

湖泊底泥中 17 β -雌二醇的生物代谢机制研究

何芳¹, 李富生², Akira Yuasa²

(1. 济南大学化学化工学院, 济南 250022; 2. 日本国立岐阜大学流域圈科学研究中心, 岐阜 501-1193)

摘要:研究了湖泊底泥微生物在好氧、厌氧环境条件下对 17 β -雌二醇(17 β -estradiol, E2)的生物降解特性,探讨了其相应地生物代谢机制.结果表明,好氧条件,反应 24 h 后约 99% 的 E2 从液相中消失,中间产物雌激素酮(estrone, E1)随反应进行浓度先增加后从液相中逐渐消失;厌氧条件,96 h 后约 4% 的 E2 仍存在于液相中,E1 浓度先增加后降低后又逐渐增加,再降低直至从液相中完全消失.综合分析 E2 和 E1 的浓度经时变化认为,好氧条件下,E2 被脱氢酶氧化成 E1,E1 再被体系中存在的其它生物酶氧化,直至被完全矿化;厌氧条件下,E1 和 E2 二者之间存在一种相互转换关系:E2 被脱氢酶氧化成 E1,同时 E1 被还原酶还原成 E2,在相互转化的过程中,体系中的其它生物酶会逐渐降解 E2、E1,直至最终将其完全矿化.与 E2 相比较,E1 更易积累于天然水域中的微生物体内.

关键词:湖泊;底泥;17 β -雌二醇;代谢途径;生物降解

中图分类号:X171 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2008)07-1961-06

Biodegradation Mechanisms of 17 β -estradiol (E2) by Lake Sediment

HE Fang¹, LI Fu-sheng², Akira Yuasa²

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Ji'nan University, Ji'nan 250022, China; 2. River Basin Research Center, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, Japan)

Abstract: Batch experiments using lake sediment mud liquors spiked with E2 were performed under aerobic and anaerobic conditions. The catabolic mechanisms of E2 were also induced. The results indicate that under aerobic condition, 99% of E2 can be removed from aqueous phase after as short as 24 h. Concentration of estrone (E1) firstly increase and then decrease slowly until to vanish from aqueous phase; Under anaerobic condition, 4% of E2 still be in aqueous phase after 96 h of reaction. Concentration profile of E1 show that E1 firstly increase then decrease, then increase and then decrease to vanish from aqueous phase finally. Analyzing the concentration profiles of E2 and E1, we draw a conclusion that E2 is oxidized to E1 by dehydrogenase and then E1 was oxidized by other enzymes within sediment to mineralization completely under aerobic condition. Under anaerobic condition, there is a mutual translation relation between E2 and E1. E2 was oxidized to E1 by dehydrogenase and synchronously E1 is reduced to E2. During this mutual translation course, E2 and E1 can be degraded gradually to finally mineralization completely by other enzymes within the reaction system. Comparing with E2, E1 can accumulate more easily within biosolid in natural waters.

Key words: lake; sediment; 17 β -estradiol; catabolic pathway; biodegradation

雌性荷尔蒙物质,也称为环境雌激素,对野生动物和人体健康具有巨大的潜在危害,已经愈来愈受到全世界的关注^[1~4].在诸多天然的雌性荷尔蒙物质中,17 β -雌二醇(E2)被认为是最具潜在影响和在水系中发现最普遍的一种,即使是很低的浓度也会产生严重影响^[5~8].研究表明^[9,10],E2 主要以葡萄糖苷酸共轭体的形式被人和其他动物体排泄到环境中,在下水道中存在各种具有葡萄糖苷酸酶的微生物,在 1 h 内即可将共轭体形态的 E2 裂解为游离态的 E2,使其具有雌激素活性.一些研究者^[11,12]分析探讨了 E2 在污水厂处理过程中的降解途径及其机制,并对 E2 的进出水浓度进行了连续测定,提出常规的活性污泥法处理雌激素物质的潜能有待进一步提高^[13~16].

目前,世界各地河流、湖泊等水环境污染状况严重,但针对此类水质中环境雌激素的评价研究却极

其缺乏^[2],尚鲜见对其中雌激素生物降解机制的报道.河流、湖泊底泥中富含硝化菌、反硝化菌、硫酸盐还原菌、甲烷菌等微生物^[17],会与水体中的雌激素物质发生物理的、化学的和生物的相互作用,其作用结果对水质自然净化起着决定性的作用;而对其生物作用机制的研究对于推动受污染水体中环境雌激素的生物治理工作起着不可忽视的作用,且对提高传统工艺的水和废水处理潜能有积极的借鉴意义.

本研究以 E2 为对象,分析了湖泊底泥在好氧、厌氧环境条件下对 E2 的生物降解特性,探讨了其相应地生物代谢机制,以期为提高饮用水水质、有效提高雌激素污染治理技术提供理论依据.

收稿日期:2007-07-17;修订日期:2007-09-08

基金项目:中日合作项目(003150103);济南大学博士启动资金项目(B0519)

作者简介:何芳(1975~),女,博士,主要研究方向为污水生物处理、水深度处理技术,E-mail: chm_hef@ujn.edu.cn

1 材料与方法

1.1 标准溶液的制备

试验所用 E2 和 E1 购自日本的 Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 根据不同的用途分别配制标准溶液及试验用溶液. 准确称取 20mg E2, 溶于 1 L Milli-Q 超纯水中, 室温下均匀搅拌 24 h, 用 0.2 μm 醋酸纤维滤膜过滤, 取滤液作为标准溶液, 其浓度约为 1.0 mg/L.

1.2 底泥样品的采集及预处理

含有微生物的底泥取自日本岐阜县境内的某一湖泊, 在距离表面水深约 6 m 的某个断面采取底泥样品, 取样 3 次后混匀置于灭菌后的容器中. 实验室中, 在 N_2 氛围下将湖泊底泥溶液置于 50 mL 离心管中, 3 000 r/min 离心分离 5 min, 离心管底部沉泥(称作远沉泥)作为实验中降解 E2 的菌源. 远沉泥特征及上清液水质见表 1, 2.

表 1 底泥样品的特征¹⁾
Table 1 Characteristics of the sediment

含水率(质量比)/%	VSS/%	C/%	N/%	P/%	底泥质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	
					湿泥	干泥
64.2	14.5	3.18	0.45	2.81	6.7	2.4

1) VSS, C, N, P 为基于离心后沉泥的质量比

表 2 上清液水质特征/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
Table 2 Characteristics of aqueous phase/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

$\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$	$\text{NH}_4^+\text{-N}$	$\text{NO}_3^-\text{-N}$	$\text{NO}_2^-\text{-N}$	DOC
0.67	5.88	0.46	0.26	6.6

1.3 试验方法

好氧试验 远沉泥用 Milli-Q 超纯水配制成一定浓度的水样, 放入已经灭菌的 500 mL 或 3 000 mL 三角烧瓶中, 再放入振荡式培养器内. 以 200 r/min 在室温下振荡搅拌的同时定量加入 E2 开始试验, 定时取样分析.

厌氧试验 远沉泥用 Milli-Q 超纯水配制成一定浓度的水样, 放入已经灭菌的 500 mL 或 3 000 mL 三角烧瓶中, 再放入振荡式培养器内, 并不断通入湿润氮气以确保厌氧条件. 为了使反应在完全厌氧的条件下进行, 在试验开始时先用振荡培养器搅拌同时通入湿润氮气 1 h 后, 再加入 E2 开始试验. 试验方法、分析及检测项目与好氧试验相同.

1.4 分析样品的预处理

(1) 对于不同时间从反应器中取出的混合液(约 10 mL), 3 000 r/min 离心分离 3 min 后, 取上清液用 0.45 μm 醋酸纤维滤膜过滤, 并按甲醇: 滤液 = 10: 90

(体积比)的比例加入甲醇, LC-MS 测定溶液液相中 E2 浓度的变化.

(2) 一定时间从反应器中取出的混合液, 3 000 r/min 离心分离 3 min 后, 取上清液用 0.9 μm 玻璃纤维滤膜过滤, 滤膜和上述离心管底部的沉泥合并后置于已灭菌的另一只离心管中, 快速加入 10 mL 甲醇, 振荡搅拌 5 min 后, 3 000 r/min 离心分离 3 min, 取 2 mL 上清液, LC-MS 测定底泥微生物体表吸附 E2 浓度随时间的变化; 离心管中残余部分超声波粉碎后, 样品中 E2 的萃取、浓缩等预处理步骤见文献[18], LC-MS 测定其 E2 总量, 减去上述微生物体表吸附量后的差值即为 E2 在微生物体内的积累量.

1.5 分析仪器及测定条件

E2、E1 浓度测定采用液-质谱联用仪 (HP1100MSD, 日本岛津), 色谱柱为 Zorbax Eclipse XDB-C8, 洗提液采用 70% 的甲醇溶液, 流速为 0.5 mL/min, 干燥气体为 N_2 , 流速为 12 L/min, 具体测定条件见表 3. 图 1 显示的是 E2 的检量线, 其检出限为 0.1 $\mu\text{g/L}$. 其他项目的测定采用标准方法.

表 3 E2、E1 的 LC-MS 测定条件

Table 3 LC-MS conditions for measurement of E2 and E1

项目	指标	项目	指标
仪器型号	HP1100MSD	离子化	ESI
进样量/ μL	100	模式	负离子
洗提液	$\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 70:30$	毛细电压/V	4 000
流速/ $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	0.5	离子束电压/V	120
测试温度/ $^{\circ}\text{C}$	35	喷雾压力/kPa	345
色谱柱	Zorbax Eclipse XDB-C8	干燥气(N_2)流速	12
		/L $\cdot\text{min}^{-1}$	

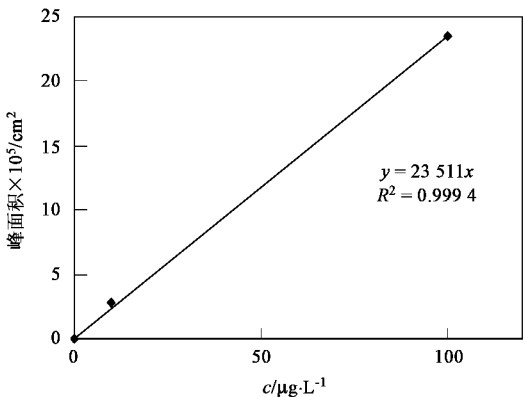


图 1 E2 的 LC-MS 检量线

Fig. 1 LC-MS detection curve of E2

2 结果与讨论

2.1 好氧条件下 E2、E1 的降解特性

由图 2 可见,好氧条件下随反应时间增加,液相中 E2 浓度快速降低,6 h 后 E2 浓度降为 4.51 $\mu\text{g/L}$, 24 h 后约 99% 的 E2 从液相中消失.随着 E2 浓度的降低,液相中 E1 浓度开始一段时间内不断上升,反应 6 h 时, E1 浓度上升到 17.56 $\mu\text{g/L}$, 然后缓慢下降,当反应进行 48 h 时, E1 达到检出限以下,没有检测到其它任何降解副产物.说明液相中消失的 E2 可能一小部分被直接完全矿化生成气体排出反应体系,绝大部分被脱氢酶氧化成 E1, E1 再被体系中存在的其它生物酶氧化,直至从液相中完全消失^[9].

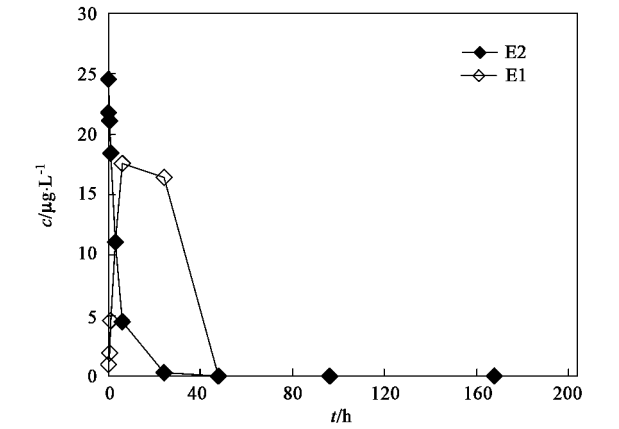


图 2 好氧条件下 E2 的衰减及副产物 E1 浓度的变化
Fig.2 Reduction of E2 and concentration of by-product, E1 under aerobic condition

2.2 厌氧条件下 E2、E1 的降解特性

可以看出,厌氧反应条件下(DO 浓度在 0.1 mg/L 以下),随反应时间增加, E2 浓度逐渐降低,与好氧条件下相比,其降解速度明显低一些,反应 6 h 降低了 9.19 $\mu\text{g/L}$, 仅约 31% 的 E2 从液相中消失, 96 h 后液相中 E2 浓度仍高达 1.12 $\mu\text{g/L}$. 试验中首次发现,与好氧反应条件不同,在厌氧条件下, E2 脱氢反应生成的 E1 随反应时间进行浓度降低后又逐渐增加, 后再降低,最终从液相中完全消失,重复试验及延长反应时间得到同样的实验现象; 同样,厌氧反应过程中没有检测到其它任何降解副产物. 尽管在厌氧条件下 E2 转化为 E1 的机制有待于进一步探讨,但 E2 的生物分解过程中生成 E1 已得到实验证实.

2.3 湖泊底泥中 E2 生物代谢途径探讨

由图 2 和图 3 可以看出,好氧和厌氧条件下, E2 的生物降解过程存在显著差异,为了分析探讨在这 2 种不同环境条件下微生物对 E2 的生物代谢途径,本研究延长反应时间,缩小取样间隔,以相同湖泊底泥为菌源进行了试验.

图 4 和图 5 分别显示了好氧和厌氧条件下 E2、E1 在液相中的浓度、底泥微生物体的吸附浓度和微生物体内蓄积浓度的经时变化.

好氧条件下 E2 的生物代谢机制分析:从图 4 (a)可见,液相中 E2 转化生成的 E1 随反应时间的进行浓度逐渐增加,反应 20 h, E1 浓度达最大值 28 $\mu\text{g/L}$,反应进行 69 h 后液相中 E1 达到检出限以下,直至试验结束(约 850 h),液相中 E1 浓度没有再上升;从图 4(b)、4(c)可以看出,底泥微生物对 E2 的吸附量和体内蓄积量很少,说明好氧条件下液相中消失的 E2 一小部分被直接完全矿化排出反应体系,大部分被脱氢酶氧化转变成 E1, E1 再被体系中存在的其它生物酶氧化,直至最终被完全矿化[图 6 (a)].上述好氧条件下湖泊底泥微生物降解 E2 的途径,与文献[9, 10]中报道的污水处理厂曝气池中活性污泥代谢 E2 的机制相同.

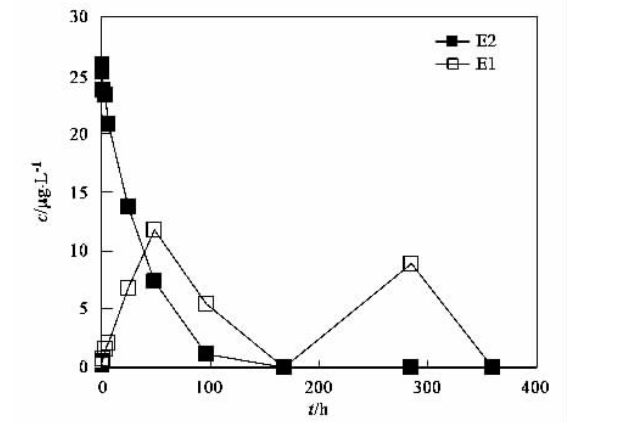


图 3 厌氧条件下 E2 的衰减及副产物 E1 浓度的变化
Fig.3 Reduction of E2 and concentration of by-product, E1 under anaerobic condition

厌氧条件下 E2 的生物代谢机制分析:由图 5 (a)可以看出,试验开始 20 h 时, E1 浓度仅为 0.72 $\mu\text{g/L}$,当反应继续进行至 32 h 时 E1 浓度升高至 23 $\mu\text{g/L}$,为 E2 初始添加量的 62%,然后再逐渐减少,直至试验结束. 仅从图 5(a)试验结果最直观的代谢机制可解释为:实验刚开始时(t 为 0 ~ 6 h),液相中减少的 E2 的一部分被微生物吸附,另一部分转化为 E1 并被完全无机化降解,反应继续进行,被微生物吸附的 E2 又缓慢释放到液相中(t 为 6 ~ 20 h),并被转化为 E1(t 为 20 ~ 32 h),从而使 E1 浓度再次升高.

对于上述直观解释,看图 5(b)、5(c)时,矛盾就产生了. 从图 5(b)可以看出,底泥微生物对 E2、E1

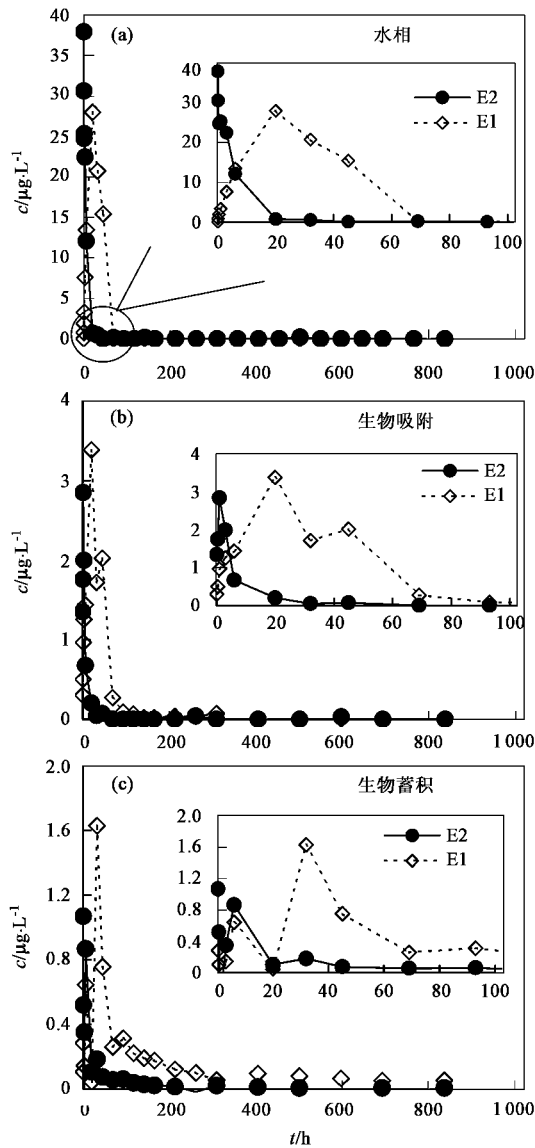


图 4 好氧条件下液相中、生物体表吸附、生物体内蓄积 E2、E1 浓度时经时变化

Fig.4 Concentration profiles of E2 and E1 with time in aqueous phase, sorbed onto biosolid and accumulated within biosolid under aerobic condition

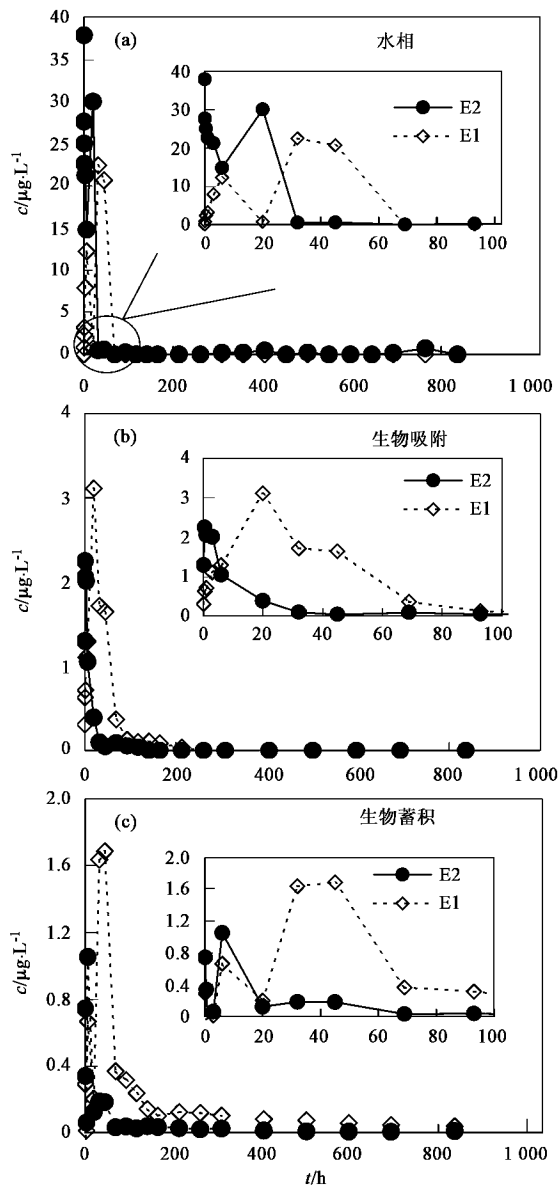


图 5 厌氧条件下液相中、生物体表吸附、生物体内蓄积 E2、E1 浓度的经时变化

Fig.5 Concentration profiles of E2 and E1 with time in aqueous phase, sorbed onto biosolid and accumulated within biosolid under anaerobic condition

的最大吸附量分别为 2.2 $\mu\text{g/L}$ 和 3.1 $\mu\text{g/L}$; 由图 5(c) 可见, 底泥微生物体内对 E2、E1 的最大蓄积量分别为 1.1 $\mu\text{g/L}$ 和 1.7 $\mu\text{g/L}$, 即使把这 4 个最大值相加, 其总和也仅能达到液相中 E1 浓度再次达到最高值时的 35%, 与刚才假定的液相中 E1 浓度再次升高, 是由微生物所吸附的 E2 再次释放到液相中导致这一解释相矛盾的, 所以必须从另外的角度来分析这一现象。

由图 5(a) 看 E2 变化: 实验开始 6 h 时, E2 的浓度为 14.8 $\mu\text{g/L}$, 当反应进行至 20 h 时, E2 的浓度上升为 30.1 $\mu\text{g/L}$, 然后 E2 从液相中缓慢完全消失 (t

为 32 h); 同时看 E1 的变化, 在 t 为 6~20 h 时间段内, E1 浓度逐渐降低至 0.72 $\mu\text{g/L}$, 而后缓慢升高, 在 t 为 32 h 时又出现峰值, 上述数据分析可见 E1 和 E2 的量是此消彼长的: E2 减少, E1 就增大, E1 增大, E2 就减少, 说明二者之间可能存在一种相互转换关系: E2 在脱氢酶作用下被氧化为 E1, E1 又在某种生物还原酶的作用下被还原为 E2, 在这个相互转化过程中, 底泥中存在的相应的其它生物酶会逐渐降解 E2、E1, 直至最终将其完全矿化。据报道^[19], 人体乳房组织中存在的氢氧类固醇酶可以将 E1 还原

以反应溶液中 E2 的摩尔质量为基准, E2、E1 的无机矿化部分、液相中残留部分、微生物吸附部分、生物体内蓄积部分等 4 部分的百分含量随反应时间的变化见图 7.

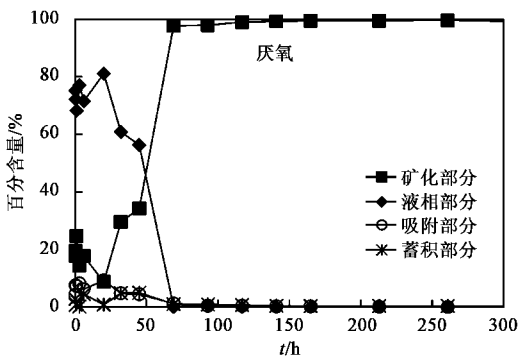
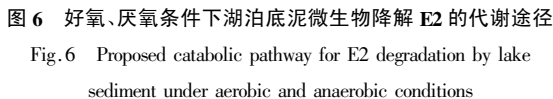


Fig.7 Mole fraction profiles of E2 and E1 with time under aerobic and anaerobic conditions

(4) E2、E1 的无机矿化部分、液相中残留部分、微生物吸附部分、生物体内蓄积部分等 4 部分的摩尔百分比随反应时间的变化表明, E2 及其产物 E1 逐渐被矿化的过程分为缓慢转化、快速矿化、缓慢降

(2)好氧条件下,液相中消失的 E2 仅一小部分被直接完全矿化生成气体排出反应体系,绝大部分被脱氢酶氧化成 E1,E1 再被体系中存在的其它生物酶氧化,直至最终被完全矿化消失。

解 3 个阶段,与 E2 相比较,E1 更容易积累于天然水域中的微生物体内。

参考文献:

- [1] Williams R J, Johnson A C, Smith J J L, *et al.* Steroid estrogens along river stretches from sewage treatment works discharges [J]. Environ Sci Technol, 2003, **37**: 1744-1750.
- [2] Young W F, Whitehouse P, Johnson I, *et al.* Proposed Predicted-No-Effect-Concentrations (PNECs) for Natural and Synthetic Steroid Oestrogens in Surface Waters [R]. Environmental Agency Bristol, R&D Technical Report, 2004. P2-T04/1.
- [3] Bouman A, Heineman M J, Faas M M. Sex hormones and the immune response in humans [J]. Hum Repr Update, 2005, **11**: 411-423.
- [4] Chris G C, Sharon E B, Bailey G, *et al.* Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review [J]. Chemosphere, 2006, **65**: 1265-1280.
- [5] Baronti C, Curini R, D'Ascenzo G, *et al.* Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water [J]. Environ Sci Technol, 2000, **34**: 5059 - 5066.
- [6] 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**: 1559-1565.
- [7] Johnson A C, Sumpter J P. Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works (critical review) [J]. Environ Sci Technol, 2001, **35**: 4697-4702.
- [8] D'Ascenzo G, Di Corcia A, Gentili A, *et al.* Fate of estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities [J]. Science of the Total Environment, 2003, **302**: 199-209.
- [9] Ternes T A, Kreckel P, Mueller J. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge [J]. Science of the Total Environment, 1999, **225**: 91-99.
- [10] Joss A, Andersen H, Ternes T, *et al.* Removal of estrogens in municipal wastewater treatment under aerobic and anaerobic conditions: consequences for plant optimization [J]. Environ Sci Technol, 2004, **38**: 3047-3055.
- [11] Layton A C, Gregory B W, Seward J R, *et al.* Mineralization of steroidal hormones by biosolids in wastewater treatment systems in Tennessee U. S. A. [J]. Environ Sci Technol, 2000, **34**: 3925-3931.
- [12] Li F S, Yuasa A, Obara A, *et al.* Aerobic batch degradation of 17- β estradiol (E2) by activated sludge: effect of spiking E2 concentrations, MLVSS and temperatures [J]. Water Research, 2005, **39**: 2065-2075.
- [13] Belfroid A C, Van der Horst A, Vethaak A D, *et al.* Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and wastewater in The Netherlands [J]. Science of the Total Environment, 1999, **225**: 101-108.
- [14] Tanaka H, Sato C, Tsumori J, *et al.* Occurrence of endocrine disruptors in sewage and their behavior in sewage treatment plants in Japan [J]. Environmental Science, 2003, **10**(1): 1-24.
- [15] Svenson A, Allard A S, Mats E K. Removal of estrogenic on Swedish municipal sewage treatment plants [J]. Water Research, 2003, **37**: 4433-4443.
- [16] Herlinde N, Tim V, Eric D W, *et al.* Occurrence of estrogens in the Scheldt estuary: A 2-year survey [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2007, **66**: 1-8.
- [17] 周群英,高廷耀. 环境工程微生物学[M]. (第二版). 北京:高等教育出版社,2000.122-124.
- [18] 小森行也,高橋明広,矢古宇靖子,等. LC/MS/MSによる下水試料中のエストロゲンの測定[A]. 見:世界湖沼会議[C]. 2001. 225-228.
- [19] Metzler M. The Hand Book of Environmental Chemistry: Endocrine Disruptors Part II [M]. Berlin:Springer, 2002.
- [20] Cargouet M, Perdiz D, Mouatassim-Souali A, *et al.* Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France) [J]. Science of the Total Environment, 2004, **324**: 55-66.