

低温硝基苯降解菌的筛选及降解特性研究

李轶, 胡洪营*, 吴乾元, 杨海洋

(清华大学环境科学与工程系环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084)

摘要: 从被硝基苯污染的某河流底泥中分离到能在低温下生长并能以硝基苯为唯一碳源的 7 株细菌, 其中菌株 NB1 在温度从 2.5 ~ 35 °C 范围内时都可以生长并矿化 20 mg/L 的硝基苯, 最适宜的生长温度为 25 °C 左右; 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. 通过生理生化反应特性、菌体形态以及 16S rDNA 序列测定结果, 确定 NB1 为恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*). 不同温度条件, 特别是低温下该菌株对硝基苯的快速降解特性为低温环境硝基苯污染的生物修复提供了可能.

关键词: 硝基苯; 生物降解; 细菌; 低温

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)04-0902-06

Isolation of a Bacterial Strain Capable of Nitrobenzene-Degradation at Low Temperature and the Biodegradation Characteristics

LI Yi, HU Hong-ying, WU Qian-yuan, YANG Hai-yang

(ESPC State Key Joint Laboratory, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Seven bacterial strains that can degrade nitrobenzene at low temperature were isolated from the sediments of a nitrobenzene polluted river. One of the strains, NB1, can mineralize 20 mg/L nitrobenzene completely under the temperature range from 2.5 °C to 35 °C with an optimum temperature of 25 °C. At 5 °C, the strain can grow and degrade 20 mg/L nitrobenzene under pH 6 ~ 9. As long as the concentration of nitrobenzene was not higher than 100 mg/L, it can be degraded by the strain successfully. The strain was identified as *Pseudomonas putida* according to its morphology, biochemical properties and 16S rDNA sequence analysis. The growth and nitrobenzene degradation character of the strain at different temperature, especially at low temperature, shows the potential for the bioremediation of nitrobenzene contaminated environment.

Key words: nitrobenzene; biodegradation; bacteria; low temperature

硝基苯是工业上重要的化学物质之一, 广泛用于制造苯胺、染料、炸药、润滑剂及肥皂等行业, 据估计每年全世界大约有 1 万 t 以上的硝基苯排入环境^[1]. 硝基苯属于有毒有害物质, 被列于世界“环境优先控制有毒有机污染物”的名单前列^[2], 大量吸入、摄入或皮肤吸收均可引起人员中毒, 导致高铁血红蛋白血症. 中毒的典型症状是气短、眩晕、恶心、昏厥、神志不清、皮肤发蓝等. 我国污水综合排放标准 (GB 8978288) 规定的硝基苯的一级、二级和三级标准分别为 2.0、3.0 和 5.0 mg/L, 地表水环境质量标准 (GB 3838-2002) 规定的 I、II、III 类水域特定值为 0.017 mg/L.

微生物修复技术是污染环境治理的有效方法之一, 其中对于可快速降解污染物的菌株的分离、培养和应用是微生物修复过程的重要环节^[3]. 近年来已分离到多种能够降解硝基苯的微生物菌种, 它们包括 *Pseudomonas* sp., *Comamonas* sp., *Bacteroides* sp. 等^[4~6]. 但大部分菌株对硝基苯的降解速率较低, 降解过程中环境因素如温度条件等要求苛刻, 有的需

要经过共代谢过程才能降解硝基苯, 从而大大限制了它们在污染环境修复中的应用^[7].

本研究从曾被硝基苯污染的河道底泥中分离得到了 7 株在低温条件下能以硝基苯为唯一碳源快速降解硝基苯的细菌, 对其中降解能力较强的 1 株的生长特性、降解特性及其主要环境因素进行了研究并进行了鉴定. 耐冷硝基苯降解菌的分离尚鲜见报道, 本研究结果对硝基苯污染环境的修复和硝基苯废水的处理具有重要意义.

1 材料与方法

1.1 培养基

分离培养的培养基: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.8 g/L; KH_2PO_4 1 g/L; NaCl 1 g/L; 琼脂 15 g/L; 硝基苯 0.1 g/L.

无机盐培养液: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.8 g/L; KH_2PO_4

收稿日期: 2006-06-28; 修订日期: 2006-08-31

作者简介: 李轶 (1975 ~), 男, 博士后, 主要研究方向为污染环境的修复技术, E-mail: envly@tsinghua.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: hyhu@tsinghua.edu.cn

1 g/L; NaCl 1 g/L; NH₄Cl 0.1 g/L; MgSO₄ 0.2 g/L.

1.2 实验方法

1.2.1 菌种的富集培养与分离纯化

于冬季(1月份)从东北某条曾被硝基苯污染的河流取底泥,将底泥和硝基苯混合后的上层清液接种到装有无机盐培养液的锥形瓶中,再将适当浓度的硝基苯溶液直接加到该锥形瓶中作为微生物生长的唯一碳源(硝基苯的初始浓度为 20 mg/L),随后放入恒温床中(35℃)培养.培养一定时间至溶液浑浊时,倒掉一半培养液换上新的含硝基苯的无机盐培养液,新溶液中的硝基苯浓度和第一次相同.然后通过在硝基苯固体培养基平板上不断分离纯化得到能降解硝基苯的纯菌株.所得菌株接种到无机盐培养液中培养一定时间后放入冰箱中在 4℃条件下保存.

1.2.2 降解菌的培养

将降解菌接种到无机盐培养液中,于恒温床中(35℃)静止培养,定期取样测定培养基中细胞浓度和硝基苯浓度.培养和下述降解实验过程中都进行空白对照实验.

1.2.3 降解菌的鉴定

降解菌的生理生化特性按照常规方法进行分析鉴定^[8,9].

16S rDNA 序列分析:菌株经培养后提取总 DNA,以此为模板,采用通用引物进行 16S rDNA 的基因扩增,引物为 fD1: 5'-AAGAG TTTGA TCTGG CTCAG-3'和 rP: 5'-TACGG TACCT TGTTA CGACTT-3',将 PCR 产物克隆后进行纯化鉴定,该工作委托中国科学院微生物所进行.

1.2.4 硝基苯降解实验

在 300 mL 锥形瓶中配制体积为 150 mL,浓度为 20 mg/L(接入菌液后的体积和浓度)的系列硝基苯无机盐培养液,接入 1 mL 处于对数生长期的菌液,分别改变培养温度、硝基苯浓度和 pH 值,通过平行实验,比较不同菌株的降解能力,研究温度、浓度和 pH 值对硝基苯降解的影响.

温度影响实验:选择硝基苯初始浓度为 20 mg/L,置于恒温培养箱中,分别在 0, 2.5, 5, 15, 25, 35℃培养,以初始溶液为空白参比测定光密度值、溶液 pH、DOC 和硝基苯浓度,确定菌体生长适宜温度范围.

硝基苯浓度影响实验:分别选择硝基苯初始浓度为 20, 50, 100 和 160 mg/L,于 5℃培养箱中培养后,以初始溶液为空白参比测定溶液光密度值和硝基苯浓度,确定菌体生长适宜的浓度范围.

pH 值影响实验:选择硝基苯初始浓度为 20

mg/L,调节培养液不同 pH 值,于 5℃培养箱中培养 8 h 和 24 h 后,以初始溶液为空白参比测定光密度值、溶液 pH 和硝基苯浓度,确定菌体生长适宜 pH 值范围.

接种、离心和取样等操作均在无菌条件下完成.

1.3 分析测定方法^[10,11]

硝基苯浓度:气相色谱法,主要仪器为 Aglient 6890N 气相色谱仪(美国 Aglient),样品离心后,取上清液用甲基叔丁基醚萃取后进行分析;气相色谱条件为进样口温度 270℃,检测器 300℃,柱温 80℃(2 min)→10℃/min→160℃(5 min),进样量 3 μL;ECD 检测器.

细胞浓度:比浊法,在 550 nm 下测定,主要仪器为 UV-1200V 型分光光度计(日本岛津).

DOC:燃烧氧化-非色散红外线吸收法,主要仪器 TOC-5000A 型总有机碳分析仪(日本岛津).

pH:玻璃电极法,主要仪器 868 型 pH 电极测定仪,奥立龙公司.

2 结果与讨论

2.1 降解菌的分离纯化及降解特性研究

2.1.1 降解菌的分离纯化

经分离纯化后得到可降解硝基苯的菌株 7 株,其菌落形态特征如表 1 所示.

表 1 降解菌的菌落特性
Table 1 Colony morphological properties of the nitrobenzene-degrading strains

编号	颜色	形状	大小	表面结构	边缘
NB1	白	圆	小	光滑	完整
NB2	白	圆	中	光滑	不完整
NB3	白偏黄	圆	小	光滑	完整
NB4	黄	圆	小	光滑	完整
NB5	黄	圆	中	中部凸起	不完整
NB6	淡蓝	圆	小	干燥	完整
NB7	蓝	圆	小	干燥	完整

2.1.2 降解菌的降解特性比较

对上述分离出的 7 株细菌进行硝基苯降解性能的比较(培养温度为 5℃,硝基苯起始浓度为 20 mg/L),结果列于表 2.按照硝基苯的降解速率,得到的菌株可分为快、慢 2 类细菌,其中 NB1、NB3、NB4、NB6 属于快速降解细菌,NB2、NB5、NB7 属于慢速降解细菌.

从 2 类细菌中各选择 1 株 NB1 和 NB5,其实验结果(硝基苯浓度和培养液吸光度随时间变化)如图 1 所示.

表 2 降解菌的降解特性

Table 2 Degradation characteristics of the nitrobenzene-degrading strains				
编号	迟滞期/h	降解 90% 硝基苯所需时间/h	降解 90% 硝基苯时的光密度值	pH 变化
NB1	无	43	0.01	不变
NB2	20	67	0.008	不变
NB3	无	43	0.012	不变
NB4	无	43	0.01	不变
NB5	无	67	0.052	不变
NB6	无	43	0.01	不变
NB7	无	72	0.064	不变

由图 1 可知,2 菌株均可以硝基苯为唯一碳源生长,NB1 的细胞增殖速度和硝基苯降解速度均大于 NB5.在 NB1 作用下,90% 的硝基苯在 43 h 左右被降解,NB5 则需要 70 h 左右,降解时前者的光密度是后者的 2 倍左右.以下实验中,选择在低温条件下降解能力较强的菌株 NB1 作为降解菌,并考察环境因素对其增殖和降解硝基苯的影响.

2.2 降解菌 NB1 的鉴定

菌株 NB1 的各项生理生化指标如表 3 所示.对

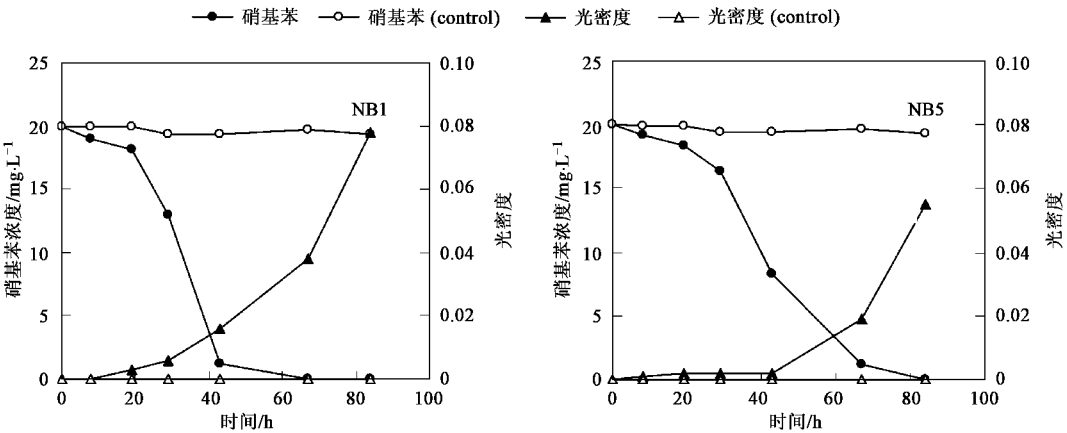


图 1 不同降解菌在 5 °C 对硝基苯的降解曲线

Fig.1 Temporal profiles of nitrobenzene degradation by NB1 and NB5 at 5 °C

表 3 降解菌 NB1 的生理生化特性¹⁾

Table 3 Biochemical properties of strain NB1			
实验项目	结果	实验项目	结果
细胞形态	杆状	革兰氏染色	阴性
对照	-	D-蜜二糖	-
α -环糊精	-	甲基葡萄糖苷	-
糊精	-	D-阿洛酮糖	+ w
糖原	-	D-棉子糖	-
Tween40	+	L-鼠李糖	-
Tween80	+	D-山梨醇	-
N-乙酰半乳糖胺	-	蔗糖	-
N-乙酰葡萄糖胺	-	D-海藻糖	-
核糖醇	-	松二糖	-
L-阿拉伯糖	-	木糖醇	-
D-阿糖醇	-	丙酮酸甲酯	+
D-纤维二糖	-	丁二酸-甲酯	-
L-赤藓醇	-	乙酸	+
D-果糖	+	顺-阿康酸	+
L-果糖	-	柠檬酸	+
D-半乳糖	+	甲酸	+
龙胆二糖	-	D-半乳糖酸内酯	+
α -D-葡萄糖	+	D-半乳糖醛酸	-
m-肌醇	-	D-葡萄糖酸	+
α -D-乳糖	-	b-甲基葡萄糖苷	-
Lactulose	-	D-葡萄糖醛酸	-
麦芽糖	-	α -羟基丁酸	-
D-甘露醇	-	b-羟基丁酸	+
D-甘露糖	+ w	g-羟基丁酸	-
氧化酶	阳性	O/F 实验	氧化
p-苯乙醇酸	-	L-组氨酸	+
衣康酸	-	羟基脯氨酸	+
α -氧代丁酸	+ w	L-亮氨酸	+
α -氧代戊二酸	+	L-鸟氨酸	+
α -氧代戊酸	+ w	L-苯丙氨酸	+
D, L-乳酸	+	L-脯氨酸	+
丙二酸	+	L-焦谷氨酸	+
丙酸	+	D-丝氨酸	-
奎尼酸	+	L-丝氨酸	+ w
D-己糖酸	+	L-苏氨酸	+ w
葵二酸	-	D, L-肉碱	+
丁二酸	+ w	g-氨基丁酸	+ w
溴代丁二酸	+	尿刊酸	+
琥珀酰胺酸	-	肌苷	-
葡萄糖醛酰胺	-	尿苷	-
L-丙氨酰胺	+	胸苷	-
D-丙氨酸	+	苯基乙胺	+ w
L-丙氨酸	+	腐胺	+
L-丙氨酰甘氨酸	-	2-氨基乙醇	+
L-天冬酰胺	+	2,3-丁二醇	-
L-天冬氨酸	+	甘油	+
L-谷氨酸	+	D, L-甘油磷酸盐	-
甘氨酸天冬氨酸	-	D-葡萄糖-1-磷酸	-
甘氨酸谷氨酸	-	D-葡萄糖-6-磷酸	-

1) + 表示可利用, - 表示不能利用, w 表示微弱利用

菌株 NB1 进行 PCR 扩增,获得1 440 bp 左右的片段,测序并用 DNAS^{tar} 分析软件将该序列与其他相应序列进行同源性比较,根据表 1 中的生理生化反应特性、菌体形态以及 16S rDNA 序列测定结果,确定 NB1 为恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*).

2.3 温度对 NB1 增殖特性和硝基苯降解过程的影响

不同温度条件下(0~35℃)降解菌的增殖及其对 20 mg/L硝基苯的降解情况如图 2 所示.在所进行的 6 组实验中,除了 0℃条件下,其他温度下 20 mg/L的硝基苯均被完全降解,表明该细菌可以硝基苯为唯一碳源进行生长.

根据硝基苯的降解曲线,不同温度下的降解可

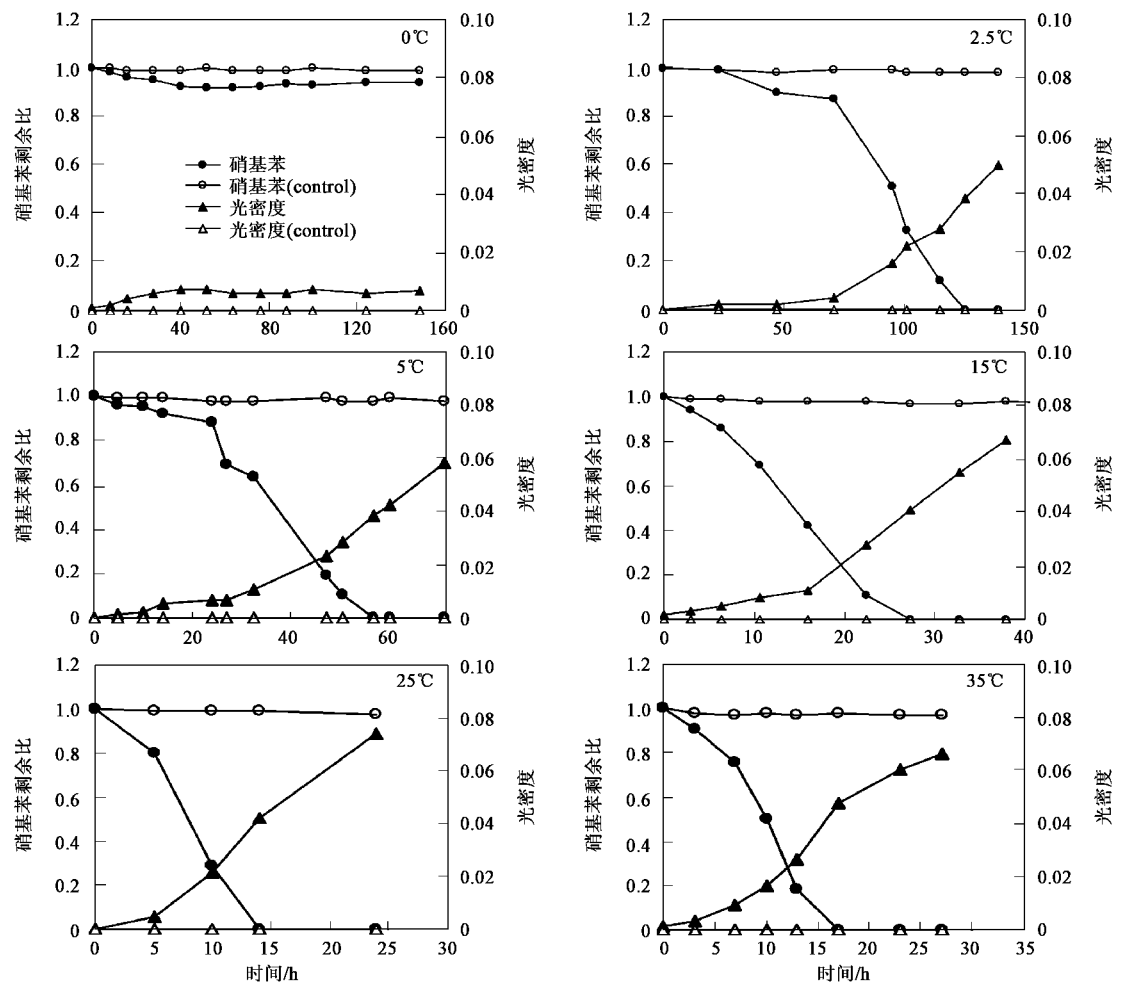


图 2 不同温度条件下降解菌 NB1 的生长和降解曲线

Fig.2 Temporal profiles of nitrobenzene degradation by NB1 under different temperature

分为 3 种情况:不能完全降解(0℃);迟滞期后降解(2.5 和 5℃);无迟滞期快速降解(15,25,35℃).

对照实验中,无细菌存在时,硝基苯的浓度略有减少,均小于 3%,主要是由于挥发的因素所引起.另外在实验过程中,对照实验未见有光密度的增加,从而也说明了灭菌过程和细菌降解硝基苯的可靠性.

0℃时,在实验所进行的 148 h 过程中,未见硝基苯有显著降解,溶液中也只有微量的细菌生长.随着培养温度的升高,菌株生长速度和对硝基苯的降解速度增加明显,在 2.5℃和 5℃条件下,可以观察

到经过一定的迟滞期后,细菌快速生长,同时硝基苯被降解;当温度增加到 15℃以上时,细菌生长和硝基苯降解已无明显的迟滞期,而观察到快速的生长和降解速率,这和蔡邦成等^[12]的报道一致.

不同温度下 NB1 的生长速度和对硝基苯的降解速度如图 3 所示.对比不同培养温度下的细菌增殖速度和硝基苯降解速度,可以发现从 0℃开始,随着温度的增加细菌增殖速度和硝基苯降解速度均显著增加,在 25℃时达到最大值,而当温度进一步增加到 35℃时,出现下降的趋势,因此可以认为该细菌为耐冷中温菌,最适宜生长温度为 25℃左右.

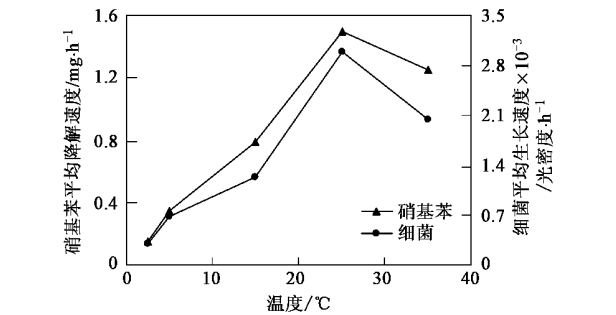


图3 温度对细菌生长速度和硝基苯平均降解速度的影响
Fig.3 Effect of temperature on cell growth and nitrobenzene degradation

不同培养温度对细菌生长以及硝基苯降解的其他结果汇总于表4中。

由于培养液中磷酸盐的缓冲能力,降解过程中

表4 温度对细菌生长和硝基苯降解的影响
Table 4 Effect of temperature on cell growth and characteristics of nitrobenzene degradation

温度 /℃	迟滞期 /h	降解 90% 硝基苯所需时间/h	降解 90% 硝基苯时的光密度值	降解末期 DOC 去除率 /%	pH
0	—	—	—	—	不变
2.5	25	120	0.028	85	不变
5	< 10	50	0.026	84	不变
15	无	23	0.029	85	不变
25	无	14	0.032	86	不变
35	无	17	0.035	85	不变

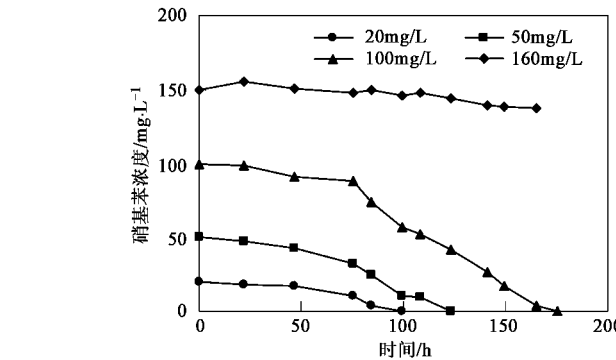


图4 低温(5℃)时细菌对不同浓度硝基苯的降解
Fig.4 Degradation of nitrobenzene at different concentrations at 5℃

在实际的环境修复过程中,应充分考虑 pH 对细菌的影响,可通过调节 pH 值来提高对硝基苯的降解效率。

3 结论

(1)从曾遭受硝基苯污染的河道底泥中分离出

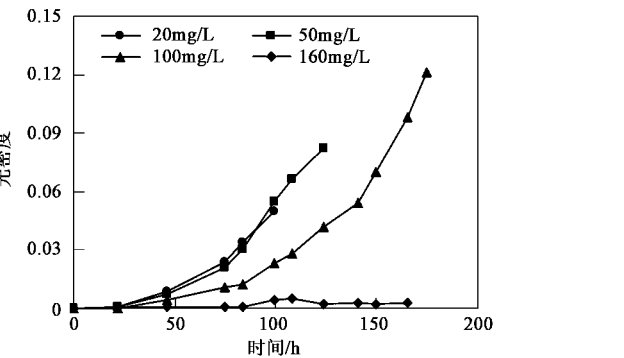
培养液的 pH 值没有显著改变,保持在中性.实验初期和末期测量的 DOC 值表明溶液中 85% 左右的 DOC 被去除,细菌具有将硝基苯在短时间内矿化的能力.在韦朝海等^[13]报道的硝基苯降解研究中,20 mg/L 的硝基苯需要 6 d 以上才能被逐渐降解,本实验所分离出的细菌可以在低温条件下快速降解硝基苯,为污染环境的微生物修复提供了可能.

2.4 硝基苯起始浓度对 NB1 降解硝基苯的影响

培养温度为 5℃ 时,NB1 对不同浓度的硝基苯降解曲线和生长曲线如图4所示.由图4可知,当硝基苯的浓度为 20,50 和 100 mg/L 时,可被降解菌 NB1 完全降解.降解过程中,迟滞期随着硝基苯起始浓度的增加而延长,20,50 和 100 mg/L 时,迟滞期分别约为 22,46 和 75 h.经过迟滞期后,硝基苯被快速降解.当硝基苯的起始浓度达到 160 mg/L 时,细菌生长缓慢,硝基苯没有显著的降解,在实验进行的 165 h 内,硝基苯的降解率为 8%,细菌的生长受到高浓度硝基苯的抑制.

2.5 pH 对 NB1 增殖特性和硝基苯降解过程的影响

培养温度为 5℃ 时,不同 pH 培养条件下实验结果如图5所示,细菌在弱碱条件下,直至 pH 为 9 时,仍然可以有效降解硝基苯;弱酸条件下,pH 下降到 5 时,对细菌有了明显的抑制作用,根据降解过程中光密度值和硝基苯浓度的变化,可以认为细菌在中性和偏碱性条件下活性更好.



7 株能在低温条件下高效降解硝基苯的菌株.其中降解能力较强的菌株 NB1 可在 2.5~35℃ 条件下快速矿化硝基苯,其最适宜温度为 25℃.

(2)低温条件下,NB1 菌株在 pH6~9 范围内生长较好,中性和弱碱条件对细菌的生长和硝基苯的降解有利,中性条件下,细菌可以降解浓度为 100

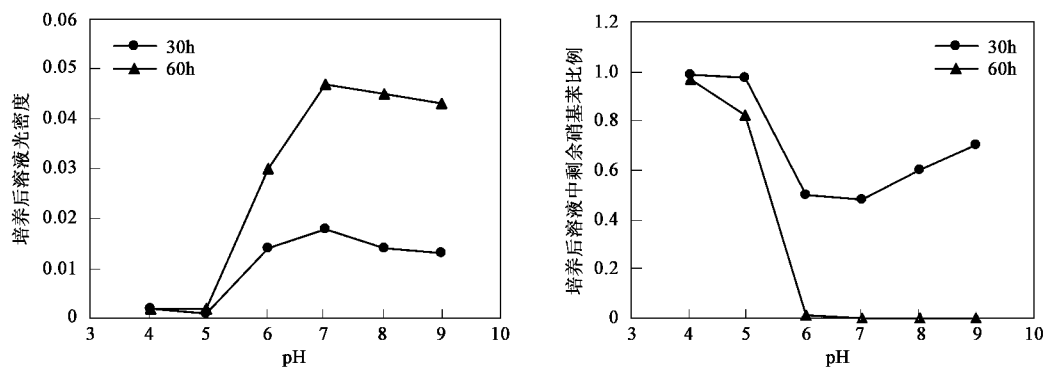


图 5 pH 对细菌生长和硝基苯降解的影响

Fig.5 Effect of pH on cell growth and nitrobenzene degradation

mg/L的硝基苯.

参考文献:

[1] Bergauer P, Fonteyne P A, Noland N, *et al.* Biodegradation of phenol and phenol-related compounds by psychrophilic and cold-tolerant alpine yeasts [J]. *Chemosphere*, 2005, **59**(7): 909 ~ 918.

[2] Ye J, Singh A, Ward O P. Biodegradation of nitroaromatics and other nitrogen-containing xenobiotics [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2004, **20**(2): 117 ~ 135.

[3] Cao H B, Li Y P, Zhang G F. Reduction of nitrobenzene with H-2 using a microbial consortium [J]. *Biotechnology Letters*, 2004, **26** (4): 307 ~ 310.

[4] Bell L S, Devlin J F, Gillham R W. A sequential zero valent iron and aerobic biodegradation treatment system for nitrobenzene [J]. *Journal of Contaminant Hydrology*, 2003, **66**(3 ~ 4): 201 ~ 217.

[5] Wu J F, Jiang C Y, Wang B J, *et al.* Novel partial reductive pathway for 4-chloronitrobenzene and nitrobenzene degradation in *Comamonas* sp. strain CNB-1 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, **72**(3): 1759 ~ 1765.

[6] Majumder P S, Gupta S K. Hybrid reactor for priority pollutant nitrobenzene removal [J]. *Water Research*, 2003, **37**: 4331 ~ 4336.

[7] 侯轶,任源,韦朝海. 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.

[8] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.

[9] 中国科学院微生物所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法 [M]. 北京: 科学出版社, 1978.

[10] Shao Y, Gao S X, Zhang H. Influence of nonionic surfactants and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on the biodegradation of nitrobenzene [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2003, **19** (8): 783 ~ 790.

[11] 国家环保局. 水和废水监测分析方法[M]. (第三版). 北京: 中国环境科学出版社, 1989. 424 ~ 426.

[12] 蔡邦成,高士祥,肖琳,等. 一株硝基苯高效降解菌的筛选及其降解特性[J]. *环境科学与技术*, 2003, **26**(4): 1 ~ 4.

[13] 韦朝海,任源,谢波,等. 硝基苯与苯胺类废水生物降解协同作用研究[J]. *环境科学研究*, 1999, **12**(3): 10 ~ 14.