

DOI:10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2022.18.006

污水处理过程中微生物降解萘普生药物的研究进展

崔迪¹, 程喜铭^{1,2}, 卫浩^{1,2}, 谷逊雪^{1,2}, 孟丽君^{1,2}

(1. 哈尔滨商业大学 药物工程技术研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076; 2. 哈尔滨商业大学 药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要: 萘普生(Naproxen)作为治疗关节炎和风湿类疾病的有效抗炎药受到了广泛关注,但其大量使用导致严重的药物残留并对水环境造成污染,且对水生生物具有明显的毒性。目前,在污水处理过程中萘普生的去除主要分为物化法与生物法,而生物法由于具有成本低廉、环境友好等突出优点而得到广泛应用。主要综述了现已报道的萘普生降解菌、降解途径以及降解酶等研究进展情况,以期为污水中抗炎药的生物法去除提供理论依据,为实际工程应用奠定理论基础。

关键词: 污水处理; 萘普生; 降解途径; 降解酶

中图分类号: TU992 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2022)18-0029-05

Advancement in Microbial Degradation of Naproxen for Wastewater Treatment

CUI Di¹, CHENG Xi-ming^{1,2}, WEI Hao^{1,2}, GU Xun-xue^{1,2}, MENG Li-jun^{1,2}

(1. Engineering Research Center for Medicine, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China; 2. School of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract: Naproxen has received extensive attention as an effective anti-inflammatory drug for the treatment of arthritis and rheumatism. However, due to the frequent usage of naproxen, there is an increase residual level of naproxen in water, thus causing pollution to the water environment, which leads to obvious toxicity to aquatic organisms. At present, the removal of naproxen in sewage treatment is mainly divided into physicochemical method and biological method, and biological method has been widely applied due to its outstanding advantages such as low cost and environmental friendliness. This paper mainly reviews the research progresses of naproxen-degrading bacteria, degradation pathways and degrading enzymes which have been reported. It provides a theoretical basis for the biological removal of anti-inflammatory drugs in sewage, laying a theoretical foundation for practical engineering applications.

Key words: wastewater treatment; naproxen; degradation pathway; degrading enzyme

萘普生(Naproxen)是药品和个人护理产品(PPCPs)中的一种,作为抗炎药,主要用于治疗关节炎和风湿类疾病。因副作用小、耐受性好而成为世界上最畅销的非处方药之一。但是萘普生的广泛使用会导致大量的药物残留进入水环境,对生态环

境安全造成潜在威胁。目前常见的萘普生处理技术主要分为物化法和生物法。物化法包括吸附法、光催化法、高级氧化法,生物法包括生物膜法、活性污泥法及生物反应器等。与其他方法相比,利用微生物降解萘普生,既可降低成本,同时还不会产生

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目(LH2021E091); 2021年哈尔滨商业大学教师“创新”项目支持计划; 黑龙江省博士后科研项目(LBH-Z20163)

二次污染。随着生物技术的不断成熟,生物降解萘普生的研究受到广泛关注,选育高效萘普生降解菌并揭示其微生物学机制具有重要意义。

1 生物处理工艺对萘普生的去除效能研究

1.1 传统生物处理工艺

活性污泥法应用广泛但不能完全有效去除城市污水中的萘普生,这是由于降解物丰度较低所致,而这一限制条件可以通过生物强化来打破,通过生物强化,能够使去除萘普生的有效微生物在处理过程中占据主导地位。Chen等^[1]对丹麦4座城市污水处理厂活性污泥中萘普生的去除效果进行了研究,结果表明传统的活性污泥法对萘普生的去除率可达46%~90%,同时还发现较高的SRT值并不会提高萘普生的降解速率,换言之,活性污泥中微生物浓度和萘普生的降解速率之间没有任何相关性,所以必须根据每座污水厂的性能单独评估其对萘普生的去除效果。汤迎等^[2]研究了活性污泥在缺氧及好氧条件下对萘普生的去除行为,结果表明好氧条件下废水中萘普生的浓度从初始的95.01 $\mu\text{g/L}$ 下降至24.09 $\mu\text{g/L}$,去除率达到了74.64%,缺氧条件下,活性污泥对萘普生也有一定的去除效果,但效果远不如好氧条件,因此,可以推断活性污泥处理工艺对萘普生的去除集中在好氧部分。与活性污泥法不同,Grenni等^[3]直接检测了Tiber River中天然微生物群落对污水厂下游水样中萘普生的降解效能,研究表明在萘普生浓度为100 $\mu\text{g/L}$ 条件下,天然微生物群落对萘普生具有降解作用,河流中的萘普生可在46 d内降解完全,且降解效果与季节有关(见图1)。推断因为秋季水温略高于春季,微生物活性也更高,故萘普生的降解速率更快。

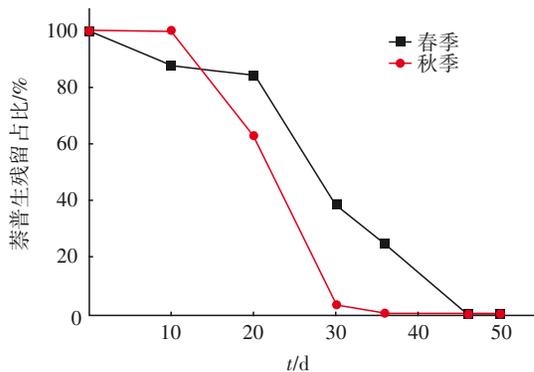


图1 Tiber River中天然微生物群落对萘普生的降解效能

Fig.1 Degradation efficiency of naproxen by natural microbial communities in Tiber River

1.2 新型生物处理工艺

近年来,国内外研究学者借助环境工程和化学工程的手段和方法,以微生物作用为主体开发了多种用于控制和治理水污染的新方法。González-Pérez等^[4]通过在高污泥浓度和长水力停留时间下工作的实验性全尺寸MBR,确定了萘普生在实际城市污水处理过程中的去除率可达95%以上。Wang等^[5]研究了在颗粒污泥膜生物反应器(GMBR)中去除萘普生的效能和微生物演替过程的影响,结果表明,GMBR对萘普生的去除率可达84%。这一结果说明细菌在萘普生降解中具有重要作用。同样,Zhao等^[6]也研究了GMBR对萘普生的去除效能,结果表明系统中的污泥造粒过程快速但不稳定,系统表现出溶解-团聚动态平衡,对萘普生的去除率达84.02%。Luo等^[7]研究表明,与MBR系统相比,移动床生物膜反应器(MBBR)能够改善一些疏水性有机化合物的去除效果。以海绵片为生物载体时,对萘普生的去除率可达81.1%。Arias等^[8]提出了一种基于UASB反应器和IFAS系统相结合的创新工艺,通过结合不同的氧化还原条件和生物量构象来提高微生物多样性。结果显示,萘普生在厌氧条件下更容易被去除,其去除率可达80%以上。

萘普生能够被新型生物处理工艺去除,是因为这一系统中存在可降解萘普生的菌群,所以分析萘普生降解途径及代谢产物仍是首要问题,需要从微观方面进行更深入的探究与解析。

2 萘普生降解微生物

由于传统的水处理工艺设计参数问题,萘普生降解菌无法在生物处理系统中富集,因此,萘普生难以通过现有的传统污水生物处理技术达到有效降解。但目前已经有研究报道了自然界中存在对萘普生具有降解能力的真菌及细菌。

2.1 真菌

1999年Cunninghamella属的真菌被发现具有与哺乳动物类似的细胞色素P-450单加氧酶系统,可对萘普生进行转化。在此基础上,Zhong等^[9]分离出三株降解转化萘普生的Cunninghamella属真菌,Cunninghamella blakesleana和Cunninghamella elegans可实现萘普生的完全转化,而菌株Cunninghamella echinulata降解能力相对较弱。该团队后续研究发现,萘普生被菌株Cunninghamella转化为两种代谢

物——去甲基萘普生及其硫酸盐。*Cunninghamella elegans* ATCC 9245 将萘普生完全转化为去甲基萘普生, *Cunninghamella blakesleana* 和 *Cunninghamella echinulata* 则可将去甲基萘普生进一步转化为Ⅱ相代谢产物去甲基萘普生-6-O-硫酸盐。Rodarte-Morales 等^[10] 在利用菌株 *P. chrysosporium* (ATCC 24725) 降解萘普生的过程中, 同样发现有细胞色素 P-450 的参与, 且对初始浓度为 2 mg/L 萘普生的降解效率达到 97%。

Marco-Urrea 等^[11] 发现并证实 *Trametes versicolor* 对萘普生具有较强的降解能力, 同时实验结果显示真菌对萘普生的降解主要是由其产生的非特异性酶——漆酶起作用。该团队在实验烧瓶中通过木质素分解酶(漆酶)以及细胞色素 P-450 使萘普生分解代谢, 并鉴定萘普生的转化产物分别为 6-O-去甲基萘普生[2-(6-羟基萘-2-基)丙酸]和 1-(6-甲氧基萘-2-基)乙酮。Rodriguez-Rodriguez^[12] 发现, 在污泥龄为 17 d 的污泥中漆酶的活性最高, 但在培养期间漆酶活性较低。而 Tran 等^[13] 的实验证明, 相对于从菌株 *Trametes versicolor* 分离出的粗制漆酶, 商业漆酶更能有效地转化萘普生, 转化率可达 100%。

在真菌降解萘普生的反应过程中, 漆酶的参与必不可少。漆酶是一种多铜氧化酶, 催化四种酚类分子的单电子氧化, 伴随着氧气还原为水, 漆酶的活性位点包括四个铜离子: I 型铜(T1, 一个 Cu 原子), 作为来自基板的电子受体; II 型铜(T2, 一个 Cu 原子), 形成三核铜簇; III 型铜(T3, 两个 Cu 原子), 发生 O₂ 的还原。与需要连续供应 H₂O₂ 的过氧化物酶相比, 使用大气氧作为最终电子受体对漆酶的应用具有较大优势。正因为漆酶的这一特征, 使其在萘普生降解过程中发挥了重要作用。由此可知, 在今后的研究中, 可以合理地利用漆酶使萘普生发生分解代谢, 从而完成对萘普生的转化。

2.2 细菌

除真菌能够降解萘普生外, 细菌对萘普生的降解效果也较好。Marchlewicz 等^[14] 从波兰某化学工厂的土壤中分离出一株革兰氏阳性的苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*), 命名为菌株 B1 (2015b)。研究表明, B1 (2015b) 可以降解萘普生, 但当萘普生作为唯一碳源时, 其降解率仅为 20% 左右; 而在葡萄糖作为外加碳源进行共代谢降解的过程中, 菌株 B1 (2015b) 对萘普生的降解能力显著提

高, 降解率可达 90% 以上。Wojcieszynska 等^[15] 在筛选出的嗜麦芽窄食单胞菌 *S. maltophilia* KB2 (VTT E-193197) 降解萘普生过程中, 同样发现了共代谢降解萘普生的效率高于单一碳源, 在唯一碳源的情况下菌株 *S. maltophilia* KB2 (VTT E-113197) 在 35 d 内仅能转化 28% 的萘普生, 而在葡萄糖或苯酚作为碳源的共代谢条件下, 降解效率可分别达到 78% 和 40%。

Domaradzka 等^[16] 的实验结果证实, 在长期的运行过程中, 共代谢降解萘普生的能力也远远优于以萘普生为单一底物的情况。研究人员在活性污泥中分离出一株假单胞菌 *Pseudomonas* sp. S5, 在单基质培养物中培育 35 d 后, 菌株 S5 能够除去约 30% 的萘普生; 在共代谢条件下, 以葡萄糖和苯酚为底物时, 培养 35 d 后菌株 S5 对萘普生的降解率分别为 (75.14±1.71)%、(86.27±2.09)%。研究人员推测是由于外加碳源促使萘普生降解菌产生更多参与反应的酶, 如萘双加氧酶、苯酚单加氧酶和羟基喹啉 1,2-双加氧酶等, 有利于萘普生的降解, 因此, 共代谢的降解效率通常优于唯一碳源的降解效率^[16]。该团队通过实验证明, 细菌在共代谢系统可以提供更高的萘普生转化效率, 同时增加体系内的生物量。菌株 *Pseudomonas* sp. S5 对萘普生的主要降解途径如下: 萘普生是萘衍生物, 可以假设由萘双加氧酶催化的二羟基化是萘普生转化的第一步, 在下一步中, 可能发生苯酚单加氧酶对 7,8-二羟基萘普生的羟基化, 并形成 5,7,8-三羟基萘普生, 而 5,7,8-三羟基萘普生又可以是羟基喹啉 1,2-双加氧酶的底物。

Wojcieszynska 等^[17] 分析了参与萘普生降解反应过程的酶, 发现 *S. maltophilia* KB2 可根据培养基中存在的诱导剂合成不同类型的羟化酶和双加氧酶。以萘普生和葡萄糖或酚为生长底物时, 培养的 KB2 菌产生了萘双加氧酶、苯酚单加氧酶和羟基喹啉 1,2-双加氧酶(见表 1)。在以葡萄糖为碳源的萘普生共代谢降解过程中, 检测到了龙胆酸 1,2-双加氧酶的活性, 表明龙胆酸 1,2-双加氧酶也参与了萘普生的转化。研究还表明, KB2 细胞在含有苯酚的培养基中生长时, 检测到了邻苯二酚 2,3-双加氧酶的活性(见表 1), 说明儿茶酚 2,3-双加氧酶在菌株 KB2 的苯酚降解中同样起着关键作用^[17]。因此, 儿茶酚 2,3-双加氧酶的活性是这种芳香基质诱导的

结果。由此可见,邻苯二酚和龙胆酸是萘普生降解的中间产物。

表1 共代谢条件下参与萘普生降解的酶的活性

Tab.1 Enzyme activity involved in naproxen degradation under co-metabolism U·mg⁻¹蛋白

项 目	特定酶活性	
	萘普生+葡萄糖	萘普生+苯酚
苯酚单加氧酶	35.2±13.0	19.4±6.6
萘双加氧酶	2.1±1.7	9.7±0.3
羟基喹啉1,2-双加氧酶	179.7±23.5	250.0±14.5
儿茶酚2,3-双加氧酶	0.0±0.0	60.0±5.9
龙胆酸1,2-双加氧酶	440.2±71.3	0.0±0.0

综上,在共代谢条件下萘普生的生物降解过程初期,起主要作用的酶是萘双加氧酶和苯酚单加氧酶,氧化酶是通过催化底物的氧化完成反应。这些酶在双电子氧化过程中与分子氧反应产生过氧化氢,随后作用于目标底物。氧化酶和氧化酶区域特异性羟基化芳族底物的芳环或侧链取代基的能力为生物催化合成难以使用有机合成的化合物提供了机会。单加氧酶催化一个O原子结合到有机基质中,另一个O原子被还原成水,在双加氧酶反应中,单个O₂分子的两个原子都掺入有机基质中^[18]。

对于 *S. maltophilia* KB2 中的儿茶酚1,2-双加氧酶,Guzik等^[18]研究发现,儿茶酚1,2-双加氧酶在pH为8.0和40℃下具有最大活性,并且在该温度下的半衰期为3h。

目前的研究结果虽然对微生物降解萘普生的代谢途径及相关基因有了初步了解,但仍未确定萘普生的完整降解途径及编码降解酶系的基因簇。因此,应继续从萘普生的微生物降解机制入手,进一步探究萘普生的降解途径及发挥作用的降解酶。

2.3 藻类

Hom-Diaz等^[19]利用微光藻反应器对湖泊水进行处理,在第一个周期中微藻对萘普生的去除率仅有10%,但第二个周期的去除率增至69%。由于萘普生的辛醇-水分配系数较低^[15],萘普生的去除主要归因于其生物降解而非吸附过程。在这一研究中,进水中较低的萘普生浓度对应较低的去除率,由此可以推测该反应器中微藻生物降解的发生需要阈值浓度。Garcia-Rodríguez等^[20]认为在微藻处理系统中,水力停留时间是影响药物去除的一个重要参数,水力停留时间越长,药物的去除率越高,这

也就解释了第二个周期中萘普生的去除率明显高于第一个周期的原因。Matamoros等^[21]利用高流速藻类池中的微藻群落处理城市废水中的萘普生,在夏季其去除率最高可达93%,冬季最高去除率可达63%。与单个微生物相比,蓝藻/微藻和细菌的结合能更有效地降解有机污染物,并去除废水中的营养物质。藻类光合作用所提供的氧气和有机物,能保证降解污染物的异养细菌生长^[22],但微藻对萘普生的降解机制还不明确,需进一步探究。

3 展望

萘普生作为一种新兴的环境污染物而受到广泛关注,因此,开发高效、廉价、环境友好的萘普生处理方法是环境科学与工程领域的研究热点。目前,微生物降解萘普生的研究刚刚起步,存在以下问题亟需解决:①由于传统水处理工艺无法有效富集萘普生降解菌,造成萘普生降解效率较低。因此,以高效萘普生降解菌为基础的生物强化技术是未来处理水环境中萘普生的有效方法之一。②现有的萘普生生物降解菌普遍存在降解效率低、降解不完全等问题,因此,选育高效的萘普生降解菌也是未来该领域的主要研究内容。③随着生物技术的不断发展,基因工程菌的应用为萘普生的微生物处理提供了有效的技术手段。然而,目前对萘普生的微生物降解途径及降解基因的研究仍处于开始阶段,因此,在未来的研究中应对萘普生的微生物降解机制进行深入探讨。

参考文献:

- [1] CHEN X J, VOLLERTSEN J, NIELSEN J L, *et al.* Degradation of PPCPs in activated sludge from different WWTPs in Denmark [J]. *Ecotoxicology*, 2015. DOI: 10.1007/s10646-015-1548-z.
- [2] 汤迎, 魏清伟, 洪澄洪, 等. 活性污泥去除4种典型药品的研究[J]. *工业水处理*, 2016, 36(2): 63-66, 70. TANG Ying, GUO Qingwei, HONG Chengyang, *et al.* Research on the removal of four kinds of typical medicine by activated sludge [J]. *Industrial Water Treatment*, 2016, 36(2): 63-66, 70 (in Chinese).
- [3] GRENNI P, PATROLECCO L, ADEMOLLO N, *et al.* Capability of the natural microbial community in a river water ecosystem to degrade the drug naproxen [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2014, 21: 13470-13479.

- [4] GONZÁLEZ-PÉREZ D M, PÉREZ J I, GÓMEZ M A. Behaviour of the main nonsteroidal anti-inflammatory drugs in a membrane bioreactor treating urban wastewater at high hydraulic- and sludge-retention time [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2017, 336: 128–138.
- [5] WANG X C, SHEN J M, CHEN Z L, *et al.* Removal of pharmaceuticals from synthetic wastewater in an aerobic granular sludge membrane bioreactor and determination of the bioreactor microbial diversity [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100: 8213–8223.
- [6] ZHAO X, CHEN Z L, WANG X C, *et al.* PPCPs removal by aerobic granular sludge membrane bioreactor [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98: 9843–9848.
- [7] LUO Y L, GUO W S, NGO H H, *et al.* Removal and fate of micropollutants in a sponge-based moving bed bioreactor [J]. *Bioresource Technology*, 2014, 159: 311–319.
- [8] ARIAS A, ALVARINO T, ALLEGUE T, *et al.* An innovative wastewater treatment technology based on UASB and IFAS for cost-efficient macro and micropollutant removal [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 359: 113–120.
- [9] ZHONG D F, SUN L L, HUANG H H. Microbial transformation of naproxen by *Cunninghamella* species [J]. *Acta pharmacologica Sinica*, 2003, 24: 442–447.
- [10] RODARTE-MORALES A I, FEIJOO G, MOREIRA M T, *et al.* Biotransformation of three pharmaceutical active compounds by the fungus *Phanerochaete chrysosporium* in a fed batch stirred reactor under air and oxygen supply [J]. *Biodegradation*, 2012, 23: 145–156.
- [11] MARCO-URREA E, PÉREZ-TRUJILLO M, BLÁNQUEZ P, *et al.* Biodegradation of the analgesic naproxen by *Trametes versicolor* and identification of intermediates using HPLC-DAD-MS and NMR [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101: 2159–2166.
- [12] RODRIGUEZ-RODRIGUEZ C E, MARCO-URREA E, CAMINAL G. Degradation of naproxen and carbamazepine in spiked sludge by slurry and solid-phase *Trametes versicolor* systems [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101: 2259–2266.
- [13] TRAN N H, URASE T, KUSAKABE O. Biodegradation characteristics of pharmaceutical substances by whole fungal culture *Trametes versicolor* and its laccase [J]. *Water Environmental Technology*, 2010, 8: 125–140.
- [14] MARCHLEWICZ A, DOMARADZKA D, GUZIK U, *et al.* *Bacillus thuringiensis* B1 (2015b) is a gram-positive bacteria able to degrade naproxen and ibuprofen [J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2016, 227: 197.
- [15] WOJCIESZYŃSKA D, DOMARADZKA D, HUPERT-KOCUREK K, *et al.* Bacterial degradation of naproxen—undisclosed pollutant in the environment. [J]. *Journal of Environmental Management*, 2014, 145: 157–161.
- [16] DOMARADZKA D, GUZIK U, HUPERT-KOCUREK K, *et al.* Cometabolic degradation of naproxen by *Planococcus* sp. Strain S5 [J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2015, 226(9): 297.
- [17] WOJCIESZYŃSKA D, GUZIK U, GREN I, *et al.* Induction of aromatic ring cleavage dioxygenases in *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 in cometabolic systems [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2011, 27: 805–811.
- [18] GUZIK U, HUPERT-KOCUREK K. High activity catechol 1,2-dioxygenase from *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 as a useful tool in *cis, cis*-muconic acid production [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2013, 103: 1297–1307.
- [19] HOM-DIAZ A, JAÉN-GIL A, BELLO-LASERNA I, *et al.* Performance of a microalgal photobioreactor treating toilet wastewater: pharmaceutically active compound removal and biomass harvesting [J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 592: 1–11.
- [20] GARCIA-RODRÍGUEZ A, MATAMOROS V, FONTÀS C, *et al.* The ability of biologically based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants—a review [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2014, 21: 11708–11728.
- [21] MATAMOROS V, GUTIÉRREZ R, FERRER I, *et al.* Capability of microalgae-based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants: a pilot-scale study [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2016, 288: 34–42.
- [22] SUBASHCHANDRABOSE S R, RAMAKRISHNAN B, MEGHARAJ M, *et al.* Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: biotechnological potential [J]. *Biotechnology Advances*, 2011, 29: 896–907.

作者简介: 崔迪(1984–), 女, 黑龙江哈尔滨人, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为环境生物技术。

E-mail: jscz_dd@hotmail.com

收稿日期: 2020-05-15

修回日期: 2020-06-25

(编辑: 丁彩娟)