



微生物降解硝基芳烃及其卤代衍生物的研究进展

闵军^{1,2,3}, 陈卫卫¹, 李俊德¹, 胡晓珂^{1,2,3*}

¹中国科学院烟台海岸带研究所, 海岸带生物学与生物资源利用重点实验室, 山东 烟台 264003

²青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东 青岛 266237

³中国科学院海洋大科学研究中心, 山东 青岛 266237

摘要: 硝基芳烃化合物作为一种重要的化工原料, 广泛应用于医药、染料、农药等化工产品的合成。在给人类社会带来空前的物质繁荣的同时, 其造成的环境污染问题也成为人类社会面临的重要挑战之一。微生物在这些环境污染物的降解中起着重要的作用。近几十年, 环境微生物工作者对微生物降解硝基芳香污染物的各个步骤, 包括趋化感应、分解代谢及生物修复进行了大量的研究工作, 获得了丰富的知识。本文综述了硝基芳烃及其卤代衍生物的微生物代谢途径、代谢机理、趋化及修复研究进展, 并对本领域的研究进行了展望, 有助于全面认知硝基芳烃污染物的微生物降解过程, 为污染环境修复提供理论基础。

关键词: (卤代)硝基芳烃, 微生物降解, 代谢途径, 代谢机理, 趋化, 生物修复

环境异生物质是一类广泛存在于环境的难降解污染物, 虽然进入环境中仅 100 多年, 但是它们引发的环境污染问题日益严重。自然界中原本并不存在利用异生物质的微生物, 但微生物有着很强的环境适应能力, 可以通过长期的进化以适应新的环境变化, 从而利用这些异生物质进行生长和繁殖。在过去几十年里, 微生物学工作者对这类环境污染物的微生物降解进行了大量的研究工作, 越来越多的异生物质分解代谢途径在不同微生物中得到阐明。目前, 能被生物降解的异生

物质及其代谢途径的信息主要收录在 3 个数据库中, 包括 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)、MetaCyc 和 University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database (UM-BBD)。这些研究成果, 不仅为解决环境污染问题提供理论基础和资源储备, 也是从事生物降解、生物催化、生物转化以及生物修复等相关研究的前提。

硝基芳烃化合物是环境中一类典型的异生物质。该类化合物作为化工原料广泛应用于医

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFC1402300); 中国科学院前沿科学重点研究计划(QYZDB-SSW-DQC013); 烟台市科技发展计划(2017ZH092); 中国科学院青年创新促进会(2020218)

*通信作者。Tel: +86-535-2109127; E-mail: xkhu@yic.ac.cn

收稿日期: 2019-11-16; 修回日期: 2020-03-03; 网络出版日期: 2020-05-28

药、染料、农药、杀虫剂、炸药等的化学合成。随着化学工业的迅猛发展,大量人工合成的硝基芳烃通过各种途径进入到自然界。苯环结构的稳定性以及硝基的吸电子的特性,极大降低了苯环的电子云密度,导致该类化合物很难被降解,能在环境中长期残留。卤代硝基芳烃是苯环上取代了一个或多个卤素原子的硝基芳烃类化合物,其相比硝基芳烃毒性更大而且更难降解。硝基芳烃污染物及其代谢产物能够影响人体物质代谢,具有致畸、致突变、引发癌症等危险,并且在食物链中有富集和放大效应,严重威胁人类的健康和生存。

针对种类繁多、结构各异的硝基芳烃及其卤代衍生物,微生物在短时间内能进化出相应的代谢途径,并且表现出极强的适应性和代谢能力的多样性。相对于真菌和厌氧细菌的非特异性代谢和转化,细菌在有氧条件下往往能够利用硝基芳烃类化合物作为唯一的碳源、氮源和能源生长,这在污染物的生物治理和生物修复中有更大的优势。微生物工作者已分离了许多能够降解硝基芳烃污染物的细菌(表 1),并对其降解这类污染物进行了大量的研究工作。本文综述了细菌降解典型硝基芳烃,包括硝基苯、硝基苯甲酸和硝基酚及其卤代衍生物的代谢途径、分子机理、微生物趋化及修复研究进展,旨在全面认知这类污染物的微生物降解过程,为环境污染修复提供理论基础。

1 硝基芳烃化合物的微生物降解机理概述

细菌好氧条件下主要通过 4 种代谢途径来完

成硝基芳烃的降解。(1) 单加氧途径:由单加氧酶催化脱硝基,同时将羟基引入苯环形成酚类化合物,然后进入下游的开环途径。如细菌降解 2-硝基酚^[1]、4-硝基酚^[2]、2-氯-4-硝基酚^[3-5]、2-溴-4-硝基酚^[6]、2,6-二溴-4-硝基酚^[7]、2-氯-4-硝基苯甲酸^[8]。(2) 双加氧途径:由双加氧酶催化脱硝基形成二元酚,随后由双加氧酶催化开环降解,如硝基苯^[9]、2-氯硝基苯^[10]、2-溴硝基苯^[11]、2-硝基甲苯^[12]的降解。(3) 还原途径:一种方式是硝基芳烃经过硝基还原酶催化生成相应的羟胺芳香化合物,再由变位酶作用生成开环底物邻氨基苯酚,如 3-硝基酚^[13]、4-氯硝基苯^[14]和 2-氯-5-硝基酚^[15]的降解。另一种还原途径是硝基经硝基还原酶作用还原成羟胺,随后由羟胺裂解酶作用水解脱氨基,形成二羟基芳香化合物进入开环途径,例如 3-硝基苯甲酸、4-硝基苯甲酸、4-硝基甲苯的降解。(4) 形成“hydride-Meisenheimer”中间体的途径主要报道于细菌降解多硝基芳香化合物如 2,4-二硝基酚、2,4,6-三硝基酚和 2,4,6-三硝基甲苯。

虽然硝基芳烃类化合物结构各异,代谢的酶也是千变万化,但是微生物降解硝基芳烃都遵循两个关键步骤:外周代谢(peripheral metabolism)和中心代谢(central metabolism)。在外周代谢过程中,结构各异的硝基芳烃经过一系列的反应会形成几种典型开环底物,如邻苯二酚(catechol)、对苯二酚(hydroquinone)、偏苯三酚(hydroxyquinol)或原儿茶酸(protocatechuate)以及它们的衍生物(图 1)。随后,开环底物在双加氧酶的作用下进入中心代谢,随后进入三羧酸循环途径。以下我们将详细阐述微生物降解各种硝基芳烃及其卤代衍生物的代谢途径和机制。

表 1. 不同微生物对硝基芳香烃化合物及其氯代衍生物的降解

Table 1. Degradation of nitroaromatic compounds and their chlorinated derivatives by different microorganisms

Substrates	Strains	Initiate enzymes	Ring-cleavage substrates
Nitrobenzene	<i>Pseudomonas putida</i> HS12	Nitroreductases	2-Aminophenol
	<i>P. pseudoalcaligenes</i> JS45		
	<i>Comamonas</i> sp. JS765	Three-component Dioxygenases	Catechol
2-Chloronitrobenzene	<i>P. putida</i> OCNB-1	Nitroreductases	3-Chlorocatechol
	<i>P. stutzeri</i> ZWLR2-1	Three-component Dioxygenases	3-Chlorocatechol
4-Chloronitrobenzene	<i>Comamonas</i> sp. CNB-1, <i>P. putida</i> ZWL73 <i>Comamonas</i> sp. LW1	Nitroreductases	4-Chloro-2-aminophenol
2-Nitrophenol	<i>P. putida</i> B2, <i>Alcaligenes</i> sp. NyZ215	One-component Monooxygenases	Catechol
3-Nitrophenol	<i>P. putida</i> B2	Nitroreductases	Hydroxyquinol
	<i>Cupriavidus necator</i> JMP134	Nitroreductases	2-Aminohydroquinone
4-Nitrophenol	<i>Pseudomonas</i> sp. WBC-3	One-component Monooxygenases	Hydroquinone
	<i>Arthrobacter</i> sp. JS443	Two-component Monooxygenases	Hydroxyquinol
2,4-Dinitrophenol	<i>R. erythropolis</i> HL24-1 <i>R. erythropolis</i> HL24-2	–	Hydride-Meisenheimer
2,6-Dinitrophenol	<i>C. necator</i> JMP134	–	4-Nitrohydroxyquinol
2,4,6-Trinitrophenol	<i>Nocardioides</i> sp. CB22-2	–	Hydride-Meisenheimer
	<i>R. erythropolis</i> HLPM-1		
2-Chloro-4-nitrophenol	<i>Burkholderia</i> sp. strain SJ98	One-component Monooxygenases	2-Chlorohydroquinone
	<i>Burkholderia</i> sp. RKJ 800		
	<i>Arthrobacter</i> sp. SJCon		
	<i>R. imtechensis</i> RKJ 300	Two-component Monooxygenases	Hydroxyquinol
4-Chloro-2-nitrophenol	<i>Exiguobacterium</i> sp. PMA	Nitroreductases	2-Aminophenol
2-Chloro-5-nitrophenol	<i>Cupriavidus</i> sp. CNP-8	Nitroreductases	2-Aminohydroquinone
	<i>C. pinatubonensis</i> JMP134		
2,6-Dihalo-4-nitrophenol	<i>Cupriavidus</i> sp. CNP-8	Two-component Monooxygenases	6-Halo-hydroxyquinol
2-Nitrobenzoate	<i>P. fluorescens</i> KU-7	Nitroreductases	3-Hydroxy-2-aminobenzoate
	<i>A. protophormiae</i> RKJ100	Nitroreductases	2-Aminobenzoate
	<i>Arthrobacter</i> sp. SPG	Monooxygenases	Catechol
3-Nitrobenzoate	<i>Pseudomonas</i> sp. JS51	Dioxygenases	Protocatechuate
	<i>Comamonas</i> sp. JS46		
	<i>Nocardia erythropolis</i> M1	Monooxygenases	
4-Nitrobenzoate	<i>C. acidovorans</i> NBA-10	Nitroreductases	Protocatechuate
	<i>Pseudomonas</i> sp. 4NT		
	<i>Pseudomonas putida</i> TW3		
	<i>Ralstonia</i> sp. SJ98		
2-Chloro-4- nitrobenzoate	<i>Acinetobacter</i> sp. RKJ12	Monooxygenases	Catechol

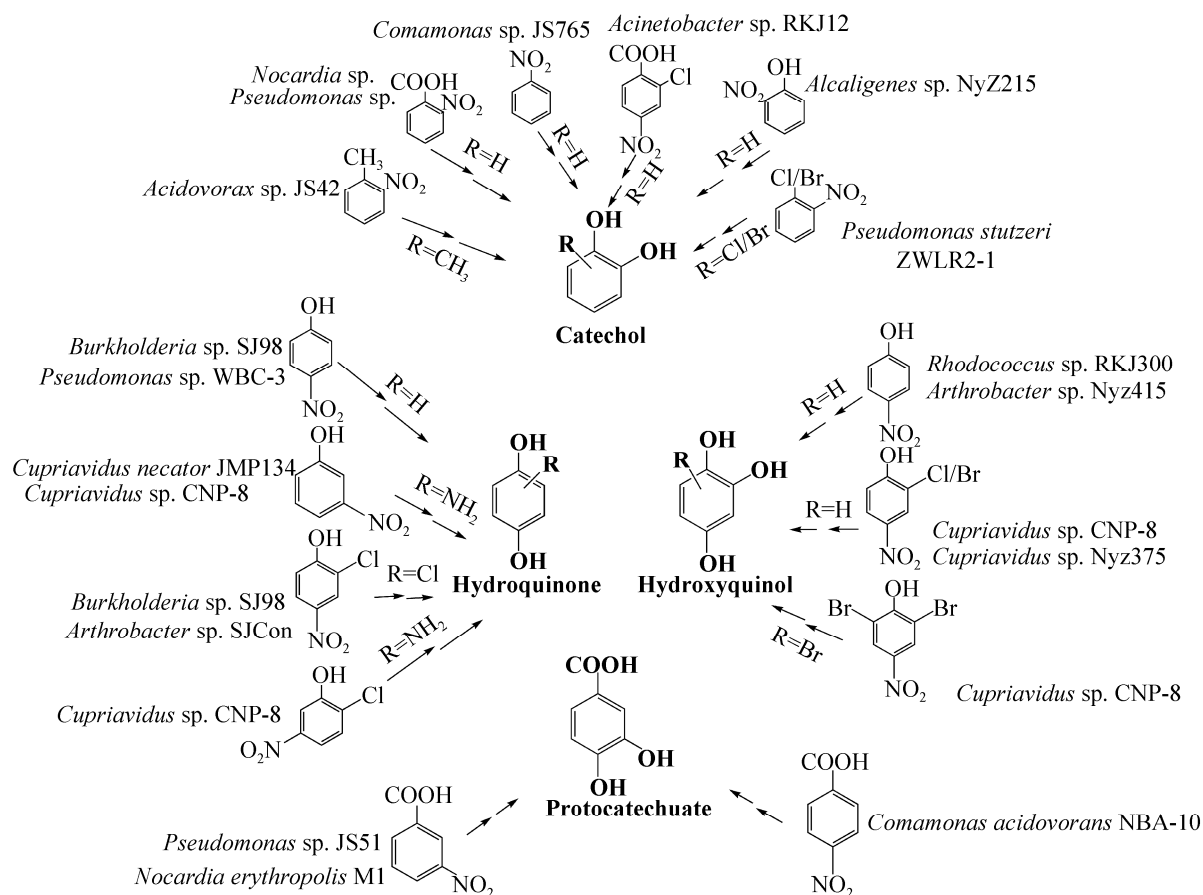


图 1. 微生物降解硝基芳香化合物的主要开环底物

Figure 1. Microbial degradation of nitroaromatics via several ring cleavage substrates.

1.1 微生物降解硝基苯类化合物

1.1.1 硝基苯的微生物代谢途径和机制: 硝基苯是结构最简单的硝基芳香烃化合物。微生物对硝基苯的降解主要通过两种途径：部分还原途径和氧化途径(图 2)。部分还原途径以能够利用硝基苯为唯一的碳源、氮源和能源生长的 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45 为代表(图 2-A)^[16]。在菌株 JS45 中，硝基苯首先在硝基还原酶作用下生成羟胺苯，然后在羟胺苯变位酶作用下生成 2-氨基酚^[17]，2-氨基酚在 2-氨基酚-1,6 双加氧酶作用下催化开环形成 2-氨基粘康酸半醛，然后被 2-氨基粘康酸半醛脱氢酶催化生成 2-氨基粘康酸，最终进入

TCA 循环^[18]。Somerville 等纯化和鉴定了 JS45 菌株中的硝基还原酶,该酶是一个黄素蛋白,在 FMN 作为辅因子条件下，能顺序催化硝基苯经由亚硝基苯生成羟胺苯^[19]。此后，该菌株中参与硝基苯代谢的羟胺苯变位酶^[17]、2-氨基粘康酸半醛脱氢酶^[20]、2-氨基酚-1,6 双加氧酶^[21]也相继被克隆和鉴定。此后，Park 等发现 *P. putida* HS12 菌株降解硝基苯的代谢途径与 JS45 相同，其硝基苯降解基因位于 2 个不同的质粒上，并且分别属于 3 个不同的操纵子^[22]。不同于部分还原途径，以硝基苯为唯一碳氮源生长的 *Comamonas* sp. JS765 则是通过双加氧途径完成硝基苯的代谢^[23](图 2-B)。该

菌株降解硝基苯时，首先在硝基苯 1,2-双加氧酶作用下氧化底物脱硝基生成邻苯二酚，随后在邻苯二酚 2,3-双加氧酶作用下开环形成 2-羟基-粘康酸半醛，并在 2-羟基-粘康酸半醛脱氢酶作用下生成 2-羟基粘康酸，随后进入 TCA 循环。Lessner 等鉴定了菌株 JS765 中起始硝基苯代谢的硝基苯 1,2-双加氧酶，该加氧酶为三组分蛋白，包含铁氧还蛋白还原酶、铁氧还蛋白、加氧酶 α 亚基和加氧酶 β 亚基。该酶具有广泛的底物利用范围，除了能催化硝基苯双加氧反应，还能氧化所有的硝基甲苯和二硝基甲苯。

1.1.2 卤代硝基苯的微生物代谢途径和机制：关于卤代硝基苯的微生物降解方面的研究主要集中在单卤素取代硝基苯如 2-氯/溴硝基苯、3-氯硝基苯 4-氯硝基苯。*P. stutzeri* ZWLR2-1^[10]和 *P. putida* OCNB-1^[24]能够利用 2-氯硝基苯作为唯一的碳源和能源生长。Liu 等克隆了菌株 ZWLR2-1 降解 2-氯硝基苯的 *cnb* 基因簇，并揭示了其代谢途径和分子机制^[10]。菌株 ZWLR2-1 中起始 2-氯硝基苯分

解代谢的酶是一个由 4 个基因(*cnbAaAbAcAd*)编码构成的三组分双加氧酶，能催化 2-氯硝基苯双加氧反应生成 3-氯-邻苯二酚，同时释放亚硝酸根离子(图 3-A)，随后 3-氯-邻苯二酚在邻苯二酚 1,2-双加氧酶(*CnbC*)作用下被裂解为 3-氯-粘康酸，进而通过 β -酮己二酸途径完成降解。对 ZWLR2-1 中的 *cnb* 基因簇遗传组成分析暗示该菌中 2-氯硝基苯的代谢途径可能是由于自然进化的过程中由硝基芳烃双加氧酶和 3-氯-邻苯二酚代谢基因簇通过组装而成的^[10]。最近，Wang 等发现 ZWLR2-1 中的 *cnb* 基因簇还负责该菌株通过 3-溴邻苯二酚开环途径分解代谢 2-溴硝基苯^[11]。菌株 OCNB-1 虽然也被报道能够通过 3-氯邻苯二酚开环降解 2-氯硝基苯，但是其降解过程与 ZWLR2-1 菌株完全不同。推测 2-氯硝基苯首先在硝基还原酶的作用下生成 2-氯苯胺，随后在苯胺双加氧酶作用下催化生成开环底物 3-氯邻苯二酚^[24]。然而，菌株 OCNB-1 中负责 2-氯硝基苯分解代谢的基因和酶至今尚未鉴定。

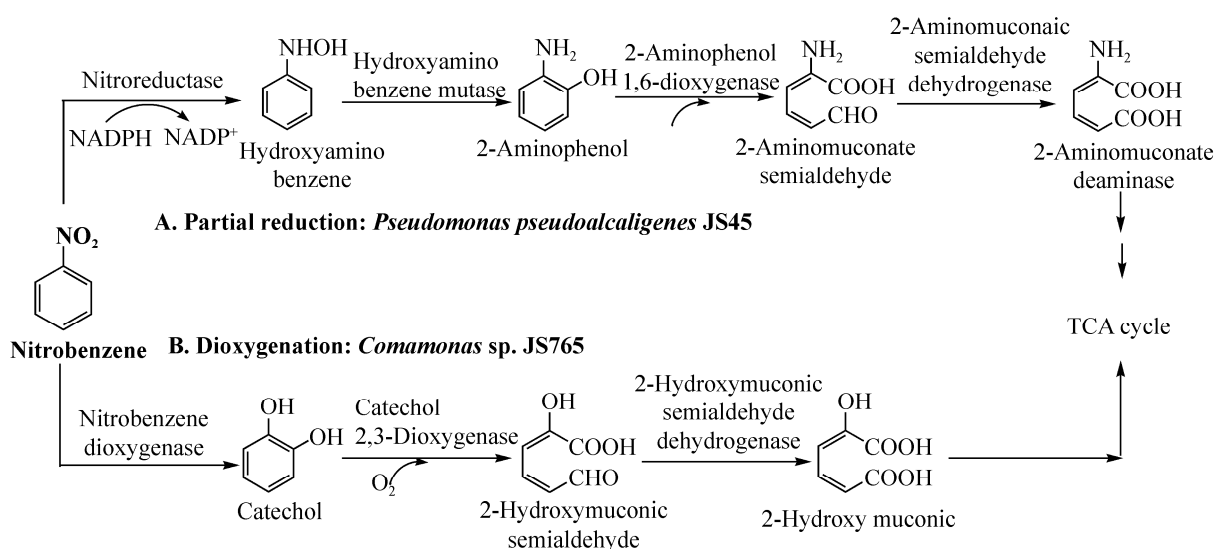


图 2. 微生物降解硝基苯的代谢途径

Figure 2. The microbial catabolic pathway of nitrobenzene. A: *P. pseudoalcaligenes* JS45 degrades nitrobenzene via partial reduction pathway; B: *Comamonas* sp. JS765 degrades nitrobenzene via dioxygenation pathway.

Comamonas sp. CNB-1、*P. putida* ZWL73 和 *Comamonas* sp. LW1 能够以 4-氯硝基苯为唯一的碳源、氮源和能源生长，并都是通过还原途径。2006 年，研究菌株 CNB-1 和 ZWL73 降解 4-氯硝基苯的代谢途径和分子机制同时被报道。在这两株菌中，4-氯硝基苯首先在 4-氯硝基苯硝基还原酶(CnbA)作用下生成 1-氯-4-羟胺苯，然后由羟胺苯变位酶(CnbB)转化为 2-氨基-5-氯苯酚^[14,25]。在菌株 CNB-1 中，2-氨基-5-氯苯酚在 2-氨基 1,6-双加氧酶(CnbCab)作用下开环形成 2-氨基-5-氯粘康酸半醛，随后由 2-氨基-5-氯粘康酸半醛脱氢酶

(CnbD)、2-氨基-5-氯粘康酸脱氢酶(CnbZ)以及 2-羟基-5-氯粘康酸互变异构酶(CnbG)进一步完成降解^[25-26](图 3-B)。

相比以上两种卤代硝基苯同分异构体，目前还没有细菌被报道能够利用 3-氯硝基苯为唯一碳氮源生长，代谢相关的基因和酶学研究更是缺乏。*P. acidovorans* CA50 在外加碳氮源的情况下可以同时降解 2-氯硝基苯、3-氯硝基苯和 4-氯硝基苯 3 种同分异构体^[27]。Ju 等将 *Comamonas* sp. JS765 中的硝基苯 1,2 双加氧酶导入 *Ralstonia* sp. JS705 中构建的工程菌能降解 3 种氯代硝基苯同分异构

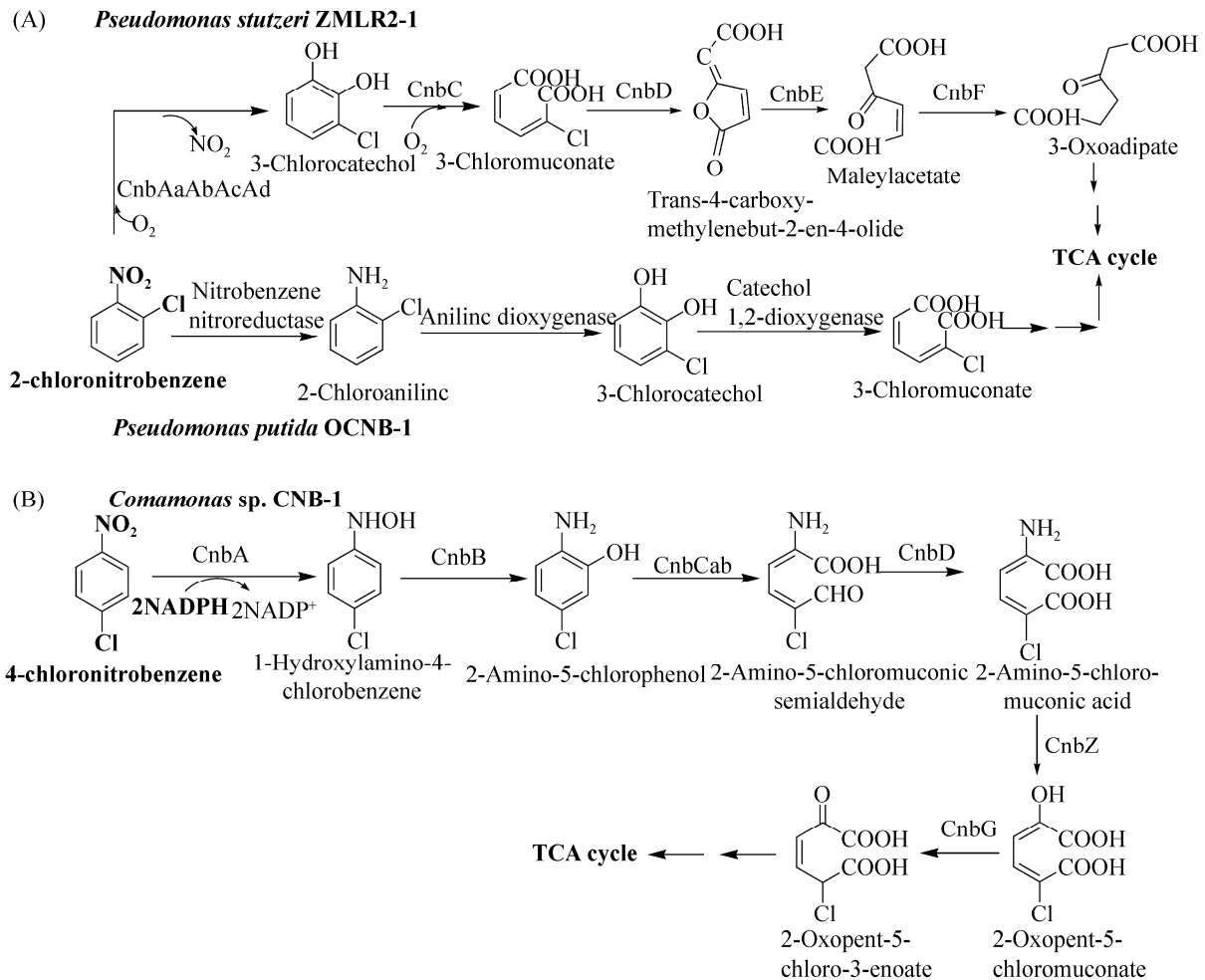


图 3. 微生物降解 2-氯代硝基苯(A)和 4-氯硝基苯(B)的代谢途径

Figure 3. The microbial catabolic pathway of 2-chloronitrobenzene (A) and 4-chloronitrobenzene (B).

体^[28]。Park 等报道将 *Pseudomonas putida* HS12 和 *Rhodococcus* sp. HS51 共培养可以完全降解 3-氯硝基苯和 4-氯硝基苯^[29]。

1.2 微生物降解硝基苯甲酸的代谢途径和机理

硝基苯甲酸包括 2-硝基苯甲酸、3-硝基苯甲酸和 4-硝基苯甲酸 3 种同分异构体。硝基取代位置不同, 微生物降解的代谢途径和机理也完全不同。微生物降解 2-硝基苯甲酸可以通过氧化途径和部分还原途径两种策略来完成。*P. fluorescens* KU-7^[30]和 *Arthrobacter protophormiae* RKJ100^[31]都能够利用 2-硝基苯甲酸作为唯一的碳源、氮源和能源生长。在菌株 KU-7 中, 2-硝基苯甲酸首先在硝基还原酶(NbaA)作用下生成 2-羟胺苯甲酸, 再由异构酶(NbaB)催化生成 3-羟基-2-氨基苯甲酸, 随后由 3-羟基-2-氨基苯甲酸 3,4-双加氧酶(NbaC)和 2-氨基-3-羧基粘康酸半醛脱羧酶(NbaD)分别催化开环和脱羧反应, 生成 2-氨基粘康酸半醛进入 TCA 循环^[30](图 4-A)。菌株 RKJ100 降解 2-硝基苯甲酸虽然也是通过还原途径来完成, 但是与 KU-7 不同, 菌株 RKJ100 中经硝基还原酶还原生成的 2-羟胺苯甲酸不是通过异构反应进一步降解, 而是进一步还原为开环底物氨基苯甲酸^[31]。Arora 报道 *Arthrobacter* sp. SPG 降解 2-硝基苯甲酸是由单加氧酶催化起始生成水杨酸, 随后水解脱羧基生成邻苯二酚, 再由邻苯二酚双加氧酶催化开环进一步降解^[32]。目前, 菌株 RKJ100 和 SPG 降解 2-硝基苯甲酸代谢的基因和酶还未鉴定。

3-硝基苯甲酸的微生物降解主要是通过氧化途径进行, 如图 4-B 所示。*Pseudomonas* sp. JS51^[33]、*Nocardia erythropolis* M1^[34]和 *Comamonas* sp. JS46^[35]都能够利用 3-硝基苯甲酸作为唯一的碳源和能源生长。菌株 JS46 通过双加氧酶起始

3-硝基苯甲酸的氧化反应, 生成原儿茶酸, 随后在原儿茶酸 4,5-双加氧酶的催化下开环, 形成 2-羟基-4-羧基粘康酸半醛进入 TCA 循环^[35]。与此不同的是, 菌株 M1 是通过单加氧酶起始 3-硝基苯甲酸的氧化反应, 生成 3-羟基苯甲酸, 继而再经过单加氧酶氧化为原儿茶酸进入开环途径^[34]。

目前报道的绝大多数细菌, 包括 *C. acidovorans* NBA-10^[36]、*Pseudomonas* sp. 4NT^[37]、*P. putida* TW3^[38]和 *P. fluorescens*^[39]降解 4-硝基苯甲酸的代谢途径都是通过还原途径, 如图 4-C 所示。其中, 菌株 NBA-10、4NT 和 TW3 降解 4-硝基苯甲酸是通过部分还原途径, 即首先由硝基还原酶催化 4-硝基苯甲酸还原, 经由 4-亚硝基苯甲酸生成 4-羟胺苯甲酸, 随后由裂解酶催化脱氨基生成原儿茶酸, 随后开环进入三羧酸循环。菌株 TW3 菌中的 4-硝基苯甲酸还原酶(PnbA)和 4-羟胺苯甲酸裂解酶(PnbB)都已经被克隆和鉴定^[40]。虽然 *P. fluorescens* 降解 4-硝基苯甲酸也是通过还原途径, 但是该菌株中 4-硝基苯甲酸首先被还原生成 4-氨基苯甲酸, 然后脱氨基生成 4-羟基苯甲酸, 随后由羟化酶催化 4-羟基苯甲酸转化生成开环底物原儿茶酸^[39], 但是参与代谢的基因和酶未被鉴定。

关于卤代硝基苯甲酸的微生物降解研究非常少。*Acinetobacter* sp. RKJ12 能利用 2-氯-4-硝基苯甲酸为唯一碳源、氮源和能源生长^[8]。不同于 4-硝基苯甲酸的微生物降解, 菌株 RKJ12 降解 2-氯-4-硝基苯甲酸首先由单加氧酶催化氧化脱氯生成 2-羟基-4-硝基苯甲酸, 然后氧化脱硝基生成 2,4-二羟基苯甲酸, 继而脱羟基生成水杨酸, 并在水杨酸羟化酶作用下氧化脱羧基生成开环底物邻苯二酚(图 4-D)。尽管 Prakash 发现 RKJ12 中参与 2,4-二羟基苯甲酸代谢基因可能在一个大小约为 55 kb 的质粒上, 但代谢途径中涉及到的基因和酶尚未鉴定。

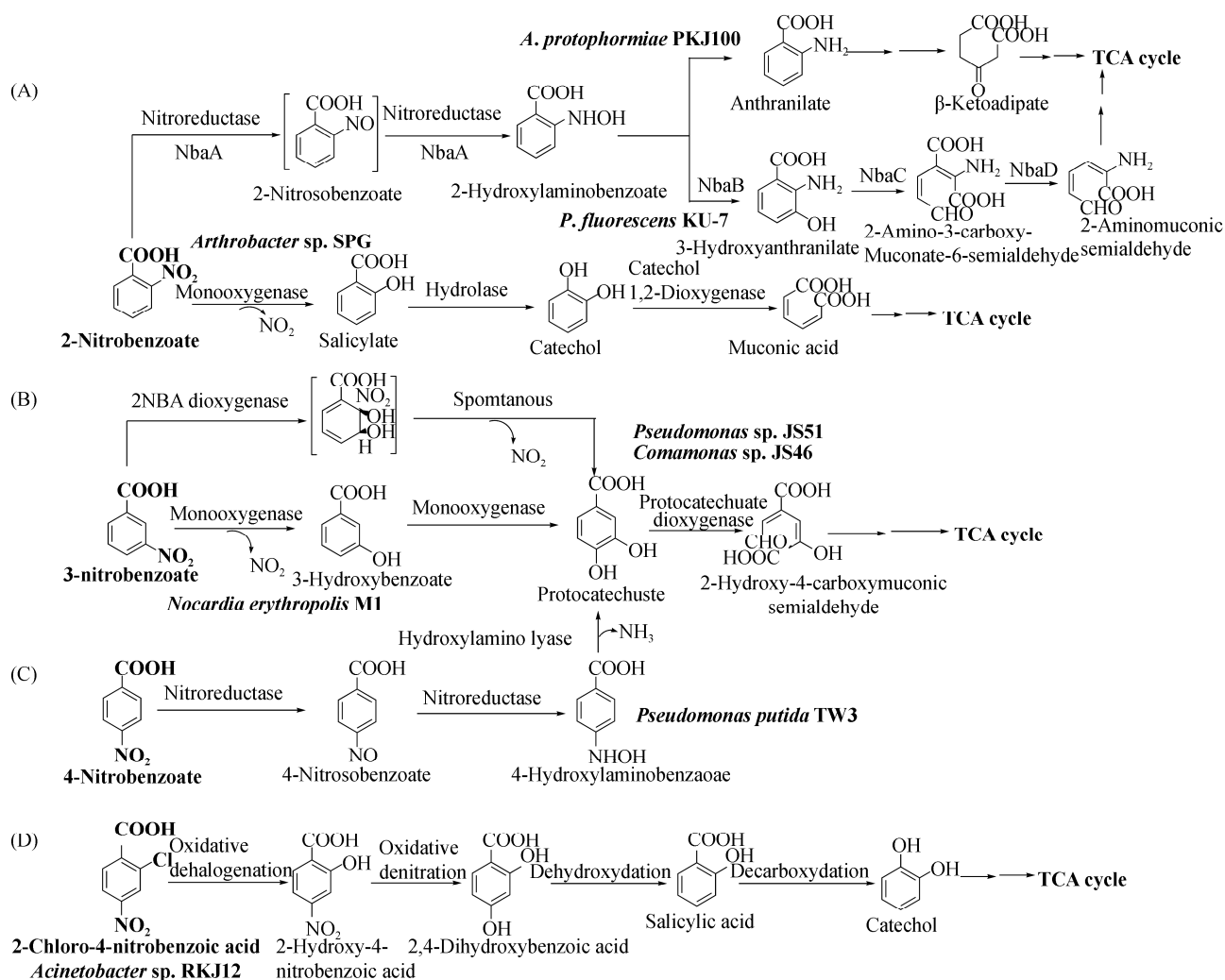


图 4. 微生物降解硝基苯甲酸的代谢途径

Figure 4. The microbial catabolic pathway of nitrobenzoate. A: 2-Nitrobenzoate; B: 3-Nitrobenzoate; C: 4-Nitrobenzoate; D: 2-Chloro-4-nitrobenzoic acid.

1.3 微生物降解硝基酚类化合物

目前已经分离了许多细菌能够降解硝基酚，包括单硝基酚、多硝基酚、卤代硝基酚。但是关于硝基酚的微生物代谢机理研究主要报道于单硝基酚及其卤代衍生物。相比硝基苯和硝基苯甲酸的微生物降解，硝基酚化合物的微生物降解机理研究更为广泛，其代谢途径多样性也最为丰富，是硝基芳烃污染物微生物降解研究中的模式化合物。

1.3.1 微生物降解单硝基酚的代谢途径和机制：

单硝基酚有 3 个同分异构体，包括 2-硝基酚、3-硝基酚和 4-硝基酚。硝基取代位置不同，微生物对其代谢途径和机理也完全不同^[41]。对于 2-硝基酚和 4-硝基酚，微生物采用氧化途径完成其代谢，而 3-硝基酚则是通过还原途径降解(图 5)。2-硝基酚微生物降解过程是由 2-硝基酚单加氧酶催化起始 2-硝基酚代谢，并以邻苯二酚为开环底物进入下游代谢途径^[42](图 5-A)。Xiao 等对 *Alcaligenens*

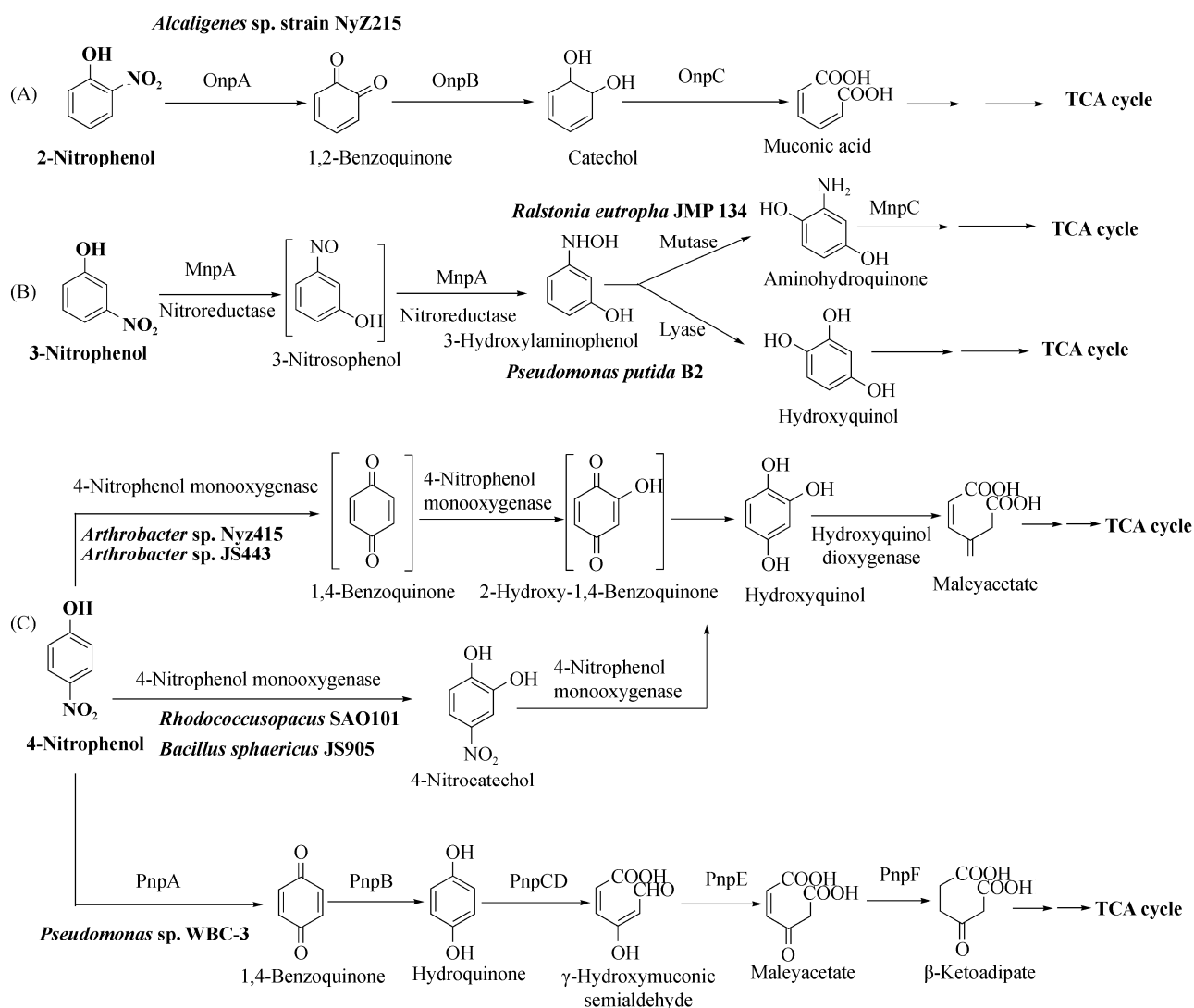


图 5. 微生物降解硝基酚的代谢途径

Figure 5. The microbial catabolic pathway of nitrophenol. A: 2-Nitrophenol; B: 3-Nitrophenol; C: 4-Nitrophenol.

sp. NyZ215 中 2-硝基酚代谢途径的分子机理研究表明, 2-硝基酚单加氧酶 OnpA 为单组分、黄素依赖的单加氧酶^[1], 并首次发现该细菌单加氧酶的 C-端有一个常常存在于真核细胞中的细胞色素 B5 的结合域, 而且是代谢活性必需的, 暗示该酶可能是细菌进化过程中通过两种来源不同的结构域融合产生^[43]。

微生物对 3-硝基酚的代谢有两种不同的策略

(图 5-B)。Pseudomonas sp. B2 降解 3-硝基酚的过程中, 3-硝基酚首先被还原成亚硝基酚, 进一步还原成 3-羟胺酚, 接着被 3-羟胺酚裂解酶催化生成偏苯三酚^[44]。对 Cupriavidus necator (最初分类为 Ralstonia eutropha) JMP134 降解 3-硝基酚的代谢途径和分子机制研究表明, 3-硝基酚首先被硝基还原酶(MnpA)还原为 3-羟胺酚, 然后在 3-羟胺酚变位酶的作用下转变为氨基对苯二酚, 随后由

对苯二酚双加氧酶(MnpC)催化开环进入下游代谢途径^[13, 45-46]。最近,我们也揭示了 *Cupriavidus* sp. CNP-8 经由硝基还原酶起始,并经氨基对苯二酚开环途径降解 3-硝基酚的分子机制^[15]。

相对于上述两个同分异构体,4-硝基酚有更大的危害性并且在环境中分布较为广泛,因此,对 4-硝基酚的生物降解研究更为重视,目前筛选到的降解菌超过 20 株^[41]。对于 4-硝基酚,微生物也有两种完全不同的氧化途径,即对苯二酚途径和偏苯三酚途径。这两种途径中,催化 4-硝基酚初始反应的都是 4-硝基酚单加氧酶,但代谢途径不同、催化代谢反应的酶的特性也完全不同,其起源和进化过程也不一样。对苯二酚途径主要存在于革兰氏阴性菌株中,如 *Moraxella*^[47]、*Pseudomonas*^[2]和 *Burkholderia*^[4]。Zhang 等首次从分子、生化和遗传学水平揭示了 *Pseudomonas* sp. WBC-3 降解 4-硝基酚的对苯二酚途径^[2]。在菌株 WBC-3 中,单组分的 4-硝基酚单加氧酶(PnpA)先催化 4-硝基酚氧化脱硝基生成对苯二醌,随后由对苯二醌还原酶(PnpB)催化对苯二醌还原为对苯二酚,并由对苯二酚双加氧酶(PnpCD)催化开环进入下游代谢途径(图 5-C)。4-硝基酚代谢的偏苯三酚途径主要存在于革兰氏阳性菌株中,如 *Rhodococcus*^[48]、*Arthrobacter*^[49-50]和 *Bacillus*^[51]。*B. sphaericus* JS905 和 *R. opacus* SAO101 降解 4-硝基酚时,先由双组分单加氧酶催化 4-硝基酚的羟化反应生成 4-硝基邻苯二酚,并进一步催化 4-硝基邻苯二酚单加氧反应脱硝基生成偏苯三酚。但是在 *Arthrobacter* sp. Nyz415 和 *Arthrobacter* sp. JS443 中,双组分单加氧酶则是先催化 4-硝基酚进行单加氧反应脱硝基生成对苯二醌,再催化对苯二醌羟化反应生成 2-羟基-1,4-对苯二醌,后

者自发还原生成偏苯三酚(图 5-C)。虽然,革兰氏阳性细菌降解 4-硝基酚都是以偏苯三酚为开环底物,但是由于双组分单加氧酶催化特性差异,革兰氏阳性细菌分解代谢 4-硝基酚也表现出代谢途径的多样性。

1.3.2 卤代硝基酚的微生物代谢途径和机制: 近几年,一些典型卤代硝基酚如 2-氯-4-硝基酚、4-氯-2-硝基酚、2-氯-5-硝基酚、2-溴-4-硝基酚、2,6-二溴-4-硝基酚的微生物降解相继被报道。其中以 2-氯-4-硝基酚的微生物降解研究最为广泛,目前有 7 株细菌被报道能够利用 2-氯-4-硝基酚为唯一碳氮源生长,包括 *Burkholderia* sp. SJ98^[52]、*Rhodococcus imtechensis* RKJ 300^[53]、*Cupriavidus* sp. CNP-8^[54]、*Cupriavidus* sp. NyZ375^[6]。我们首次报道了革兰氏阴性菌 *Burkholderia* sp. SJ98^[4]和革兰氏阳性菌 *R. imtechensis* RKJ 300^[3]降解 2-氯-4-硝基酚的分子机制。这两株细菌在降解 2-氯-4-硝基酚时采用两种完全不同的代谢策略。在革兰氏阴性细菌 SJ98 中,单组分单加氧酶(PnpA)起始 2-氯-4-硝基酚的分解代谢生成 2-氯-对苯二醌,并在对苯二醌还原酶(PnpB)的作用下生成开环底物 2-氯对苯二酚,随后由对苯二酚双加氧酶(PnpCD)催化开环^[4](图 6-B)。革兰氏阳性细菌 RKJ300 由双组分单加氧酶(PnpA1A2)催化起始 2-氯-4-硝基酚的分解代谢生成 2-氯对苯二醌,进一步催化 2-氯对苯二醌水解脱氯生成开环底物偏苯三酚,然后由偏苯三酚开环酶(PnpB)催化偏苯三酚开环进入下游代谢途径^[3](图 6-B)。最近,我们发现革兰氏阴性细菌 *Cupriavidus* sp. CNP-8 降解 2-氯-4-硝基酚也是由双组分单加氧酶 HnpAB 催化起始,虽然菌株 CNP-8 和 RKJ300 具有一样的代谢途径,但是这两株细菌中参与 2-氯-4-硝基酚代谢的基因

簇的进化起源完全不同^[5]。同时, Li 等报道了 *Cupriavidus* sp. NyZ375 菌株经过偏苯三酚降解 2-溴-4-硝基酚的代谢途径和分子机制^[6]。与菌株 CNP-8 降解 2-氯-4-硝基酚不同, 菌株 NyZ375 是先由双组分单加氧酶 BnpAB 催化 2-溴-4-硝基酚生成 4-硝基邻苯二酚中间体, 随后该单加氧酶进一步催化 4-硝基邻苯二酚脱硝基生成偏苯三酚。

Exiguobacterium sp. PMA 是目前唯一一株被报道能利用 4-氯-2-硝基酚为唯一碳源和能源生长的野生型纯培养细菌^[55]。中间代谢产物鉴定推测该菌株降解 4-氯-2-硝基酚通过还原途径, 即 4-氯-2-硝基酚在硝基还原酶的催化下生成 4-氯-2-氨基苯酚, 然后由脱卤酶催化脱氯反应生成 2-氨基苯酚, 随后进一步降解进入三羧酸循环(图 6-A)。然而, 菌株 PMA 中涉及 4-氯-2-硝基酚分解代谢的基因和酶尚未被鉴定。此外, 还有通过遗传工程和混合培养等手段降解 4-氯-2-硝基酚的报道。Bruhn 等通过遗传改造将 *C. necator* JMP134 的氯邻苯二酚代谢基因簇导入到能将 4-氯-2-硝基酚转化成氯邻苯二酚的 *Pseudomonas* sp. N31 中, 构建了能利用 4-氯-2-硝基酚作为唯一碳源、氮源和能源的工程菌^[56]。Beunink 和 Rehm 通过混合培养 *Enterobacter cloacae* 和 *Alcaligenes* sp. TK-2 实现了 4-氯-2-硝基酚完全降解, 其中 *E. cloacae* 首先在厌氧条件下将 4-氯-2-硝基酚转化为 4-氯-2-氨基酚, 然后 *Alcaligenes* sp. TK-2 在好氧条件下进一步降解 4-氯-2-氨基酚^[57]。

关于 2-氯-5-硝基酚的微生物降解, 目前只有 *C. pinatubonensis* JMP134^[46] 和 *Cupriavidus* sp. CNP-8^[15] 被报道能够利用 2-氯-5-硝基酚为唯一碳源、氮源和能源生长。这两株细菌都是通过部分还原途径完成 2-氯-5-硝基酚的分解代谢, 即在硝

基还原酶作用下, 2-氯-5-硝基酚被催化成 2-氯-5-羟胺酚, 进而转化为 2-氨基-5-氯对苯二酚, 随后由脱卤酶催化 2-氨基-5-氯对苯二酚脱氯生成开环底物 2-氨基对苯二酚(图 6-C)。我们克隆了菌株 CNP-8 中的 2-氯-5-硝基酚代谢基因簇 *mnpABCDEF*, 并鉴定了 2 个代谢关键酶 MnpA 和 MnpC^[15]。MnpA 是一个 NADPH 依赖的硝基还原酶, 起始催化 2-氯-5-硝基酚经由 2-氯-5-亚硝基酚生成 2-氯-5-羟胺酚。MnpC 是一个亚铁离子依赖的双加氧酶, 负责催化 2-氨基对苯二酚开环。

相比单卤代硝基酚, 微生物降解多卤素取代硝基酚方面的报道极少。我们筛选鉴定 *Cupriavidus* sp. CNP-8 除了能够降解 2-氯-4-硝基酚、2-氯-5-硝基酚, 还能够利用 2,6-二溴-4-硝基酚为唯一碳源、氮源和能源生长。我们鉴定了菌株 CNP-8 降解 2,6-二溴-4-硝基酚的代谢途径及参与其代谢的基因簇 *hnpABCD*, 并对其中的双组分单加氧酶(HnpAB)和开环酶(HnpC)进行了酶学特性和生理功能研究^[7]。HnpAB 催化 2,6-二溴-4-硝基酚先氧化脱硝基生成 2,6-二溴对苯二醌, 并进一步催化该产物水解脱溴生成 6-溴偏苯三酚(图 6-D), 且氧化酶组分编码基因 *hnpA* 是菌株 CNP-8 降解 2,6-二溴-4-硝基酚所必需的基因, 而还原酶组分 HnpB 则是非特异性的。HnpC 是一个偏苯三酚双加氧酶, 能催化 6-溴偏苯三酚双加氧开环生成 2-溴马来酰乙酸, 进入后续的分解代谢。

综上所述, 微生物降解硝基芳香化合物代谢途径多样化, 参与代谢的酶也是各不相同。以研究最为透彻的硝基酚的微生物代谢为例, 硝基的取代位置不同, 微生物降解 2-硝基酚、3-硝基酚和 4-硝基酚这 3 种同分异构体的代谢途径和酶存在很大的差异。微生物降解 3-硝基酚由硝基还原

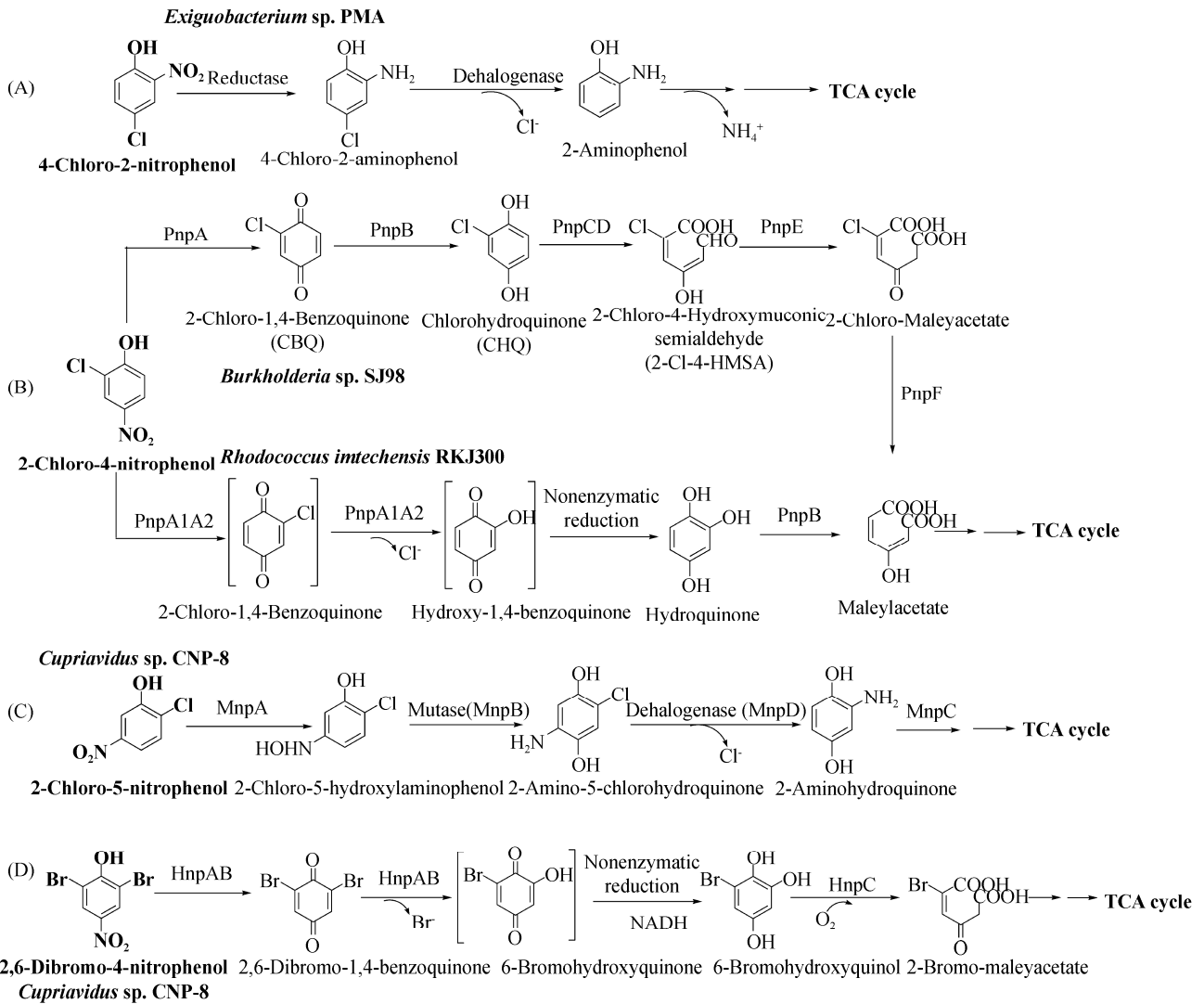


图 6. 微生物降解卤代硝基酚的代谢途径

Figure 6. The microbial catabolic pathway of halogenated nitrophenol. A: 4-Chloro-2-nitrophenol; B: 2-Chloro-4-nitrophenol; C: 2-Chloro-5-nitrophenol; D: 2,6-Dibromo-4-nitrophenol.

酶催化起始，而且硝基还原酶的底物范围普遍较广。微生物降解 2-硝基酚和 4-硝基酚虽然都是通过单加氧催化起始，但是起始 2-硝基酚和 4-硝基酚代谢的单加氧酶基本没有相似性。2-硝基酚单加氧酶和单组分 4-硝基酚单加氧酶的底物范围都比较窄。双组分 4-硝基酚单加氧酶则不同，这类酶除了能够催化 4-硝基酚氧化脱硝基，还能催化卤代-4-硝基酚的氧化脱硝基和脱卤反应，暗

示这类酶具有较广的底物范围。

2 微生物趋化硝基芳香化合物

某些细菌在降解芳烃污染物的同时，也会对环境污染物产生趋化感应。趋化是细菌趋向对自身有利或趋避对自身有害的环境因子或者化学物质，从而使细菌处于最适生长环境中的一种行为。趋化是细菌进化过程中产生的一种选择优势，能

够使细菌从环境中获取碳源和能源时更具有竞争力^[58]。细菌趋化还可以促进代谢质粒在环境微生物中进行传递,从而提高环境中污染物的生物利用度,在生物降解和修复方面起着十分重要的作用^[59]。*Escherichia coli* 由于具有最简单的趋化信号通路,其趋化系统及机制研究最为广泛,并作为细菌趋化性研究的模式生物。细菌趋化过程可以分为3个部分:(1)位于细胞膜上的甲基受体趋化蛋白(methyl-accepting chemotaxis protein, MCP)感应趋化效应物,通过自身构象变化产生信号;(2)信号通过MCP传递,影响组氨酸激酶(CheA)的自磷酸化活性,随后进一步影响响应调控蛋白(CheY)的磷酸化水平;(3)磷酸化的CheY与鞭毛蛋白(FliM)结合,进而影响细菌鞭毛的旋转方向,最终决定细菌的运动方向^[60]。

某些细菌如 *Pseudomonas*、*Burkholderia*、*Acidovorax*、*Cupriavidus* 被报道对硝基芳香族化合物具有趋化响应现象^[60]。细菌对硝基芳香族化合物的趋化分为代谢依赖型和非代谢依赖型。*Burkholderia* (最初分类为 *Ralstonia*) sp. SJ98 对其能够代谢的硝基芳香族化合物(4-硝基酚、4-硝基邻苯二酚、3-甲基-4-硝基酚、2-氯-4-硝基酚、4-氯-2-硝基苯甲酸和 5-氯-2-硝基苯甲酸)和共代谢底物(3-氯-4-硝基酚和 2-氯-4-硝基苯甲酸)会产生正向趋化效应,而对不能代谢的 4-氯-2-硝基酚不具有趋化响应^[61],说明该菌株对硝基芳香族化合物的趋化响应为代谢依赖型。*Pseudomonas* sp. JHN 对其代谢底物 4-氯-2-硝基酚和 4-氯-3-硝基酚也具有正向趋化响应^[62-63]。与菌株 SJ98 和 JHN 对硝基芳烃的代谢依赖型响应不同, *Pseudomonas* sp. WBC-3 对 4-硝基酚、硝基苯和 2,6-二硝基酚以及多种芳香族化合物降解中间产物(邻苯二酚、水杨酸、4-羟基苯甲酸、龙胆酸和原儿茶酸)的趋化响应为非代

谢依赖型^[64]。*P. putida* TW3 和 *Pseudomonas* sp. 4NT 对 4-硝基甲苯及其代谢中间物 4-硝基苯甲酸具有相似的趋化特性,并且趋化响应都是由它们的中间物代谢 β -酮己二酸诱导完成^[65]。相比而言,菌株 WBC-3 趋化多种芳香族化合物,其可能具有组成型的 β -酮己二酸趋化系统^[64]。此外,微生物趋化硝基甲苯、二硝基甲苯(2,3-、2,4-、2,5-二硝基甲苯)、2,4,6-三硝基甲苯也有相应的报道^[66]。最近,我们报道了 *Cupriavidus* sp. CNP-8 对 3-硝基酚、2-氯-4-硝基酚和 2-氯-5-硝基酚的趋化响应现象^[54]。

虽然不少细菌趋化响应硝基芳香族化合物,但主要集中在报道其趋化现象^[60]。相比 *E. coli*,降解芳香族化合物的细菌基因组中趋化受体冗余现象非常突出^[67],导致已成功功能鉴定的硝基芳烃的甲基受体趋化蛋白(MCP)数量非常有限,关于趋化受体感应硝基芳烃化合物的机制更是鲜有报道。Luu 等鉴定了 *P. putida* F1 中的甲基受体趋化蛋白 PcaY,能介导菌株 F1 趋化响应多种取代苯甲酸,包括 3-硝基苯甲酸和 4-硝基苯甲酸^[68]。*P. fluorescens* KU-7 中鉴定的甲基受体趋化蛋白 NbaY 介导了该菌株对 2-硝基苯甲酸的趋化^[69]。但是,与这两个甲基受体趋化蛋白直接结合的配体并未报道,它们引发细菌趋化硝基芳烃的确切机制也尚不明确。

3 硝基芳香族化合物污染环境的微生物修复

环境污染修复技术包括物理、化学和生物修复方法。相比物理/化学修复技术,生物修复具有二次污染小、成本低、可大面积治理等优点。此外,很多微生物能够利用硝基芳烃为唯一碳源、氮源和能源生长,在污染修复过程中不会产生中

间代谢物, 可以完全脱毒污染物, 使其在环境污染修复中具有更大的优势。目前, 有很多利用生物增强成功修复硝基芳烃污染的报道。关于硝基芳烃污染物的微生物修复, 有单一细菌和复合菌群修复两种策略。

3.1 利用单一细菌修复硝基芳烃污染

Pseudomonas putida ZWL73 能以硝基苯为唯一碳源和氮源生长^[14]。Zhao 等将菌株 ZWL73 接入到硝基苯污染土壤中进行生物增强, 不仅能快速去除硝基苯污染, 还可以降低硝基苯对土著菌的毒性。土壤中氨氧化细菌群落结构变化与硝基苯、氨、亚硝酸盐和硝酸盐浓度等环境因子的变化相关, 而且生物增强能降低这些环境因子对氨氧化细菌群落结构的影响^[70]。Niu 等利用菌株 ZWL73 进行了 4-氯硝基苯污染土壤的微生物修复^[71]。在污染土壤中, 4-氯硝基苯抗性菌的数量有所增加, 而可培养异养细菌的数量和多样性则明显降低。生物增强会导致土著细菌群落结构发生明显的变化。Liu 等还报道了苜蓿与 *Comamonas* sp. CNB-1 联合修复 4-氯硝基苯污染土壤, 这种植物-微生物联合修复技术可以在 1-2 d 内完全去除土壤中的污染物, 并且菌株 CNB-1 的引入能消除 4-氯硝基苯对苜蓿的毒性。在联合修复过程中, 苜蓿根际 CNB-1 菌的数量是非根际土壤的 10-100 倍, 并且菌株 CNB-1 可以稳定定殖在苜蓿根系^[72]。

关于单一菌株修复硝基酚污染土壤也有相关的报道。Labana 等通过生物增强研究了 4-硝基酚降解菌 *Arthrobacter protophormiae* RKJ100 对 4-硝基酚污染土壤的修复效果^[73]。他们发现, 相比游离细菌, 菌株 RKJ100 经玉米粉固定后能明显提升细菌的稳定性。自然环境下, 小规模的原位修复试验显示固定化细胞在 5 d 内能完全降解原

位环境中的 4-硝基酚污染; 而在此期间, 游离的细菌只能降解 75% 的 4-硝基酚污染。而且, 在污染修复过程中, 4-硝基酚的去除速率随土壤深度的增加而降低。我们利用 *Cupriavidus* sp. CNP-8 成功修复了 2-氯-4-硝基酚污染土壤, 发现菌株 CNP-8 经底物预先诱导后能显著提升 2-氯-4-硝基酚的去除速率^[54]。此外, 我们还报道了单一细菌修复多种硝基酚复合污染土壤。*Burkholderia* sp. SJ98 能以 4-硝基酚、3-甲基-4-硝基酚和 2-氯-4-硝基酚为唯一碳源、氮源和能源生长, 利用该菌株实现了这 3 种硝基酚复合污染土壤的生物修复。结果显示生物增强能在 8-16 d 完全去除 3 种硝基酚污染物, 而且菌株 SJ98 的引入可以缓解硝基酚污染对土著菌的毒害。对菌株 SJ98 降解这 3 种硝基酚的单加氧酶编码基因进行了定量分析, 显示菌株 SJ98 的丰度在生物修复过程中虽然有所下降, 但是污染修复完成后, 该菌株能在系统中稳定存在^[74]。

3.2 利用复合菌群修复硝基芳烃污染

单硝基酚包含 3 种同分异构体, 即 2-硝基酚、3-硝基酚和 4-硝基酚。Chi 等将 2-硝基酚降解菌 *Alcaligenes* sp. NyZ215、3-硝基酚降解菌 *Cupriavidus necator* JMP134 和 4-硝基酚降解菌 *Pseudomonas* sp. WBC-3 接入到 3 种单硝基酚污染土壤中研究复合菌群的生物增强效果^[75]。相对于未接菌的自然土壤, 生物增强能显著加快 3 种硝基酚的降解, 且铵根和亚硝酸根的积累在生物增强处理中也相对较快。通过荧光定量 PCR 对这 3 株细菌中参与硝基酚代谢的功能基因进行定量分析, 表明菌株 NyZ215、JMP134 和 WBC-3 在生物修复过程中能在土壤里较好地存活, 而且在污染物完全降解后可以利用土壤里原有的资源并建

立新的生态系统。在生物增强过程中,虽然土壤土著细菌的物种丰富度随时间的变化表现出动态变化过程,但是生物增强对土壤土著菌群结构的影响并不明显^[75]。最近, Fu 等将菌株 NyZ215、JMP134 和 WBC-3 固定在聚氨酯上,在实验室规模的连续反应器中同时降解了 2-硝基酚、3-硝基酚和 4-硝基酚 3 种同分异构体^[76]。在 18 d 内,固定化的复合菌群可以降解 2.8 mol/L 2-硝基酚、1.5 mol/L 3-硝基酚和 2.3 mol/L 4-硝基酚。与土壤修复类似,这些细菌在硝基酚降解过程中能保持相对稳定。

综上所述,虽然微生物修复硝基芳烃污染环境的研究不少,但大多是在实验室理想条件下进行,涉及到原位环境污染修复的报道很少,究其原因可能是原位环境各种生物和非生物影响因素太多。对于修复手段而言,相比单一菌株修复,采用复合菌群修复更为可取。目前原位修复瓶颈主要是修复工艺条件难以控制。生物修复要付诸实施就需要充分考虑到原位环境的复杂性。除了从原位环境筛选高效的降解菌,主要还取决于气候条件,比如温度、氧气、含水量等。因此,在原位修复实际应用过程中就需要考虑搭建温室以控温、经常翻土以增氧、间隔施水以保湿,但这又势必会导致修复过程中造成较大耗能,经济性有待考究。

4 结论和展望

微生物降解硝基芳烃目前主要集中在单硝基芳烃的微生物分解代谢,而关于多硝基芳烃,尤其是卤代多硝基芳烃的微生物代谢途径和分子机制还有待更深入的研究。开展相关研究的前提是分离具有多硝基芳烃及其卤代衍生物降解能力的

菌株,为这类难降解污染物的生物降解、生物转化及生物修复提供充足的菌株资源。此外,在硝基芳烃化合物降解新基因和酶的挖掘方面,传统的分子生物学和遗传操作方法主要用于可培养细菌中的功能基因鉴定,未来可以借助宏基因组手段,构建宏基因组文库进行高通量筛选,挖掘环境微生物中新的污染物降解基因,为合成生物学提供完备的基因资源。

趋化对微生物降解环境污染物具有重要的意义,但是,目前关于硝基芳烃的微生物趋化研究不多,鉴定的微生物趋化硝基芳烃的甲基受体趋化蛋白非常有限,引发细菌趋化这类污染物的确切机制更是鲜有报道。因此,鉴定微生物趋化硝基芳烃的甲基受体趋化蛋白及其功能也是环境微生物基础研究的一个重要方向,可以帮助我们认知微生物对环境中的硝基芳烃污染物的响应及其适应性进化机制。

硝基芳烃的微生物降解研究,最终目的是修复这类污染物污染环境,从而改善人们的生存环境。很多微生物能够降解硝基芳烃,但是生物修复大多只是在实验室条件下取得一定的成效。那么,这些微生物是否适合用于修复原位环境、修复效果如何、原位环境的微生物生态和复杂的化学组成是否支持它们在自然条件下降解硝基芳烃,这些都有待考究。在获得具有高效降解能力,并适应复杂原位环境的修复菌株方面,借助微生物组学和合成生物学手段构建适应不同环境、且具有广底物谱的污染物降解工程菌已经成为环境微生物领域的研究热点。此外,在微生物修复过程中,除了关注关键的降解功能菌外,解析它们与原位环境微生物的信号交流及代谢网络也极其重要,这对研发原位修复微生物菌群具有重要的指导意义。

参考文献

- [1] Xiao Y, Zhang JJ, Liu H, Zhou NY. Molecular characterization of a novel *ortho*-nitrophenol catabolic gene cluster in *Alcaligenes* sp. strain NyZ215. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(18): 6587–6593.
- [2] Zhang JJ, Liu H, Xiao Y, Zhang XE, Zhou NY. Identification and characterization of catabolic *para*-nitrophenol 4-monooxygenase and *para*-benzoquinone reductase from *Pseudomonas* sp. strain WBC-3. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(8): 2703–2710.
- [3] Min J, Zhang JJ, Zhou NY. A two-component *para*-nitrophenol monooxygenase initiates a novel 2-chloro-4-nitrophenol catabolism pathway in *Rhodococcus imtechensis* RKJ300. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(2): 714–723.
- [4] Min J, Zhang JJ, Zhou NY. The gene cluster for *para*-nitrophenol catabolism is responsible for 2-chloro-4-nitrophenol degradation in *Burkholderia* sp. strain SJ98. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(19): 6212–6222.
- [5] Min J, Xu LX, Fang SY, Chen WW, Hu XK. Molecular and biochemical characterization of 2-chloro-4-nitrophenol degradation via the 1,2,4-benzenetriol pathway in a Gram-negative bacterium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(18): 7741–7750.
- [6] Li YY, Liu H, Xu Y, Zhou NY. A two-component monooxygenase initiates a novel 2-bromo-4-nitrophenol catabolic pathway in newly isolated *Cupriavidus* sp. strain NyZ375. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2019, 140: 99–105.
- [7] Min J, Chen WW, Hu XK. Biodegradation of 2,6-dibromo-4-nitrophenol by *Cupriavidus* sp. strain CNP-8: Kinetics, pathway, genetic and biochemical characterization. *Journal of Hazardous Materials*, 2019, 361: 10–18.
- [8] Prakash D, Kumar R, Jain RK, Tiwary BN. Novel pathway for the degradation of 2-chloro-4-nitrobenzoic acid by *Acinetobacter* sp. strain RKJ12. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(18): 6606–6613.
- [9] Lessner DJ, Johnson GR, Parales RE, Spain JC, Gibson DT. Molecular characterization and substrate specificity of nitrobenzene dioxygenase from *Comamonas* sp. strain JS765. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(2): 634–641.
- [10] Liu H, Wang SJ, Zhang JJ, Dai H, Tang HR, Zhou NY. Patchwork assembly of *nag*-like nitroarene dioxygenase genes and the 3-chlorocatechol degradation cluster for evolution of the 2-chloronitrobenzene catabolism pathway in *Pseudomonas stutzeri* ZWLR2-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(13): 4547–4552.
- [11] Wang L, Gao YZ, Zhao H, Xu Y, Zhou NY. Biodegradation of 2-bromonitrobenzene by *Pseudomonas stutzeri* ZWLR2-1. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2019, 138: 87–91.
- [12] Parales JV, Parales RE, Resnick SM, Gibson DT. Enzyme specificity of 2-nitrotoluene 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain JS42 is determined by the C-terminal region of the α subunit of the oxygenase component. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(5): 1194–1199.
- [13] Yin Y, Xiao Y, Liu HZ, Hao FH, Rayner S, Tang HR, Zhou NY. Characterization of catabolic *meta*-nitrophenol nitroreductase from *Cupriavidus necator* JMP134. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(6): 2077–2085.
- [14] Xiao Y, Wu JF, Liu H, Wang SJ, Liu SJ, Zhou NY. Characterization of genes involved in the initial reactions of 4-chloronitrobenzene degradation in *Pseudomonas putida* ZWL73. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 73(1): 166–171.
- [15] Min J, Chen WW, Wang JP, Hu XK. Genetic and biochemical characterization of 2-chloro-5-nitrophenol degradation in a newly isolated bacterium, *Cupriavidus* sp. strain CNP-8. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1778.
- [16] Nishino SF, Spain JC. Degradation of nitrobenzene by a *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(8): 2520–2525.
- [17] Davis JK, Paoli GC, He ZQ, Nadeau LJ, Somerville CC, Spain JC. Sequence analysis and initial characterization of two isozymes of hydroxylaminobenzene mutase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(7): 2965–2971.
- [18] He ZG, Spain JC. A novel 2-aminomuconate deaminase in the nitrobenzene degradation pathway of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(9): 2502–2506.
- [19] Somerville CC, Nishino SF, Spain JC. Purification and characterization of nitrobenzene nitroreductase from

- Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(13): 3837–3842.
- [20] He ZQ, Davis JK, Spain JC. Purification, characterization, and sequence analysis of 2-aminomuconic 6-semialdehyde dehydrogenase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(17): 4591–4595.
- [21] Davis JK, He ZQ, Somerville CC, Spain JC. Genetic and biochemical comparison of 2-aminophenol 1,6-dioxygenase of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45 to meta-cleavage dioxygenases: divergent evolution of 2-aminophenol meta-cleavage pathway. *Archives of Microbiology*, 1999, 172(5): 330–339.
- [22] Park HS, Kim HS. Identification and characterization of the nitrobenzene catabolic plasmids pNB1 and pNB2 in *Pseudomonas putida* HS12. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(3): 573–580.
- [23] Nishino SF, Spain JC. Oxidative pathway for the biodegradation of nitrobenzene by *Comamonas* sp. strain JS765. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(6): 2308–2313.
- [24] Wu HZ, Wei CH, Wang YQ, He QC, Liang SZ. Degradation of *o*-chloronitrobenzene as the sole carbon and nitrogen sources by *Pseudomonas putida* OCNB-1. *Journal of Environmental Sciences*, 2009, 21(1): 89–95.
- [25] Wu JF, Jiang CY, Wang BJ, Ma YF, Liu ZP, Liu SJ. Novel partial reductive pathway for 4-chloronitrobenzene and nitrobenzene degradation in *Comamonas* sp. strain CNB-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(3): 1759–1765.
- [26] Liu L, Wu JF, Ma YF, Wang SY, Zhao GP, Liu SJ. A novel deaminase involved in chloronitrobenzene and nitrobenzene degradation with *Comamonas* sp. strain CNB-1. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(7): 2677–2682.
- [27] Kuhlmann A, Hegemann W. Degradation of monochloronitrobenzenes by *Pseudomonas acidovorans* CA50. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 1997, 25: 298–305.
- [28] Ju KS, Paraless RE. Application of nitroarene dioxygenases in the design of novel strains that degrade chloronitrobenzenes. *Microbial Biotechnology*, 2009, 2(2): 241–252.
- [29] Park HS, Lim SJ, Chang YK, Livingston AG, Kim HS. Degradation of chloronitrobenzenes by a coculture of *Pseudomonas putida* and a *Rhodococcus* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(3): 1083–1091.
- [30] Hasegawa Y, Muraki T, Tokuyama T, Iwaki H, Tatsuno M, Lau PCK. A novel degradative pathway of 2-nitrobenzoate via 3-hydroxyanthranilate in *Pseudomonas fluorescens* strain KU-7. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 190(2): 185–190.
- [31] Pandey G, Paul D, Jain RK. Branching of *o*-nitrobenzoate degradation pathway in *Arthrobacter protophormiae* RKJ100: identification of new intermediates. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 229(2): 231–236.
- [32] Arora PK, Sharma A. New metabolic pathway for degradation of 2-nitrobenzoate by *Arthrobacter* sp. SPG. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 551.
- [33] Nadeau LJ, Spain JC. Bacterial degradation of *m*-nitrobenzoic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(2): 840–843.
- [34] Cartwright NJ, Cain RB. Bacterial degradation of the nitrobenzoic acids. *Biochemical Journal*, 1959, 71(2): 248–261.
- [35] Providenti MA, Shaye RE, Lynes KD, McKenna NT, O'Brien J M, Rosolen S, Wyndham RC, Lambert IB. The locus coding for the 3-nitrobenzoate dioxygenase of *Comamonas* sp. strain JS46 is flanked by IS1071 elements and is subject to deletion and inversion events. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(4): 2651–2660.
- [36] Groenewegen PEJ, Breeuwer P, van Helvoort JMLM, Langenhoff AA, de Vries FP, de Bont JAM. Novel degradative pathway of 4-nitrobenzoate in *Comamonas acidovorans* NBA-10. *Journal of General Microbiology*, 1992, 138(8): 1599–1605.
- [37] Haigler BE, Spain JC. Biodegradation of 4-nitrotoluene by *Pseudomonas* sp. Strain 4NT. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(7): 2239–2243.
- [38] Rhys-Williams W, Taylor SC, Williams PA. A novel pathway for the catabolism of 4-nitrotoluene by *Pseudomonas*. *Journal of General Microbiology*, 1993, 139(9): 1967–1972.
- [39] Durham NN. Studies on the metabolism of *p*-nitrobenzoic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 1958, 4(2): 141–148.
- [40] Hughes MA, Williams PA. Cloning and characterization of the *pnb* genes, encoding enzymes for 4-nitrobenzoate catabolism in *Pseudomonas putida* TW3. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(4): 1225–1232.
- [41] Arora PK, Srivastava A, Singh VP. Bacterial degradation of

- nitrophenols and their derivatives. *Journal of Hazardous Materials*, 2014, 266: 42–59.
- [42] Zeyer J, Kocher HP, Timmis KN. Influence of *para*-substituents on the oxidative metabolism of *o*-nitrophenols by *Pseudomonas putida* B2. *Applied and Environmental Microbiology*, 1986, 52(2): 334–339.
- [43] Xiao Y, Liu TT, Dai H, Zhang JJ, Liu H, Tang HR, Leak DJ, Zhou NY. OnpA, an unusual flavin-dependent monooxygenase containing a cytochrome *b₅* domain. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(6): 1342–1349.
- [44] Meulenbergh R, Pepi M, de Bont JAM. Degradation of 3-nitrophenol by *Pseudomonas putida* B2 occurs via 1,2,4-benzenetriol. *Biodegradation*, 1996, 7(4): 303–311.
- [45] Yin Y, Zhou NY. Characterization of MnpC, a hydroquinone dioxygenase likely involved in the *meta*-nitrophenol degradation by *Cupriavidus necator* JMP134. *Current Microbiology*, 2010, 61(5): 471–476.
- [46] Schenzle A, Lenke H, Spain JC, Knackmuss HJ. Chemoselective nitro group reduction and reductive dechlorination initiate degradation of 2-chloro-5-nitrophenol by *Ralstonia eutropha* JMP134. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(6): 2317–2323.
- [47] Spain JC, Gibson DT. Pathway for biodegradation of *p*-nitrophenol in a *Moraxella* sp.. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(3): 812–819.
- [48] Kitagawa W, Kimura N, Kamagata Y. A novel *p*-nitrophenol degradation gene cluster from a gram-positive bacterium, *Rhodococcus opacus* SAO101. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(15): 4894–4902.
- [49] Liu PP, Zhang JJ, Zhou NY. Characterization and mutagenesis of a two-component monooxygenase involved in *para*-nitrophenol degradation by an *Arthrobacter* strain. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2010, 64(4): 293–299.
- [50] Jain RK, Dreisbach JH, Spain JC. Biodegradation of *p*-nitrophenol via 1,2,4-benzenetriol by an *Arthrobacter* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(8): 3030–3032.
- [51] Kadiyala V, Spain JC. A two-component monooxygenase catalyzes both the hydroxylation of *p*-nitrophenol and the oxidative release of nitrite from 4-nitrocatechol in *Bacillus sphaericus* JS905. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(7): 2479–2484.
- [52] Pandey J, Heipieper HJ, Chauhan A, Arora PK, Prakash D, Takeo M, Jain RK. Reductive dehalogenation mediated initiation of aerobic degradation of 2-chloro-4-nitrophenol (2C4NP) by *Burkholderia* sp. strain SJ98. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 92(3): 597–607.
- [53] Ghosh A, Khurana M, Chauhan A, Takeo M, Chakraborti AK, Jain RK. Degradation of 4-nitrophenol, 2-chloro-4-nitrophenol, and 2,4-dinitrophenol by *Rhodococcus imtechensis* strain RKJ300. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(3): 1069–1077.
- [54] Min J, Wang JP, Chen WW, Hu XK. Biodegradation of 2-chloro-4-nitrophenol via a hydroxyquinol pathway by a Gram-negative bacterium, *Cupriavidus* sp. strain CNP-8. *AMB Express*, 2018, 8(1): 43.
- [55] Arora PK, Sharma A, Mehta R, Shenoy BD, Srivastava A, Singh VP. Metabolism of 4-chloro-2-nitrophenol in a gram-positive bacterium, *Exiguobacterium* sp. PMA. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11: 150.
- [56] Bruhn C, Bayly RC, Knackmuss HJ. The in vivo construction of 4-chloro-2-nitrophenol assimilatory bacteria. *Archives of Microbiology*, 1988, 150(2): 171–177.
- [57] Beunink J, Rehm HJ. Coupled reductive and oxidative degradation of 4-chloro-2-nitrophenol by a co-immobilized mixed culture system. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1990, 34(1): 108–115.
- [58] Porter SL, Wadhams GH, Armitage JP. Signal processing in complex chemotaxis pathways. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(3): 153–165.
- [59] Krell T, Lacal J, Reyes-Darias JA, Jimenez-Sanchez C, Sungthong R, Ortega-Calvo JJ. Bioavailability of pollutants and chemotaxis. *Current Opinion in Biotechnology*, 2013, 24(3): 451–456.
- [60] Parales RE, Ditty JL. Chemotaxis to Hydrocarbons//Krell T. Cellular Ecophysiology of Microbe: Hydrocarbon and Lipid Interactions. Cham: Springer, 2018: 221–239.
- [61] Pandey J, Sharma NK, Khan F, Ghosh A, Oakeshott JG, Jain RK, Pandey G. Chemotaxis of *Burkholderia* sp. strain SJ98 towards chloronitroaromatic compounds that it can metabolise. *BMC Microbiology*, 2012, 12: 19.
- [62] Arora PK, Srivastava A, Singh VP. Degradation of 4-chloro-3-nitrophenol via a novel intermediate, 4-chlororesorcinol by *Pseudomonas* sp. JHN. *Scientific Reports*, 2014, 4: 4475.

- [63] Arora PK, Bae H. Biotransformation and chemotaxis of 4-chloro-2-nitrophenol by *Pseudomonas* sp. JHN. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13: 110.
- [64] Zhang JJ, Xin YF, Liu H, Wang SJ, Zhou NY. Metabolism-independent chemotaxis of *Pseudomonas* sp. strain WBC-3 toward aromatic compounds. *Journal of Environmental Sciences*, 2008, 20(10): 1238–1242.
- [65] Parales RE. Nitrobenzoates and aminobenzoates are chemoattractants for *Pseudomonas* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(1): 285–292.
- [66] Leungsakul T, Keenan BG, Smets BF, Wood TK. TNT and nitroaromatic compounds are chemoattractants for *Burkholderia cepacia* R34 and *Burkholderia* sp. strain DNT. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 69(3): 321–325.
- [67] Lacal J, Muñoz-Martínez F, Reyes-Darías JA, Duque E, Matilla M, Segura A, Calvo JJO, Jiménez-Sánchez C, Krell T, Ramos JL. Bacterial chemotaxis towards aromatic hydrocarbons in *Pseudomonas*. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(7): 1733–1744.
- [68] Luu RA, Kootstra JD, Nesteryuk V, Brunton CN, Parales JV, Ditty JL, Parales RE. Integration of chemotaxis, transport and catabolism in *Pseudomonas putida* and identification of the aromatic acid chemoreceptor PcaY. *Molecular Microbiology*, 2015, 96(1): 134–147.
- [69] Iwaki H, Muraki T, Ishihara S, Hasegawa Y, Rankin KN, Sulea T, Boyd J, Lau PCK. Characterization of a pseudomonad 2-nitrobenzoate nitroreductase and its catabolic pathway-associated 2-hydroxylaminobenzoate mutase and a chemoreceptor involved in 2-nitrobenzoate chemotaxis. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(9): 3502–3514.
- [70] Zhao S, Ramette A, Niu GL, Liu H, Zhou NY. Effects of nitrobenzene contamination and of bioaugmentation on nitrification and ammonia-oxidizing bacteria in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 70(2): 159–167.
- [71] Niu GL, Zhang JJ, Zhao S, Liu H, Boon N, Zhou NY. Bioaugmentation of a 4-chloronitrobenzene contaminated soil with *Pseudomonas putida* ZWL73. *Environmental Pollution*, 2009, 157(3): 763–771.
- [72] Liu L, Jiang CY, Liu XY, Wu JF, Han JG, Liu SJ. Plant-microbe association for rhizoremediation of chloronitroaromatic pollutants with *Comamonas* sp. strain CNB-1. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(2): 465–473.
- [73] Labana S, Pandey G, Paul D, Sharma NK, Basu A, Jain RK. Pot and field studies on bioremediation of *p*-nitrophenol contaminated soil using *Arthrobacter protophormiae* RKJ100. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39(9): 3330–3337.
- [74] Min J, Wang B, Hu XK. Effect of inoculation of *Burkholderia* sp. strain SJ98 on bacterial community dynamics and *para*-nitrophenol, 3-methyl-4-nitrophenol, and 2-chloro-4-nitrophenol degradation in soil. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 5983.
- [75] Chi XQ, Zhang JJ, Zhao S, Zhou NY. Bioaugmentation with a consortium of bacterial nitrophenol-degraders for remediation of soil contaminated with three nitrophenol isomers. *Environmental Pollution*, 2013, 172: 33–41.
- [76] Fu H, Zhang JJ, Xu Y, Chao HJ, Zhou NY. Simultaneous biodegradation of three mononitrophenol isomers by a tailor-made microbial consortium immobilized in sequential batch reactors. *Letters in Applied Microbiology*, 2017, 64(3): 203–209.

Microbial degradation of nitroaromatics and their halogenated derivatives

Jun Min^{1,2,3}, Weiwei Chen¹, Junde Li¹, Xiaoke Hu^{1,2,3*}

¹Key Laboratory of Coastal Biology and Bioresource Utilization, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, Shandong Province, China

²Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, Shandong Province, China

³Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266237, Shandong Province, China

Abstract: Nitroaromatic compounds are important chemical materials and widely used in the chemical syntheses of pharmaceuticals, dyes and pesticides. Inevitably, as hazardous pollutants, nitroaromatic compounds have been extensively introduced into our surrounding environments because of anthropogenic activities. Microorganisms play an important role in degrading these recalcitrant contaminants. In the past decades, microbial degradation of nitroaromatics has been investigated extensively, leading to dramatic progress in understanding the microbial strategies and associated mechanisms for the degradation of these pollutants. Here we present an integrated review of the bacterial degradation of nitroaromatic compounds and their halogenated derivatives in the catabolic pathway and mechanism, microbial chemotaxis, together with bioremediation of nitroaromatics-contaminated environment. In addition, we propose future research. This review will increase our current understanding of the microbial degradation process of these toxic and recalcitrant pollutants.

Keywords: (halogenated) nitroaromatics, microbial degradation, catabolic pathway, catabolic mechanism, chemotaxis, bioremediation

(本文责编: 李磊)

Supported by the State's Key Project of Research and Development Plan (2016YFC1402300), by the Foreword Key Priority Research Program of Chinese Academy of Sciences (QYZDB-SSW-DQC013), by the Yantai Science and Technology Project (2017ZH092) and by the Youth Innovation Promotion Association Program of the Chinese Academy of Sciences (2020218)

*Corresponding author. Tel: +86-535-2109127; E-mail: xkhu@yic.ac.cn

Received: 16 November 2019; Revised: 3 March 2020; Published online: 28 May 2020

胡晓珂, 中科院烟台海岸带研究所特聘研究员, 海岸带生物学与生物资源保护实验室副主任, 海洋环境微生物与生物技术研究组组长, 青岛海洋科学与技术试点国家实验室成员。现任所学术委员会和学位委员会委员、中国微生物学会微生物专业委员会委员、海洋生物资源专业委员会委员、Front Microbiol, Sci Rep, Curr Chinese Sci 杂志编委。获海洋工程科技奖二等奖(第一)、海洋科学技术奖(第一)等省部级科研奖励 4 项。主要从事海洋功能微生物资源的挖掘、有机污染物的微生物代谢、调控与生物修复等方面的研究。主持国家自然科学基金、国家重大科技专项、973 课题等 20 余项, 经费 3500 余万。发表学术论文 90 余篇, SCI 论文 70 余篇, 他引达 1500 多次, 第一作者单篇最高引用 238 次, 单篇最高影响因子 43.34。撰写英文专著 5 部, 授权专利 10 项。

