

# 沼灌土壤 17 $\beta$ -雌二醇专性降解菌的分离筛选及降解特性

余薇薇<sup>1</sup>, 疏明慧<sup>1</sup>, 谢明原<sup>1</sup>, 张敏讷<sup>1</sup>, 刘 聪<sup>2</sup>, 杨 硕<sup>1</sup>, 万巧玲<sup>3</sup>, 毛羽丰<sup>1</sup>,  
陈杰云<sup>4</sup>

(1. 重庆交通大学河海学院水利水运工程教育部重点实验室, 重庆 400074; 2. 西南技术工程研究所, 重庆 400039; 3. 重庆市渝东水务有限公司, 重庆 404000; 4. 重庆市渝北区建设管理事务中心, 重庆 401120)

**摘 要:**集约化畜禽养殖场产生的沼液通常就地回用,在循环利用有机物的同时也会带来类固醇雌激素(Steroid Estrogens, SEs)的累积及污染。为降低沼灌后 SEs 对水土环境的污染风险,该研究采用富集和纯化培养法,对西南地区某奶牛养殖场沼灌区土壤中雌激素降解菌进行分离及筛选,获得一株利用 17 $\beta$ -雌二醇(17 $\beta$ -E2)为唯一碳源生长繁殖的降解菌。通过 16S rDNA 基因序列进行同源性比对以确定种属,并研究其降解特性。分别研究了菌株在不同温度、pH 值、底物浓度三种单因素条件下的降解特性,然后利用三因素三水平正交试验继续优化菌株最适降解条件。结果表明:分离出的优势菌为生丝微菌属(*Hyphomicrobium* sp.),命名为 *Hyphomicrobium* sp.SS-1,该菌株在 10~40 °C、pH 值为 5~9、底物浓度为 1~10 mg/L 的条件下,均能不同程度降解 17 $\beta$ -E2。其中菌株在温度为 30 °C、pH 值为 7、底物浓度 5 mg/L 的条件下,培养 7 d 对 17 $\beta$ -E2 的降解率可达 71%,并伴随毒性低于 E2 的降解产物 E1 和 E3 生成,总雌激素去除率为 56.8%。正交试验结果显示,各因素对菌株降解能力的影响顺序从小到大为:底物浓度、温度、pH 值,且都为显著影响( $P < 0.05$ );菌株最适降解条件为温度 35 °C、pH 值为 7、底物浓度 5 mg/L,该条件下培养 7 d,菌株对 17 $\beta$ -E2 的降解率可达 97.09%。研究结果可为复杂基质环境中微生物降解 SEs 提供优质菌种资源,并为沼液灌溉区土壤的雌激素污染修复提供有效途径。

**关键词:**降解;微生物;17 $\beta$ -雌二醇(17 $\beta$ -E2);生丝微菌属;降解菌;土壤污染

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2022.08.025

中图分类号: X52

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2022)-08-0218-07

余薇薇,疏明慧,谢明原,等.沼灌土壤 17 $\beta$ -雌二醇专性降解菌的分离筛选及降解特性[J].农业工程学报,2022,38(8):218-224. doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2022.08.025 http://www.tcsae.org

Yu Weiwei, Shu Minghui, Xie Mingyuan, et al. Isolation, screening, and degradation characteristics of 17 $\beta$ -estradiol obligate degradation bacteria in the soil of marsh irrigation[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2022, 38(8): 218-224. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2022.08.025 http://www.tcsae.org

## 0 引 言

随着生活水平的不断提高,人们对猪肉和牛肉等畜禽的消费量日渐增加,推动了农业和畜牧业的集约化发展。中国畜禽养殖业规模居世界首位,养殖场饲料中的激素类药品与畜禽排放的粪便是环境类固醇雌激素(Steroid Estrogens, SEs)的主要来源<sup>[1]</sup>。中国农业部早在 1999 年颁布法令禁止在畜禽饲料中添加雌激素类似物<sup>[2]</sup>,但仍存在商家为降低成本,使用雌二醇(E2)等添加剂的现象。大部分雌激素添加剂会通过粪便和尿液以原药或代谢产物的形式排泄到体外,据统计,每年约有 40 亿吨畜禽粪便排放到环境中或用于农业生产<sup>[3]</sup>。环境中天然类固醇雌激素(SEs)主要有雌酮(E1)、17 $\alpha$ -雌二醇(17 $\alpha$ -E2)、17 $\beta$ -雌二醇(17 $\beta$ -E2)和雌三醇(E3)。其中 17 $\beta$ -E2 是雌激素活性最强的,且备受学者关注,仅纳克级别的 17 $\beta$ -E2 便可引起鱼类雌性化、雌雄同体、幼鱼

变态等干扰效应<sup>[4-5]</sup>。中国国家环保总局对 23 个省市调查后发现,全国 90%的畜禽养殖场未经过环境影响评价,60%的养殖场污染防治措施不完善<sup>[6]</sup>。大量研究表明,沼液回用后养殖场沼灌区周边水体及土壤中均检测出较高浓度的 SEs<sup>[7-9]</sup>。农业源 SEs 带来潜在的环境生态风险和人体健康风险不容小觑。从环境介质中分离出功能菌株,并通过其生长代谢降解 SEs 类物质,采用生物法去除雌激素污染是目前环境友好的方法。

国内外已有学者进行雌激素降解菌的分离和筛选,Fujii 等<sup>[10]</sup>首次从活性污泥中分离出一株以 E2 为唯一碳源生长的新鞘氨醇杆菌(*Novosphingobium* sp.)。Takeshi 等<sup>[11]</sup>从污水处理厂活性污泥中筛选出马红球菌(*Rhodococcus equi*),在 24 h 内对 100 mg/L E1、E2 和 E3 的降解率为 95%。于清淼等<sup>[12]</sup>筛选出一株红球菌(*Rhodococcus* sp.)在 3 d 内可完全降解 1 mg/L E2。然而,当前学者们主要是从污水处理厂活性污泥中分离 E2 降解菌,生活污水其 SEs 污染负荷不大,且污水中多是常规的污染物,其余特殊污染物例如抗生素等含量相对较少,对于专性微生物的培养及其降解都可以达到比较好的效果。现阶段,针对农业 SEs 污染,由于沼灌区土壤基质复杂,有必要从当地受 SEs 污染的土壤中筛选并培养出

收稿日期: 2021-09-02 修订日期: 2022-03-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(51608079);重庆市研究生教育教学改革研究项目(yig182028);重庆市大学生创新创业训练项目(S202010618007);重庆市基础研究与前沿探索项目(cstc2018jcyjAX0322)

作者简介: 余薇薇,博士,教授,研究方向为水处理。

Email: yu11237@cqjtu.edu.cn

专性降解优势菌株，针对性解决该地区 SEs 污染问题。

本研究对养殖场沼灌区土壤中 SEs 降解菌进行分离筛选，获得利用 17 $\beta$ -E2 为唯一碳源生长的专性菌株，并研究其降解特性。为沼液这类复杂基质中生物降解雌激素增添新的功能菌株，并为农业生态系统中雌激素污染修复提供有效途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

土壤样品采集自重庆某奶牛养殖场沼液灌溉区域，该处地形为低丘缓坡，海拔 290~300 m。利用对角线法采集 5~10 cm 的中层土壤，再用四分法收集，避光于 4 °C 冰箱保存备用。

### 1.2 培养基配制

微量元素溶液：0.002 g CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、0.024 g NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O、0.19 g CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O、0.061 g MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O、0.024 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O、0.07 g ZnCl<sub>2</sub>、0.006 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>，蒸馏水 1 L。

无机盐培养基：4.26 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、2.65 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.02 g CaCl<sub>2</sub>、1.5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O，pH 值调至 7.0，加入 1 mL 微量元素，蒸馏水定容至 1 L。

17 $\beta$ -E2 降解液体培养基：将溶于甲醇的 17 $\beta$ -E2 加入经 121 °C 灭菌 30 min 的无机盐培养基中，水浴加热并氮吹使甲醇蒸发，使 17 $\beta$ -E2 浓度为 10 mg/L。

17 $\beta$ -E2 降解固体培养基：无机盐培养基中加入 20 g/L 琼脂，凝固后将 17 $\beta$ -E2 涂布于培养基表面。

### 1.3 17 $\beta$ -E2 降解菌的分离筛选

在无菌条件下，将 1 g 采集样品加入 17 $\beta$ -E2 浓度为 10 mg/L 的降解液体培养基中，共设四组，于 30 °C、125 r/min 的摇床培养 7 d 后，吸取 200  $\mu$ L 接种于新的 17 $\beta$ -E2 液体培养基中，重复操作 4 次，对 17 $\beta$ -E2 降解菌进行富集。将四组样品所对应的富集液分别进行 17 $\beta$ -E2 降解试验，选择降解率最高的样品。取 1 mL 富集好的菌液用无菌水按 10 倍稀释法，从 10<sup>-1</sup> 逐级稀释至 10<sup>-8</sup>。取 10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-8</sup> 的稀释液涂布于 17 $\beta$ -E2 降解固体培养基上，设三个平行组，置于 30 °C 培养箱中 7 d。挑取不同颜色和形态菌落，纯化获得单菌落，分别编号保存，分光光度计测定其 OD<sub>600</sub> 值，以此选出优势菌。

### 1.4 菌株的鉴定及系统发育分析

采用 TIANGEN 细菌试剂盒提取菌株基因组 DNA。选用细菌通用引物对 27F/16SF：

5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492R/16SR：5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3' 进行 16S rDNA 基因扩增。扩增体系：10 $\times$ Taq Buffer 2.5  $\mu$ L，Taq DNA 聚合酶 0.2  $\mu$ L，dNTPs (2.5 mmol/L) 2.0  $\mu$ L，上下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 1.0  $\mu$ L，DNA 模板 2.0  $\mu$ L，双蒸水补至 25  $\mu$ L。PCR 反应条件：94 °C 预变性 3 min，94 °C 变性 30 s，56 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 1.5 min，35 个循环；72 °C 最终延伸 5 min，16 °C 保存。引物合成与扩增产物均青岛屿创公司完成。测序结果利用 Blast 在 GenBank 数据库中进行对比分析，采用 MEGA 软件中的邻接法构建系统发育树。

### 1.5 菌株的降解特性试验设置及测定

17 $\beta$ -E2 降解菌的最适温度的试验中，初定 pH 值为 7，底物浓度 10 mg/L，温度设置为：10、20、25、30、35、37、40 °C。最适 pH 值试验中，初定温度为 30 °C，底物浓度 10 mg/L，pH 值调节为：5、6、7、8、9。最适底物浓度试验中，定温度为 30 °C，pH 值为 7，底物浓度配制为：1、3、5、7、10 mg/L。各培养基摇床转速 125 r/min，接种量 5% (体积分数)，在第 7 d 采用高效液相色谱仪 (HPLC) 测定 17 $\beta$ -E2 浓度，色谱条件为：进样量 20  $\mu$ L，流动相 (A) 乙腈：(B) 超纯水=45：55，流速 1.0 mL/min，保留时间为 12 min，检测波长 201 nm。此方法能够将 E1、E2、E3 完全分离，峰形对称性良好。

### 1.6 正交试验

在单因素试验的基础上，进行三因素三水平 (L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>)) 正交试验设计，继续优化温度 (A)、pH 值 (B)、底物浓度 (C) 对降解菌的影响，确定最优降解条件。

## 2 结果与分析

### 2.1 17 $\beta$ -E2 降解菌的分离与筛选

通过对西南地区某奶牛养殖场沼灌区土壤样品中的 17 $\beta$ -E2 降解菌进行富集培养和分离纯化，得到 3 株菌落，编号分别为 SS-1、SS-2 及 SS-3。30 °C 培养 5~7 d 后，SS-1 菌株呈圆形，乳白色，不透明，边缘光滑；SS-2 菌株呈红色，不透明，边缘光滑；SS-3 菌株呈白色，不透明，边缘粗糙。将 3 株菌株分别接种到 17 $\beta$ -E2 降解液体培养基中，30 °C、125 r/min 恒温振荡条件下培养 7 d 后测量其 OD<sub>600</sub>，分别为 1.508、0.489、1.084。编号 SS-1 的菌落生长状况最好，因此选取菌株 SS-1 进行后续降解试验。图 1 为 SS-1 菌株扫描电镜照片。

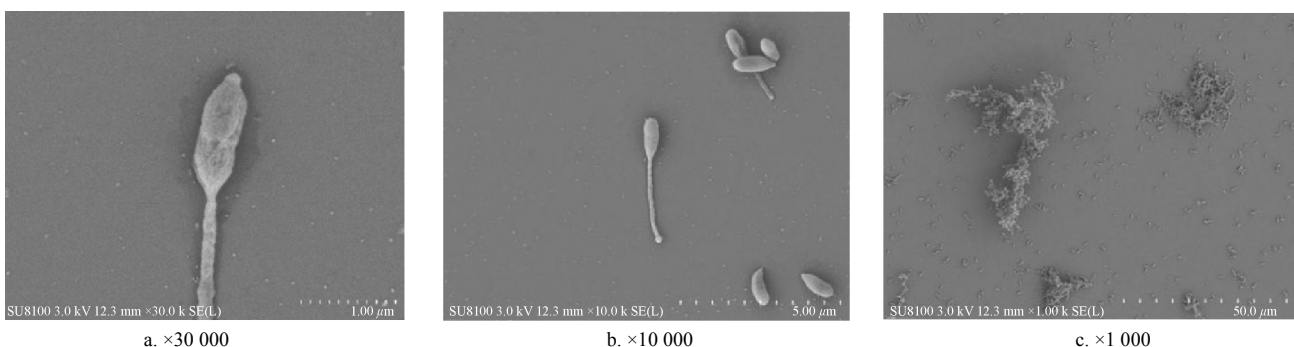
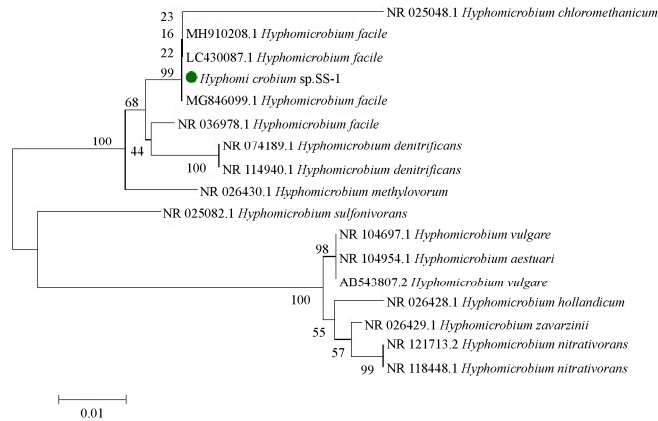


图 1 菌株 SS-1 的扫描电镜图

Fig.1 Scanning electron micrograph of strain SS-1

## 2.2 菌种鉴定结果

将菌株 SS-1 扩增产物的测序结果在 Genbank 数据库中对比较分析。结果表明, 经筛选得到的 17 $\beta$ -E2 降解菌株与 *Hyphomicrobium facile* 的 16S rRNA 基因序列同源性为 99.7%, 鉴定该菌株为生丝微菌属 (*Hyphomicrobium* sp.), 命名为 *Hyphomicrobium* sp.SS-1。该菌系统发育树如图 2 所示。



注: 线段 0.01 表示序列差异的分支长度。

Note: Line segment 0.01 represents the branch length of sequence difference.

图 2 菌株 SS-1 的 16S rDNA 系统发育树

Fig.2 The phylogenetic tree of strain SS-1 based on 16S rDNA

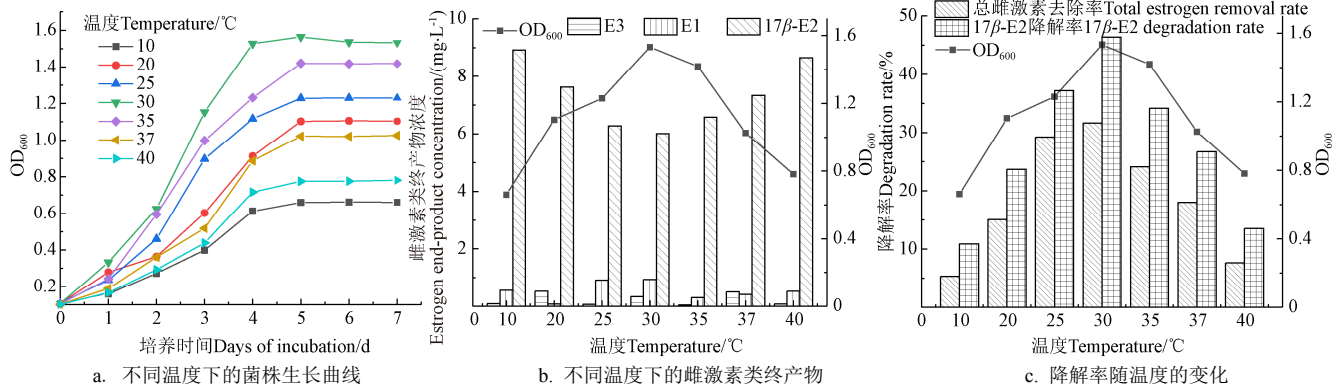
## 2.3 菌株降解能力

如图 3 所示, 在 30 $^{\circ}$ C、中性条件下, 将菌株 SS-1 在 10 mg/L 17 $\beta$ -E2 培养基中培养 7 d, 发现菌株生长状况良好, 能够代谢 17 $\beta$ -E2。随着菌株 OD<sub>600</sub> 值的增高, 17 $\beta$ -E2 的浓度逐渐降低。第 2~4 天菌株属于对数生长期, 其间降解速率最快。第 4~7 天菌株繁殖量减小, 属于稳定期, 降解速率也逐渐变缓, 最终 7 d 后 10 mg/L 17 $\beta$ -E2 去除率为 49.2%。17 $\beta$ -E2 在生物降解过程中会转化为 E1 和 E3, 其中 E1 为主要转化产物, 占总雌激素浓度的 9%, E3 占比为 3%, 之后再进一步降解。各类 SEs 分子结构上取代基类型、位置、空间结构的差异会导致其雌情活性强弱不一, 其中 17 $\beta$ -E2 活性最强, 它与代谢产物 E1、E3 的雌激素效应相对值为 100:2.54:17.60, E1、E3 毒性远低于 17 $\beta$ -E2<sup>[13]</sup>。随着反应进行, 基质中雌激素效应不断减小。

## 2.4 影响菌株对 17 $\beta$ -E2 降解能力的因素

### 2.4.1 温度

如图 4 所示, 在 7 组不同温度条件下, 菌株 SS-1 表

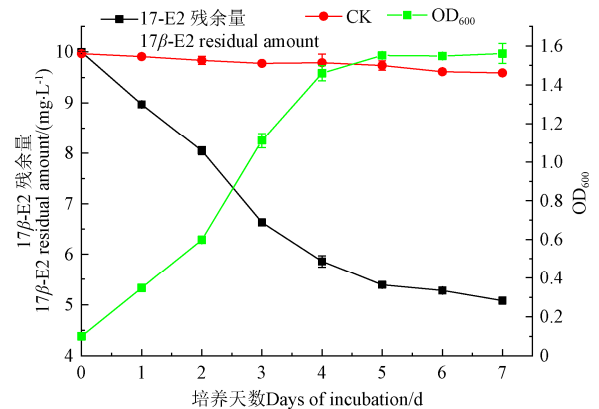


a. Growth curves of strain cultured at different temperatures b. End-products of estrogen at different temperatures c. Change of degradation rate with temperature

图 4 温度对菌株 SS-1 的影响

Fig.4 Effect of temperature on strain SS-1

现出不同的降解率。结果显示, 30 $^{\circ}$ C 条件下, 菌株 SS-1 表现出最优的降解率, OD<sub>600</sub> 值最大, 菌体长势最好。图 4a 显示了不同温度下菌株的生长量变化情况, 温度过高或过低都不利于菌株生长, 菌株适宜生长范围为 25~35 $^{\circ}$ C。图 4b 表明 SS-1 在降解 17 $\beta$ -E2 过程中, 会转化为 E1 和 E3, 随温度的升高, E2 的降解率呈现先增加后降低的趋势, 这与 OD<sub>600</sub> 表现出正相关的趋势, 菌体细胞密度越大, 菌种活性越好, 降解率越高。在转化成的 E1 和 E3 中, E1 占主要部分, 20~30 $^{\circ}$ C 条件下菌株产生的 E1 随温度的升高而增多, 说明菌株的活性增加会促进 E1 的产生, 总体上 E3 生成量相对较少, 说明菌株在降解过程中向着雌激素活性较低的 E1 转化。图 4c 表明菌株在 10~40 $^{\circ}$ C 对总雌激素的去除率, 结果表明该菌株对温度具有较好的耐受范围, 在 25~35 $^{\circ}$ C 生长更好, 降解率较高, 30 $^{\circ}$ C 时 17 $\beta$ -E2 降解率可达 46.4%。随着温度的升高, 17 $\beta$ -E2 的降解率呈先上升后下降的规律, 这是因为不同温度下物质的溶解度不一, 且温度也是影响微生物膜液晶结构、蛋白质合成与酶活性的关键因素之一。温度过低制约了降解酶的合成, 阻碍了有机污染物在水相及生物膜间的扩散, 因此 10 $^{\circ}$ C 时, 菌株繁殖速度及 17 $\beta$ -E2 降解率较低。随着温度升高, 菌株中降解酶活性增强, 生化反应速率加快, 进而降解上升。温度过高时, 酶的结构改变, 从而导致酶不可逆的失活, 微生物生命活动受限, 因此 40 $^{\circ}$ C 时, 菌株生长量及降解率明显下降。



注: CK 曲线为空白对照组 17 $\beta$ -E2 浓度。OD<sub>600</sub> 为 600 nm 波长处的吸光值。  
Note: Curve CK refers to the 17 $\beta$ -E2 concentration of the blank control group. OD<sub>600</sub> is the absorption value at the wavelength of 600 nm.

图 3 菌株 SS-1 降解特性

Fig.3 Degradation characteristics of strain SS-1

### 2.4.2 pH 值

菌株 SS-1 在不同 pH 值条件下对 17 $\beta$ -E2 降解影响如图 5 所示，培养 7 d 后，菌株在 pH 值为 5~9 范围内均有一定的降解效果。图 5a 显示了培养周期内菌株的生长量变化情况，菌株在中性条件下长势最优，最适 pH 值顺序依次为：7、8、9、6、5。图 5b 显示，菌株的 OD<sub>600</sub> 呈现先升高后降低的趋势，说明在 pH 值为 7 时，菌株的长势最好，17 $\beta$ -E2 的浓度呈现先降低，后趋于平缓的趋势，说明在碱性条件下，菌株对 17 $\beta$ -E2 的降解能力更优。

降解过程中仍会产生 E1 和 E3，弱碱性条件下产生的 E3 的量小于弱酸性条件下产生 E3 的量，而产生的 E1 的量大于弱酸性条件下产生 E1 的量，说明在酸性环境中更有利于 E3 的产生。由图 5c 可知，在 pH 值为 7 时，17 $\beta$ -E2 降解率最高，总雌激素去除率最好，分别为 45.1% 和 37.5%。在 pH 值为 5 时，OD<sub>600</sub> 值最低，17 $\beta$ -E2 降解率约为 11%。菌株在酸性条件下的适应力明显低于在碱性条件下的适应力，说明菌株适合在中性及弱碱性的环境中生存。

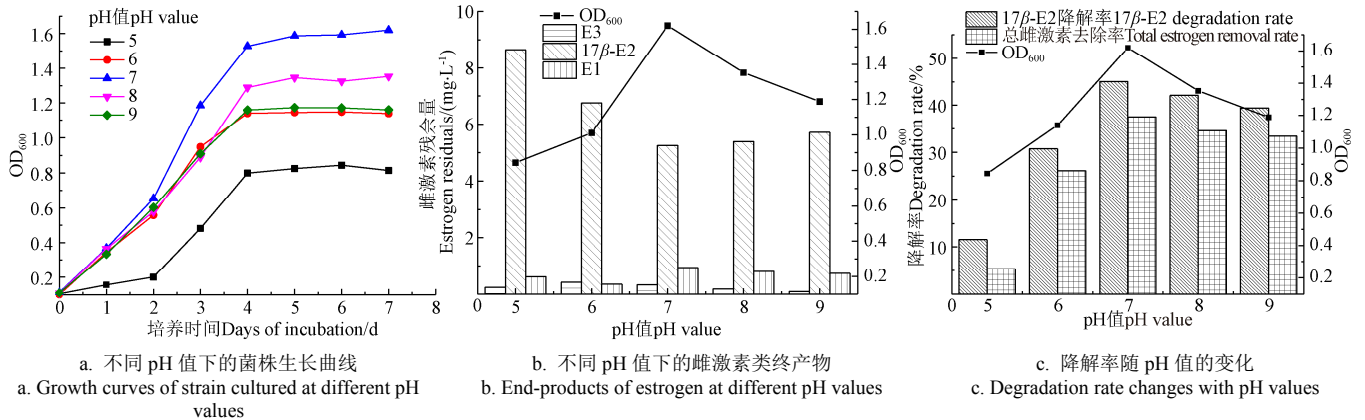


图 5 pH 值对菌株 SS-1 的影响  
Fig.5 Effect of pH value on strain SS-1

### 2.4.3 底物浓度

不同底物浓度对菌株 SS-1 的生长发育和降解特性具有不同的影响如图 6 所示，培养 7 d 后，菌株可不同程度地降解各浓度的 17 $\beta$ -E2。图 6a 显示了 1~10 mg/L 底物浓度下菌株的生长量变化情况，菌株适宜底物浓度范围为 5~10 mg/L。由图 6b 可知，在不同的底物浓度下，仍然会检测到一定浓度的 E1、17 $\beta$ -E2 和 E3，结果表明，在 7 d 时间内菌株并不能完全降解 17 $\beta$ -E2，且在底物浓度为 1 和

3 mg/L 的情况下，E1 的浓度大于 17 $\beta$ -E2，说明菌株在降解 17 $\beta$ -E2 过程中更趋于向 E1 转化。在 5 mg/L 时，菌株 OD<sub>600</sub> 值最高达到 1.625，说明该浓度下，菌株长势最好。高浓度下 OD<sub>600</sub> 值减小，说明高浓度的 17 $\beta$ -E2 抑制了菌株的生长。图 6c 显示了菌株对雌激素的去除率，在最适浓度条件（底物浓度 5 mg/L）下，菌株对 17 $\beta$ -E2 的去除率为 71.4%，总雌激素去除率为 56.8%。随底物浓度的升高，菌株对 17 $\beta$ -E2 的去除率呈现先升高后降低的趋势。

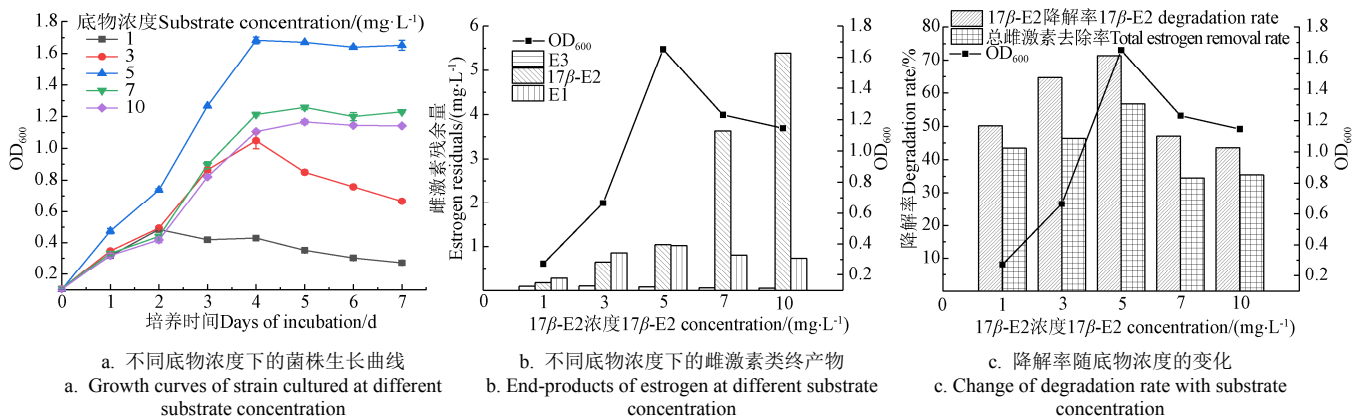


图 6 底物浓度对菌株 SS-1 的影响  
Fig.6 Effect of substrate concentration on strain SS-1

### 2.5 正交试验结果

以菌株对 17 $\beta$ -E2 的去除率为目标函数的正交试验结果如表 1 所示，由极差分析的 R 值和方差分析的 F 值可知，影响菌株对 17 $\beta$ -E2 去除率的因素从大到小依次为底物浓度、温度、pH 值。且各影响因素的方差分析结果均表现为显著影响 (P<0.05)。结合 K 值大小

和方差分析结果可以得出最佳降解因素组合为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>。即正交试验结果表明，菌株对 17 $\beta$ -E2 的最适降解条件为温度 35 °C、pH 值为 7、底物浓度 5 mg/L。在最适条件下进行降解试验，重复 3 次，取重复试验数据平均值。试验结果显示，菌株在该条件下培养 7 d 后对 17 $\beta$ -E2 降解率为 97.09%。

表 1 正交试验结果  
Table 1 Results of orthogonal experimental

序号 No.	因素 Factors			17 $\beta$ -E2 去除率 17 $\beta$ -E2 removal rate/%
	温度 Temperature/ °C	pH 值 pH value	底物浓度 Substrate concentration/(mg·L <sup>-1</sup> )	
1	25	6	3	57.70
2	25	7	5	82.29
3	25	8	7	51.81
4	30	6	5	54.86
5	30	7	7	47.87
6	30	8	3	67.27
7	35	6	7	50.87
8	35	7	3	96.37
9	35	8	5	93.18
$\bar{K}_1$	63.933	54.476	73.779	
$\bar{K}_2$	56.665	75.510	76.775	
$\bar{K}_3$	80.139	70.751	50.183	
R	23.474	21.034	26.592	
离差平方和 Sum of squares	866.464	729.966	1 272.869	
自由度 Degree of freedom	2	2	2	
均方 Mean square	433.232	364.983	636.435	
F 值 F value	279.254	235.262	410.235	
显著性 Significance	*	*	*	

注: \* 表示显著 ( $P < 0.05$ )。

Note: \* indicates significance ( $P < 0.05$ ).

### 3 讨论

相较于物理法和化学法,生物法不仅可以高效降解 SEs,而且环境友好。目前被报道的 80 余株 SEs 降解菌中,变形菌门最多,放线菌门和厚壁菌门次之<sup>[14]</sup>。其中,鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas* sp.)、香茅醇假单胞菌 (*Pseudomonas citronellolis*) 及马红球菌 (*Rhodococcus equi*) 等,都能不同程度降解几种类固醇雌激素<sup>[15-16]</sup>。本研究于沼灌土壤中分离出的 17 $\beta$ -E2 专性降解菌株为生丝微菌属 (*Hyphomicrobium* sp.),在以 10 mg/L 17 $\beta$ -E2 培养基培养 7 d 后,培养基中除含有 51% 的初始底物 17 $\beta$ -E2 外,还伴随着 E1 和 E3 的生成,这是因为 E2 在微生物降解过程中会被转化为低雌激素活性的产物。Zhang 等<sup>[17]</sup>分离出的苍白杆菌属 (*Ochrobactrum* sp.) 菌株 FJ1 降解 E2 的主要降解产物也是 E1,并且随着反应进行 E1 能够进一步被降解为其他化合物。此外,本研究菌株 SS-1 降解 17 $\beta$ -E2 符合一级降解动力学方程,决定系数值 ( $R^2$ ) 为 0.905,降解半衰期为 7.07 d。吴蔓莉等<sup>[18]</sup>从污水处理厂好氧池活性污泥中分离出的镰刀菌属 (*Fusarium* sp.) Wu-SP1,对不同初始浓度 E2 进行一级动力学拟合,结果显示  $R^2$  均大于 0.9,降解均符合一级动力学反应。

改变菌株生存的环境条件如温度、pH 值和底物浓度等会影响微生物活性,进而造成菌株降解 SEs 的能力有所不同。本研究菌株 SS-1 最适繁殖、降解温度范围为 25~35 °C,在温度单因素影响试验中 30 °C 时降解率达最高

值。郭海慧<sup>[19]</sup>也发现筛选出的生丝微菌 (*Hyphomicrobium* sp.) 最适温度为 30 °C,过高或过低温度都不利于菌株降解雌激素。菌株的生长状况和诱导酶都受到温度的影响,这两个因素也是影响菌株降解污染物能力的关键,高温或低温会减慢菌株生长代谢速率,酶产量减少,导致降解率下降<sup>[20]</sup>。pH 值同样可以影响菌株繁殖和诱导酶。菌株 SS-1 最适 pH 值为 7~9,在 pH 值为 7 时降解率最高。这与石月娥<sup>[21]</sup>的研究结果相似,中性条件更适宜戈登式菌 (*Gordonia*) 生长,且降解 E2 的能力高于酸碱性环境。相较于弱酸性环境,本试验中菌株 SS-1 更倾向于弱碱性环境中生长,降解率也更高。刘敏<sup>[22]</sup>也表明在弱酸性环境中,E1 和 E2 的生物降解率仅为 30%~40%,但在弱碱性环境时降解率有所提高。因为菌株在降解污染物的过程中会生成酸性产物,致使弱碱性的生存环境中趋向于中性环境<sup>[23]</sup>。此外,过酸和过碱的环境都会破坏微生物结构,进而制约微生物活性和代谢<sup>[24]</sup>。菌株最适底物浓度为 5 mg/L,菌株的活性会被高浓度的 17 $\beta$ -E2 抑制,从而导致降解率降低。方振炜等<sup>[25]</sup>也发现底物浓度过高会对菌株产生毒害作用。

### 4 结论

本研究从畜禽养殖场沼灌区土壤中分离、筛选,得到了一株可降解 17 $\beta$ -E2 的优势菌株 SS-1,16S rDNA 鉴定其为生丝微菌属 (*Hyphomicrobium* sp.)。在设置的各组不同温度、pH 值及底物浓度单因素条件下培养菌株 SS-1,菌株的降解能力变化显著,降解率随温度、pH 值及底物浓度的升高先呈阶梯式上升后逐渐减小。正交试验表明各因素对菌株降解能力的影响顺序从小到大为底物浓度、温度、pH 值,且各因素均为显著影响 ( $P < 0.05$ )。该菌株最适生长环境为温度 35 °C、pH 值为 7、底物浓度 5 mg/L。菌株在最适条件下培养 7 d 后对 17 $\beta$ -E2 降解率为 97.09%。

本研究可为生物在沼液这类复杂基质环境中降解 17 $\beta$ -E2 提供新型功能菌株,并为解决农业生态系统中养殖场沼液灌溉区类固醇雌激素污染等问题提供有效途径。

#### [参 考 文 献]

- [1] Khanal S K, Xie B, Thompson M L, et al. Fate, Transport, and biodegradation of natural estrogens in the environment and engineered systems[J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(21): 6537-6546.
- [2] 崔鹏程. 鸡粪中雌激素污染物的检测及微生物降解[D]. 长春: 吉林农业大学, 2020.  
Cui Pengcheng. Detection and Microbial Degradation of Estrogen Contaminants in Chicken Feces[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2020. (in Chinese with English abstract)
- [3] 刘姝芳, 李艳霞, 张雪莲, 等. 东北三省畜禽养殖类固醇雌激素排放及其潜在污染风险[J]. *环境科学*, 2013, 34(8): 3180-3187.  
Liu Shufang, Li Yanxia, Zhang Xuelian, et al. Excretion of manure-borne steroid hormones and their potential risk in the three northeast provinces of China[J]. *Environmental Science*,

- 2013, 34(8): 3180-3187. (in Chinese with English abstract)
- [4] Xu E G, Liu S, Ying G G, et al. The occurrence and ecological risks of endocrine disrupting chemicals in sewage effluents from three different sewage treatment plants, and in natural seawater from a marine reserve of Hong Kong[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2014, 85(2): 352-362.
- [5] Hu S, Zhang H, Shen G, et al. Effects of 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethynylestradiol on the embryonic development of the clearhead icefish (*Protosalanx hyalocranium*)[J]. *Chemosphere*, 2017, 176: 18-24.
- [6] 国家环境保护总局. 2000 年中国环境状况公报[R]. 北京: 中国环境保护总局, 2000.
- [7] Tremblay L A, Gadd J B, Northcott G L. Steroid estrogens and estrogenic activity are ubiquitous in dairy farm watersheds regardless of effluent management practices[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2018, 253: 48-54.
- [8] Gall H E, Sassman S A, Jenkinson B, et al. Comparison of export dynamics of nutrients and animal-borne estrogens from a tile-drained Midwestern agroecosystem[J]. *Water Research*, 2015, 72: 162-173.
- [9] Zhang F S, Xie Y F, Li X W, et al. Accumulation of steroid hormones in soil and its adjacent aquatic environment from a typical intensive vegetable cultivation of North China[J]. *Science of the Total Environment*, 2015, 538: 423-430.
- [10] Fujii 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]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2002, 68(4): 2057-2060.
- [11] Takeshi Y, Fumiko N, Junji, et al. Degradation of estrogens by *Rhodococcus zopfii* and *Rhodococcus equi* isolates from activated sludge in wastewater treatment plants[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2004, 70(9): 5283.
- [12] 于清淼, 王平, 刘东波, 等. 17 $\beta$ -雌二醇降解菌红球菌 (*Rhodococcus* sp.) DS201 的分离鉴定及其特性研究[J]. 东北师大学报 (自然科学版), 2017, 49(1): 140-147.  
Yu Qingmiao, Wang Ping, Liu Dongbo, et al. Isolation, identification of 17 $\beta$ -estradiol-degrading *Rhodococcus* sp. strain DS201 and its degradation characteristics[J]. *Journal of Northeast Normal University (Natural Science Edition)*, 2017, 49(1): 140-147. (in Chinese with English abstract)
- [13] 都韶婷, 金崇伟, 刘越. 水体类固醇雌激素污染现状研究进展[J]. *环境科学*, 2013, 34(9): 3358-3367.  
Du Shaoting, Jin Chongwei, Liu Yue. A review on current situations of steroid estrogen in the water system[J]. *Environmental Science*, 2013, 34(9): 3358-3367. (in Chinese with English abstract)
- [14] 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.  
Zhang Fangfang, Qin Dan, Gao Liangmin, et al. Microbial degradation of estrogens in the environment[J]. *Microbiology China*, 2012, 39(5): 711-721. (in Chinese with English abstract)
- [15] 史江红, 韩蕊, 宿凌燕, 等. 某污水处理厂中 17 $\alpha$ -乙炔基雌二醇降解菌的分离鉴定及其降解特性[J]. *环境科学学报*, 2010, 30(12): 2414-2419.  
Shi Jianghong, Han Rui, Su Lingyan, et al. Isolation and identification of a 17 $\alpha$ -ethynylestradiol-degrading strain from a wastewater treatment plant and its degradation characteristics[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2010, 30(12): 2414-2419. (in Chinese with English abstract)
- [16] Kurisu F, Ogura M, Saitoh S, et al. Degradation of natural estrogen and identification of the metabolites produced by soil isolates of *Rhodococcus* sp. and *Sphingomonas* sp.[J]. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 2010, 109(6): 576-582.
- [17] Zhang Q, Xue C, Owens G, et al. Isolation and identification of 17 $\beta$ -estradiol degrading bacteria and its degradation pathway[J]. *Journal of Hazardous Materials*. 2022, 423: 127185.
- [18] 吴蔓莉, 祝长成, 祁燕云, 等. 1 株镰刀菌属 KY123915 的分离及其对 17 $\beta$ -雌二醇的降解特性[J]. *环境科学*, 2018, 39(10): 4802-4808.  
Wu Manli, Zhu Changcheng, Qi Yanyun, et al. Isolation, identification and degradation characteristics of a 17 $\beta$ -estradiol degrading strain *Fusarium* sp. KY123915[J]. *Environmental Science*, 2018, 39(10): 4802-4808. (in Chinese with English abstract)
- [19] 郭海慧. EE2 降解菌的筛选及其在植物-微生物联合修复污染土壤中的应用[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2018.  
Guo Haihui. Screening EE2 Degradation Bacteria and Remediation of EE2 Contaminated Soil with Plants[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2018. (in Chinese with English abstract)
- [20] Ye J S, Yin H, Qiang J, et al. Biodegradation of anthracene by *Aspergillus fumigatus*[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 185(1): 174-181.
- [21] 石月娥. 雌激素在畜禽粪便改良农田土壤中的迁移转化及修复[D]. 长春: 吉林大学, 2016.  
Shi Yue'e. Fate, Transformation, and Remediation of Estrogens in Livestock Manure-amended Agricultural[D]. Changchun: Jilin University, 2016. (in Chinese with English abstract)
- [22] 刘敏. 畜禽粪便土地利用中典型内固醇雌激素的分析和降解研究[D]. 广州: 暨南大学, 2011.  
Liu Min. The Study on Analysis and Degradation of Typical Steroid Estrogens in Animal Waste during Land Use[D]. Guangzhou: Jinan University, 2011. (in Chinese with English abstract)
- [23] Zhao H P, Wu S Q, Wang L, et al. Degradation of phenanthrene by bacterial strain isolated from soil in oil refinery fields in Shanghai China[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 164(2/3): 863-869.
- [24] Silva I S, Grossman M, Durrant L R, et al. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons(2-7rings) under microaerobic and very-low-oxygen conditions by soil fungi[J]. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2009, 63(2): 224-229.
- [25] 方振炜, 徐德强, 张亚雷, 等. 2, 6-二叔丁基酚降解菌的降解特性研究[J]. *环境科学*, 2004, 25(3): 98-101.  
Fang Zhenwei, Xu Deqiang, Zhang Yalei, et al. The degradation characteristics of degrading bacterium of 2, 6-Di-tert-butylphenol[J]. *Environmental Science*, 2004, 25(3): 98-101. (in Chinese with English abstract)

## Isolation, screening, and degradation characteristics of 17 $\beta$ -estradiol obligate degradation bacteria in the soil of marsh irrigation

Yu Weiwei<sup>1</sup>, Shu Minghui<sup>1</sup>, Xie Mingyuan<sup>1</sup>, Zhang Minne<sup>1</sup>, Liu Cong<sup>2</sup>, Yang Shuo<sup>1</sup>, Wan Qiaoling<sup>3</sup>, Mao Yufeng<sup>1</sup>,  
Chen Jieyun<sup>4</sup>

(1. Key Laboratory of Hydraulic and Waterway Engineering of the Ministry of Education, School of River and Ocean Engineering, Chongqing Jiaotong University, Chongqing 400074, China; 2. Southwest Technology and Engineering Research Institute, Chongqing 400039, China; 3. Chongqing Yudong Water Affairs Co., Ltd., Chongqing 404000, China; 4. Chongqing Yubei District Construction Management Affairs Center, Chongqing 401120, China)

**Abstract:** Biogas slurry has been usually reused on-site in intensive livestock and poultry farms. It can also inevitably bring the accumulation and pollution of Steroid Estrogens (SEs) while recycling the organic matter during production. This study aims to reduce the pollution risk of SEs to the soil and water environment after biogas irrigation. The enrichment and purification were also adopted to isolate and screen the estrogen-degrading bacteria in the soil of a dairy farm in the southwest China of the biogas irrigation areas. A strain of estrogen-degrading bacteria was obtained, where the 17 $\beta$ -estradiol (17 $\beta$ -E2) was used as the only carbon source for growth and reproduction. The strain was homologated by the 16S rDNA gene sequences, further to identify the species for the subsequent 17 $\beta$ -E2 degradation tests. The strains were then characterized at different temperatures (10, 20, 25, 30, 35, 37, and 40 °C), pH values (5, 6, 7, 8, and 9), substrate concentrations (1, 3, 5, 7, and 10 mg/L) degradation characteristics. A three-factor and three-level orthogonal test was continued to optimize the degradation conditions of the strain. The results show that a dominant strain isolated from the sample was identified as *Hyphomicrobium* sp., named *Hyphomicrobium* sp. SS-1. There were varying degrees of degrading the 17 $\beta$ -E2 under the conditions of 10-40 °C, pH value of 5 ~ 9, and substrate concentration of 1-10 mg/L. Specifically, the degradation rate of 17 $\beta$ -E2 by strains showed a trend of increasing first and then decreasing, with the increase of temperature, pH value, and substrate concentration. The optimal growth temperature of the strain was achieved at 30 °C in the environmental temperature test, indicating that the high temperature was not conducive to the growth and metabolism of the strain. The degradation rate of 17 $\beta$ -E2 increased first and then decreased, with the increase in temperature, where the maximum degradation was 46.4% at 30 °C. Furthermore, the presence of E1 and E3 estrogenic products was accompanied by the degradation of 17 $\beta$ -E2. In addition, the strain was more adapted to the alkaline condition rather than the acidic in the pH value test. The optimal sequence of pH values for the growth of the strain was ranked in the descending order of 7, 8, 9, 6, 5. The degradation rate was higher in the alkaline environment than that in the acidicones. Particularly, the degradation rate of 17 $\beta$ -E2 and the removal rate of total estrogen were 45.1% and 37.5%, respectively, in the pH value of the 7 test group. In the substrate concentration, the growth state of the strain at 5 mg/L substrate concentration was much better than the others, while the degradation rate of 17 $\beta$ -E2 reached 71% after 7 days of incubation. There was also less toxic than E2 degradation products E1 and E3 generation, where the total estrogen removal rate was 56.8%. The metabolism was inhibited significantly, with the increase in the substrate concentration strain growth. The orthogonal test showed that the influencing factors on the degradation ability of the strain were ranked in the order of substrate concentration > temperature > (pH value, indicating all significant effects. The optimal degradation conditions were achieved for the strain, including the temperature 35 °C, pH 7, and substrate concentration of 5 mg/L. Consequently, the degradation rate of 17 $\beta$ -E2 reached 97.09% by the strain after being cultured for 7 days under optimum conditions. This finding can provide high-quality strain resources for the microbial degradation of SEs in complex substrate environments. Anyway, the effective way can be widely expected for the estrogen pollution remediation in methane irrigated soil.

**Keywords:** degradation; microorganism; 17 $\beta$ -estradiol (17 $\beta$ -E2); *Hyphomicrobium* sp.; degrading bacteria; soil pollution