

17 α -乙炔基雌二醇降解菌的分离鉴定及降解特性

任海燕¹, 纪树兰^{1*}, 刘志培², 王道¹

(1. 北京工业大学环境与能源工程学院, 北京 100022; 2. 中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要: 从避孕药生产厂废水处理站的活性污泥中驯化、分离到 1 株能够以 17 α -乙炔基雌二醇 (17 α -ethynylestradiol, EE2) 为唯一碳源和能源生长的菌株 JCR5。经过对其形态特征、生理生化以及 16S rDNA 序列分析, 该菌株为鞘氨醇杆菌属 (*Sphingobacterium* sp.)。研究表明, 菌株 JCR5 利用 EE2 生长的适宜温度为 25~40℃, 培养基初始 pH 为 7~9。金属离子 Ni²⁺、Mn²⁺、Cu²⁺、Fe³⁺ 能够促进菌株的生长, 而 Zn²⁺、Ag⁺、Pb²⁺、Ca²⁺ 和 Al³⁺ 离子对菌株的生长具有不同程度的抑制作用。菌株 JCR5 在 10d 内对初始底物浓度为 30mg·L⁻¹ EE2 的降解率可达到 87%。

关键词: 17 α -乙炔基雌二醇; 鞘氨醇杆菌; 甾体雌激素; 降解特性

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)06-1186-05

Isolation, Identification of 17 α -Ethinylestradiol-Degrading Strain and Its Degradation Characteristics

REN Hai-yan¹, JI Shu-lan¹, LIU Zhi-pei², WANG Dao¹

(1. College of Environment and Energy Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100022, China; 2. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: A bacterial strain that degrades 17 α -ethinylestradiol (EE2) was isolated from activated sludge of wastewater treatment plant treating wastewater from pharmacy factory mainly producing contraceptive medicine in Beijing, China. Based on its morphology, physiological and biochemical characters, as well as 16S rDNA sequence analysis, this strain was identified as *Sphingobacterium* sp. JCR5. Strain JCR5 can use EE2 as sole carbon and energy source for growth. The optimal temperature and pH for strain JCR5 utilizing EE2 was 25~40℃ and 7~9, respectively. Metal ions such as Ni²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺ and Fe³⁺ promote growth of strain JCR5, and some metal ions such as Zn²⁺, Ag⁺, Pb²⁺, Ca²⁺ and Al³⁺ inhibit its growth. The degradation process for EE2 with initial concentration of 30mg·L⁻¹ indicated that the degradation rate of EE2 by strain JCR5 within 10 days was 87%.

Key words: 17 α -ethinylestradiol; *Sphingobacterium* sp.; steroid estrogen; degradation characteristics

雄性生物体的雌性化现象已经受到各国研究者的关注。1994 年, Purdom 首次报道了英国城市污水处理厂出水口附近鱼类的雌雄同体现象^[1]。Desbrow, Routledge 等人认为, 鱼类雌性化的表现, 在某种程度上归咎于天然雌激素甾酮 (estrone, E1)、17 β -甾二醇 (estradiol, E2) 以及许多避孕药中的活性成分 EE2^[2,3]。由于 EE2 具有潜在的内分泌干扰作用, 并且普通水处理技术难以有效地去除水中 EE2^[4,5], 利用微生物降解包括 EE2 在内的甾体雌激素逐渐引起人们的重视。迄今为止, 获得能够降解 EE2 的微生物菌种资源十分有限, 除 Yoshimoto 等人分离出能够降解 100 mg·L⁻¹ EE2 的 *Rhodococcus* sp.^[6]; Shi 等人分离出的 15d 内对初始浓度为 25 mg·L⁻¹ EE2 的降解率可达 97% 的真菌 *Fusarium proliferatum*^[7]; 以及利用硝化污泥和氨氧化菌^[8]对 EE2 进行生物降解研究外, 有关甾体雌激素的降解菌种和降解特性方面的研究甚少。本研究报道了从避孕药生产厂废水处理站的活性污泥中驯化、分离

得到 1 株能够以 EE2 为唯一碳源和能源的鞘氨醇杆菌 JCR5 菌株, 并对该细菌降解 EE2 的特性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

17 α -乙炔基雌二醇、甾酮、17 β -雌二醇、雌三醇以及炔雌醇甲醚均为 Sigma 公司色谱纯, 纯度大于 98%。Thermo Finnigan Surveyor 高效液相色谱仪, 配有自动进样器。色谱柱: Reliasil C18, 5 μ m, 150mm $\times$ 2mm。

1.2 菌种富集纯化和培养基组成

污泥样品采自某避孕药生产厂污水处理站的曝气池。污泥样品按照 10% 的接种量接种于培养基

收稿日期: 2005-06-01; 修订日期: 2005-07-25

基金项目: 北京市自然科学基金项目 (8042007)

作者简介: 任海燕 (1977~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为环境微生物及水污染控制。

* 通讯联系人, E-mail: crchhwy@emails.bjut.edu.cn

中,于 30℃、200r·min⁻¹摇床上振荡培养 1 周左右后,按 1% 的接种量转接到新鲜培养基中培养 1 周左右,重复 4 次。然后在琼脂平板上反复划线分离,直到得到纯的单菌落。

培养基组成: Na₂HPO₄·12H₂O 2.0g; KH₂PO₄ 0.5g; MgSO₄·7H₂O 0.2g; (NH₄)₂SO₄ 1.0g; 酵母粉 0.05g; 微量元素溶液 5.0mL^[9]; 蒸馏水 1 000mL; 4mol·L⁻¹ NaOH 调 pH 至 7.5。固体培养基中加入 15 g·L⁻¹ 的琼脂粉。EE2 溶于丙酮后抽滤灭菌,加到预先灭菌的无机盐培养基中,终含量为 30mg·L⁻¹,待丙酮挥发后使用。

1.3 细菌生长测定和生理生化指标测定

细菌生长以 600nm 吸光度值表示。革兰氏染色、柠檬酸盐利用、硝酸盐还原以及碳源利用等指标测定参照文献[10]的方法进行。

1.4 16S rDNA 扩增和序列测定及同源性比较

菌株基因组 DNA 按文献[11]方法提取。以总 DNA 为模板,通过 PCR 扩增 16S rDNA 基因。正向引物 Pf: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (对应 *Escherichia coli* 碱基位置为 8~27), 反向引物 Pr: 5'-ACGGCTACCTTGTACGACT-3' (对应 *E. coli* 碱基位置为 1495~1514)。PCR 反应体系 (50μL) 为: 10×buffer 5μL, 25mmol·L⁻¹ MgCl₂ 3μL, 10mmol·L⁻¹ dNTPs 1μL, 30pmol·L⁻¹ 引物各 1μL, *Taq* DNA 酶 0.4μL, 双蒸水 38μL。PCR 反应条件为: 95℃ 4min, 95℃ 1min, 55℃ 1min, 72℃ 1min, 30 个循环, 72℃ 10min, 4℃ 保存。PCR 产物的纯化和测序由上海基康生物技术公司完成,利用 Blast 程序进行序列同源性检索。

1.5 EE2 浓度的测定

将待测样品乙酸乙酯等体积萃取,分 2 次进行 (加标回收率为 93%~101%), 0.20μm 滤膜过滤后用高效液相色谱分析 EE2 浓度。UV 检测器,检测波长 280nm,柱温为室温,流动相体积比为乙腈:水 = 60:40,流速为 200μL/min,进样量为 10μL。每个样品测 3 次取平均值。

2 结果与讨论

2.1 EE2 降解菌株的分离和鉴定

经过反复筛选和驯化,获得 EE2 降解菌株,命名为 JCR5。该菌株在 LB 平板培养基上生长时菌落呈圆形,φ1.5~2.5mm,麦秆黄,不透明,表面光滑,湿润,低凸起,边缘裂叶状。革兰氏染色阴性。电镜下,JCR5 呈杆状,有荚膜,无鞭毛,不运动,大小约为

(0.50~0.60) μm × (0.90~2.10) μm。图 1 和图 2 分别为该菌株细胞的扫描电镜和透射电镜照片。

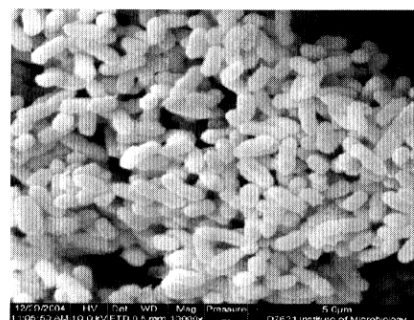


图 1 菌株 JCR5 的扫描电镜照片

Fig. 1 Scanning electron micrograph of strain JCR5 (10 000×)

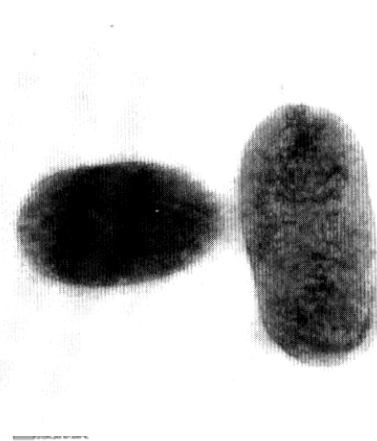


图 2 菌株 JCR5 的透射电镜照片

Fig. 2 Transmission electron micrograph of strain JCR5 (25 000×)

菌株 JCR5 氧化酶和接触酶阳性,好氧,无内生芽孢。生理生化反应测定结果表明,菌株 JCR5 能够利用包括果糖、葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露糖、蜜二糖、淀粉、棉子糖和纤维二糖在内的各种碳源,但不能利用鼠李糖、阿拉伯糖、木糖醇、甘露醇、核糖醇等。

扩增菌株 JCR5 的 16S rDNA 部分基因 (1463bp),序列测定后进行同源性分析,结果表明该菌株与多株嗜热鞘氨醇杆菌 (*Sphingobacterium thalpophilum*) 的相似性为 99% 以上,与多食鞘氨醇杆菌 (*Sphingobacterium multivorum*) 的相似性为 96.8%。结合菌株的形态和生理生化特征,菌株 JCR5 鉴定为鞘氨醇杆菌属 (*Sphingobacterium* sp.)。

图 3 为基于菌株 JCR5 和选择的其它 9 株菌利用 Phylip 软件绘制的 16S rDNA 序列的无根系统发育树。由图 3 可以看出,菌株 JCR5 与 AJ438117 和 M58779 具有较高的相似性。

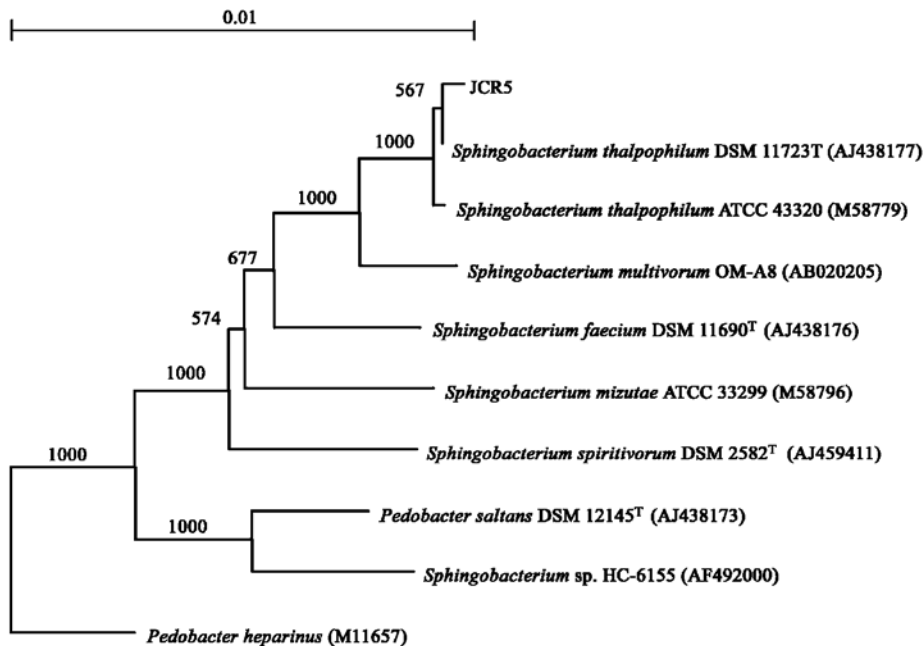


图3 基于10个菌株的16S rDNA序列的无根系统发育树

Fig. 3 Unrooted phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence of strain JCR5 and other nine validly described bacteria

2.2 菌株 JCR5 生长及 EE2 降解的影响条件试验

200 r·min⁻¹摇床培养 7d, 研究温度、pH、金属离子和不同初始底物浓度对菌株 JCR5 生长及 EE2 降解的影响. 每个条件做 3 个平行样, 结果取平均值.

2.2.1 温度对菌株 JCR5 生长和 EE2 降解的影响

由图 4 可以看出, 在温度为 25~40℃ 范围内, 菌株对 30mg·L⁻¹ EE2 的降解率保持在 66%~75% 之间. 30℃ 时 EE2 的降解率最高, A_{600nm} 可达到 0.125. 可见, 该菌株可在较宽温度范围内生长, 最适温度为 30℃.

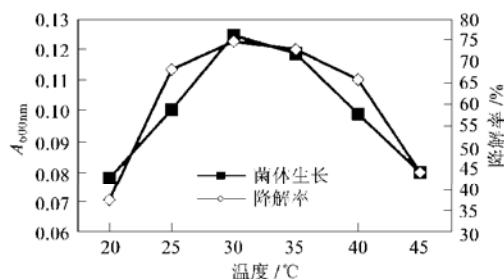


图4 温度对菌株 JCR5 生长和 EE2 降解的影响

Fig. 4 Effects of temperature changes on the growth of strain JCR5 and on the degradation of EE2

2.2.2 初始 pH 对菌株 JCR5 和 EE2 降解的影响

图 5 表明, 菌株在初始 pH 为 7.0~9.0 范围内

具有较高降解能力, A_{600nm} 可达到 0.115~0.123, 降解率在 65%~75% 之间, 最适初始 pH 为 8.0.

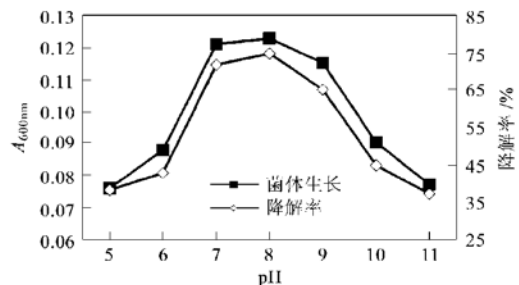


图5 初始 pH 对菌株 JCR5 生长和 EE2 降解的影响

Fig. 5 Effect of initial pH changes on the growth of strain JCR5 and on the degradation of EE2

2.2.3 金属离子对菌株 JCR5 和 EE2 降解的影响

在工业废水中, 通常含有一些金属离子, 它们可为微生物生长提供各种重要元素, 同时也存在部分金属离子, 可能会对微生物生长和降解底物能力产生负面影响. 实验研究了与废水中金属离子浓度相近的几种离子对菌株 JCR5 生长和 EE2 降解的影响, 结果如表 1 所示. 由表 1 可见, Ni^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Fe^{3+} 具有一定的促进作用; Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 和 Co^{2+} 的作用不明显; Zn^{2+} 、 Ag^{+} 、 Pb^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Al^{3+} 具有抑制作用, 其中 Ag^{+} 和 Pb^{2+} 的作用最为显著, 它们完全抑制了菌株 JCR5 的生长.

表 1 金属离子对 JCR5 菌株降解 EE2 的影响

Table 1 Effect of metal ions on the degradation of EE2 by strain JCR5

金属离子	浓度 / $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	菌体生长 $A_{600\text{nm}}$	EE2 降解率 / %
对照	0	0.120	77.1
Ag^+	0.1	0.000	0.0
Pb^{2+}	0.5	0.000	0.0
Cd^{2+}	0.5	0.110	73.5
Al^{3+}	1.0	0.025	13.0
Ni^{2+}	1.0	0.131	81.1
Hg^{2+}	0.02	0.117	73.4
Fe^{3+}	1.0	0.126	80.0
Co^{2+}	1.0	0.105	76.5
Zn^{2+}	1.0	0.063	34.9
Mn^{2+}	1.0	0.135	83.2
Cu^{2+}	1.0	0.135	82.9
Ca^{2+}	1.0	0.038	40.0

2.2.4 初始底物浓度对菌株 JCR5 和 EE2 降解的影响

不同初始底物浓度对菌株降解性能的影响实验见图 6. 当底物浓度小于 $30\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 菌株的生长和底物的降解率都随初始 EE2 浓度的增加而增大; 底物浓度大于 $30\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 菌株的生长和底物的降解出现了一定程度的停滞. 说明在低底物浓度范围内, 底物浓度的增加对底物的降解和菌株的生长有促进作用, 而高浓度则会带来一定的毒害作用, 抑制菌体生长. 由图 6 还可以看出, 该菌株对较低浓度的 EE2 有较高的降解率. 初始 EE2 浓度为 $30\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 降解率达到 85%, 而当初始 EE2 浓度为 $240\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 降解率仅为 30%.

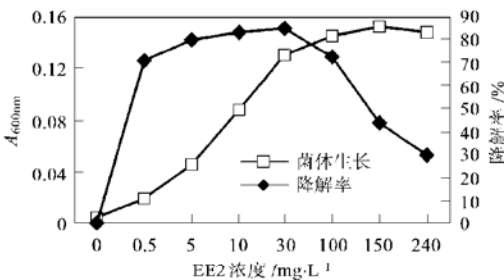


图 6 初始底物浓度对菌株 JCR5 降解性能的影响

Fig. 6 Effects of initial concentrations of EE2 on the degradation ability of strain JCR5

2.3 最佳条件下 EE2 的降解

以 EE2 为唯一碳源, 进行菌株 JCR5 降解 EE2 的摇瓶试验. 以不接种为对照. $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 恒温摇床中培养, 一定时间取样测定菌体生长和 EE2

浓度变化.

菌株 JCR5 可以利用 EE2 为唯一碳源和能源生长. EE2 的降解和细胞生长的相关性见图 7. 由图 7 可知, 细胞生长在培养初期(约 2d)存在一个短暂的滞后期, 表明菌株对培养环境有一个适应的过程. 由图 7 还可以看出, 菌株 JCR5 对 EE2 有较好的降解能力, 在最佳培养条件下, 培养 10d 时的降解率可达 87%.

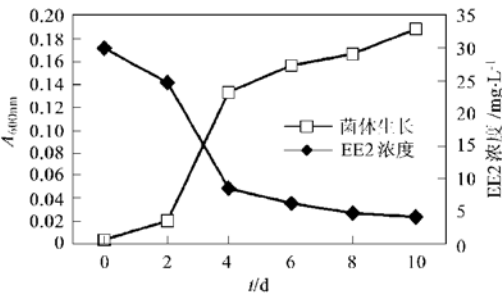


图 7 菌株 JCR5 的生长-EE2 降解关系

Fig. 7 Growth of strain JCR5 and degradation of EE2

3 结论

(1) 从避孕药生产厂废水处理站的活性污泥中筛选得到 1 株能降解 EE2 的革兰氏阴性细菌 JCR5 菌株, 该菌株鉴定为 *Sphingobacterium* sp..

(2) 菌株 JCR5 可在培养温度为 $25\sim 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以及培养基初始 pH 为 $7.0\sim 9.0$ 的条件下降解 EE2. 这样的宽温度和宽 pH 范围有利于菌株在环境中的竞争与存活, 能够有效地发挥该菌降解甾体雌激素的能力. 菌株 JCR5 降解 EE2 的最适温度为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 最适初始 pH 为 8.0 .

(3) 金属离子 Ni^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Fe^{3+} 能够促进菌株的生长, 而 Zn^{2+} 、 Ag^+ 、 Pb^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Al^{3+} 离子对菌株的生长具有不同程度的抑制作用.

(4) 初始 EE2 浓度低于 $30\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, EE2 浓度的增加促进菌株 JCR5 的生长和底物的降解, 而高于该浓度时, 则起抑制作用. 菌株 JCR5 在 10d 内对 $30\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ EE2 的降解率可达 87%.

参考文献:

[1] Purdom C E, Hardiman P A, Bye V J, et al. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works[J]. Chem. Ecol., 1994, 8(4): 275~ 285.

[2] Desbrow C, Routledge E J, Brighty G C, et al. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent: 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening[J]. Environ. Sci. Technol., 1998, 32(11): 1549~ 1558.

- [3] Routledge E J, Sheahan D, Desbrow C, *et al.* Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. *In vivo* responses in trout and roach[J]. Environ. Sci. Technol., 1998, **32**(11): 1559~ 1565.
- [4] Andersen H, Siegrist H, Halling-Sørensen H, *et al.* Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant[J]. Environ. Sci. Technol., 2003, **37**(18): 4021~ 4026.
- [5] Harries J E, Sheahan D A, Jobling S, *et al.* Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout [J]. Environ. Toxicol. Chem., 1997, **16**: 534~ 542.
- [6] Yoshimoto T, Nagai F, Fujimoto J, *et al.* Degradation of estrogens by *rhodococcus zopfii* and *rhodococcus equi* isolates from activated sludge in wastewater treatment plants[J]. Appl. Envir. Microbiol., 2004, **70**(9): 5283~ 5289.
- [7] Shi J H, Suzuki Y, Lee B D, *et al.* Isolation and characterization of the ethynylestradiol biodegrading microorganism *Fusarium proliferatum* strain HNS-1 [J]. Wat. Sci. Technol., 2002, **45**(12): 175~ 179.
- [8] Shi J, Fujisawa S, Nakai S, *et al.* Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea* [J]. Wat. Res., 2004, **38**: 2323~ 2330.
- [9] Kaminski U, Janke D, Prauser H, *et al.* Degradation of aniline and monochloroanilines by *Rhodococcus* sp. An117 and a *pseudomonad*: a comparative study [J]. Z. Allg. Mikrobiol., 1983, **23**(4): 235~ 246.
- [10] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [11] Treadway S L, Yanagimachi K S, Lankenau E, *et al.* Isolation and characterization of indene bioconversion genes from *Rhodococcus* strain I24 [J]. Appl. Microbil. Biotechnol., 1999, **51**(6): 786~ 793.

欢迎订阅《环境科学》

《环境科学》创刊于 1976 年,由中国科学院主管,中国科学院生态环境研究中心主办,是我国环境科学学科中最早创刊的学术性期刊。

《环境科学》自创刊以来,始终坚持“防治污染,改善生态,促进发展,造福人民”的宗旨,报道我国环境科学领域内具有创新性高水平,有重要意义的基础研究和应用研究成果,以及反映控制污染,清洁生产和生态环境建设等可持续发展的战略思想,理论和实用技术等。

《环境科学》在国内外公开发行,并在国内外科技界有较大影响,被国内外一些重要检索系统收录,如美国的《EI》,《BA》,《CA》;日本的《科学技术文献速报》;俄罗斯的《文摘杂志》等;国内的检索系统有《环境科学文摘》,《中国生物学文摘》,《中国地理科学文摘》,《中国地质文摘》,《中国科学引文数据库》和《中国科学论文统计与分析数据库》等。

全国各地邮局均可订阅,如有漏订的读者可直接与编辑部联系,办理补订手续。

《环境科学》为 16 开本,208 页,38 元/册,全年 12 期。

国内统一刊号: CN11-1895/X 国际标准刊号: ISSN 0250-3301

国外发行代号: M 0205 国内邮发代号: 2-821

编辑部地址: 北京市海淀区双清路 18 号(2871 信箱) 邮编: 100085

电话: 010-62941102 传真: 010-62849343 E-mail: hjkx@rcees.ac.cn