

水体中硝基苯厌氧降解微生物的筛选及其降解特性研究

卢桂兰¹, 郭观林¹, 王世杰^{1,2}, 谷庆宝¹, 李发生¹

(1.中国环境科学研究院土壤污染与控制研究室, 北京 100012; 2.北京科技大学土木与环境工程学院, 北京 100083)

摘要:以硝基苯为碳源,采用间歇式曝气方式,经 90 d 驯化培养,从处理硝基苯废水的生物活性污泥中分离得到 13 株高效降解菌,在厌氧环境条件分离纯化,筛选得到降解能力最强的 MY4 菌,并研究了其对不同浓度硝基苯的降解特性。结果表明,经 16S rRNA 鉴定,MY4 菌属于兼性葡萄球菌属(*Staphylococcus* sp),其在 $10^4\sim 10^7$ CFU·mL⁻¹ 范围内对硝基苯的去除率没有显著差异,降解率均为 65%,硝基苯的降解速率在 3~5 d 期间达到最大。高浓度的硝基苯对微生物的降解过程存在抑制作用,随着浓度的增高,其降解半衰期明显延长。GC-MS 分析表明,硝基苯经 MY4 菌株降解后的主要产物为苯胺。

关键词:硝基苯;污水;厌氧微生物;生物降解

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2010)03-0556-07

Screening and Biodegradation of Anaerobic Microorganisms for Nitrobenzene in Water

LU Gui-lan¹, GUO Guan-lin¹, WANG Shi-jie^{1,2}, GU Qing-bao¹, LI Fa-sheng¹

(1.Department of Soil Pollution Control, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China; 2.School of Civil & Environmental Engineering, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China)

Abstract: 13 high efficiency bacterium strains were obtained from the activated sludge in waste water contaminated with nitrobenzene after 90 days intermittent aeration. MY4 was screened out in anaerobic condition, which was identified to be the most efficient bacteria strain. Further experiments were conducted on the biodegradation characteristics of MY4 strain. Results indicated that MY4 was *Staphylococcus* sp based on the 16S rRNA analysis. No obvious distinctions were observed in the biodegradation of nitrobenzene when MY4 strain concentration ranging from 10^4 to 10^7 CFU·mL⁻¹. The degradation process was composed of three phases, among which the most rapid one was appeared in first 3 to 5 days. The high concentration of nitrobenzene could posed the negative effect on biodegradation, and the half life ($t_{1/2}$ ·d⁻¹) of nitrobenzene was prolonged with its concentration increased. The prominent product in biodegradation of nitrobenzene was determined to be aniline according to the results of GC-MS analysis.

Keywords: nitrobenzene; wastewater; anaerobic microorganism; biodegradation

硝基苯是广泛应用于石油化工、染料、医药等工业的重要原料。硝基苯类化合物具有很强的致癌和致突变性,被列为环境优先控制的污染物,每年约超过 10 000 t 的硝基苯通过各种不同途径进入到各种环境

介质中^[1]。许多硝基苯类物质通过废水排放和事故泄漏进入到水体环境中,水体硝基苯类污染也日益受到人们的关注。国内已有很多关于微生物法降解硝基苯方面的研究:有研究者从河道底泥和硝基苯废水沉积底泥,分离到 18 株以硝基苯为唯一碳源的细菌,筛选出 5 株具有对硝基苯降解较强的菌种^[2];通过活性污泥,低温条件下分离出一组混合菌株,以硝基苯为唯一碳源生长,48 h 内将初始浓度为 382 mg·L⁻¹ 的硝基苯降解^[3]。硝基苯能够在好氧条件下被微生物所降解,其中包括微白黄链霉菌、胶红酵母、藤黄微球菌、假单

收稿日期:2009-08-04

基金项目:全国土壤调查修复专项(NC5120801);科技部国际合作专项(2008DFR90550);院公益项目(GYK5120803)

作者简介:卢桂兰(1980—),女,主要从事土壤环境化学与生物学研究工作。

通讯作者:李发生 E-mail: lifs@craes.org.cn

胞杆菌属、动性球菌属等^[4-6]。在硝基苯微生物降解的优化条件研究中得出,对硝基苯降解率有极显著影响的因素依次为硝基苯初始浓度>pH值>NaCl浓度>重金属^[7]。在厌氧条件下分离出2株菌株为吉氏拟杆菌(*Bacteroides distasonis*)和屎拟杆菌(*Bacteroides merdae*),硝基苯初始浓度必须低于450 mg·L⁻¹,1 g葡萄糖能共代谢还原200~260 mg硝基苯,还原产物为苯胺^[8]。在硝基苯的生物降解的研究过程中,不同菌属的高效降解微生物被分离、鉴定,丰富了硝基苯生物降解的数据库,同时在厌氧或好氧条件下的不同降解途径和动力学特征的研究,以及驯化、筛选和鉴定技术等方面取得很大进展。

但是,目前的研究仍然存在很大的缺陷,例如:大多研究集中在好氧微生物方面,而相对厌氧微生物的研究则较少;多数菌株的降解速率很低,有的需要共代谢才能降解硝基苯,从而限制了在实际污水处理中的应用;我国规定硝基苯废水排放标准分别为2.0、3.0和5.0 mg·L⁻¹(GB 8978—1988)^[9],针对高浓度的硝基苯废水处理受到限制,现有研究分离得到芽孢杆菌属,对硝基苯最高降解浓度为1 000 mg·L⁻¹。实际降解过程中,多数微生物对硝基苯的降解范围在20~500 mg·L⁻¹,超过这个范围,将造成微生物受毒害死亡^[10]。本研究以硝基苯为唯一碳源,通过对富含硝基苯的活性污泥驯化、分离和筛选,得到能够降解高浓度硝基苯污染废水的厌氧微生物,同时研究不同硝基苯初始浓度和微生物量对降解效率的影响,探明微生物降解产物的组成和特征,为硝基苯废水厌氧生物处理的实际应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用化学试剂均为分析纯。1 000 mg·L⁻¹硝基苯标样购于北京百灵威化学试剂有限公司;甲醇、正己烷为色谱纯溶剂,购于美国FISHER公司。

PYG培养基(Peptone-Yeast Extract-Glucose):胰胨0.5 g,大豆蛋白胨0.5 g,0.1%刃天青水溶液0.1 mL(刃天青是常用的氧化还原指示剂,用于鉴定培养基中的含氧情况,颜色变化灵敏,在无氧条件下无色,在有氧条件下,碱性时呈蓝色,酸性时呈红色)^[11-12],蒸馏水100 mL,酵母提取物1.0 g,葡萄糖1.0 g,吐温80 0.1 mL,半胱氨酸盐酸盐0.05 g,盐溶液4.0 mL,pH6.8~7.0。

YM培养基(Yeast extract malt extract broth):将3

g酵母提取物,2 g麦芽提取物,5 g蛋白胨和10 g葡萄糖,0.1%刃天青水溶液0.1 mL添加到1 L水中,培养基的pH值因其成分的批次不同而在5~6之间,121℃湿热灭菌15 min。

1.2 水中硝基苯的分析测定

将5 mL正己烷加入到盛有10 mL硝基苯水溶液的规格为40 mL螺口带盖棕色试剂瓶中(Scientific Specialties Service Inc, Dikma),在恒温振荡器(HZQ-C,哈尔滨市东明医疗仪器厂)上以200 r·min⁻¹速率水平振荡30 min,然后超声萃取20 min(频率28 kHz),吸取上层1 mL正己烷溶液转入气相色谱仪(GC-2010,日本岛津公司Shimadzu)测定。气相色谱条件:进样口220℃,检测器240℃,柱温160℃(5 min)→5℃·min⁻¹→220℃(5 min)。进样量1 μL,分流进样,分流比为10:1^[13]。

硝基苯降解产物的定性分析:取1 L水样,以2~3 mL·min⁻¹流速通过已活化(活化过程:先用2 mL正己烷清洗柱床,抽空流出液,再依次加入甲醇和蒸馏水各5 mL,抽空流出液)的C18-SPE小柱,上样结束之后,用5 mL去离子水清洗C18固相小柱,之后以50 mL正己烷洗脱液以2~3 mL·min⁻¹流速洗脱,收集洗脱液,氮吹浓缩至1 mL,有机相进行气相色谱-质谱联用分析,测定降解产物。采用气相色谱-质谱联用仪(7890A-5975C,美国安捷伦公司),气相色谱条件:DB-5MS毛细管色谱柱,载气为He,载气流量为1 mL·min⁻¹,分流比为20:1,进样口温度为250℃,初始柱温70℃,升温速率为40℃·min⁻¹,终止温度200℃。质谱条件:E1源,40~200 m·z⁻¹扫描范围,电子轰击能量为70 eV,离子阱温度为150℃。

1.3 硝基苯降解菌种的驯化、分离与筛选

菌种驯化:称取50 g活性污泥(某化工厂硝基苯废水生物反应池)置于1 000 mL三角瓶中,再加入450 mL 0.85%的生理盐水,28~30℃下振荡48 h。以硝基苯为唯一碳源,采用间歇式曝气,每隔7 d依次加入浓度分别为10、50、100、500、1 000 mg·L⁻¹的硝基苯溶液(某化工厂提供的硝基苯原液,工业纯),连续驯化培养90 d,获得硝基苯降解混合菌液。

菌种分离与纯化:吸取上述降解菌混合溶液各1 mL,分别转入PYG和YM液体培养基(硝基苯浓度为25 mg·L⁻¹)的螺口试管中,PYG液体培养基作为好氧环境培养基,不进行充氮气处理,直接用硅胶塞封口,而YM培养基作为厌氧环境培养基,连续对其充氮气12 h后,拧盖后外部用蜡封口,在28~30℃和120 r·

min^{-1} 转速下振荡培养 120 h, 添加的刃天青氧化还原指示剂在 PYG 培养基中显示浅蓝色, 而在 YM 培养基中显示无色。选取菌体生长明显的试管, 转接到固体培养基上。从固体平板上挑取单菌落划线分离, 反复纯化 3 次, 获得 13 株以硝基苯为唯一碳源的菌株, 分别命名为 WH1~WH7 (好氧培养菌) 和 MY1~MY6 (厌氧培养菌)。

硝基苯高效降解菌筛选: 将 13 株菌株培养液分别按好氧和厌氧条件加入到 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硝基苯无菌水溶液中, 降解菌浓度达到 $10^7 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 恒温培养 15 d 后, 测定硝基苯剩余含量, 筛选出降解效率最高的菌株。

1.4 MY4 菌株在不同硝基苯和微生物初始浓度下厌氧降解特性研究

1.4.1 硝基苯降解菌加入量对降解的影响

将 MY4 菌液扩大培养, 加入到浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硝基苯水溶液中, 使其降解菌浓度分别为 8.75×10^4 、 1.75×10^5 、 8.75×10^5 、 $1.75 \times 10^7 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 在 $25 \sim 30^\circ \text{C}$ 进行厌氧生物降解, 每 1 d 取样测定硝基苯残留含量, 每个样品分别重复 3 次。

1.4.2 硝基苯初始浓度对降解的影响

在硝基苯浓度大约为 5、750 和 $3\,000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的水溶液中, 分别加入 MY4 菌液, 使其浓度达到 $8.75 \times 10^5 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 于 $25 \sim 30^\circ \text{C}$ 恒温振荡 ($120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 进行厌氧生物降解, 浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 大约每 1 d 取样测定, 连续检测 5 d; 浓度为 750 和 $3\,000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 每隔 3 d 取样测定硝基苯残留含量, 连续检测 20 d, 每个试验浓度分别重复 3 次。检测 20 d 后的剩余溶液用于降解产物分析。

1.5 MY4 硝基苯高效降解菌株的鉴定

菌体染色及形态观察: 采用 YM 培养基接种 MY4 菌株, 将处于对数生长期的菌体进行革兰氏染色, 在光学显微镜下观察染色结果及细菌形态。

细菌的 16S rRNA 聚类分析: 将细菌置于转速 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、培养温度为 30°C 的摇床中培养 24 h, $5\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 去上清液收集细菌菌体, 用酚-氯仿法提取 DNA 用作模板, 采用 PCR 扩增仪 (PE 9700, 美国 Biometra Tgradient); 扩增引物为细菌的通用引物, 序列如下:

正向引物: 27f5'-GAGAGTTTGATTTGATCCTG GC-TCAG-3'

反向引物: 1521 r5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'

扩增后的产物经过 E.Z.N.A. Gel Extraction Kit

纯化后测序 (凝胶成像分析系统 ULTRA-LUM MEGA 10, 美国; 电泳仪 PAC1000, 美国 Bio-Rad), 利用 BLAST 将菌株的 16S rDNA 的序列与 GenBank 数据库中已登录的序列进行比较, 采用 Clustel X1.8 进行比对, 进行序列同源性分析, 构建系统发育树。

2 结果分析与讨论

2.1 硝基苯高效降解菌的筛选

图 1 表明 13 株微生物菌株在厌氧和好氧条件下, 硝基苯的降解率出现显著差异: 厌氧条件下, MY4 菌株降解率高于 80%, 其余菌株降解率均在 20%~40% 之间; 好氧条件下, 硝基苯的降解率总体在 30%~70% 之间, WH3 菌株降解率约为 80%。由于目前硝基苯厌氧微生物降解的研究较少, 选取去除率最高的 MY4 厌氧菌株作为实验研究对象。硝基苯能被好氧和厌氧微生物降解, 并因不同环境条件和菌种本身的生化性质而使其降解能力产生差异^[2]。通过降解率看出, MY4 厌氧菌株在浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 15 d 降解率达到 81%, 说明从受硝基苯污染物的污泥和废水中获得高效厌氧生物降解菌是一可行途径。在国内外硝基苯生物降解的研究中, 许多学者提出可以通过强化技术来提高降解效率, 例如投基质葡萄糖进行共代谢降解硝基苯, 添加营养盐及其他物质提高微生物降解活性, 优化温度、溶解氧浓度、pH 值等条件提高降解反应速率, 或通过遗传工程手段构建高效降解工程菌^[14]。这些手段可以在实际修复过程中提高水体硝基苯厌氧生物降解的可行性。

2.2 硝基苯降解菌株的形态及其鉴定

MY4 菌株电子显微镜观察结果显示, 其菌落特征为表面光滑, 中间微隆起, 边缘整齐, 微黄, 菌落直

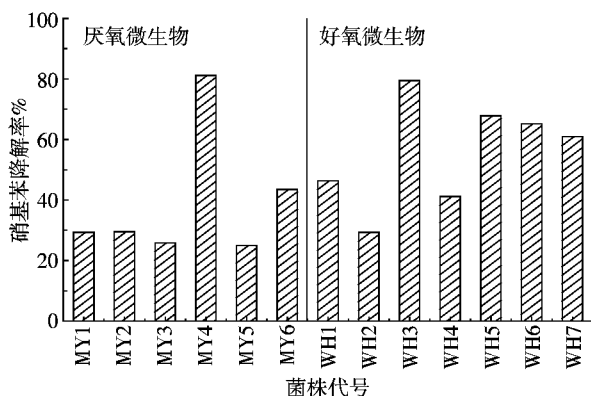


图 1 筛选降解菌株对硝基苯的降解率

Figure 1 Degradation efficiencies of screened microorganism for nitrobenzene

径小于 0.5 mm。用细菌的 16S rRNA 通用引物扩增 MY4 的 16S rRNA 序列经凝胶电泳后,在紫外灯下可看见长约 1 500 bp 的单一一条带(图 2)。将菌株 MY4 的 16S DNA 核苷酸序列输入到 GenBank 数据库中,在 GenBank 数据库进行 BLAST 比对,利用系统发育树软件 Clustalv 构建发育树(图 2)。通过序列同源性分析表明,MY4 与 GenBank 中的兼性 *Staphylococcus* sp(葡萄球菌属)同源性较高,与转糖链球菌 *Streptococcus mutans* 同源性较低,与金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* *rosenbach* 同源性达 68%,与表皮葡萄球菌 *Staphylococcus epider*、头状葡萄球菌 *Staphylococcus capitis*、解糖葡萄球菌 *Staphylococcus saccharolyticus* 同源性达 99%,与表皮葡萄球菌 *Staphylococcus epider* 同源性达 76%。细菌 MY4 初步鉴定为兼性 *Staphylococcus* sp(葡萄球菌属)。葡萄球菌、链球菌、棒状杆菌对硝基苯的降解能力可能由染色体编码所获得。

2.3 硝基苯降解菌加入量对降解的影响

MY4 厌氧菌降解总体分为 3 个阶段:缓慢升高期、快速降解期和平稳期。初始浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 12 d 去除率接近 70%,见图 3,在 1~3 d 时,降解菌处于适应调整期,降解效果不明显;在 3~5 d 时,降解菌处于快速繁殖的对数增长期,降解率由 20%迅速上升到 55%~65%;在 5~12 d 期间,硝基苯的降解率出现波动,但总体呈现平稳趋势,上升幅度只有 10%。说明 MY4 厌氧菌对硝基苯的降解主要在快速繁殖的对数增长期,初始浓度一样的情况下,硝基苯降解菌的添加量对降解没有直接影响。

2.4 硝基苯的初始浓度对降解效果的影响

由图 4 所示,相同时间内,低浓度硝基苯的降解率总体高于高浓度硝基苯,第 3 d 时,初始浓度为 5、

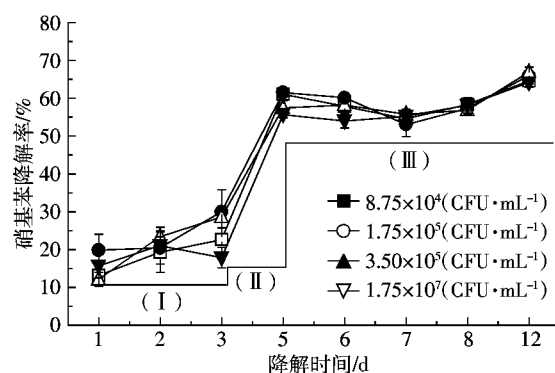


图 3 不同接种量对硝基苯降解的影响

Figure 3 Effects of different inoculation on the degradation of nitrobenzene

750 和 $3\,000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的降解率分别为 47.10%、16.33% 和 10.58%。第 5 d 时,低浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,降解率已经达到 89.97%,而高浓度为 750 和 $3\,000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时降解率才分别约为 21%和 19%。随时间的增加,降解率呈线性趋势升高。高浓度时微生物对硝基苯的降解影响呈滞后效应。20 d 时 $3\,000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 硝基苯的降解率不足 80%,而 $750 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硝基苯降解率达到 89.58%。通过 SPSS 数据统计拟合,MY4 厌氧菌降解硝基苯的动力学方程符合二阶反应方程:初始浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,方程为

$$-\ln(C_t/C_0) = 0.060t^2 - 0.124t + 0.116$$

相关系数 $R^2 = 0.973\,8$,半衰期($t_{1/2} \cdot \text{d}^{-1}$)为 3.8 d;

初始浓度为 $750 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,方程为

$$-\ln(C_t/C_0) = 0.005t^2 - 0.065t + 0.274$$

相关系数 $R^2 = 0.973$,半衰期($t_{1/2} \cdot \text{d}^{-1}$)为 15.9 d;

初始浓度为 $3\,000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,方程为

$$-\ln(C_t/C_0) = 0.002t^2 - 0.005t + 0.059$$

相关系数 $R^2 = 0.990\,8$,半衰期($t_{1/2} \cdot \text{d}^{-1}$)为 18.1 d。

说明初始浓度越高,硝基苯的生物降解半衰期越长,降解的难度增大。硝基苯初始浓度对降解产生影

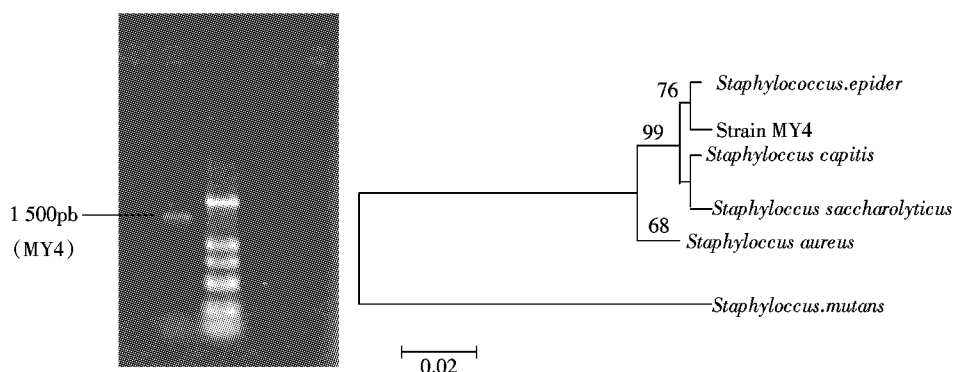


图 2 菌株 MY4 电泳图片及相关种 16S rRNA 基因的系统发育树

Figure 2 Electrophoresis and phylogenetic analysis of MY4 strain

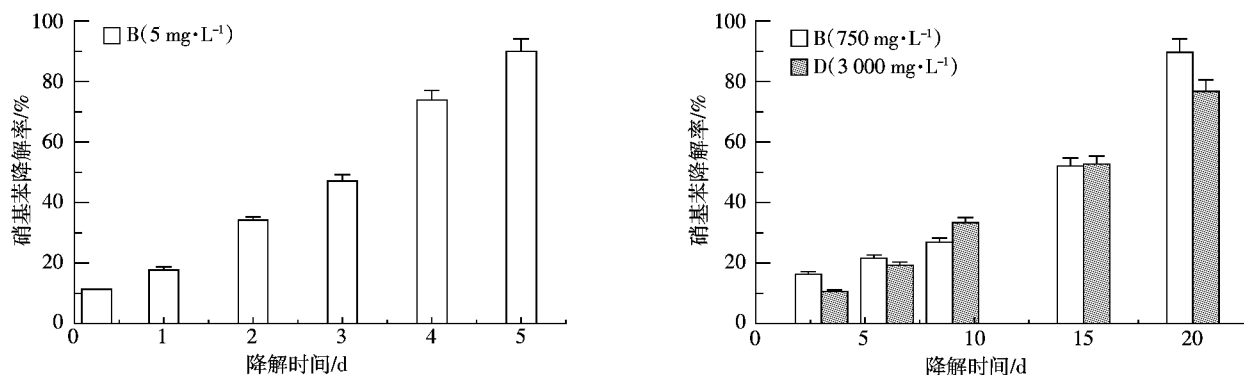


图 4 不同硝基苯初始浓度对降解的影响

Figure 4 Effects of different initial concentration of nitrobenzene on degradation

响,随着初始浓度的增加,硝基苯生物降解滞后期延长,表现为污染物降解半衰期时间增大,硝基芳烃类化合物对生物降解产生抑制作用^[15]。

现有研究表明,硝基苯一方面为微生物的生长提供唯一的碳源,如果浓度过低,微生物不能获得充足营养因而生长会受到限制;另一方面硝基苯本身具有毒性,浓度超过一定值时就会对微生物的生长造成危害,因而浓度过高时微生物的生长也会受到抑制作用^[6]。

2.5 硝基苯降解菌的降解产物分析

从图 5 可以看出,硝基苯降解产物的 GC-MS 图谱中有 5 个峰(a、b、c、d、e)出现,分别为 a: Benzenamine, N-ethyl-45; b: Benzenamine, N-propyl-38; c: Benzenamine, N-butyl-90; d: 4-tert-butylaniline 49; e: N-Methyl-N-benzyl-4-oxo-4-phenyl-butylamide 72。第一个峰出现在保留时间为 8.334 min 和 9.769 min 阶段,硝基苯生成的产物均检出为苯胺。硝基的强电负性使硝基苯在好氧条件下较难生物降解,而厌氧菌可将废水中的硝基苯经亚硝基苯和苯基羟胺还原成苯胺类物质,苯胺是其主要代谢产物^[1,16]。

在自然界主要是通过厌氧生物降解过程,还原生成苯胺。侯铁等^[17]用混合厌氧菌株研究了废水硝基苯降解机理,结果表明,厌氧环境下硝基苯降解为苯胺,然后苯胺氧化成邻苯二酚后再进一步降解。但是,硝基苯在厌氧条件下产生的苯胺和对硝基苯胺,并不是混合微生物新陈代谢最理想的碳源,通常需要添加初级碳源,如葡萄糖等,用于刺激微生物产生相应的诱导酶,从而使对硝基苯胺得到降解^[18]。由于硝基的吸电子性使得苯环上电子云密度下降,从而使氧化酶的亲电子受阻,硝基苯及其衍生物难以生物降解^[19]。厌氧环境下硝基苯通常降解为苯胺,是由于硝基得电子

还原所致,其降解模型如图 6 所示。

通过 GC-MS 对硝基苯降解产物分析表明,硝基苯厌氧生物降解的最终产物为苯胺。硝基苯生物降解途径可分为氧化途径和还原途径,其中还原途径又分为硝基的部分还原和苯环加氢的还原途径,氧化途径则分为单加氧酶和双加氧酶催化的途径。对于含有 1~2 个硝基的芳香化合物,代谢途径中的第一步骤,即芳环羟化或硝基还原及芳环断裂步骤是代谢途径的关键,而对于多硝基芳香化合物则是通过芳环直接加氢进行还原反应^[20]。另外,有些有机物能够促进硝基苯类污染物的生物降解,例如,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,1 g 葡萄糖共代谢还原 200~260 mg 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^[14]。

3 结论

(1)从硝基苯污染废水生物处理的活性污泥中筛选的 MY4 菌株,经驯化后,兼性葡萄球菌属(*Staphylococcus* sp)在厌氧环境中对水体硝基苯具有高效降解作用。

(2)MY4 对硝基苯的降解过程分为 3 个阶段,缓慢升高期、快速降解期和平稳期。其中在 3~5 d 时硝基苯降解速率最大,初始浓度为 500 mg·L⁻¹ 的硝基苯降解率能达到 55%~65%。

(3)MY4 对硝基苯的降解过程中,其接种量对降解效率没有明显影响,而硝基苯的初始浓度将影响其降解效率,较高浓度的硝基苯会使其厌氧降解反应产生滞后,主要因为高浓度硝基苯对生物产生毒性后抑制其降解效率。

(4)硝基苯厌氧生物降解过程中,通过氧化和还原途径,产物经过亚硝基和羟基苯胺,最终降解为苯胺。

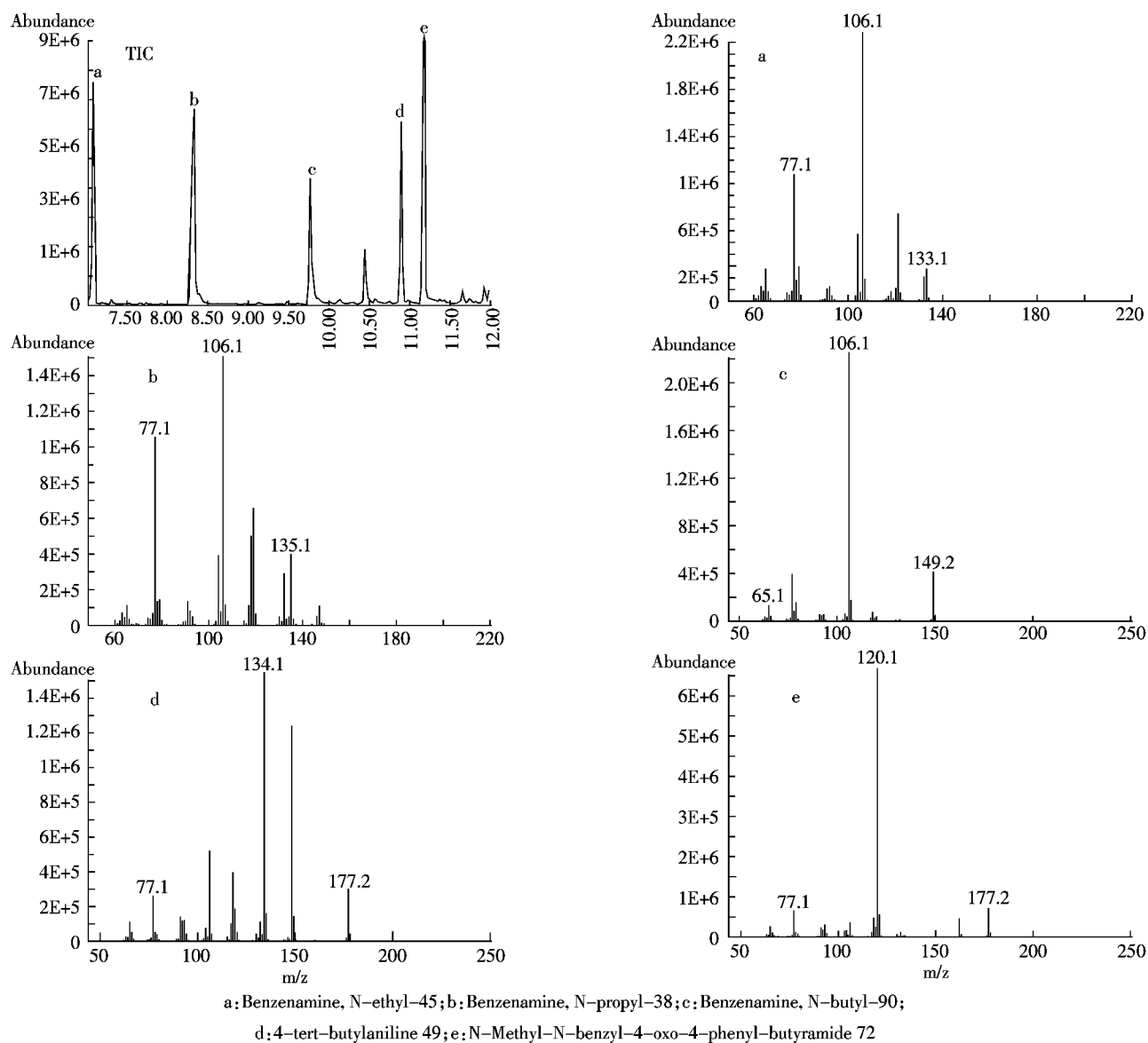


图5 硝基苯降解菌的降解产物 GC-MS 分析图

Figure 5 GC-MS analysis for the degradation products of Nitrobenzene

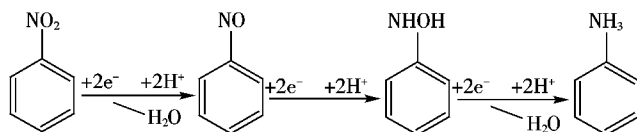


图6 硝基苯厌氧生物降解反应途径

Figure 6 Anaerobic biodegradation pathway of Nitrobenzene

参考文献:

- [1] Haigler B E, Spain J C. Biotransformation of nitrobenzene by bacteria containing toluene degradation pathways[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57(11):3156-3161.
- [2] 赵 钰, 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.

ZHAO Yu, ZENG Su, FU Da-fang, et al. Screening of some novel nitrobenzene degrading strains[J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2002, 8(4): 427-429.

- [3] 马会强, 张兰英, 李 爽, 等. 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.
- MA Hui-qiang, ZHANG Lan-ying, LI Shuang, et al. Biodegradation of nitrobenzene by cold-adapted compound bacteria [J]. *Environmental Science and Technology*, 2007, 30(12):5-7.
- [4] 郑春莉, 周集体, 王 竞, 等. 硝基苯高效降解菌群对硝基苯好氧降解[J]. *大连理工大学学报*, 2008, 48(2):174-177.
- ZHENG Chun-li, ZHOU Ji-ti, WANG Jing, et al. Degradation of nitrobenzene by a mixture of nitrobenzene degrading strains under aerobic condition[J]. *Journal of Dalian University of Technology*, 2008, 48(2): 174-177.
- [5] 王书航, 孙世群, 张 乐, 等. 硝基苯降解菌筛选和鉴定[J]. *合肥工业*

- 大学学报, 2008, 31(11):1751-1754
- WANG Shu-hang, SUN Shi-qun, ZHANG Le, et al. Study on screening and identification of nitrobenzene degrading strains[J]. *Journal of Hefei University of Technology*, 2008, 31(11):1751-1754.
- [6] 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):1-2, 58.
- CAI Bang-cheng, GAO Shi-xiang, XIAO Lin, et al. Screening of an effective nitrobenzene degrading strain and its biodegradation characteristics[J]. *Environmental Science and Technology*, 2003, 26(4):1-2, 58.
- [7] 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.
- WANG Song, SUN Tie-heng, SUN Li-na, et al. Optimizing the parameters of biodegrading nitrobenzene by orthogonal design [J]. *Journal of Safety and Environment*, 2008, 8(6):5-8.
- [8] 李湛江, 韦朝海, 任源, 等. 硝基苯降解菌生长特性及其降解活性[J]. 环境科学, 1999, 20(5):20-24.
- LI Zhan-jiang, WEI Chao-hai, REN Yuan, et al. Growth characteristics and activities of nitrobenzene anaerobic biodegradation strains[J]. *Environmental Science*, 1999, 20(5):20-24.
- [9] 王丽敏, 刘振鸿, 等. 硝基苯废水治理技术研究进展[J]. 江苏环境科技, 2005, 18(2):40-42.
- WANG Li-min, LIU Zhen-hong, et al. Progresses of treatment technologies for nitrobenzene waste water[J]. *Jiangsu Environmental Science and Technology*, 2005, 18(2):40-42.
- [10] 李明堂, 徐镜波, 盛连喜, 等. 硝基苯好氧降解细菌的筛选和降解活性的研究[J]. 吉林农业大学学报, 2006, 28(5):552-559.
- LI Ming-tang, XU Jing-bo, SHENG Lian-xi, et al. Screening of nitrobenzene degrading microorganism under aerobic conditions and its degrading activities[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2006, 28(5):552-559.
- [11] 靳孝庆, 周华, 吴薛明, 等. 丙酮-丁醇发酵生产菌的快速筛选方法[J]. 过程工程学报, 2008, 8(6):1185-1189.
- JIN Xiao-qing, ZHOU Hua, WU Xue-ming, et al. A rapid screening method of producing strain in acetone-butanol fermentation[J]. *The Chinese Journal of Process Engineering*, 2008, 8(6):1185-1189.
- [12] 代淑艳, 王殿钧, 解华, 等. 硫乙醇酸盐培养基中的刃天青的作用研究[J]. 中国生物制品学杂志, 2005, 18(5):426-428.
- DAI Shu-yang, WANG Dian-jun, XIE Hua, et al. Research on the mechanism of resazurin in thioglycollate medium[J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2005, 18(5):426-428.
- [13] 王世杰, 谷庆宝, 杜平, 等. 零价铁表面对泥浆反应体系中硝基苯降解行为的影响[J]. 环境科学研究, 2007, 20(6):106-109.
- WANG Shi-jie, GU Qing-bao, DU Ping, et al. Effects of iron surface area on reduction of nitrobenzene-contaminated sediment in slurry reaction system [J]. *Research of Environmental Sciences*, 2007, 20(6):106-109.
- [14] Hallas, Alexander. Microbial transformation of nitroaromatic compounds in sewage effluent[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1983, 45:1234-1241.
- [15] 郑金来, 李君文, 晁福寰, 等. 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.
- ZHENG Jin-lai, LI Jun-wen, CHAO Fu-huan, et al. Advance in study on biodegradation of aniline, nitrobenzene and trinitrotoluene[J]. *Microbiology*, 2001, 28(5):85-88.
- [16] 袁星, 郎佩珍. 硝基苯在江水中生物降解动力学模拟研究[J]. 环境化学, 1991, 10(6):24-30.
- YUAN Xing, LANG Pai-zhen. Simulation study on biodegradation kinetics of nitrobenzene in river water [J]. *Environmental Chemistry*, 1991, 10(6):24-30.
- [17] 侯轶, 任源, 韦朝海, 等. 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):25-27.
- HOU Yi, REN Yuan, WEI Chao-hai, et al. Selection of nitrobenzene-degrading microorganism under aerobic conditions and its degrading character[J]. *Research of Environmental Sciences*, 1999, 12(6):25-27.
- [18] 杨彬, 雷乐成. 混合培养微生物好氧降解对硝基苯胺的特性研究[J]. 环境工程, 2003, 21(3):73-76.
- YANG Bin, LEI Le-cheng. Study on characteristics of aerobic degradation of P-nitroaniline by mixed culture microbe [J]. *Environmental Engineering*, 2003, 21(3):73-76.
- [19] 马淳安, 张文魁, 黄辉, 等. 硝基苯的电还原特性研究[J]. 电化学, 1999, 5(4):395-398.
- MA Chun-an, ZHANG Wen-kui, HUANG Hui, et al. Study on electrochemical reduction properties of nitrobenzene [J]. *Electro Chemistry*, 1999, 5(4):395-398.
- [20] 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):10-13.
- WEI Chao-hai, REN Yuan, XIE Bo, et al. Study of cooperate biodegradation of waste water containing nitrobenzene and aniline[J]. *Research of Environmental Sciences*, 1999, 12(3):10-13.