酸), $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 摇床 30 min, 计算底物降解速率. 3 个平行样.

1.8 分析方法

菌体生长通过 JASCO V-560 紫外-可见分光光度计进行测定, 由 660 nm 下测定的吸光度 (OD_{660}) 表示. 硝基苯、 NH_4^+ 、 NO_2^- 分析方法见文献 [13, 14]. 中间产物的相对分子质量由 Hewlett-Packard 1100 型 LC-MC 确定. 流动相为 90% 水 (含 1% 乙酸)-10% 甲醇, 流速 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 质谱条件: 离子源为 API-ES 模式, 分别采用正、负离子模式检测. 溶液总有机碳 (TOC) 分析采用 TOC-5000 分析仪 (Shimadzu, 日本).

2 结果与讨论

2.1 菌种鉴定

鉴定结果显示 3 株菌分别为 *Streptomyces albidoflavus* (微白黄链霉菌)、*Rhodotorula mucilaginosa* (胶红酵母)、*Micrococcus luteus* (藤黄微球菌).

2.2 菌群的生长与硝基苯的降解

在以硝基苯为唯一碳、氮、能源的液体培养基中, 随着菌群的生长, 60 h 内硝基苯完全降解 (图 1), 硝基苯在紫外光区 268 nm 处的特征峰消失 (图 2). 通过离子色谱分析仪和化学分析手段检测到少量的 NH_4^+ , 没有发现 NO_2^- .

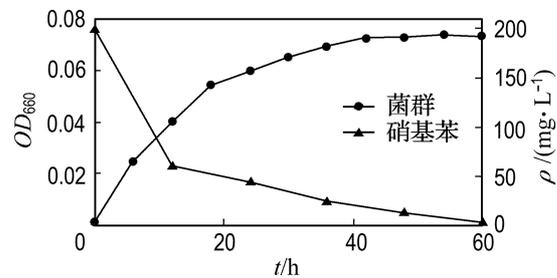


图 1 菌群在液体培养基中的生长以及硝基苯的降解

Fig. 1 Growth of mixture of bacterium on liquid medium and the degradation of nitrobenzene

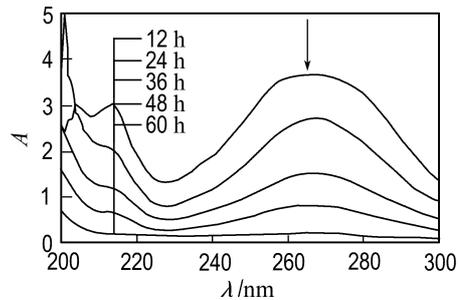


图 2 硝基苯降解过程中的紫外光谱

Fig. 2 UV spectra during degradation of nitrobenzene

硝基苯的部分还原途径是以 NH_4^+ 的释放为特点, 氧化途径是以 NO_2^- 的释放为特点. 在菌群对硝基苯的降解过程中, NH_4^+ 被检测出来, 没有发现 NO_2^- . 表 1 比较了菌群和 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45 (部分还原途径) 对不同底物的利用, 结果表明菌群与 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45 (简称 JS45) 都利用 2-氨基酚, 不同的是菌群还利用吡啶甲酸. 为了进一步研究菌群对硝基苯的好氧降解, 本文采用完整细胞考查了硝基苯的降解机理.

表 1 菌群和 JS45 对不同碳源利用的比较

Tab. 1 Comparison of substrates utilization between JS45 and the mixed strains

	苯胺	苯酚	邻苯二酚	2-氨基酚	3-氨基酚	4-氨基酚	吡啶甲酸
JS45	-	-	-	+	-	-	-
菌群	-	-	-	+	-	-	+

注: + 利用; - 不利用

2.3 完整细胞对底物的降解

2.3.1 硝基苯的厌氧转化 在硝基苯的部分还原途径中,第一步反应为硝基还原酶催化的部分还原反应,硝基还原酶在好氧和厌氧条件下均具有活性.在厌氧条件下硝基苯仅转化为2-氨基酚,这是由于双加氧酶在厌氧条件下失活不能催化2-氨基酚的开环反应.因此本文在厌氧条件下考查了菌群完整细胞对硝基苯的转化.图3显示0 h时,硝基苯在268 nm处有明显的特征吸收峰;2 h时,硝基苯特征吸收峰消失,283 nm处出现新的特征吸收峰.LC显示硝基苯厌氧转化的产物为单一产物,通过与标准物质比较停留时间,并结合降解规律,该物质确定为2-氨基酚.因此推测在菌群对硝基苯的降解过程中,第一步反应为硝基的部分还原反应,2-氨基酚为还原产物.

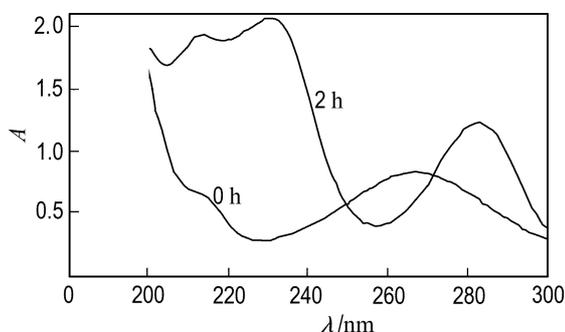


图3 完整细胞对硝基苯的厌氧转化

Fig. 3 Anaerobic transformation of nitrobenzene by the resting cells

2.3.2 2-氨基酚的好氧降解 图4显示了菌群完整细胞对2-氨基酚的好氧降解.0 h时,2-氨基酚在283 nm处有明显的特征吸收峰.降解进行到1 h,2-氨基酚特征吸收峰减弱,同时在265 nm处出现吸收峰;2 h时,2-氨基酚特征吸收峰消失,265 nm处出现明显的特征吸收峰;降解进行到6 h,265 nm处的吸收峰消失.

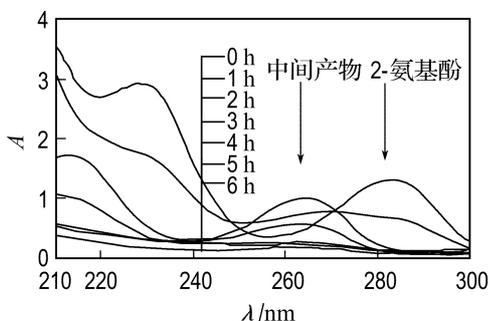


图4 完整细胞对2-氨基酚的好氧降解

Fig. 4 Aerobic degradation of 2-aminophenol by the resting cells

2.3.3 中间产物(A₂₆₅)的确定 硝基苯的部分还原途径也称2-氨基酚途径,这是由于2-氨基酚为途径中的中间产物,2-氨基酚氧化开环生成2-氨基粘康酸,2-氨基粘康酸再彻底降解、脱氨,同时由于2-氨基粘康酸不稳定,一部分发生分子内缩合反应,生成不能降解的副产物吡啶甲酸(A₂₆₅).这一降解模式在许多菌体中发现.同样在硝基芳香类化合物的部分还原途径中,2-氨基酚类化合物为中间产物,氧化开环生成2-氨基粘康酸类化合物,2-氨基粘康酸类化合物再进一步降解、脱氨,同时由于2-氨基粘康酸类化合物不稳定,一部分发生分子内缩合反应,吡啶甲酸类化合物作为不能降解的副产物生成^[9].本文中,在2-氨基酚的降解过程中,有最大吸收波长为265 nm的产物(A₂₆₅)生成.

图5显示了该物质的LC-MS图.LC图中出现一个单峰,保留时间为1.704 min,对应于该保留时间的质谱图显示:m/z=124.2对应于[M-H]⁺,m/z=122.2对应于[M-H]⁻,因此该物质的分子量推测为123.2;通过与标准物质比较停

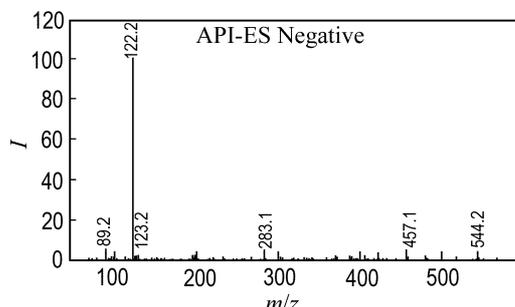
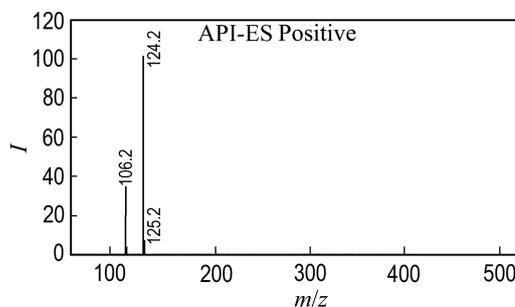
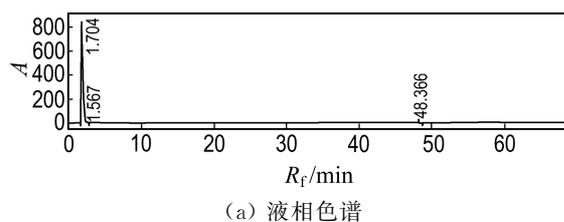


图5 2-氨基酚好氧降解过程中中间产物的液相色谱-质谱图

Fig. 5 LC-MS spectra of the middle product during the aerobic degradation of 2-aminophenol

留时间,该物质被确定为吡啉甲酸. TOC 含量分析显示 6 h 时 TOC 去除率为 99.27%, NH_4^+ 同时被检测出来. 结果表明在菌群完整细胞对 2-氨基酚的降解过程中, 2-氨基酚开环降解并脱氨, 最终矿化为无害的二氧化碳和水, 同时, 副产物吡啉甲酸也被矿化. 本文中 2-氨基酚的降解途径以及吡啉甲酸的生成机制需要进一步研究, 然而与以往文献不同的是, 菌群能够降解吡啉甲酸.

2.3.4 吡啉甲酸的好氧降解 在磷酸盐缓冲液 (0.02 mol/L, pH 7.0) 中, 吡啉甲酸初始浓度为 100 mg/L, 4 h 内吡啉甲酸在紫外光区 265 nm 处的特征吸收峰消失 (图 6); TOC 含量分析显示 4 h 时, TOC 去除率为 92.17%, 吡啉甲酸最终矿化为无害的二氧化碳和水.

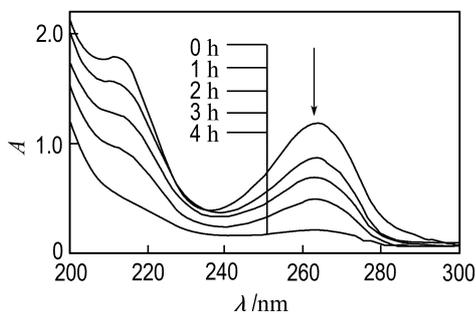


图 6 完整细胞对吡啉甲酸的好氧降解

Fig. 6 Aerobic degradation of picolinic acid by the resting cells

2.4 完整细胞对硝基苯、2-氨基酚、吡啉甲酸的降解动力学

将硝基苯、2-氨基酚、吡啉甲酸作为菌群完整细胞的降解底物. 完整细胞对底物的降解可以看做是相应酶对底物的降解过程, 采用单底物酶催化反应动力学模型, 根据 Michaelis-Menten 方程将不同浓度下的底物降解速率对底物浓度作双倒数图^[15] (图 7).

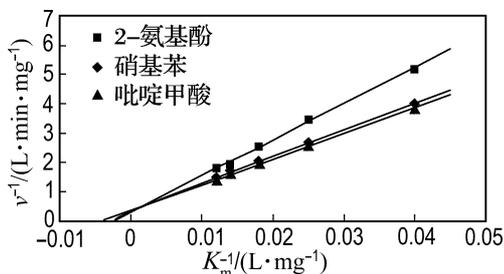


图 7 完整细胞对硝基苯、2-氨基酚和吡啉甲酸的降解动力学

Fig. 7 Degradation kinetics of nitrobenzene, 2-aminophenol and picolinic acid by resting cells

从图 7 中得出 $K_m(\text{硝基苯})=246.57 \text{ mg/L}$, $v_{\max}(\text{硝基苯})=2.70 \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{min})$; $K_m(2\text{-氨基酚})=281.58 \text{ mg/L}$, $v_{\max}(2\text{-氨基酚})=3.18 \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{min})$; $K_m(\text{吡啉甲酸})=433.41 \text{ mg/L}$, $v_{\max}(\text{吡啉甲酸})=3.49 \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{min})$. 表明菌群对硝基苯、2-氨基酚降解酶的亲和力高于吡啉甲酸.

硝基苯的好氧生物降解主要通过两种途径: 氧化途径和部分还原途径, 其中部分还原途径更为常见^[16]. 这是由于硝基的吸电子效应造成苯环上电子云密度下降, 阻碍了氧化酶的亲电进攻, 更易发生还原反应. 在 Spain 等研究的 155 株硝基苯降解菌中, 154 株通过部分还原途径降解硝基苯, 1 株通过氧化途径降解硝基苯. 王竞等研究的 *Pseudomonas sp.* JX165 对硝基苯的好氧降解也为部分还原途径^[17]. 在硝基苯的部分还原途径中, 吡啉甲酸作为非酶催化的副产物出现. 吡啉甲酸具有生物毒性, 不能被硝基苯降解菌进一步利用, 其生成阻碍了硝基苯的好氧降解. 本文中菌群对硝基苯的好氧降解与以往文献报道的部分还原途径相似, 不同的是该菌群可降解吡啉甲酸, 这一新的代谢特性可能解决硝基苯好氧生物降解中的瓶颈同时有助于发现新的酶系.

3 结 论

(1) 在菌群对硝基苯的降解过程中, 第一步反应为硝基苯经部分还原生成 2-氨基酚, 2-氨基酚再进一步开环降解, 在 2-氨基酚的降解过程中, 有中间产物吡啉甲酸生成.

(2) 不同于以往报道, 本实验中菌群可以矿化吡啉甲酸.

参 考 文 献:

- [1] 赵 珏, 曾 苏, 傅大放, 等. 多株硝基苯降解菌的筛选[J]. 应用与环境生物学报, 2002, 8(4):427-429
- [2] NISHINO S F, SPAIN J C. Oxidative pathway for the biodegradation of nitrobenzene by *Comamonas sp.* strain JS765 [J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1995, 61(6):2308-2313
- [3] LESSNER D J, JOHNSON G R, PARALES R E, et al. Molecular characterization and substrate specificity of nitrobenzene dioxygenase from *Comamonas sp.* strain JS765 [J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2002, 68(2):634-641
- [4] NISHINO S F, SPAIN J C. Degradation of nitrobenzene by a *Pseudomonas pseudoalcaligenes* [J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1993, 59(7):2520-2525

- [5] 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]. **Applied Environmental Microbiology**, 1997, **63**(12): 4839-4843
- [6] SOMERVILLE C C, NISHINO S F, SPAIN J C. Purification and characterization of nitrobenzene nitroreductase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45 [J]. **Journal of Bacteriology**, 1995, **177**(13): 3837-3842
- [7] HE Z Q, NADEAU L J, SPAIN J C. Characterization of hydroxylaminobenzene mutase form pNBZ139 cloned from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45 [J]. **European Journal of Biochemistry**, 2000, **267**:1110-1116
- [8] DAVIS J K, PAOLI G C, HE Z Q, *et al.* Sequence analysis and initial characterization of two isozymes of hydroxylaminobenzene mutase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45 [J]. **Applied Environmental Microbiology**, 2000, **66**(7):2965-2971
- [9] LENDENMANN U, SPAIN J C. 2-aminophenol 1, 6-dioxygenase: a novel aromatic ring cleavage enzyme purified from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45 [J]. **Journal of Bacteriology**, 1996, **178**(21): 6227-6232
- [10] HE Z Q, DAVIS J K, SPAIN J C. Purification, characterization, and sequence analysis of 2-aminomuconic 6-semialdehyde dehydrogenase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45 [J]. **Journal of Bacteriology**, 1998, **180**(17):4591-4595
- [11] HE Z Q, SPAIN J C. A novel 2-aminomuconate deaminase in the nitrobenzene degradation pathway of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45 [J]. **Journal of Bacteriology**, 1998, **180**(9):2502-2506
- [12] BRUHN C, LENKE H, KNACKMUSS H J. Nitrosubstituted aromatic compounds as nitrogen source for bacteria [J]. **Applied Environmental Microbiology**, 1987, **53**(1):208-210
- [13] 朱明霞, 车文实, 王君. 分光光度法测定痕量亚硝酸根[J]. 高师理科学刊, 2000, **20**(1):37-38
- [14] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法: 第4版[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002
- [15] 藏荣春, 夏风毅. 微生物动力学模型: 第1版[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004
- [16] HE Z Q, SPAIN J C. Comparison of the downstream pathways for degradation of nitrobenzene by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45 (2-aminophenol pathway) and by *Comamonas sp.* JS765 (catechol pathway) [J]. **Archives of Microbiology**, 1999, **171**(5): 309-316
- [17] 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

Degradation of nitrobenzene by a mixture of nitrobenzene degrading strains under aerobic condition

ZHENG Chun-li*, ZHOU Ji-ti, WANG Jing, ZHAO Li-hong, CONG Li-xin

(School of Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: Nitrobenzene is harmful to the environment. Microorganisms degrade nitrobenzene mainly through the partial reductive pathway under aerobic condition. However, on the partial reductive pathway, picolinic acid emerged as a dead-end product. The formation of picolinic acid impeded the nitrobenzene degradation. The isolation and characterization of three nitrobenzene degrading strains were reported, which were identified as *Streptomyces albidoflavus*, *Rhodotorula mucilaginosa* and *Micrococcus luteus*. The degradation pathway of nitrobenzene by the mixture of three strains was studied. Nitrobenzene was partially reduced to 2-aminophenol and 2-aminophenol was cleaved and degraded. During the degradation of 2-aminophenol, picolinic acid was formed and was mineralized to CO₂ and H₂O to degrade picolinic acid.

Key words: nitrobenzene; aerobic degradation; kinetics