

汪晶, 柯凤乔. 一株降解雌二醇的恶臭假单胞菌的分离鉴定及降解活性[J]. 环境化学, 2015, 34(4): 814-816



## 一株降解雌二醇的恶臭假单胞菌的分离鉴定及降解活性

汪晶<sup>1\*</sup> 柯凤乔<sup>2</sup>

(1. 南京林业大学化工院, 南京, 210037; 2. 浙江大学环境与资源学院, 杭州, 310058)

**摘要** 从江苏省某废水处理站的活性污泥中分离出一株高效降解 17 $\beta$ -雌二醇(E2)的细菌, 编号为 CR7. 研究表明, CR7 能以 E2 为唯一碳源, 在 3d 内对初始浓度为 10 mg·L<sup>-1</sup> 的 E2 降解率为 79%. 分析其形态学、生理生化及 16S rRNA 序列, 鉴定为一株恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*). 在培养温度 25 °C, 添加 Cr<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Ba<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup> 的培养液中, E2 的降解率分别为 0.33%、0、83.33%、82.17%、83.37% 和 87.10%. 使用重组基因酵母技术检测了 CR7 菌株降解污染 E2 的土壤, 在 168 h 降解 E2 的效果达到 72%.

**关键词** 17 $\beta$ -雌二醇(E2), 恶臭假单胞菌, 生物降解, 重组基因酵母技术(YES).

E2 普遍存在于各种环境, 特别是污染的水体中, 由于 E2 的作用强度高于雌激素酮(E1)和雌三醇(E3), 具有潜在的内分泌干扰特性, 因此去除环境中的 E2 污染, 逐步引起人们的重视. 生物降解法利用微生物自身的代谢过程降解有机污染物, 具有运行成本低和无二次污染的优点, 因此被广泛运用在污水处理等方面. 迄今为止, 国内外发现了一些雌激素降解菌株包括 *Sphingomonas* sp. strain D12, *Rhodococcus zopfii*, *Rhodococcus equi*, *Sphingomonas* sp. 和 *Aminobacter* sp. 等<sup>[1-4]</sup>.

本文采集江苏某制药厂污水处理站好氧池的活性污泥, 以 E2 为唯一碳源, 分离筛选 E2 降解菌株, 探讨金属离子对筛选菌株对 E2 的降解影响, 利用固相萃取柱技术提取 E2, 并采用重组基因酵母(YES)技术检测该菌株降解污染土壤中 E2 的效率, 筛选出一株对 E2 具良好降解效果的恶臭假单胞菌.

### 1 实验部分

#### 1.1 实验材料与仪器

污泥取自江苏省某制药厂污水处理站的好氧池活性污泥. 土壤采集自南京八卦洲一处农田.

E2 标准品(纯度 $\geq$ 98.5%)和 E1 标准品(纯度 $\geq$ 99.5%)为德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司, 高效液相色谱级乙腈和甲醇(德国, Merck 公司). 0.22  $\mu$ m 聚偏氟乙烯微孔滤膜(上海兴亚净化材料厂); 重组基因酵母菌试剂盒(中国科学院水质学国家重点实验室); 雌激素专用固相提取柱(Waters Oasis)(国家标准物质中心). E2 无机盐培养基: 3 g·L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub>, 1 g·L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 g·L<sup>-1</sup> KCl, 0.5 g·L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.01 g·L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>. 在 100 mL 的 E2 无机盐培养液中加入 1 mL E2 甲醇溶液, 使得 E2 的终浓度为 10 mg·L<sup>-1</sup>, 121 °C 灭菌 20 min, 使助溶剂甲醇挥发<sup>[5]</sup>.

CA-1390-1 垂直层流洁净工作台(上海上净净化设备有限公司), 涡旋仪(MS2, 广州 IKA Works), 岛津 LC-20A 高效液相色谱仪(HPLC)等.

#### 1.2 降解 E2 细菌的筛选

将采集的活性污泥按体积分数 15% 加至 E2 无机盐培养液中, 30 °C、120 r·min<sup>-1</sup> 摇床培养, 每 2 d 更换 1 次培养液, 重复 4—5 次, 富集能利用 E2 为唯一碳源的菌株, 之后, 在牛肉膏蛋白胨平板上多次划线分离直到获得可降解 E2 的纯化菌株. 将筛选纯化的细菌接种到 E2 无机盐培养液中, 将达到对数生长期的降解菌培养液接种于 10 mg·L<sup>-1</sup> 的 E2 无机盐培养液中, 25 °C、120 r·min<sup>-1</sup> 摇床培养 3 d.

雌激素 E2 降解后的培养液加入的等体积乙腈混合均匀, 采用 0.22  $\mu$ m 聚偏氟乙烯微孔滤膜过滤, 使用 HPLC 检测降解后溶液中 E2 的含量, 筛选降解率高的细菌. 检测 E2 条件为, 柱温 28 °C, 流动相为乙腈: 双蒸水 = 7:3, 检测波长为 276 nm, 流速为 1 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量为 10  $\mu$ L, 检出限为 0.01 mg·L<sup>-1</sup>.

#### 1.3 降解 E2 细菌的形态学及生理生化鉴定

形态学及生理生化鉴定 按常规方法进行<sup>[6]</sup>.

\* 通讯联系人, Tel: 025-85427544; E-mail: cristo.w@qq.com

设计 16SrDNA 正向引物: 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 反向引物: 5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'。16 SrDNA 采用菌落 PCR 方法提取 DNA 和 PCR 扩增, PCR 反应程序: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 40 s; 46 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 30 个循环, 72 °C 冷却 10 min, 4 °C 至恒定。扩增产物回收纯化后送上海生工生物工程有限公司测序。从 GenBank 中调取相关菌株 16SrDNA 序列用于系统发育学分析, 全序列用 Bioedit 软件拼接, OrientationChecker 和 Mallard 检测序列的方向一致性和嵌合体的有无, 用 ClustalX (1.8) 软件包排序, 用 MEGA version 4 软件包中的 Kimura2-Parameter Distance 模型计算进化距离, 用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树, 1000 次随机取样, 计算自引导值 (Bootstrap) 以评估系统发生树的置信度。

#### 1.4 不同金属离子对细菌降解 E2 的影响

为研究土壤中可能存在的金属离子对 E2 降解菌的降解效率的影响, 将降解菌培养液接种于 10 mg·L<sup>-1</sup> 的 E2 无机盐培养液中, 25 °C、120 r·min<sup>-1</sup> 摇床培养 3 d 后, 实验组分别加入 2 mL 的 1 mg·L<sup>-1</sup> 的金属离子 Cr<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Ba<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>, 对照组加入等量的无菌双蒸水。25 °C、120 r·min<sup>-1</sup> 摇床培养 7 d, 检测 E2 降解情况。

#### 1.5 筛选菌株降解污染土壤中 E2 的效果

500 mL 三角瓶中称量土壤 200 g (115 °C 灭菌 20 min, 烘干, 研磨, 过筛 0.2 mm), 加入 20 mL 10 mg·L<sup>-1</sup> E2 的甲醇溶液。在通风橱中振荡 1—2 d 至完全吹干, 使 E2 终浓度为 100 mg·g<sup>-1</sup>。实验组加入 10 mL 处于对数生长期的菌悬液; 对照组 I 加入等量的灭菌双蒸水; 对照组 II 加入等量灭活的菌液 (121 °C 灭菌 20 min)。放置在 25 °C 培养箱中培养。

固相萃取提取土壤中 E2。按照 E2 检测时间点 (168 h, 每隔 24 h 取样) 将需要处理的样品从培养箱中取出, 冷冻干燥 24 h, 用色谱纯甲醇分两次, 分别为 5 mL 和 2.5 mL 萃取土壤中的 E2, 萃取后的有机溶液离心, 收集上清液, 旋转蒸发浓缩, 然后用 SPE 固相萃取柱, 最后用乙腈洗脱, 溶解在乙腈中, 定容到 1 mL, 待测。

重组基因酵母检测土壤中雌激素 E2 方法参照试剂盒说明及文献 [5-10]。用以下公式计算半乳糖苷酶活性  $U$ :  $U = \frac{OD_{420} - OD'_{420}}{t \times V \times OD_{600}}$ 。其中,  $OD'_{420}$  为采用 8 mL 双蒸水暴露测得的 420 nm 光密度值;  $V$  为测试用的菌液体积; 0.4 mL;  $OD_{600}$  为样品在 600 nm 光密度值;  $t$  为反应时间, 60 min;  $D$  为稀释因子, 12。

参照 17 $\beta$ -雌二醇双蒸水溶液建立的浓度-酶活性关系曲线 (S 形曲线), 计算样品的 E2 当量浓度。将降解实验中土壤样品的乙腈提取液, 进行 E2 浓度的分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 降解 E2 的细菌初步筛选及降解效果

通过前期的富集培养, 分离纯化出 23 株降解 E2 的细菌, 分别编号为 CR1-CR23。经过雌激素降解实验, 复筛出 CR1、CR3、CR7 和 CR16 等 4 株细菌。起始浓度为 10 mg·L<sup>-1</sup> 的 E2 培养液, 经过 4 株细菌 CR1、CR3、CR7 和 CR16 的 3 d 降解后, 最终浓度分别为: 8.9、6.5、2.1、8.8 mg·L<sup>-1</sup>, 降解率分别为 11%、35%、79%、12%。选择 CR7 菌株作为后续研究细菌。

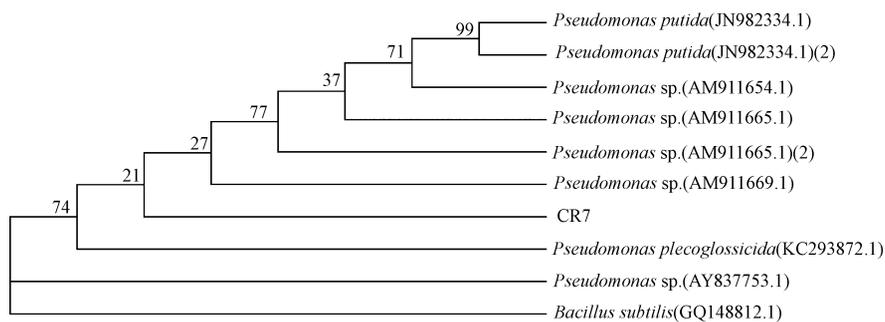


图 1 细菌 CR7 的系统发育树

### 2.2 高效降解 E2 的细菌 CR7 的鉴定

革兰阴性杆菌, 卵圆形, 最适生长温度 25 °C—30 °C, 42 °C 不生长, 有腥臭味。葡萄糖发酵实验阳性, 还原硝酸盐, 氧化酶实验阳性。

CR7 菌株的 16S rRNA 序列与恶臭假单胞菌相似, 随机调取数据库中已鉴定菌株的 16SrDNA 序列和相关属其他主要菌株的 16SrDNA 序列构建系统发育树, 如图 1 所示。根据 CR7 细菌的形态学、生理生化, 结合分子生物学 16S rRNA 序列和系统发育树结果, 鉴定 CR7 为恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)。

### 2.3 金属离子对 CR7 菌株降解 E2 的影响

加入 Cr<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Ba<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup> 的培养液, E2 残留量分别为 9.97、10、1.67、1.78、1.63、1.29 mg·L<sup>-1</sup>, 降解率分别为 0.33%、0、83.33%、82.17%、83.37%、87.10%。结果说明, 一定量的 Ca<sup>2+</sup> 可以促进 CR7 菌株降解 E2, 反之加入 Cr<sup>2+</sup> 和 Pb<sup>2+</sup>

使 CR7 对 E2 的降解率明显下降,尤其  $Pb^{2+}$  的加入影响了 CR7 正常生长,使其降解率为 0.

#### 2.4 细菌 CR7 降解污染土壤中 E2 的效果

图 2 显示了实验组中由于 E2 浓度变化导致的重组基因酵母中  $\beta$ -半乳糖苷酶活力的改变(EG).而对照组 I(G I)和对照组 II(G II),E2 未经降解,浓度较高,令重组基因酵母显示  $\beta$ -半乳糖苷酶的高酶活.实验组中,细菌 CR7 以 E2 为唯一碳源生长,E2 浓度随着时间推移逐渐降低.在 CR7 降解 E2 的 24—48 h 时间段内 E2 的降解率达到最大 26%,48 h 中 CR7E2 的降解率达到了 38%.之后随时间的增加,CR7 降解 E2 速率逐步下降.对照组 II 加入灭活的菌悬液,由于灭活菌体对 E2 有一定的吸附作用,因此在 24 h 内,E2 浓度有所降低,但是 24 h 后,E2 浓度不发生变化.对照组 I 由于加入等量的无菌水,E2 的浓度变化没有发生.168 h 左右,实验组中 CR7 降解 E2 的效率达到了 72%,说明细菌 CR7 菌株对 E2 污染土壤具有良好的降解性.

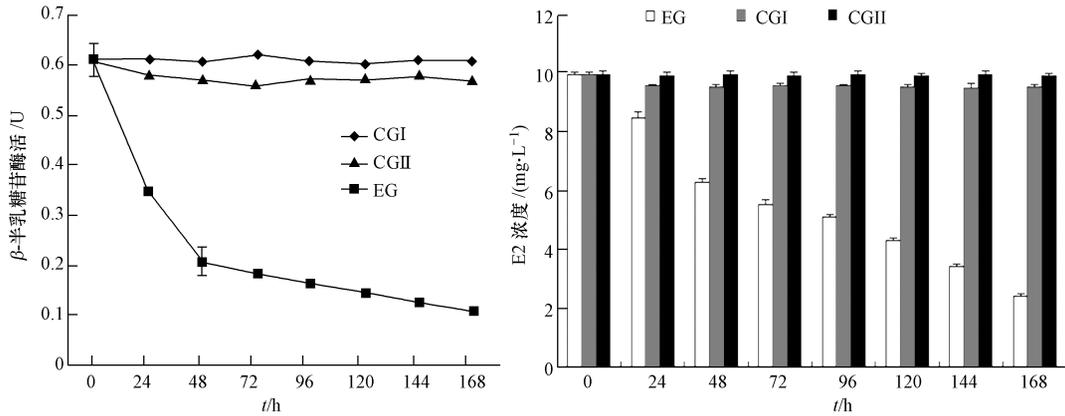


图 2 菌株 CR7 降解 E2 变化

### 3 结论

本文得到一株能够降解 E2 的恶臭假单胞菌 CR7.该菌在降解污染土壤 E2 的过程中,48 h 左右活力达到最大,同时在 24—48 h 时间段内,E2 的降解速率最大,168 h 左右,降解效率达 72%,说明 CR7 菌株对 E2 具有良好的降解效果.

加入  $Ca^{2+}$  能够促进 E2 的降解,这可能由于  $Ca^{2+}$  有利于降解过程中与功能基团的亲和,而向培养液中加入  $Pb^{2+}$  和  $Cr^{2+}$ ,则抑制了 CR7 的降解活力,主要表现在对菌体生长的影响, $Pb^{2+}$  完全抑制了菌体生长,令降解率为 0,其他金属离子的加入对 CR7 降解活力略有抑制,说明该菌对金属离子具有较好的耐受性,适用于降解自然环境中的雌激素.

### 参 考 文 献

- [1] Wilson V S, Lambright C, Osrby J, et al. *In vitro* and *in vivo* effects of 17 $\beta$ -trenbolone: a feedlot effluent contaminant [J]. *Toxicol Sci*, 2002, 70: 202-211
- [2] Chao Y, Kurisu F, Saitoh S, et al. Degradation of 17 $\beta$ -estradiol by *Sphingomonas* sp. strain D12 isolated from Soil [J]. *J Environ Biotech*, 2004, 3: 89-94
- [3] Yoshimoto T, Nagai F, Fujimoto J, et al. Degradation of estrogens by *Rhodococcus zopfii* and *Rhodococcus equi* isolates from activated sludge in wastewater treatment plant [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 7: 5238-5289
- [4] Weber S, Leuschner P, Kämpfer P, et al. Degradation of estradiol and ethinyl estradiol by activated sludge and by a defined mixed culture [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 67: 106-112
- [5] Bovee T F H, Schoonen W G E J, Hamers A R M, et al. Screening of synthetic and plant-derived compounds for (anti) estrogenic and (anti) androgenic activities [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 390 (4): 1111-1119
- [6] 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: 2
- [7] Fernandez M P, Buchanan I D, Ikononou M G. Seasonal variability of the reduction in estrogenic activity at a municipal WWTP [J]. *Water Res*, 2008, 42 (12): 3075-3081
- [8] 杨俊,姜理英,陈建孟. 1 株 17 $\beta$ -雌二醇高效降解菌的分离鉴定及降解特性 [J]. *环境科学*, 2012, (31): 1-5
- [9] Qiu FB, Huang Y, Lei S, et al. *Leifsonia ginsengi* sp. nov., isolated from ginseng root [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, 57: 405-408
- [10] 张方方,秦丹,高良敏,等. 环境中雌激素的微生物降解 [J]. *微生物学通报*, 2012, 39(5): 711-721