

苯胺、硝基苯和三硝基甲苯生物降解研究进展

郑金来 李君文 晁福寰

(军事医学科学院卫生学环境医学研究所 天津 300050)

摘要: 苯胺、硝基苯和 TNT 类化合物是广泛应用的化工原料, 目前它们已造成了严重的环境污染, 并危及人体的健康。利用微生物处理环境中污染物的方法目前倍受青睐。迄今为止, 人们已经找到了很多环境污染物的降解微生物。综述了降解苯胺、硝基苯和 TNT 的微生物及其降解机理, 并指出 DNA 重组等分子生物学技术的发展与应用为彻底治理环境污染指明了出路。

关键词: 苯胺, 硝基苯, 三硝基甲苯, 微生物, 降解

中图分类号: Q93 **文献标识码:** D **文章编号:** 0253-2654 (2001) 05-0085-04

苯胺和硝基苯类化合物是广泛应用的化工原料, 主要用于国防、印染、塑料、农药和医药工业等。它们的大量生产和广泛应用, 对环境造成了污染。苯胺是严重污染环境和危害人体健康的有害物质, 具有致癌性, 如: 可导致膀胱癌等。硝基苯也可毒害人和动物, 破坏血液循环和神经系统, 引起贫血甚至死亡。由于苯胺、硝基苯及其衍生物对生态生物的毒性, 被列为环境优先控制污染物, 在工业排水中要求严格控制。目前, 国内每年生产苯胺 80, 000 吨以上, 其下游产品有 150 余种, 全世界每年排入环境中的苯胺和硝基苯类化合物约为 30, 000 和 10, 000 吨。随着化工工业的发展, 这两类化学品的需求呈明显上升趋势, 由此进入环境的量也会越来越多, 对环境的毒害也会越来越大。

2, 4, 6-三硝基甲苯 (TNT) 是一种广泛应用的炸药, 具有高毒性和致变性, 它可通过呼吸系统、消化系统及皮肤而进入生物体内, 导致血相改变、紫绀、白内障、正铁血蛋白血症和中毒性肝炎等。由于土壤对 TNT 有很强的吸附作用, 因而如果废水中的 TNT 不经过处理直接排放, TNT 就会很快渗入地下, 积存于土壤中, 将严重危害环境, TNT 对水体和土壤环境的污染早已受到重视。

处理环境污染物的常规方法主要有物理法、化学法和生物法等。其中, 物理法和化学法由于投资大、占地广又需要特殊设备而逐渐不受欢迎; 利用生物主要是微生物的代谢活性处理环境中的有机污染物的方法由于投资少、占地少也不需要特殊设备而倍受青睐。迄今为止, 人们采用微生物来处理环境中的有机污染物已经取得了一定的成功, 同时, 这一方面研究的不断深入也为彻底治理环境污染指明了出路。本文综述了降解苯胺、硝基苯和 TNT 的微生物及其降解机理。

1 降解苯胺、硝基苯和 TNT 的微生物

对于微生物而言, 苯胺属较易降解化合物, 而硝基苯和 TNT 则属于难降解化合物。国内外众多研究者通过富集培养等技术已经发现了许多能够降解苯胺、硝基苯及三硝基甲苯的微生物, 见表 1。

对于硝基苯而言, 由于硝基的吸电子性使得苯环上的电子云密度下降, 从而使氧化酶的亲电子受阻, 这导致硝基苯的好氧降解速度较慢; 在厌氧条件下, 硝基苯可较

易被还原为苯胺，苯胺又可进一步被彻底矿化。由于硝基苯的毒性比苯胺大 50 倍，并且苯胺易好氧降解为无毒无害物质。因此，我们可以筛选能够将硝基苯还原为苯胺的菌株，然后再在苯胺降解菌的作用下彻底矿化，这样较难降解的硝基苯就可以通过这两步得到了彻底降解：厌氧还原为苯胺，好氧降解苯胺为无机物。

表 1 苯胺、硝基苯和三硝基甲苯的降解微生物

化合物	降解菌	参考文献
苯胺	<i>Nocardia</i> 诺卡氏菌	1~4
	<i>Comamonas acidovorans</i> 食酸丛毛单胞菌 AN3 株	
	<i>Pseudomonas</i> 假单胞菌 AK20 菌株	
	<i>Ochrobactrum anthropi</i> 人苍白杆菌	
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 乙酸钙不动杆菌	
	<i>Rhodococcus erythropolis</i> 红串红球菌	
	<i>Alcaligenes</i> 产碱杆菌	
	<i>Scenedesmus Obliquus</i> 斜生栅藻	
硝基苯	<i>Bacteroides distasonis</i> 吉氏拟杆菌	1, 5~8
	<i>Bacteroides merdas</i> 屎拟杆菌	
	<i>C. perfringens</i> 产气荚膜杆菌	
	<i>Corynebacterium</i> 棒状杆菌	
	<i>Pseudomonas mendocina</i> 门多萨氏菌	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 肺炎克雷伯氏菌	
	<i>Staphylococcus</i> 葡萄球菌	
	<i>Streptococcus</i> 链球菌	
<i>Pseudomonas putida</i> 恶臭假单胞菌		
TNT	<i>Bacillus</i> sp. 芽胞杆菌	9~10
	<i>Candida krusei</i> 克鲁丝假丝酵母	
	<i>Citrobacter</i> sp. 柠檬杆菌	
	<i>C. quercitrusa</i> 橡树假丝酵母	
	<i>C. fanata</i> 无名假丝酵母	
	<i>Desulfovibrio</i> sp. 脱硫菌	
	<i>Enterobacter</i> sp. 肠杆菌	
	<i>Escherichia</i> 埃希氏杆菌	
	<i>Hansenula beijerinckii</i> 伯杰汉逊酵母	
	<i>H. subpelliculosa</i> 亚膜汉逊酵母	
	<i>Geotrichum candidum</i> 白地霉	
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> 白腐真菌	
	<i>Pseudomonas</i> sp. 假单胞菌	
<i>Klebsiella</i> sp. 克氏杆菌		

2 微生物降解苯胺、硝基苯及 TNT 的机理

在好氧条件下苯胺的微生物降解可以通过两种代谢途径，即邻位 (ortho) 和间位 (meta) 代谢途径，分别由邻苯二酚-1, 2-加双氧酶或邻苯二酚-2, 3-加双氧酶催化。这两种途径的前两步反应是相同的，都是将苯胺氧化成邻苯二酚，邻苯二酚以后的反应则不同。当苯胺通过邻位代谢途径时，在两个羟基之间切割邻苯二酚，再经多步反应产生三羧酸循环的中间代谢物琥珀酸和乙酰辅酶 A。当苯胺通过间位代谢途径时，在其中一个羟基的旁侧切割儿茶酚，最后产生丙酮酸和乙醛。食酸丛毛单胞菌 AN13 菌株的加双氧酶属于诱导酶，除苯胺外，它还可降解乙酰苯胺，它主要是通过邻位代谢途径降解苯胺。假单胞菌的某些菌株可以通过间位代谢途径降解苯胺^[3,4]。诺卡氏菌通过

加双氧酶反应将苯胺转化为邻苯二酚,进而既可以通过邻位代谢途径也可以通过间位代谢途径降解邻苯二酚^[2,3]。Meyers 等人^[11]还对苯胺降解酶进行了基因定位,发现假单胞菌的邻苯二酚-2,3-加双氧酶的基因可能定位于质粒上。

由于生物降解过程的复杂性,硝基苯类化合物降解途径仍所知甚少。目前,比较公认硝基苯降解途径主要有3种:2种好氧途径和1种厌氧途径。好氧途径中,由于苯环上的硝基极大的负电性使之氧化非常困难,加之硝基苯挥发性很强,极易造成二次污染。另外硝基苯在好氧降解时还可能生成一种毒性更大的、几乎不能降解的终产物 γ -吡啶甲酸。因而硝基苯的好氧降解难以进行。厌氧环境下硝基苯转化为苯胺被理解为硝基苯上的硝基得电子还原所致^[5,6],目前人们对于该途径的认识也还有限^[8]。Billy 等人^[7]利用3株菌种研究了硝基苯的降解途径,并且鉴定了有关中间产物,发现不同微生物的硝基苯降解途径存在差异,但是,没有研究进一步矿化的降解途径。Kwan 等人^[6]研究了假单胞菌降解硝基苯的途径:硝基苯在甲苯双氧化酶的作用下发生羟基化生成硝基邻苯二酚;后者在氧化型NAD和TACG脱氢酶的作用下脱去硝基,生成邻苯二酚,TACG脱氢酶是降解硝基苯的关键酶,其基因可能定位在TOL质粒上;邻苯二酚再在邻苯二酚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。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或3或4位^[12,13]而降解硝基苯。葡萄球菌、链球菌、棒状杆菌对硝基苯的降解能力可能是由染色体编码的。另外,有些有机物能够促进硝基苯等环境污染物的生物降解,如:吉氏拟杆菌和屎拟杆菌等菌株能够与葡萄糖共代谢还原硝基苯,1g葡萄糖共代谢还原200mg~260mg硝基苯^[8],因而通过添加适量的葡萄糖也会有助于硝基苯的降解。

白腐真菌对TNT的降解可能是通过自由基过程而实现的,这种自由基反应是高度非特异性的。主要依赖于白腐真菌分泌的胞外酶进行,这些酶主要包括:木质素过氧化物酶LiP和Mn-过氧化物酶MnP等。另外,漆酶、还原酶、甲基化酶和蛋白酶等也参与组成了降解系统的主体。降解酶系通常在碳、氮源受限的情况下才表达。在有氧的条件下,葡萄糖等在己二醛氧化酶的作用下,形成过氧化氢,过氧化氢刺激LiP或MnP触发一系列的自由基链反应降解TNT,实现对底物无特异性的氧化分解,藜芦醇等可促进该反应的进行。值得注意的是,在LiP和MnP分泌之前,依赖于质膜的氧化还原系统可将高度氧化的TNT还原为氨基对应物AmDNT,主要是2-氨基和4-氨基二硝基甲苯,这是TNT生物降解的关键^[10]。

3 应用前景、存在的不足和展望

许多化工厂等已经应用降解性微生物处理工业废水中的苯胺、硝基苯和TNT,并且已经取得了显著的效果。但是还不能完全满足实际的需要,这是因为在自然环境中散在分布的污染物不能象工业废水一样进行集中统一处理;受污染环境化合物成分变化大,pH波动也较大,有可能抑制降解菌的生长;降解菌对环境污染物的降解速度慢,达不到实际需要的要求或经常发生变异不能够继续降解污染物;受污染环境不能有效地维持降解菌的生物量,在实际应用降解菌时常会发生降解菌在总量上的减少。为此,国内外许多学者都提出应用生物强化技术来提高降解菌对环境污染物的降解效率,如:向环境中投加营养(如投加葡萄糖以便能够共代谢硝基苯);或添加底物类似

物来刺激降解菌的生长或提高其降解活性；或通过遗传工程手段改良环境污染物降解菌，其中最后一种方法是目前最有希望和前途的一种手段。通过遗传工程改良或构建环境污染物降解菌有以下几种手段。

3.1 构建“超级细菌” 质粒可分为相容性质粒和非相容性质粒，可以把相容性的降解质粒转化到一种菌株里，赋予该菌株能够同时降解多种有机污染物的能力。当然，也可以把不同的降解基因通过体外重组组建到同一个质粒或载体上去，然后再把这个质粒转化到特定环境的优势菌株中去。这样，就可以构建“超级细菌”，从而扩大其对污染物的降解范围，提高治理效果，增强其净化环境的作用。

3.2 原生质体融合 原生质体融合技术在生物修复中的应用始于80年代初，但在短短的几年里得到了较为广泛的应用。在有些情况下，两种或多种微生物在共同存在时才能降解苯胺、硝基苯及TNT，单独存在时不能降解该污染物，这可能是因为彼此为对方提供了生长所必须的条件或为对方消除了生长的障碍，使得它们在共存的条件能够顺利降解环境污染物。在这种情况下，可以采用原生质体融合技术融合这两种微生物，融合子就会具备两个亲本的基因与优点：能够降解某种环境污染物，这也是目前污染治理工程菌制备的一个主要途径。

3.3 降解酶或降解基因的改良 通常，人们从自然界筛选的降解菌其降解酶的活性较低，不能满足实际需要。可以通过各种分子生物学技术来提高其活性，以增强降解菌对污染物的降解能力，如可以通过定向诱变或随机突变等技术来筛选高活性的降解基因或降解酶。DNA-改组技术是1994年由美国的Stemmer博士^[14]首先提出来的，是一种在试管内模拟达尔文进化的过程。自DNA改组技术诞生以来，得到了迅猛的发展和广泛的应用，美国已经开始应用该技术去除环境污染物。

我们有理由相信，随着分子生物学的飞速发展，应用分子生物学技术改良或构建新的环境污染物降解菌为人们指明了光明的方向。一些科学家指出，过分强调或夸大基因工程菌的危害，将会使人们失去一个对付环境污染的强有力的工具。

参 考 文 献

- [1] 韦朝海, 任源, 谢波, 等. 环境科学研究, 1999, 12 (3): 10~13.
- [2] Michael L, Christel H, Gunther D, *et al.* Arch Microbiol, 1990, 155: 56~61.
- [3] Allan K, Deboah K, Ronald F T. Appl Environ Microbiol, 1989, 55 (2): 385~389.
- [4] Kenji A, Yoko N, Shuichiro M, *et al.* Agric Biol Chem, 1990, 54 (1): 205~206.
- [5] Spangord R J, Spain J C, Nishino S F, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1991, 57: 3200~3205.
- [6] Kwan H J, Jang Y L, Hak S K. Biotechnol and Bioengng, 1995, 48: 625~630.
- [7] Billy E H, Spain J C. Appl Environ Microbiol, 1991, 57 (11): 3156~3162.
- [8] 李湛江, 韦朝海, 任源, 等. 环境科学, 1999, 20 (5): 2024.
- [9] 尹萍, 白彦彦, 周培瑾. 微生物学报, 1998, 38 (4): 295~299.
- [10] 黄俊, 周申范. 环境科学与技术, 1999, 3: 17~19.
- [11] Meyers N L. Current Microbiol, 1992, 24 (6): 303~310.
- [12] Whited G M, Gibson D. J Bacteriol, 1991, 173: 3017~3020.
- [13] Flsom B R, Chapman P J, Pritchard P H. Appl environ Microbiol, 1990, 56: 1279~1285.
- [14] Stemmer W P. Nature, 1994, 370 (4): 389~391.