1 株 17β-雌二醇高效降解菌的分离鉴定及降解特性

杨俊, 姜理英*, 陈建孟
(浙江工业大学生物与环境工程学院, 杭州 310032)

摘要: 从浙江仙居某制药厂废水处理站的活性污泥中驯化、分离得到 1 株能以雌二醇(17β-estradiol, E2)为唯一碳源生长的细菌菌株 E2-Y. 经过对其形态特征、生理生化以及 16S rDNA 序列分析, 确定该菌为一种芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.). 通过摇瓶实验考察了温度、pH 等因素对 E2 微生物降解性能的影响, 得出最适温度为 30℃, 最佳 pH 值 7.5. 培养基中不同添加物对 E2 降解的影响迥异: 蛋白胨、牛肉膏等有较强的促进作用; Ba^{2+}、Zn^{2+}、Sn^{2+}、Cd^{2+}、Cr^{2+}、Pb^{2+} 等几种金属离子的抑制作用依次增强; 而投加硝酸钾、淀粉、氯化铵、Ca^{2+}、Fe^{2+} 等物质对 E2 降解无明显影响. 在最佳实验条件下, 该菌株可以在 7 d 内将初始浓度为 0.5 ~ 50 mg/L 的 E2 完全降解, E1 是菌株 E2-Y 降解 E2 的最初代谢产物, 并且可进一步被逐渐降解; 降解实验进行 15 d 后, 初始浓度为 1 mg/L 的 E2 的雌激素总体效应可被该菌株降低 95% 以上.

关键词: 17β-雌二醇; 芽孢杆菌; 环境雌激素; 降解特性; 雌激素活性
中图分类号: X172 **文献标识码**: A **文章编号**: 0250-3301(2010)05-1313-07

Isolation, Identification of 17β-estradiol (E2)-Degrading Strain and Its Degradation Characteristics

YANG Jun, JIANG Li-ying, CHEN Jian-meng
(College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China)

Abstract: A novel bacterium capable of degrading 17β-estradiol (E2) was isolated from the activated sludge collected from wastewater treatment plant of an oral contraceptives producing factory in Xianju, Zhejiang. According to its morphology, physiochemical characteristics and 16S rDNA sequence analysis, this strain was identified as *Bacillus* sp. The optimal pH and temperature for E2 biodegradation in shaking flasks were 7.5 and 30℃, respectively. The enhanced action of peptone and Lab-Lemco were quite obvious; metal ions such as Ba^{2+}, Zn^{2+}, Sn^{2+}, Cd^{2+}, Cr^{2+}, Pb^{2+} inhibited degradation, and the actions were ordinal increasing; the addition such as Ca^{2+}, Fe^{2+}, KNO_3 and amylum had no obvious effect on the degradation of E2. Furthermore, this strain could degrade E2 completely within 7 days with initial concentration ranged from 0.5 to 50 mg/L and was capable of converting E2 to estrone (E1), then to nonestrogenic compounds, thus 95% of initial estrogenic activities was decreased within 15 days during the biodegradation process.
Key words: 17β-estradiol (E2); *Bacillus* sp.; environmental estrogen; degradation characteristics; estrogenic activities

环境雌激素(environmental estrogens)是对生物有机体维护正常的动态平衡、繁殖、生长及行为有不利影响的环境化学物质. 即使环境中只有少量这类物质, 也可能导致各种生物体的性激素分泌量下降、活性减弱、精子数量减少、生殖器官异常、癌症等发病率增加, 并影响到各生物的生殖系统、免疫系统和神经系统等[1,2]. 环境雌激素按其来源大致可分为天然雌激素(雌二醇、雌酮、雌三醇等)、植物性雌激素和真菌性雌激素、人工合成的雌激素(乙炔基雌二醇等)以及环境化学污染物(农药、表面活性剂、塑料制品等)[3].

17β-雌二醇(E2)是如今诸多环境雌激素中作用最强的一种, 作用强度是其 2 种代谢产物雌酮(E1)和雌三醇(E3)的 5 ~ 1 000倍. E2 普遍存在于各类环境, 特别是水环境中, 由于 E2 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 E2, 因此用微生物降解包括 E2 在内的甾体雌激素逐渐引起了人们的重视[4~7], 但此技术前提是获得高效稳定的降解菌. 迄今为止, 研究人员已获得一些 E2 降解菌. Fujisawa 等[8]从活性污泥中分离出第 1 株能够降解 E2 的菌株 *Novosphingobium* sp. (ARI-1); Yoshimoto 等[9]从污水处理厂的活性污泥中分离出 4 株能降解 E2 的高效菌株 (*Rhodococcus*); Yu 等[10]分离出 14 株 E2 降解菌, 分别属于 *Aminobacter*、*Brevundimonas*、*Flavobacterium*、*Nocardioides*、*Sphingomonas*. 然而, 目前国内关于 E2 降解菌的报道相对较少, 仅有北京工业大学纪树兰从某避孕药生产厂废水处理站好氧池活性污泥中得到 *Sphingobacterium* sp. JCR5[11]、同济大学曾庆玲报

收稿日期: 2009-09-08; 修订日期: 2009-11-16
基金项目: 浙江省自然基金项目(Y506237); 浙江省科技厅分析测试项目(2008F70014); 浙江工业大学重中之重学科开放基金研究课题项目(20080212)
作者简介: 杨俊(1985 ~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为甾体雌激素微生物降解, E-mail: junjun_sunny@163.com
* 通讯联系人, E-mail: jiangly@zjut.edu.cn

道的以 E2 为唯一碳源的菌株 *Pseudomonas aeruginosa* TJ1[12],并且都只对降解菌的降解特性进行了初步研究,未对降解菌的 E2 降解机制和降解过程中雌激素活性的变化进行深入的阐述.因此,筛选出适应中国本土环境的 E2 高效降解菌,并对降解活性和降解机制进行研究是开展环境雌激素生物降解研究的重要前提.

本研究从浙江仙居某避孕药厂废水处理站好氧池的活性污泥中驯化、分离得到 1 株能够以 E2 为唯一碳源的芽孢杆菌(*Bacillus* sp.),对该菌株的 E2 降解特性进行了分析,同时考察了降解过程中雌激素总体活性的变化,并对该菌株的 E2 降解机制进行了初步的探讨,以期为含环境激素类废水的生物强化处理提供新菌株材料及其基本特性参数.

1 材料与方法

1.1 污泥来源

取自浙江仙居某制药厂废水处理站好氧池的活性污泥.

1.2 活性污泥的驯化及菌种富集培养基

用于 E2 降解菌分离和培养的无机盐培养基(g/L):K_2HPO_4 3.5、KH_2PO_4 1.5、NaCl 0.5、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15、$NaHCO_3$ 0.002、$MgSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.000 3、$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.000 2、$(NH_4)_2Mo_2O_{24} \cdot 4H_2O$ 0.000 2、$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.001、$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.000 5、$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005,pH = 7.0. 固体培养基中加入 15 g/L的琼脂.

用于菌体保存及菌悬液制备的 R_2A 培养基(g/L):酵母 0.5、酪蛋白酸水解物 0.5、可溶性淀粉 0.5、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05、胰蛋白胨 0.25、葡萄糖 0.5、丙酮酸钠 0.3、KH_2PO_4 0.3, pH = 7.0. 固体培养基中加入 15 g/L的琼脂.

1.3 菌种的富集、分离及纯化

将 E2 溶于甲醇,加入到 100 mL 的无机盐培养基,使 E2 终浓度为 1 mg/L.水浴下加热培养基,待甲醇完全蒸发后[10],将采集的污泥按体积分数为 20% 的接种量加入到该培养基中,于 30℃,150 r/min的摇床培养.每 2 ~ 3 d 更换一次营养液重复 8 周,以富集 E2 降解细菌,淘汰对 E2 敏感的微生物.驯化结束以后,在琼脂平板上多次划线分离直到得到可降解 E2 的单菌落.

1.4 细菌生长测定和生理生化指标测定

细菌生长以 D_{600} 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[13]的方法进行.

1.5 菌株 16S rDNA 扩增及菌种鉴定

DNA 提取:采用 3S 柱离心式环境样品 DNA 回收试剂盒(V2.2,上海申能博彩生物科技有限公司提供)提取和纯化菌种 DNA.

PCR 扩增:选用细菌的通用引物 BSF8/20 和 BSR1541/20.94℃预变性 4 min,35 个循环(94℃变性 60 s,59℃退火 60 s,72℃延伸 90 s),最终 72℃延伸 10 min,4℃保温 10 min. PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶检验后交由上海英骏生物技术有限公司测序.

菌株 16S rDNA 序列分析:利用 BLAST 将所测得序列与 GenBank 数据库中的 16S rDNA 基因序列进行同源性比较分析,选取1 400 bp左右的长度进行比对[Clustelx(1.81)],采用邻位连接(Neighbour Joining,NJ)法进行系统学分析(MEGA).

1.6 菌悬液的制备

用接种环从 4℃保存的 R_2A 斜面上挑取一环细菌,接到无菌的装有 100 mL R_2A 液体培养基的三角瓶中,于 30℃、150 r/min摇床培养 24 h 至对数生长期.然后10 000 r/min离心 10 min,倒去上清液,加入不含 E2 的无菌无机盐液体培养基洗涤,再10 000 r/min离心 10 min,倒去上清液,如此反复洗涤 3 次后用漩涡混合器将菌体打散,最后用无机盐培养基将菌液稀释到 D_{600} 值为 1.0,制成菌悬液备用.

1.7 菌株对 E2 的降解实验

在确定最适温度的实验中,培养基的 pH 为 7.0,E2 浓度为 1 mg/L,选取不同培养温度(15、20、25、30、35、40、45℃);在确定最适 pH 实验中,培养温度为 30℃,E2 浓度为 1 mg/L,培养基取不同 pH 值(4.5、5.5、6.5、7.5、8.5、9.5、10.5);在培养基优化实验中,培养基的 pH 为 7.0,温度为 30℃,E2 浓度为 1 mg/L,添加物分别为 0.01 g/L的 Al^{3+}、Cu^{2+}、Fe^{2+} 等金属离子及 0.1 g/L不同营养物质;在不同初始浓度 E2 的降解实验中,培养基的 pH 为 7.0,温度为 30℃,设定不同 E2 初始浓度(0.5、1.0、2.0、10.0、30.0、50.0 mg/L).定时取样,对 E2 进行定性定量分析.

上述操作均做 3 次平行实验,并做空白对照.实验中使用 250 mL 三角瓶,装 100 mL 含 E2 的无机盐液体培养基,菌株接种量为 2%(体积分数),摇床转速为 150 r/min.

1.8 雌激素定性定量分析检测方法

雌激素的定性定量检测采用 HP6890-5975N 气

相色谱-质谱仪(GC/MS),色谱柱为 HP-5MS 毛细管柱. 检测条件:GC 条件为以氦气为载气,恒流流速为 1.0 mL/min,进样口温度为 250℃. 升温程序:初始温度为 100℃,保持 1 min,然后以 10 ℃/min升至 200℃,再以 3 ℃/min升至 300℃并保持 10 min. 不分流方式进样,进样体积为 2.0 μL. MS 条件:接口温度为 280℃,离子源温度为 250℃,电离方式为 EI,电子轰击能量为 70 eV,溶剂延迟时间为 15 min,以选择离子监测模式定量. 样品处理:取 1 mL 样品离心浓缩后取上清液,用等体积二氯甲烷萃取后转入 1.5 mL 小瓶中,加入 100 ng E2-d4 内标,于温和氮气流中进一步蒸发至干,残余物加入 50 μL 吡啶和 100 μL BSTFA(1% TMCS),于 70℃下反应 30 min,衍生物冷却至室温后用 GC/MS 测定分析[14~16].

1.9　雌激素总体效应的测定

E2 以及其代谢产物的雌激素总体效应的测定采用中国科学院生态环境研究中心提供的酵母干粉型试剂盒. 其原理为采用冷冻离心方法制备重组人雌激素受体基因酵母干粉,该酵母能特异性结合水溶液中的雌激素和类雌激素化合物,产生具有生物学活性的酶,生成黄色的酶反应产物(在 420 nm 处有特征吸收)[17,18]. 通过检测 D_{420} 值,可以定量计算水溶液的雌激素浓度,具体方法参照文献[19].

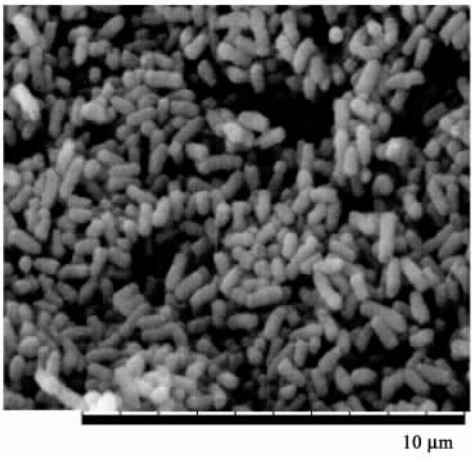
本实验在 250 mL 的三角瓶中加入 100 mL 无机盐培养基,E2 初始浓度为 1 mg/L,菌体投加量为 2%(体积分数),摇床转速为 150 r/min,于最佳反应条件下,在反应时间分别为 0、4、8、15 d 时取样,然后将其稀释 100 倍,测定各个样的 β-半乳糖苷酶活性,通过 β-半乳糖苷酶活性可以看出各个样的雌激素总体效应[20].

2　结果与讨论

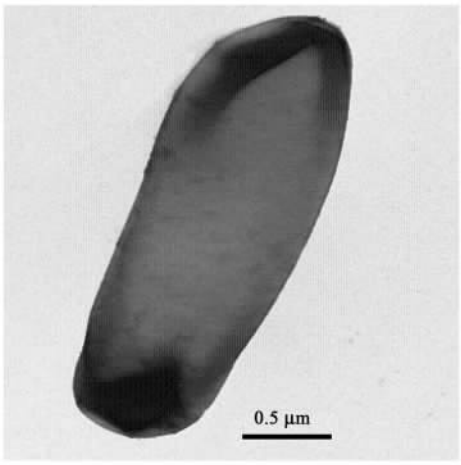
2.1　分离菌株的形态和生理生化特征

经过反复分离、培养和纯化,获得 1 株能以 E2 为唯一碳源生长的降解菌株,将其命名为 E2-Y. 该菌株在 R_2A 培养基平板上生长时,菌落为圆形,菌落较大,边缘整齐,表面呈灰白色无光泽,不易扩张. 透射电镜观察菌株形态:短杆状,很少成链,大小为 (0.7~0.8) μm × (2.0~3.0) μm,内生孢子. 图 1 为菌株扫描电镜以及透射电镜照片,菌株生理生化实验结果如表 1 所示.

2.2　菌株 16S rDNA 鉴定结果



(a) 扫描电镜 (×8 000)



(b) 透射镜 (×30 000)

图 1　菌株 E2-Y 的扫描及透射电镜照片

Fig. 1　Scanning and transmission micrograph of strain E2-Y

表 1　菌株 E2-Y 的生理生化特性

Table 1　Physiological characteristics of strain E2-Y

项目	结果	项目	结果
革兰氏染色	+	葡萄糖作用(产气)	−
运动性	+	淀粉水解	+
氧化酶	+	丙二酸盐利用	+
硝酸盐(还原)	+	柠檬酸盐利用	+
硝酸盐(产气)	+	M. R	+
葡萄糖作用(产酸)	+	V. P	+

对该菌株的 DNA 进行 PCR 扩增以及 16S rDNA 基因鉴定后,利用 BLAST 在 GenBank 数据库中进行同源性检索,结果显示,该菌株的 16S rDNA 基因序列均与 GenBank 中许多芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)的 16S rDNA 基因序列的同源性在 99% 以上,结合菌株的形态和生理生化特征,该菌株鉴定为芽孢杆菌(*Bacillus* sp.),在芽孢杆菌属中发现降解 E2 的菌

株,本研究为首次报道. 图 2 是这该菌株及部分相关菌株基于 16S rDNA 基因的系统进化树.

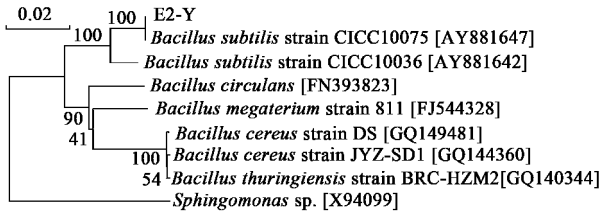


图 2 菌株 E2-Y 的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain E2-Y

2.3 影响菌株降解 E2 的因素

2.3.1 温度对 E2 降解的影响

由图 3 可知,在温度为 15 ~ 30℃ 范围内,随着培养温度升高,菌株生长和 E2 降解速率都随着提高,并且在 30℃ 时达到最佳,E2 降解率为 90%;但当温度继续升高时,菌株生长和 E2 的降解速率都受到一定程度的抑制. 这主要是由于温度会影响微生物膜的液晶结构、酶及蛋白质的合成与活性,进而影响降解等生命活动. 在 15 ~ 30℃ 之间,随着培养温度升高,菌株中的蛋白质和酶活性增强,生化反应加快,生长及降解速率提高;当温度继续升高时,细胞中某些温度敏感的物质受到不可逆的破坏,生命活动受到抑制[21]. 图 3 说明该细菌最适的生长、降解温度处在 25 ~ 35℃ 之间,结合文献[12]报道,本研究菌株 E2-Y 的培养温度选择 30℃.

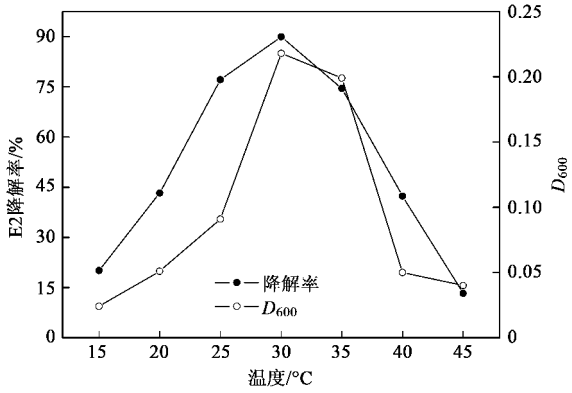


图 3 温度对 E2 降解的影响

Fig. 3 Effects of temperature on the degradation of E2 by strain E2-Y

2.3.2 初始 pH 值对 E2 降解的影响

从图 4 看出,pH 值为 4.5 和 10.5 时,菌株E2-Y 不能正常生长,对 E2 的降解率不到 15%,这是因为在 pH 为 4.5 的过酸条件下,细胞质的理化性质可能受到影响,酶的分子结构发生不可逆的破坏,导致微生物对营养物质的摄取也会受到影响[21]. 而在 pH 值为 10.5 时,一部分 OH^- 离子与培养基中的离子生成沉淀,破坏了培养基组成而不利于细菌生长. 在 pH 为 6.5 ~ 8.5 的条件下,菌株 E2-Y 的降解率在 65% 以上,降解最快的 pH 值为 7.5,降解率可以达到 90%.

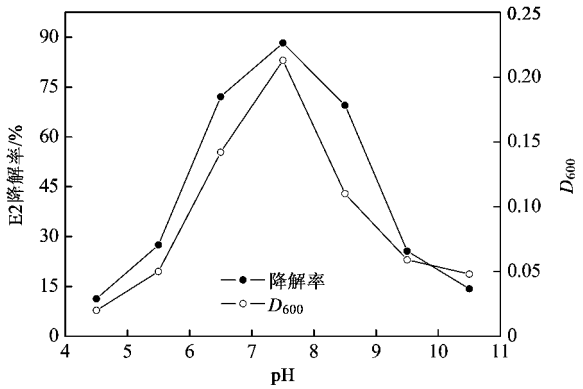


图 4 初始 pH 值对 E2 降解的影响

Fig. 4 Effects of initial pH on the degradation of E2 by strain E2-Y

2.4 培养基组成优化实验

在培养基中添加不同的营养物质及金属离子对 E2 降解有着不同的影响. 从表 2 可以看出,对 E2 降解有促进作用的添加物及其作用程度为:蛋白胨 > 牛肉膏 > 葡萄糖 > 乳糖 > 酵母粉 > 硝酸铵. 其中蛋白胨与牛肉膏促进作用最为明显,添加后 E2 降解率达到 97% 以上. 这可能是菌株更容易利用有机氮源为细菌提供足够的能量,诱导其产生更多的 E2 降解酶,进而促进其对 E2 的降解. 该结果与 Stumpe 等[22]的报道类似. 同时表 2 结果显示,Ba^{2+}、Zn^{2+}、Sn^{2+}、Cd^{2+}、Cr^{2+}、Pb^{2+} 几种金属离子对 E2 降解的抑制作用依次增强. 而投加硝酸钾、淀粉、氯化铵、Ca^{2+}、Fe^{2+} 等物质对 E2 降解无明显影响.

表 2 添加物对 E2 降解的影响

Table 2 Effects of adding nutrition on the degradation of E2 by strain E2-Y

添加物	降解率/%	添加物	降解率/%	添加物	降解率/%
空白	89.91	硝酸铵	92.21	Ba^{2+}	60.23
硝酸钾	89.16	酵母粉	92.93	Zn^{2+}	51.05
淀粉	89.21	乳糖	94.11	Sn^{2+}	42.03
Ca^{2+}	90.16	葡萄糖	96.14	Cd^{2+}	15.33
氯化铵	90.32	牛肉膏	97.32	Cr^{2+}	9.26
Fe^{2+}	91.23	蛋白胨	98.26	Pb^{2+}	0.00

2.5　菌株对不同浓度 E2 的生物降解

从图 5 可以看出,当 E2 初始浓度为 0.5 ~ 50 mg/L时,7 d 内均可被完全降解. 在 E2 初始浓度≤ 2.0 mg/L时,菌体很容易适应生长环境,E2 降解率直线上升,在 5 d 内可以将 E2 完全降解. E2 初始浓度为 10.0、30.0、50.0 mg/L时,E2 分别在第 5、6、7 d 时被完全降解. 另外,从图 6 也可以看出,在 0.5 ~ 50 mg/L范围内,细菌的比降解速率随着 E2 浓度的增加而线性增加,相关系数 $R^2 > 0.99$. 这说明该菌能够适应较高 E2 浓度的环境,具有较强地抵抗 E2 毒性和降解 E2 的能力.

上述结果表明,该菌可以在 4d 内将 1 mg/L的 E2 完全降解,降解速率略低于 Yu 等[10]报道的菌株 *Sphingomonas*(在 3 d 内能完全降解 E2),但是菌株 E2-Y 具有较高的 E2 耐受能力,在 E2 浓度高达 50 mg/L时仍具有较高的降解效率,这一结果高于以往的研究报道[23,24]. 此外,Quan 等[25]研究报道,菌株 *Bacillus subtilis* 可以快速降解环境雌激素 DEHP. 综上所述,该菌株(*Bacillus subtilis*)对环境雌激素具有较高的耐性和降解能力.

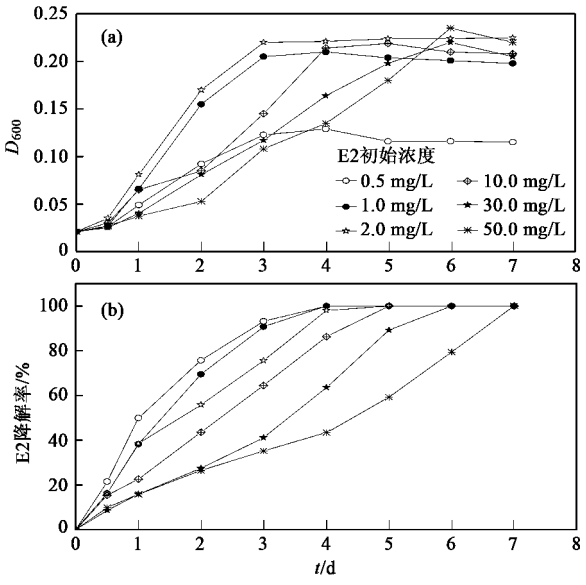


图 5　菌株 E2-Y 对不同浓度 E2 的生物降解

Fig. 5　Effects of initial E2 concentration on the degradation by strain E2-Y

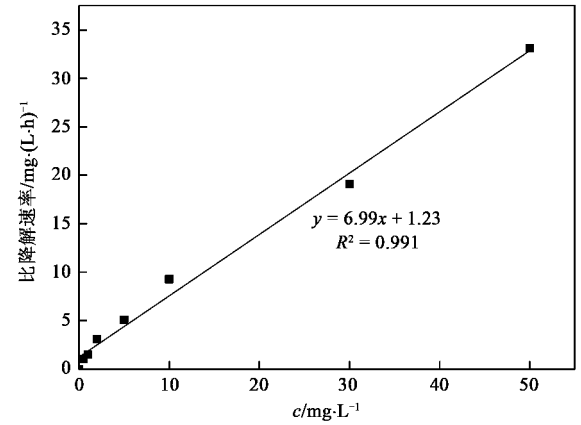


图 6　底物浓度与菌株比降解速率相关性分析

Fig. 6　Analysis of the relativity between the transformation rate and substrate concentration

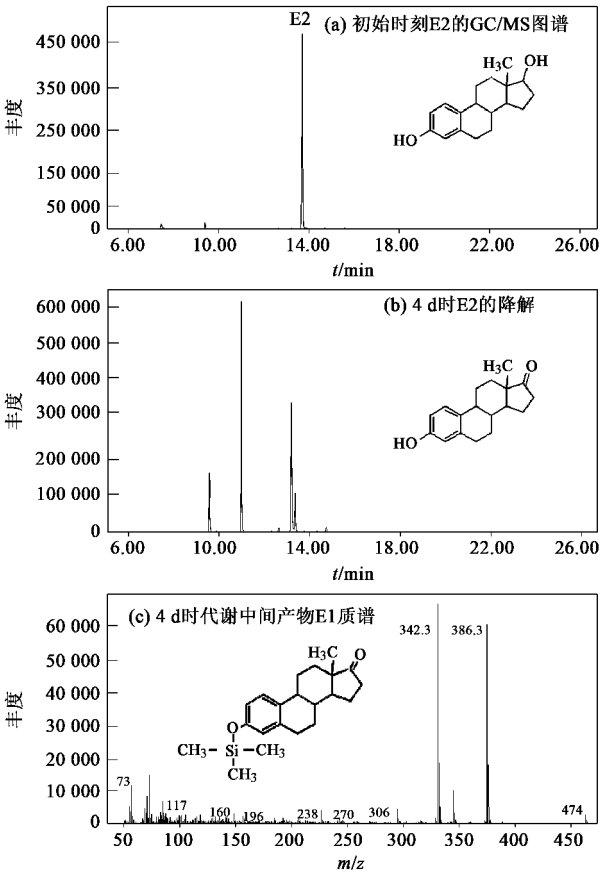


图 7　菌株降解 E2 中间产物的气相-质谱联用分析结果

Fig. 7　Results of GC/MS analysis of E2 metabolites produced by strain E2-Y

2.6　最初代谢产物及雌激素活性分析

利用 GC/MS 对菌株降解 E2 过程的中间产物进行定性分析,结果见图 7. 根据中间代谢产物的 GC/MS 图谱和有关研究报道[26,27],对 E2 代谢中间产物进行了初步鉴定. 在降解体系中捕捉到 E1(t_R = 13.216min, m/z 为 342.3),这说明 E1 是 E2 的一种代谢产物,这在已有报道的 E2 降解菌中也有发现[9,10]. 同时图 8 也表明,随着 E2 的逐步降解,基质中 E1 的浓度逐渐增大,在实验第 4 d 时,E2 被完全

降解,此时 E1 的浓度约为 0.70 mg/L.在 E2 被完全降解以后,E1 浓度开始逐渐降低,在 8 d 内 E1 浓度降低至 0.27 mg/L.此外,从反应过程中的雌激素总体活性变化分析可见(图 9),随着反应的进行,基质中的雌激素总体效应不断减小,并且在降解过程中,前 4 d 雌激素总体效应下降得较快,而在反应后期雌激素总体效应降低得较慢,降解实验进行 15 d 后基质中雌激素总体效应降低了 95% 以上,这也正说明了在反应前期 E2 正快速地被生物降解为雌激素活性较低的 E1,而后随着 E1 的进一步降解雌激素活性随着减少.

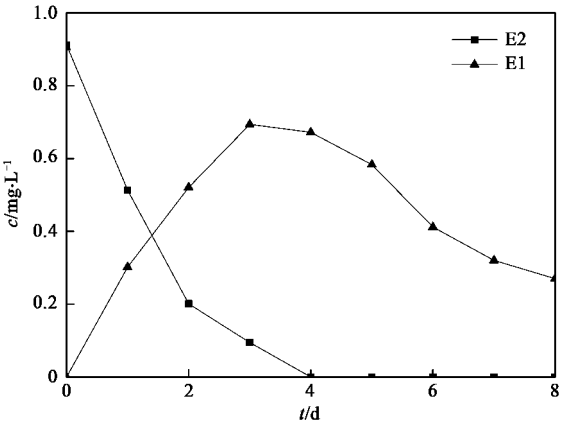


图 8 菌株 E2-Y 对代谢产物 E1 的生物降解

Fig. 8 Degradation of metabolite E1 by strain E2-Y

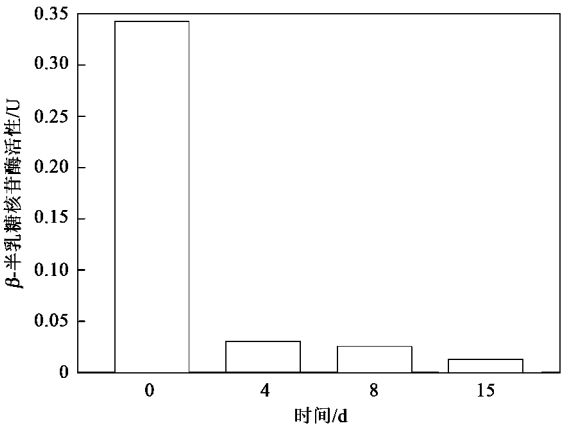


图 9 E2 微生物降解过程中雌激素活性的变化

Fig. 9 Change of estrogenic activities during the degradation of E2 by strain E2-Y

3 结论

(1) 从制药厂污水处理站的活性污泥中驯化、分离得到 1 株降解 17β-雌二醇的高效菌株,通过形态学及 16S rDNA 基因序列分析,初步鉴定该菌株为芽孢杆菌(*Bacillus* sp.).

(2) 该菌株生长最适 pH 值为 7.5,最适温度为 30℃.蛋白胨、牛肉膏、葡萄糖等对 E2 降解有较强的促进作用; Ba^{2+}、Zn^{2+}、Sn^{2+}、Cd^{2+}、Cr^{2+}、Pb^{2+} 这 6 种金属离子对 E2 降解的抑制作用依次增强.

(3) 在最佳实验条件、E2 初始浓度为 0.5 ~ 50 mg/L的无机盐培养基中,E2 均能保持降解活性,可在 7d 将 E2 完全降解.

(4) 菌株 E2-Y 降解 E2 的最初代谢产物为 E1,并且可进一步将 E1 逐渐降解,降解实验进行 15d 后,雌激素总体效应可以降低 95% 以上.

参考文献:

[1] Rahman M F, Yanful E K, Jasim S Y. Endocrine disrupting compounds (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the aquatic environment: implications for the drinking water industry and global environmental health [J]. J Water Health, 2009, **7**(2): 224-243.

[2] Isidori M, Bellotta M, Cangiano M, *et al*. Estrogenic activity of pharmaceuticals in the aquatic environment [J]. Environ Int, 2009, **35**(5): 826-829.

[3] Sikka S C, Wang R. Endocrine disruptors and estrogenic effects on male reproductive axis [J]. Aust J Androl, 2008, **10**(1): 134-145.

[4] Belfroid A C, Vander H A, Vethaak A D, *et al*. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and wastewater in the Netherlands [J]. Sci Total Environ, 1999, **225**(1-2): 101-108.

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

[6] Spink B C, Bennett J A, Pentecost B T, *et al*. Long-term estrogen exposure promotes carcinogen bioactivation, induces persistent changes in gene expression, and enhances the tumorigenicity of MCF-7 human breast cancer cells [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2009, **240**(3): 355-366.

[7] Gong J, Ran Y, Chen D Y, *et al*. Occurrence and environmental risk of endocrine-disrupting chemicals in surface waters of the Pearl River, South China [J]. Environ Monit Assess, 2009, **156**(1-4): 199-210.

[8] Fujisawa K, Kikuchi S, Satomi M, *et al*. Degradation of 17 beta-estradiol by a gram-negative bacterium isolated from activated sludge in a sewage treatment plant in Tokyo, Japan [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, **70**(9): 5283-5289.

[9] 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 Environ Microbiol, 2004, **68**(4): 2057-2060.

[10] Yu C P, Roh H, Chu K H. 17β-estradiol-degrading bacteria

isolated from activated sludge [J]. Environ Sci Technol, 2007, **41**(2): 486-492.

[11] Ren H Y, Ji S L, Ahmad N U D, *et al*. Degradation characteristics and metabolic pathway of 17α-ethynylestradiol by *Sphingobacterium* sp. JCR5 [J]. Chemosphere, 2007, **66**(2): 340-346.

[12] Zeng Q L, Li Y M, Gu G W, *et al*. Sorption and Biodegradation of 17 beta-estradiol by Acclimated Aerobic Activated Sludge and Isolation of the Bacterial Strain [J] Environ Eng Sci, 2009, **26**(4):783-790.

[13] **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.

[14] **黄成,姜理英,陈建孟. 固相萃取-气相色谱质谱法定量测定制药厂污水中环境雌激素** [J]. **色谱**,2008, **6**(5): 618-621.

[15] **金士威,徐盈,惠阳,等. 污水中 8 种雌激素化合物的定量测定** [J]. **中国给水排水**,2005,**21**(12):94-97.

[16] Liu R, Zhou J L, Wilding A. Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2004, **1022**(1-2): 179-189.

[17] Chu W L, Shiizaki K, Kawanishi M, *et al*. Validation of a new yeast-Based reporter assay consisting of human estrogen receptors alpha/beta and coactivator SRC-1: Application for detection of estrogenic activity in environmental samples [J]. Environ Toxicol, 2009,**24**(5):513-521.

[18] Frische T, Faust M, Meyer W, *et al*. Toxic masking and synergistic modulation of the estrogenic activity of chemical mixtures in a yeast estrogen screen (YES) [J]. Environ Sci Pollut Res, 2009, **16**(5):593-603.

[19] Li J, Li N, Ma M, *et al*. *In vitro* profiling of the endocrine disrupting potency of organochlorine pesticides [J]. Toxicol Lett, 2008, **183** (1-3): 65-71.

[20] Denier X, Hill E M, Rotchell J, *et al*. Estrogenic activity of cadmium, copper and zinc in the yeast estrogen screen [J]. Toxicol *In Vitro*,2009,**23**(4):569-573.

[21] **沈萍. 微生物学** [M]. **北京:高等教育出版社**, 2000.

[22] Stumpe B, Marschner B. Factors controlling the biodegradation of 17 beta-estradiol, estrone and 17 alpha-ethinylestradiol in different natural soils [J]. Chemosphere, 2009, **74**(4): 556-562.

[23] Gaulke L S, Strand S E, Kalhorn T F, *et al*. Estrogen biodegradation kinetics and estrogenic activity reduction for two biological wastewater treatment methods [J]. Environ Sci Technol, 2009, **43**(18): 7111-7116.

[24] Weber S, Leuschner P, Kampfer P, *et al*. Degradation of estradiol and ethinyl estradiol by activated sludge and by a defined mixed culture [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, **67**(1): 106-112.

[25] Quan C S, Liu Q, Tian W J, *et al*. Biodegradation of an endocrine-disrupting chemical, di-2-ethylhexyl phthalate, by Bacillus subtilis No. 66 [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, **66**(6):702-710.

[26] Pauwels B, Wille K, Noppe H, *et al*. 17α-ethinylestradiol cometabolism by bacteria degrading estrone, 17β-estradiol and estriol [J]. Biodegrad, 2008, **19**(5):683-693.

[27] Lee H B, Liu D. Degradation of 17 beta-estradiol and its metabolites by sewage bacteria [J]. Water Air Soil Pollut, 2002, **134**(1-4):353-368.