

厌氧条件下 *Shewanella oneidensis* MR-1 对 2,4-二硝基甲苯的还原转化

黄杰勋¹ 陈星¹ 李非里¹ 盛光遥^{2*}

(1. 浙江工业大学 生物与环境工程学院 浙江 杭州 310032)

(2. 同济大学 污染控制与资源化研究国家重点实验室 环境科学与工程学院 上海 200029)

摘要: 【目的】研究 *Shewanella oneidensis* MR-1 厌氧生物转化 2,4-二硝基甲苯(2,4-DNT) 的能力、转化过程和影响因素。【方法】以乳酸钠为电子供体, 2,4-DNT 为电子受体, *S. oneidensis* MR-1 为降解菌, 黄素为胞外电子载体, 设立四个不同的对照体系并监测各体系在转化过程中 2,4-DNT 及其产物的动态变化。同时研究不同 2,4-DNT 浓度下细胞的生长情况, 以及不同黄素浓度下 2,4-DNT 的降解情况。【结果】*S. oneidensis* MR-1 菌能够高效还原转化 2,4-DNT 为 4-氨基-2-硝基甲苯(4A2NT)和 2-氨基-4-硝基甲苯(2A4NT), 并将其进一步还原为 2,4-二氨基甲苯(2,4-DAT), 黄素能加速转化过程。【结论】*S. oneidensis* MR-1 菌具备高效还原转化 2,4-DNT 的能力, 为实际环境中硝基苯污染的原位修复提供科学依据。

关键词: *Shewanella oneidensis* MR-1, 2,4-二硝基甲苯, 厌氧还原, 生物转化

Reductive biotransformation of 2,4-dinitrotoluene by *Shewanella oneidensis* MR-1 under anaerobic conditions

HUANG Jie-Xun¹ CHEN Xing¹ LI Fei-Li¹ SHENG G. Daniel^{2*}

(1. College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou, Zhejiang 310032, China)

(2. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200029, China)

Abstract: [Objective] Reductive biotransformation of 2,4-dinitrotoluene (2,4-DNT) by *Shewanella oneidensis* MR-1 was evaluated under anaerobic conditions. [Methods] Four systems were set up where 2,4-dinitrotoluene (2,4-DNT), *S. oneidensis* MR-1 and flavins were used as electron acceptor, degrading bacteria and extracellular mediator, respectively. Concentrations of 2,4-DNT and its metabolites were monitored by time temporal sampling. Growth of *S. oneidensis* MR-1 under different concentrations of 2,4-DNT and biotransformation of 2,4-DNT under different concentrations of flavins were also studied. [Results] *S. oneidensis* MR-1 could efficiently biotransform 2,4-DNT to 4-amino-2-nitrotoluene (4A2NT) or 2-amino-4-nitrotoluene (2A4NT), both of them were further reduced to 2,4-diaminotoluene (2,4-DAT). The presence of flavins could accelerate the biotransformation. [Conclusion] *S. oneidensis* MR-1 showed a high capacity for biotransforming 2,4-DNT and could be further applied in the in situ bioremediation of nitrobenzene contaminations in the environment.

Keywords: *Shewanella oneidensis* MR-1, 2,4-Dinitrotoluene, Anaerobic reduction, Biotransformation

2,4-二硝基甲苯(2,4-DNT)被广泛应用于工业生产中, 通常在生产甲苯二胺、染料和农药时作为中间体, 以及作为前体物质用于制造产量巨大的聚氨酯泡沫塑料^[1-3]。此外, 2,4-DNT 也是火箭推进剂生产中的主要成分^[4]以及 TNT 炸药生产过程的主要副产物^[5]。然而生产使用 2,4-DNT 过程中的不恰当操作使得许多工厂附近的地下水、土壤和沉积物受到污染, 尤其是军工厂周围的环境^[6]。2,4-DNT 具有显著的生物毒性^[7], 美国环境保护署(Environmental protection agency, EPA)已将其列入优先控制污染物名单^[8], 其对人类的毒性表现在对神经系统、心脏和循环系统的影响,

以及致突变性和致癌性^[9]。

微生物转化一直以来都被认为是环境中 2,4-DNT 修复的有效途径, 首株能够完全矿物化 2,4-DNT 的菌株在二十多年前就被报道^[10]。至今, 生物降解 2,4-DNT 依旧是研究热点。有氧条件下生物转化 2,4-DNT 是较早开始的研究, 如 Lendenmann U.等^[3]早在 1998 年就证明 2,4-DNT 在氧气充足的流动床生物膜反应器中能被定量降解。然而, 在工业上应用有氧生物降解法处理 2,4-DNT 却很难达到 EPA 的排放标准^[2]。较多报道是先在厌氧条件下将 2,4-DNT 转化为稳定的中间产物, 再将其进一步有氧降解^[11-12]。最近, 在

受到2,4-DNT污染的海洋沉积物中也观察到类似降解模式,并且发现其中 *Shewanella canadensis* 和 *S. sediminis* 起了关键作用^[13]。

Shewanella 菌属在自然环境中广泛分布,能利用多种多样的有机物或无机矿物作为电子供体。据我们所知,利用 *Shewanella* 菌属还原转化2,4-DNT 至今仍未见报道,本实验将以 *S. oneidensis* MR-1 作为模式菌,研究该菌在厌氧条件下对2,4-DNT的生物转化及影响因素,这将有助于我们理解硝基芳香化合物在海洋沉积物中的环境过程,为硝基芳香化合物的原位生物修复提供新思路,因此具有重要的环境意义。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 主要试剂: 2,4-二硝基甲苯(2,4-DNT, 99%)、2-氨基-4-硝基甲苯(2A4NT, 98%)、4-氨基-2-硝基甲苯(4A2NT, 98%)和 2,4-二氨基甲苯(2,4-DAT, 98%)均购自阿拉丁公司。用于高效液相色谱分析(HPLC)的溶剂均为色谱级,购自 Tedia (美国)公司。用于配制基础培养基的成分均购自上海生工生物工程有限公司。

1.1.2 菌株: *S. oneidensis* MR-1 由美国南加州大学(University of Southern California)的 Kenneth Henry Nealson 提供。

1.1.3 主要仪器: 高效液相色谱仪(HPLC, Waters e2695), 超纯水制备仪(Milli-Q water)。

1.2 方 法

1.2.1 储备液的制备: 2,4-DNT (5 g/L)储备液用甲醇配制并储存在棕色瓶中。乳酸钠储备液(2 mol/L)、富马酸钠储备液(0.45 mol/L)和黄素储备液(核黄素和黄素单核苷酸, 1:1, 250 $\mu\text{mol/L}$)均用超纯水(Milli-Q)配制,通过孔径为 0.22 μm 的滤头注入到高温灭菌过的厌氧密封血清瓶中。以上储备液均在 4 $^{\circ}\text{C}$ 恒温储存。

1.2.2 *S. oneidensis* MR-1 的培养: 基础培养基(BSM)的制备参照文献[14]的描述。在含 BSM 血清瓶中以 20 mmol/L 的乳酸钠为电子供体, 23 mmol/L 的富马酸钠为电子受体, 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温厌氧培养 48 h。培养得到的菌液在无菌离心管中以 3 000 r/min 离心 10 min, 去上清液后用无菌 BSM 以 5:1 浓缩后得到 *S. oneidensis* MR-1 细胞重悬液, 用分光光度法(600 nm)和平板计数法进行细胞数定量(4×10^6 – 6×10^6 CFU/mL)。

1.2.3 2,4-DNT 的浓度与 *S. oneidensis* MR-1 厌氧生长试验: 在 50 mL 无菌血清瓶中, 以 20 mmol/L 的乳酸钠为电子供体, 分别添加 2,4-DNT 50、100 和 150 $\mu\text{mol/L}$, 各添加 *S. oneidensis* MR-1 细胞重悬液 1.0 mL, 30 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温厌氧培养 48 h 后, 取出培养液用平板计数法监测 *S. oneidensis* MR-1 生长情况。

1.2.4 *S. oneidensis* MR-1 对 2,4-DNT 的生物转化试验: 设立了 4 个反应体系, 各设 2 个平行样。第一个体系是在 50 mL 的无菌血清瓶中通过一次性无菌注射器添加 2,4-DNT (90 $\mu\text{mol/L}$)、乳酸钠储备液(20 mmol/L)、黄素(5 $\mu\text{mol/L}$)和 *S. oneidensis* MR-1 细胞重悬液 1.0 mL; 第二个体系未添加黄素; 作为对照样, 第三个体系未添加细胞重悬液; 第四个体系添加了经 95 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 30 min 后的细胞重悬液。所有体系都在 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温、避光条件下反应。为了进一步研究较长时间内 *S. oneidensis* MR-1 对 2,4-DNT 的生物转化情况, 对所有体系在反应进行到第 48 h 后再次添加 2,4-DNT (约 100 $\mu\text{mol/L}$)。取样过程中, 用无菌注射器从各个反应体系中抽取 1.0 mL 反应液以 6 000 r/min 离心 90 s, 取上清液于高效液相色谱仪监测 2,4-DNT 残留和其降解产物生成。

1.2.5 黄素对 *S. oneidensis* MR-1 转化 2,4-DNT 的影响试验: 在 50 mL 的无菌血清瓶中添加 2,4-DNT (90 $\mu\text{mol/L}$)、乳酸钠储备液(20 mmol/L)

和 *S. oneidensis* MR-1 细胞重悬液 1.0 mL, 并分别添加黄素 0, 2.5 和 5.0 $\mu\text{mol/L}$, 各设 2 个平行样, 监测不同时间点 2,4-DNT 残留情况及其降解产物生成情况。

1.2.6 化学分析: 2,4-DNT 和其生成产物通过高效液相色谱仪(C18 柱, Sun Fire, 5 μm , 4.6 mm \times 250 mm)进行监测, 进样量均为 10 μL 。

(1) 分离 2,4-DNT、4A2NT 和 2A4NT, 以甲醇-水作为流动相, 流速为 1.0 mL/min, 其组成为: 0–11 min 为 50% (V/V) 甲醇, 11–13 min 时为 70% (V/V) 甲醇。设定紫外检测器(Waters 2998, Photodiode Array Detector)的检测波长为 254 nm, 得到 3 种物质的保留时间分别在 11.60、7.24 和 7.80 min。

(2) 2,4-DAT 以乙腈-磷酸盐缓冲液(20 mmol/L, pH 7.0, 30/70, V/V)为流动相, 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 224 nm, 其保留时间为 4.40 min。

2 结果与分析

2.1 *S. oneidensis* MR-1 以 2,4-DNT 作为唯一电子受体生长

3 个 2,4-DNT 初始浓度为 150、100 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 的体系, 经过 48 h 的转化反应后 *S. oneidensis* MR-1 细胞浓度分别为 2.5×10^6 、 2.1×10^6 和 1.1×10^6 CFU/mL (图 1)。对该数据进行拟合发现, *S. oneidensis* MR-1 的最终生物量与 2,4-DNT 初始浓度基本成正比, 相关系数 R^2 为 0.96, 此外未添加 2,4-DNT 的空白对照中没有检测到微生物的生长, 表明 *S. oneidensis* MR-1 能够以 2,4-DNT 作为唯一的电子受体支持细胞生长。

在本生物转化体系中, *S. oneidensis* MR-1 分别以乳酸钠和 2,4-DNT 作为唯一电子供体和电子受体获取能量并厌氧生长, 与此同时氧化乳酸钠来还原 2,4-DNT, 此过程中微生物生长和

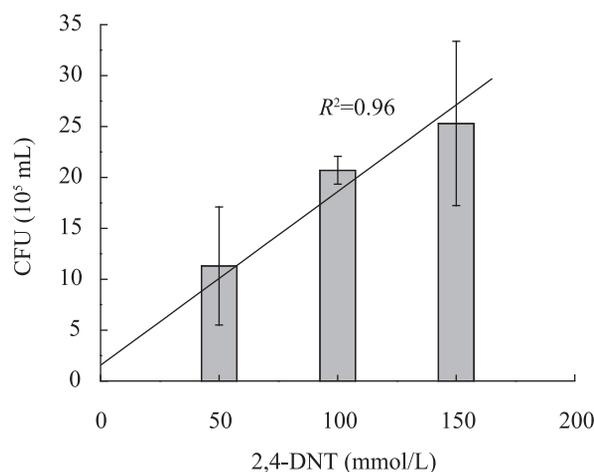


图 1 不同 2,4-DNT 浓度下 *S. oneidensis* MR-1 的生长情况

Fig. 1 Growth of *S. oneidensis* MR-1 under different concentrations of 2,4-DNT

2,4-DNT 还原相耦合。微生物在 2,4-DNT 存在下生长早有报道, Cheng J. Y.等^[2]以氢气和乙醇为底物厌氧转化 2,4-DNT, 最终两种底物是部分用于生物转化 2,4-DNT, 部分用于支持微生物生长, 虽然此时 2,4-DNT 转化量和底物消耗量在化学计量上不成正比。Yang H.等^[13]也报道了在受到 2,4-DNT 污染的海洋淤泥促进了 *Shewanella* 菌属的生长。在对 *S. decolorationis* S12 厌氧还原偶氮类物质研究中发现, 微生物生长与偶氮类物质的还原相耦合, 最终生物量与偶氮染料的初始浓度也成正比^[15]。

2.2 *S. oneidensis* MR-1 生物转化 2,4-DNT

在两个含细胞重悬液的生物体系中(图 2), 不论黄素存在与否, 2,4-DNT (液相中初始浓度约为 90 $\mu\text{mol/L}$)均在 24 h 内被完全降解并监测到其降解产物的生成。而两个未添加微生物细胞的体系或者是添加了灭活微生物细胞的非生物对照体系中, 2,4-DNT 均没有发生降解, 也未监测到降解产物生成。可见活性降解菌的存在是发生 2,4-DNT 转化的关键, 两个生物体系中的转化是微生物酶催化的结果, 属于生物转化。

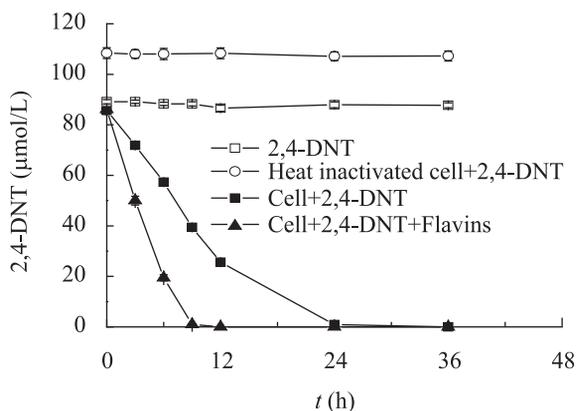


图2 不同体系中 2,4-DNT 的厌氧还原
Fig. 2 Anaerobic reduction of 2,4-DNT in different systems

2,4-DNT 在两个生物体系中的降解速率有所不同, 在第一个体系(Cell+2,4-DNT+Flavins)和第二个体系(Cell+2,4-DNT)中, 2,4-DNT 被完全降解的时间分别是约 12 h 和 24 h。而 Cheng 等^[2]曾在相近的 2,4-DNT 浓度下以乙醇为底物做过生物降解实验, 其结果显示将约 90 μmol/L 的 2,4-DNT 完全降解需要近 100 h。相比其他菌种和研究体系, 本体系中的菌种 *S. oneidensis* MR-1 降解 2,4-DNT 明显更快。

2.3 2,4-DNT 的还原转化中间产物及途径分析

根据 HPLC 监测结果, 两个生物体系在降解过程中都生成了中间产物 2A4NT 和 4A2NT (图 3), 且随着反应进行两者又都被进一步还原生成 2,4-DAT, 类似转化过程在其他研究中也早有报道^[5,16-17]。将两个生物体系在不同时间点的 4A2NT+2A4NT+2,4-DAT 总浓度与初始 2,4-DNT 浓度进行比较, 前 48 h 反应时间内的平均比值为 99%, 后 48 h 内的平均比值达到 110%, 物质量基本守恒。据此提出 2,4-DNT 在本实验体系中的还原转化途径(图 4), 在此途径中 2,4-DNT 上的一个硝基先被还原成 2A4NT 或 4A2NT, 接着第二个硝基被逐步还原最终生成二氨基甲苯。

值得注意的是, 两种 ANT 中间产物的生成

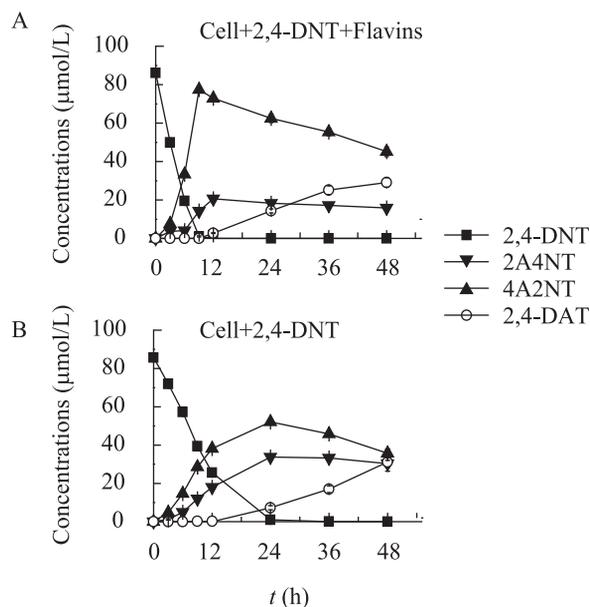


图3 2,4-DNT 及其还原产物在不同时间点的浓度
Fig. 3 Concentrations of 2,4-DNT and the biotransformation products from different sampling time

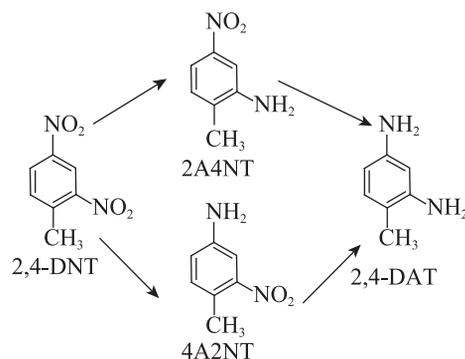


图4 *S. oneidensis* MR-1 对 2,4-DNT 的厌氧生物转化途径

Fig. 4 The anaerobic biotransformation pathway of 2,4-DNT by *S. oneidensis* MR-1

速率存在差异, 4A2NT 在两个生物体系中的生成速率及其进一步被还原为 2,4-DAT 的速率均比 2A4NT 快, 即 2,4-DNT 的对位硝基更容易被还原。例如, 在未添加黄素的生物体系中(图 3B), 第 24 h 生成的 4A2NT 在所有物质中占 61%, 而 2A4NT 仅占 39%。这与一些生物转化 2,4-DNT 研究中报道的结果一致^[6,16-17]。相比邻位硝基, 对位硝基位置更开阔, 溶剂化程度更高, 因而更

容易接受电子被还原。也有研究显示, 在以乙醇作底物厌氧降解 2,4-DNT 过程中, 4-硝基在 2,4-DNT 浓度较低时较易被还原, 而 2-硝基则在 2,4-DNT 浓度较高时较易被还原^[18]。本实验体系中的 2,4-DNT 浓度约为 100 $\mu\text{mol/L}$, 属于较低范围。

2.4 黄素对 2,4-DNT 生物降解的促进作用

缺少黄素的第二个生物体系中 2,4-DNT 的降解速率相比第一个体系有所减慢(图 5), 且在首次添加 2,4-DNT 的前 48 h 中降解速率差异更大。为了进一步研究黄素浓度对 *S. oneidensis* MR-1 生物转化 2,4-DNT 的影响, 在不同黄素浓度下建立了 2,4-DNT 生物转化体系, 结果也显示, 黄素浓度越高时 2,4-DNT 的转化速率越快(图 6), 当反应进行到第 6 h, 黄素添加量为 5 $\mu\text{mol/L}$ 的体系中 2,4-DNT 的转化率是添加量为 0 体系的 2.3 倍。黄素在 *S. oneidensis* MR-1 降解 2,4-DNT 的生物体系中起着促进作用。

Shewanella 菌胞外呼吸的显著特性是细胞自身可以合成并释放出胞外电子载体, 通过电子载体作为媒介将电子从细胞表面传递到电子

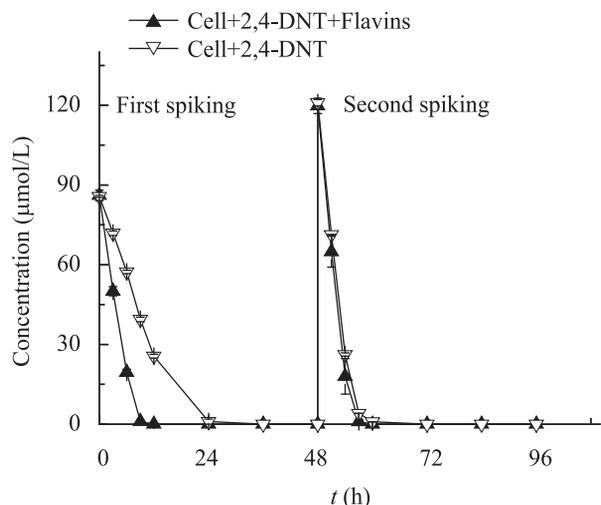


图 5 两次加入 2,4-DNT 后两个生物体系中的 2,4-DNT 降解情况

Fig. 5 Biodegradation of 2,4-DNT during two spiking in two biosystems

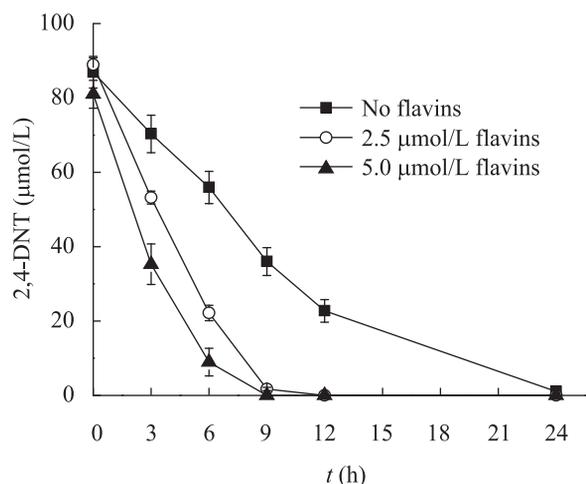


图 6 不同黄素浓度下 2,4-DNT 的生物转化速率

Fig. 6 Biotransformation rate of 2,4-DNT under different concentrations of flavins

受体, 尤其是像 Fe (III)氧化物这类细胞通常无法直接接触到的固体物质^[19-20]。实验中添加的黄素由核黄素和黄素单核苷酸(FMN)组成, 是 *Shewanella* 菌常用的电子载体^[21-22]。已有报道证实, 黄素在 *Shewanella* 菌还原萘酚绿 B 染料^[23]、甲基橙染料^[24]过程中, 都起着电子载体的作用。2,4-DNT 是一种类似物质, 因此黄素在本生物转化 2,4-DNT 过程中很可能也是作为电子传导物, *S. oneidensis* MR-1 在本实验的生物体系中以乳酸钠为电子供体获取电子, 通过细胞内部电子传递链传导将电子从细胞内膜传递到细胞外膜, 位于细胞外的氧化态黄素从细胞表面获得电子被还原, 通过扩散将电子传递给 2,4-DNT 后重新被氧化, 从而促进了转化反应进行。在未添加黄素的生物体系中, 经过前 48 h 的生长, *S. oneidensis* MR-1 逐步释放出了胞外电子载体, 释放出的电子载体黄素在后 48 h 发挥功能促进反应进行, 极大提高了该体系中的 2,4-DNT 转化速率, 使得在后 48 h 中 2,4-DNT 在两个生物体系中的降解速率相近。

在缺少黄素的生物体系中, 在反应初期培养液中的电子载体浓度较低, 2,4-DNT 虽然发生

转化,但转化速率较慢,说明 *S. oneidensis* MR-1 生物转化 2,4-DNT 过程中存在着其它不通过黄素也能将电子从细胞外膜传递到 2,4-DNT 的途径。Xiao X.等^[23]以及 Cai P. J.等^[24]最近的研究认为,在 *Shewanella* 菌,尤其是在其模式菌 *S. oneidensis* MR-1 中,电子除了依靠胞外电子传导物进行传递,也可以通过其位于细胞膜上的诸如 MtrA、MtrB、MtrC 和 OmcA 等细胞色素直接传递到终端电子受体。在本实验的生物转化体系中,溶解态的 2,4-DNT 可以直接与 *S. oneidensis* MR-1 细胞的还原位点接触,从而不依赖黄素也能从细胞外膜上的细胞色素处获取直接释放的电子而被还原。

尽管 2,4-DNT 的最终还原产物 2,4-DAT 仍具有毒性,但大量研究表明 2,4-DAT 在有氧条件下很容易被降解为无毒产物^[11-12,25]。*Shewanella* 菌在自然界中广泛存在,且因可以利用种类繁多的有机物作为电子供体,对自然环境下特别是处于好氧/厌氧边界的沉积物环境中 2,4-DNT 的环境归属具有重要意义^[26-27]。*S. oneidensis* MR-1 厌氧降解 2,4-DNT 至今未见报道,本研究为利用 *Shewanella* 菌修复受到 2,4-DNT 污染的自然环境提供了重要参考。

3 结论

在以乳酸钠为电子供体的生物降解体系中,*S. oneidensis* MR-1 能在厌氧条件下高效地还原转化 2,4-二硝基甲苯,转化过程是由微生物的生物催化完成,其中微生物细胞的生长和 2,4-DNT 的还原过程相耦合。在转化过程中,2,4-DNT 首先是被还原成中间产物 2A4NT 和 4A2NT,其中 4A2NT 是主要的中间产物,接着苯环上的第二个硝基再接受电子而被进一步还原为 2,4-DAT。黄素可以加快 *S. oneidensis* MR-1 对 2,4-DNT 的还原,主要是通过作为胞外电子载体发生作用。

细胞外的电子传递除黄素传导作用外,也同时存在着细胞与 2,4-DNT 间的直接传递作用。

参考文献

- [1] Gong P, Kuperman RG, Sunahara GI. Genotoxicity of 2,4- and 2,6-dinitrotoluene as measured by the *Tradescantia* micronucleus (Trad-MCN) bioassay[J]. Mutation Research-genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2003, 538(1/2): 13-18.
- [2] Cheng JY, Makram TS, Albert DV. Anaerobic biotransformation of 2,4-dinitrotoluene with ethanol, methanol, acetic acid and hydrogen as primary substrates[J]. Water Research, 1998, 32(10): 2921-2930.
- [3] Lendenmann U, Spain JC, Smets BF. Simultaneous biodegradation of 2,4-dinitrotoluene and 2,6-dinitrotoluene in an aerobic fluidized-bed biofilm reactor[J]. Environmental Science and Technology, 1998, 32(1): 82-87.
- [4] Christopher HJ, Boardman GD, Freedman DL. Aerobic biological treatment of 2,4-dinitrotoluene in munitions plant wastewater[J]. Water Research, 2000, 34(5): 1595-1603.
- [5] Hughes JB, Wang CY, Zhang CL. Anaerobic biotransformation of 2,4-dinitrotoluene and 2,6-dinitrotoluene by *Clostridium acetobutylicum*: A pathway through dihydroxylamino intermediates[J]. Environmental Science and Technology, 1999, 33(7): 1065-1070.
- [6] Bradley PM, Chapelle FH, Landmeyer JE, et al. Microbial transformation of nitroaromatics in surface soils and aquifer materials[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60(6): 2170-2175.
- [7] Smock LA, Stoneburner DL, Clark JR. The toxic effects of trinitrotoluene (TNT) and its primary degradation products on two species of algae and the fathead minnow[J]. Water Research, 1976, 10(6): 537-543.
- [8] Keither L, Telliard W. Priority pollutants: I-a perspective view[J]. Environmental Science and Technology, 1979, 13(4): 416-423.

- [9] Rickert DE, Butterworth BE, Popp JA, et al. Dinitrotoluene: acute toxicity, oncogenicity, genotoxicity, and metabolism[J]. *Critical Reviews in Toxicology*, 1984, 13(3): 217–234.
- [10] Spangord RJ, Spain JC, Nishino SF, et al. Biodegradation of 2,4-dinitrotoluene by a *Pseudomonas* sp.[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(11): 3200–3205.
- [11] Vanderloop SL, Makram TS, Moustafa AM, et al. Biotransformation of 2,4-dinitrotoluene under different electron acceptor conditions[J]. *Water Research*, 1999, 33(5): 1287–1295.
- [12] Sponza DT, Atalay H. Treatability of 2,4-dinitrotoluene in anaerobic/aerobic sequential processes[J]. *Journal of Environmental Science and Health Part A-toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 2003, 38(8): 1529–1548.
- [13] Yang H, Zhao JS, Hawari J. Effect of 2,4-dinitrotoluene on the anaerobic bacterial community in marine sediment[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107(6): 1799–1808.
- [14] Huang J, Sun B, Zhang X. Electricity generation at high ionic strength in microbial fuel cell by a newly isolated *Shewanella marisflavi* EP1[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(4): 1141–1149.
- [15] Hong Y, Xu M, Guo J, et al. Respiration and growth of *Shewanella decolorationis* S12 with an Azo compound as the sole electron acceptor[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(1): 64–72.
- [16] Noguera DR, Freedman DL. Reduction and acetylation of 2,4-dinitrotoluene by a *Pseudomonas aeruginosa* strain[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(7): 2257–2263.
- [17] Yang H, Halasz A, Zhao JS, et al. Experimental evidence for in situ natural attenuation of 2,4- and 2,6-dinitrotoluene in marine sediment[J]. *Chemosphere*, 2008, 70(5): 791–799.
- [18] Cheng JY, Yoshinori K, Makram TS, et al. Anaerobic biotransformation of 2,4-dinitrotoluene with ethanol as primary substrate: mutual effect of the substrates on their biotransformation[J]. *Water Research*, 1996, 30(2): 307–314.
- [19] Lovley DR, Holmes DE, Nevin KP. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction[J]. *Advances in Microbial Physiology*, 2004(49): 219–286.
- [20] DiChristina TJ, Bates DJ, Burns JL, et al. *Shewanella*: novel strategies for anaerobic respiration. In *Past and Present Water Column Anoxia*[M]. Netherlands: Springer, 2006:443-469
- [21] Marsili E, Baron DB, Shikhare ID, et al. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(10): 3968–3973.
- [22] Covington ED, Gelbmann CB, Kotloski NJ, et al. An essential role for UshA in processing of extracellular flavin electron shuttles by *Shewanella oneidensis*[J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 78(2): 519–532.
- [23] Xiao X, Xu CC, Wu YM, et al. Biodecolorization of naphthol green B dye by *Shewanella oneidensis* MR-1 under anaerobic conditions[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 110: 86–90.
- [24] Cai PJ, Xiao X, He YR, et al. Anaerobic biodecolorization mechanism of methyl orange by *Shewanella oneidensis* MR-1[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(4): 1769–1776.
- [25] Lenke H, Jürgen W, Gregor D, et al. Biological treatment of TNT-Contaminated Soil. 2. Biologically induced immobilization of the contaminants and full-scale application[J]. *Environmental Science and Technology*, 1998, 32(13): 1964–1971.
- [26] Nealson KH, Scott J. Ecophysiology of the genus *Shewanella*. In *The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria*[M]. New York: Springer, 2006: 1133–1151.
- [27] Hau HH, Gralnick JA. Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2007, 61: 237–258.