



环境雌激素的微生物降解

田克俭¹, 孟繁星¹, 霍洪亮^{1,2*}

¹ 东北师范大学环境学院, 吉林 长春 130117

² 吉林省水污染控制与资源化工程实验室, 吉林 长春 130117

摘要: 雌激素作为环境内分泌干扰物的一类重要物质, 生物降解法是最为经济、最为绿色和最为适用的去除方法。通过分析雌激素的主要来源和危害、国内外雌激素降解菌的筛选与鉴定、类固醇雌激素降解酶的表达与检测、雌激素降解菌的基因组学特征以及雌激素的降解途径和机制, 进一步阐述了雌激素生物降解的研究现状与进展, 对未来的研究工作作出了展望。

关键词: 雌激素, 降解菌, 降解酶, 生物降解机制

环境雌激素污染已经成为全球性问题, 严重影响人类健康和生态平衡, 治理环境雌激素污染成为人们关注热点。环境雌激素广泛存在于人类和动物排泄物、植物性化合物以及塑料制品和残留农药中, 其中人类和各种大型家畜排泄物中类固醇雌激素是城镇和农村地表水重要污染源。主要的环境雌激素有雌酮(Estrone, E1)、17 β -雌二醇(17 β -estradiol, E2)、雌三醇(Estriol, E3)和孕酮等。另外, 人工合成雌激素 17 α -乙炔基雌二醇(17 α -ethynyl estradiol, EE2)也是主要环境雌激素污染物之一。它们均具有脂溶性和很强的生物活性, 与其他内分泌干扰素(EDCs)相比较有更强的内分泌干扰作用, 对人类健康和生态环境的影响

最为显著, 在极低的浓度下(1.0 ng/L)就会对生物体产生明显的影响, 有严重的致畸致癌作用, 能诱发雄性个体雌性化, 引发女性肿瘤、癌症、男性不育和儿童性早熟等。因此, 世界卫生组织已将雌激素列为一类致癌物和重要环境污染物。目前, 去除污水中环境雌激素的方法主要采用微生物降解法。筛选强化高效雌激素降解菌、建立活性污泥降解菌菌群优势生态位和调控菌体雌激素降解酶表达是污水处理场降解环境雌激素的关键性工作。本文将主要总结近年来开展环境雌激素主要降解菌、类固醇雌激素降解酶以及雌激素微生物代谢途径等相关研究工作, 为今后在污水处理中构建和利用工程微生物以及开展相关研究提

基金项目: 国家自然科学基金(51478096); 吉林省自然科学基金(20180101083JC)

*通信作者。Tel: +86-431-89165602; E-mail: huohl@nenu.edu.cn

收稿日期: 2018-05-14; 修回日期: 2018-08-26; 网络出版日期: 2018-11-28

供理论依据。

1 雌激素降解菌

雌激素的微生物降解主要是通过细菌以及少部分真菌和藻类植物完成, 降解菌大多是在污水处理厂活性污泥中分离或是根据雌激素来源在农田土壤或堆肥中分离。目前, 被报道的雌激素降解菌已经有 80 余种, 它们在一定时间范围内对雌激素的降解效率都能达到 90% 以上。在这其中, 变形菌门最多, 有 44 株, 其次是放线菌门有 16 株, 厚壁菌门 12 株。其他菌门菌株数量较少, 如拟杆菌门只有 3 株。

在变形菌门, 对高浓度雌激素降解率大多高于 95%。 α -变形菌纲有 6 株, 主要以鞘氨醇单胞菌属为主。如鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp.)ED8 菌株, 对 E2 降解率达到 100%^[1]; γ -变形菌纲有 4 株, 主要以假单胞菌属为主, 如铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)BP3 菌株, 对浓度为 3.6 mg/L 的 E3 在 24 h 降解率达到 99%^[2]; β -变形菌纲有 3 株, 其中 2 株是皮氏罗尔斯顿菌属, 如皮氏罗尔斯顿菌(*Ralstonia pickettii*) BP2 雌激素降解率达到 100%。在放线菌门, 菌株对高浓度雌激素具有更好的底物适应性, 菌体生长无延迟。同时, 雌激素降解效率和降解率相对较高。目前在已经筛选鉴定的 16 株放线菌中, 高效降解菌有 5 株, 均属于红球菌属(*Rhodococcus* sp.), 并且对雌激素 E1、E2、E3 和 EE2 的降解率全部都大于 95%, 例如马红球菌(*Rhodococcus equi*) Y50156 对浓度为 100 mg/L 的上述 4 种主要雌激素降解率在 24 h 内均大于 95%^[3]。因此, 红球菌可能是构建雌激素降解工程菌的优势备选菌株之一。

除以上菌株外, 表 1 列出 23 种根据雌激素的

初始浓度、培养时间以及降解率等因素筛选出的雌激素高效降解菌, 另有 60 余种未列出。

2 雌激素降解酶

微生物降解雌激素主要是通过酶促反应来完成。Chen 等^[4]对鞘氨醇单胞菌 KC8 降解酶研究表明, 由 OecA 编码的 $3\beta,17\beta$ -羟基类固醇脱氢酶、OecB 编码的雌酮-4-羟化酶、OecC 编码的 4-羟基雌酮 4,5-双加氧酶是菌株雌激素降解的关键酶。Khunjar 等^[5]研究表明, 欧洲亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas europaea*)在降解 EE2 时, 氨单加氧酶发挥重要作用, 并且可以与异养菌产生协同作用。通过对不动杆菌(*Acinetobacter* sp.) Sphe3 和 AGAT-W 研究发现, 双加氧酶和邻苯二酚双加氧酶也是降解类固醇雌激素的重要酶系, 它们分别负责苯环氧分子的催化反应以及芳香环的彻底开环裂解, 是多环芳烃化合物降解起始和彻底代谢的关键酶^[6-7]。王平等^[8]在以雌二醇为唯一碳源的不动杆菌 DSSKY-A-001 培养中, 双加氧酶和邻苯二酚 1,2 双加氧酶得到表达, 并推测可能参与雌二醇的生物降解过程。

学者对放线菌门雌激素降解酶的研究更为详细。以红球菌属为例, 已知参与类固醇雌激素分解代谢的酶共有 60 余种, 主要分为脱氢酶、羟化酶/单加氧酶、双加氧酶、水解酶、水合酶以及其他辅酶等。前三种酶在类固醇雌激素分解代谢过程中起主要作用。脱氢酶以 3-类固醇- Δ^1 -脱氢酶为代表的类固醇脱氢酶(KSTD)研究最为深入。Geize 等^[9]通过活性染色的方法还发现, 在红平红球菌(*Rhodococcus erythropolis*) SQ1 中, 存在 2 种 KSTD, 分别是 KSTD1 和 KSTD2。两种酶均在 4-雄甾烯-3,17-二酮(AD)和 9α -羟基-4-雄甾烯-3,17-

表 1. 已分离的雌激素降解菌
Table 1. Isolated estrogen-degrading bacteria

Phylogenetic affiliation	Name	Degradation ability and mechanism	Concentration	Degradation rate/%	Time/h	References
Alpha-proteobacteria	<i>Sphingomonas</i> sp. ED8	E1, E2	E2: 0.8 mg/4 mL E1: 0.8 mg/4 mL	100.0 90.0	120 120	[1]
	<i>Sphingomonas</i> sp. KC8	E1, E2	E1: product E2: 3 mg/L	100.0 100.0	72 24	[10]
	<i>Sphingomonas</i> sp. CYH	E1, E2	E2: 500 µg/L E1: 500 µg/L	100.0 100.0	48 48	[11]
	<i>Novosphingobium tardaugens</i> ARI-1	E1, E2, E3	E3: 10 mg/30 mL	100.0	240	[12]
	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> BP1	E1, E2, E3, co-metabolism EE2	E1: 3.2 mg/L	99.0	24	[2]
	<i>Brevundimonas diminuta</i> 1	E1, E2, EE2	E2: 3.5 mg/L E1: 2 mg/L EE2: 3 mg/L	100.0 95.0 99.0	24 96 360	[13]
	Beta-proteobacteria	<i>Ralstonia pickettii</i> BP2	E1, E2, E3, co-metabolism EE2	E2: 2.3 mg/L	100.0	48
<i>Ralstonia</i> sp. <i>picketii</i>		E1, E2		100.0	72	[14]
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>		E1, E2	E2: 1.5 mg/L	100.0	3	
Gamma-proteobacteria	<i>Pantoea agglomerans</i> ES1	EE2	EE2: 10 mg/L	97.0	288	[15]
	<i>Pseudomonas citronellolis</i> SS-2	E1, E2, EE2	E1: 2 mg/L	99.0	36	[16]
			E2: 2 mg/L	99.0	36	
			EE2: 4 mg/L	93.6	168	
<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> BP3	E1, E2, E3, co-metabolism EE2	E1: 3.6 mg/L	99.0	24	[2]	
Firmicutes	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TJ1	E2	E2: 5-15 µg/L	100.0	2	[17]
	<i>Virgibacillus halotolerans</i> LF1	E1, E2	E2: 5 mg/L	100.0	504	[18]
			E1: product	100.0	768	
	<i>Bacillus flexus</i> LF3	E1, E2	E2: 5 mg/L	98.0	768	
	<i>Bacillus</i> sp. E2Y1	E1, E2	E2: 1 mg/L	100.0	144	[19]
	<i>Bacillus</i> sp. E2Y2	E2	E2: 1 mg/L	100.0	96	
	<i>Bacillus</i> sp. E2Y4	E1, E2	E2: 1 mg/L	100.0	144	
Actinobacteria	<i>Rhodococcus equi</i> Y50155	E1, E2, E3, EE2	E2: 100 mg/L	99.0	24	[3]
			E1: 100 mg/L	99.0	24	
			E3: 100 mg/L	72.0	24	
			EE2: 100 mg/L	80.0	24	
	<i>Rhodococcus equi</i> Y50156	E1, E2, E3, EE2	E1: 100 mg/L	99.0	24	
			E2: 100 mg/L	99.0	24	
			E3: 100 mg/L	95.0	24	
			EE2: 100 mg/L	96.0	24	
	<i>Rhodococcus zopfii</i> Y50158	E1, E2, E3, EE2	E1: 100 mg/L	100.0	24	
			E2: 100 mg/L	100.0	24	
			E3: 100 mg/L	100.0	24	
			EE2: 100 mg/L	100.0	24	
	<i>Rhodococcus rubber</i> KC4	E2	E2: 3 mg/L	99.0	24	[4]
<i>Rhodococcus equi</i> DSSKP-R-001	E1, E2, E3, EE2	E1: 30 mg/L	100.0	96	This study	
		E2: 30 mg/L	100.0	96		
			E2: 30 mg/L	90.0	96	

二酮(9OHAD)的降解过程中起作用。通过基因敲除进一步证明, 其中 KSTD1 失活, 该菌株仍能使类固醇底物 A 环发生 C1、2 位脱氢反应^[20], 说明 KSTD1 同工酶在反应过程中还起到一定作用。羟化酶中 3-甾酮-9 α -羟基化酶(KSH)也是广泛存在于甾醇化合物降解菌中的一种双组分铁含硫单加氧酶, 由终端氧化酶(kshA)和还原酶两部分(kshB)组成^[21], 能在多元环的 9 位加入一个羟基(9 α -OH), 并且与 KSTD 一同参与类固醇母核 B 环的碳骨架断裂^[22-23]。2002 年, Geize 等^[24]首先对红平红球菌 SQ1 的 3-甾酮-9 α -羟基化酶编码基因 kshA 和 kshB 进行了分子鉴定。2009 年, Petrusma 等^[25]在大肠杆菌中表达了来自紫红红球菌(*Rhodococcus rhodochrous*) DSM 43269 的 kshA 和 kshB 基因, 并证明 kshB 将来自还原型辅酶 I (NADH)的还原力传递给 kshA, 后者催化底物的羟基化反应。2011 年, Petrusma 等^[26]分析了存在于紫红红球菌 DSM43269 基因组中的 5 个 kshA 基因产物的酶学特性, 发现 kshA1 到 kshA5 分属于 4 个不同的基因簇, 对于类固醇底物选择有很大的重叠性, 其中 kshA1 仅对胆酸具有一定的分解代谢能力,

而 KshA5 的多功能性与 KshA1 形成鲜明对比, 底物特异性较为广泛没有明显的底物偏好。红球菌属其他菌株的典型类固醇雌激素降解的主要酶见表 2。

3 雌激素降解菌基因组

基因组学在污染物降解菌的研究中的作用日渐重要, 对菌株降解能力以及底物偏好作出了更合理的判断和预测。雌激素降解菌的基因组学研究尚处于起步阶段, 目前已有部分类固醇降解菌进行了全基因组测序。例如, α -变形菌纲的鞘氨醇单胞菌 KC8、新鞘氨醇杆菌 Chol 11 以和交替赤杆菌 MH-B5, β -变形菌纲的睾丸酮丛毛单胞菌 ATCC11996 和伯克氏菌 CQ001, γ -变形菌纲的恶臭假单胞菌 SJTE-1、香茅醇假单胞菌 SJTE-3 和不动杆菌 DSSKY-A-001, 放线菌门的红球菌 DSSKP-R-001、红球菌 P14 和红球菌 RHA1 等。其中红球菌 RHA1 基因组最大, 为 9.7 Mb; 伯克氏菌 CQ001 次之, 为 7.27 Mb; 不动杆菌 DSSKY-A-001 最小, 仅为 3.13 Mb。大多数菌株基因组大小在

表 2. 红球菌属雌激素降解相关酶

Table 2. Estrogen degradation related enzymes of *Rhodococcus* sp.

Categories	Abbreviation	Encoding gene	Name	References
Dehydrogenase	HSD	hsd	3-hydroxysteroid dehydrogenase/5-4 isomerase	[27]
		hsd4A	17-hydroxysteroid dehydrogenase	[28]
			3 α -hydroxysteroid dehydrogenase	[29]
	KSTD	ksdD	3-indolone Δ 1-dehydrogenase	[28]
		kstD1	3-indolone Δ 1-dehydrogenase	
		kstD2	3-indolone Δ 1-dehydrogenase	[30]
		kstD3	3-keto-5-steroidal Δ 1-dehydrogenase	
Hydroxylase/ Monooxygenase	KSH	kshA	3-ketosteroid 9 α -hydroxylase oxygenase component	
		kshB	3-iketosteroid 9 α -hydroxylase	[31]
	Hsa	hsaA	Flavin-dependent monooxygenase	[31-32]
		hsaB	Flavin-dependent monooxygenase	[28, 31]
	Cyp	Cyp 450	Cytochrome P450	[33]
	cyp125	Member of the cholesterol catabolic gene cluster	[34]	
Dioxygenase		hsaC	2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase	[28]

5 Mb 左右。红球菌 RHA1 和新鞘氨醇杆菌 Chol 11 除染色体外还包含有 3 个质粒，其他菌株质粒数量较少或没有。除不动杆菌 DSSKY-A-001 之外，其他菌株均有较高的 GC 含量，最高为红球菌 P14 达到 70.42%。部分类固醇激素降解菌的基因组特征见表 3。

红球菌属对类固醇化合物表现出很强的降解能力因而研究较为深入。例如，红球菌 DSSKP-R-001 核苷酸序列全长为 5438826 bp，基因全长为 4917591 bp，占总核苷酸全长的 90.42%。通过数据库注释，得到编码蛋白基因 3736 个，参与代谢通路基因 2590 个，描述功能基因 3472 个以及物种分类基因 4292 个。虽然该菌株基因组不大，但包含的功能基因却非常丰富。又如伯克氏菌 CQ001 也具有较强烈的类固醇降

解功能^[43]，其基因组测序结果表明，基因全长为 7.57 Mb。70.1% 的基因可以在 COG 数据库注释到。其中，氨基酸转运和代谢的基因 741 个，脂质运输和新陈代谢的基因 308 个，碳水化合物的运输和新陈代谢的基因 395 个，次生代谢生物合成、转运和分解代谢的基因 260 个。在 KEGG 数据库注释发现 80.3% 的基因参与了 8 种类固醇化合物代谢途径。其中，碳水化合物代谢基因 268 个，氨基酸代谢基因 253 个，外源性化学物质生物降解和新陈代谢基因 165 个，脂质代谢基因 90 个等。

对于筛选的大量污染物降解菌，全基因组测序工作尚有很大的开展空间。基因组学、转录组学和蛋白质组学三者的相互融合也是未来污染物降解菌研究的重要方向。

表 3. 雌激素降解菌基因组特征

Table 3. Genomic characteristics of estrogen-degrading bacteria

Name	Total sequence length/bp	Contig N50/bp	GC content/%	Total number of Chr and Pla	CDS	Coding gene in COG	Coding gene in KEGG	References
<i>Pseudomonas putida</i> SJTE-1	5551505	79005	62.25	1	4915	4408	–	[35]
<i>Sphingomonas</i> sp. KC8	4074265	142404	63.70	1	3950	3531	–	[36]
<i>Altererythrobacter</i> MH-B5	3668441	339753	60.00	1	3475	–	–	[37]
<i>Pseudomonas citronellolis</i> SJTE-3	7309421 ^{Chr} 370338 ^{Pla}	–	67.04 ^{Chr} 56.57 ^{Pla}	2	6756	–	–	[38]
<i>Acinetobacter</i> DSSKY-A-001	3132860	18130	41.64	1	2963	2174	1770	[18]
<i>Rhodococcus</i> DSSKP-R-001	5438826	5252360	68.72	3	5180	3736	2590	This study
<i>Rhodococcus</i> sp. P14	5669990	23966	70.42	1	5501	–	–	[39]
<i>Rhodococcus</i> sp. RHA1	9702737	–	67.00	4	9145	–	–	[40]
<i>Comamonas testosteroni</i> ATCC 11996	5415699	250929	61.48	1	4985	–	–	[41]
<i>Novosphingobium</i> sp. Chol11	3660000	–	62.44	4	3532	–	–	[42]
<i>Burkholderia</i> sp. CQ001	7570308	82290	66.90	1	8632	6487	6931	[43]

Chr: Chromosome; Pla: Plasmid.

4 雌激素降解途径

类固醇雌激素是一类环戊烷多氢菲衍生物, 具有相同的母核结构, 一般能降解环戊烷多氢菲母核的菌株对 E1、E2 和 E3 均有降解能力, 其降解方式也很相似。EE2 是含有双苯环芳香族化合物, 是一类难降解物质, 能够单独降解 EE2 的微生物只有少量报道。但是, 当以 E1、E2 或者 E3 为碳源与 EE2 进行共代谢时, EE2 则能够被较高程度地降解。另外, E2 与 EE2 的比值对 EE2 本身的降解起重要作用, E2 浓度越高 EE2 的降解效率也越高^[2]。E2 和 E3 一般在脱氢酶的作用下首先代谢为 E1, 之后再进一步降解。E3 也可在脱氢酶作用下转化为 E2 之后再进一步降解。

由于 E2 是活性最高的天然雌激素, 对 E2 生物降解的研究相对广泛而深入, 目前已发现 E2 有多个不同的降解途径, 根据 E2 降解菌种属不同, 本文归纳为变形菌门途径、放线菌门途径和其他菌门途径。

变形菌门的 E2 降解菌主要有鞘氨醇单胞菌、欧洲亚硝化单胞菌、不动杆菌、木糖氧化无色杆菌和罗尔斯通氏菌, 各菌降解 E2 主要通过 A-D

四种途径完成, 如图 1 所示。鞘氨醇单胞菌 ED8 降解 E2 途径用 A 代表。主要通过加氧酶以及元劈裂作用从 B 环开始逐步裂解并进行进一步代谢^[1], 该途径的中间及末端产物尚未完全研究清楚。此外, 菌株 ED8 的双加氧酶还能通过途径 D1 将 E2 降解为 4-OH-E1, 但进一步降解产物未见报道。B 路径是欧洲亚硝化单胞菌将 E2 的 C-17 位置脱水生成雌甾四烯(Estratetraenol, E0)^[44], 并沿着这一路径继续降解, 这一过程主要是脱氢酶的作用。C 路径是木糖氧化无色杆菌(*Achromobacter xylosoxidans*)和罗尔斯通氏菌的混合菌液通过单加氧酶把 E2 降解为 16 α -OH-E1^[8], 之后进入未知降解途径。D 路径是不动杆菌(*Acinetobacter* sp.) DSSKY-A-001 通过脱氢酶作用把 E2 降解为 E1, 之后在加氧酶作用下在 C4 位置首先裂解形成代谢下游产物, 之后经过一系列的未知代谢途径^[18]。

放线菌门降解 E2 途径主要是红球菌属研究的比较详细, 均由菌株将 E2 首先降解成 E1, 之后再降解为 4-羟基雌酮, 然后主要通过 E-G 三种路径完成最终降解, 如图 2 所示。E 路径是马红球菌 DSSKP-R-001 在单加氧酶作用下通过在 C-16 位置上经单加氧酶羟基化生成 4,16-二羟基-雌酮,

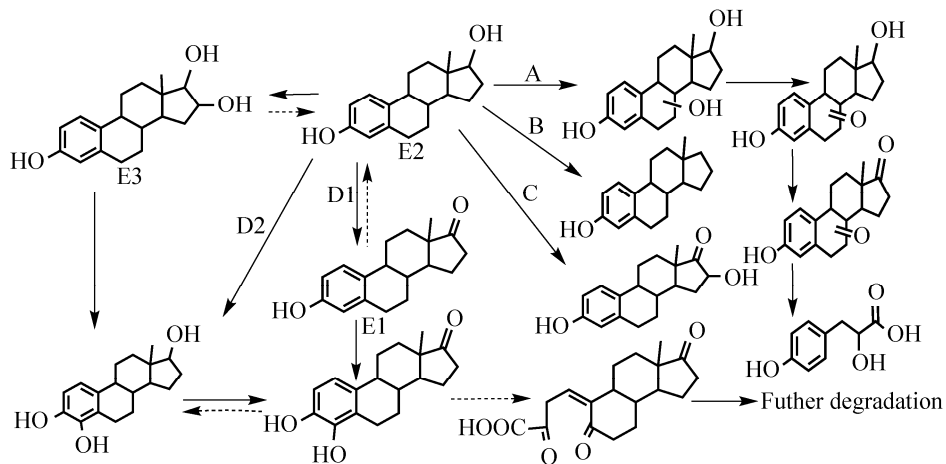


图 1. 变形菌门 5 种代表菌株对 E2 的生物降解途径

Figure 1. Biodegradation pathway of E2 by five representative strains of Proteobacteria.

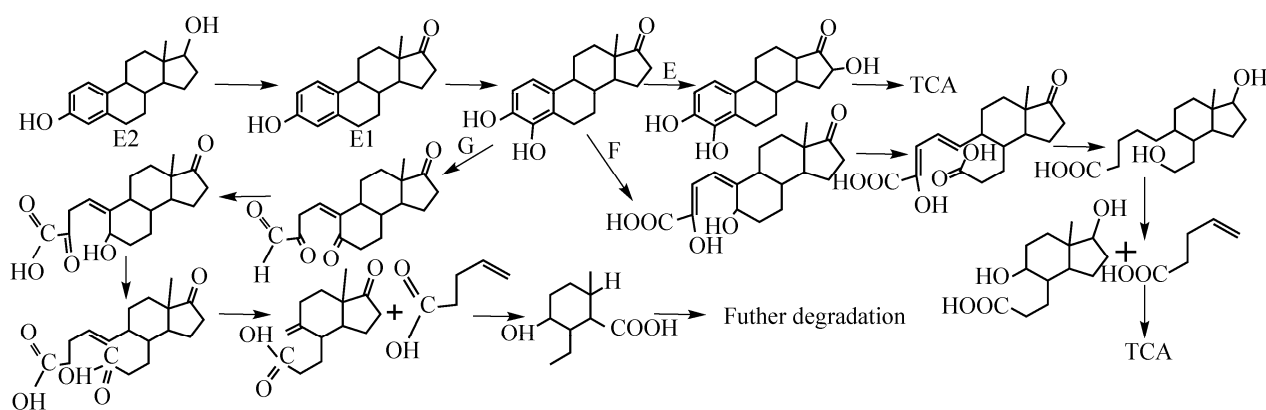


图 2. 放线菌门 2 种代表菌株对 E2 的生物降解途径

Figure 2. Biodegradation pathway of E2 by two representative strains of actinomycetes.

再经过一系列降解过程，最终进入三羧酸循环。此途径是目前已知雌激素降解菌降解 E1 最为高效的途径。F 路径是在加氧酶作用下通过在 C-4 和 C-5 之间加入 1 分子氧，之后 C-5 位置被氧化成羧基，通过一系列氧化还原反应以及裂解作用最终进入三羧酸循环。G 路径是红球菌 DS201 在 C-4 和 C-5 之间裂解，使 4-羟基雌酮形成一种中间产物，并经过进一步裂解形成 2-乙基-3-羟基-6-甲基环己烷-1-羧酸，之后再进入未知的裂解途径^[45]，在这一过程中双加氧酶可能发挥重要作用。E2 其他降解途径如图 3 所示，主要是在活性污泥菌群的作用下先将 E2 降解为 E1，之后 E1 的 D 环再通过加氧酶作用裂解形成一种不稳定的内脂化合物，最终进入三羧酸循环^[46]。

人工合成雌激素 EE2 具有很高的雌激素活性，在环境中不易降解。根据目前研究结果，EE2 的生物降解可分为微藻途径和变形菌门途径。微藻途径主要有四尾栅藻、纤维藻和羊角月牙藻 3 个

路径，用 H-J 表示，如图 4 所示。H 路径是 EE2 在四尾栅藻加氧酶作用下，通过羟基化和糖基化将 3-羟基转化为 3-酮，从而将 EE2 转化为新的代谢产物。I 路径是 EE2 在纤维藻作用下引起 C-6 羟基化进行降解，之后进入未知代谢途径，该路径过程中 EE2 生物降解产物最为复杂。J 路径是羊角月牙藻在 EE2 的 C-2 和 C-6 位置进行羟基化，在 C-3 位置糖基化形成共轭 EE2^[47]。变形菌门途径主要由亚消化单胞菌、亚硝化球菌、亚硝化螺菌组成的菌群和鞘氨醇杆菌参与的 2 个路径组成，分别用 K 和 L 表示，如图 5 所示。K 路径是在菌群反应器中通过双加氧酶首先在 A 环 C-2 位置发生羟化形成 2-OH-EE2，之后使 A 环裂解形成产物 ETDC^[48]。L 路径是鞘氨醇杆菌 JCR5 将 EE2 降解为 E1 之后在双加氧酶作用下使 E1 的 B 环发生羟化和酮化，将 B 环裂解后在 A 环羟化形成 3,4-邻苯二酚，之后经过水解最终形成水和二氧化碳^[49]。

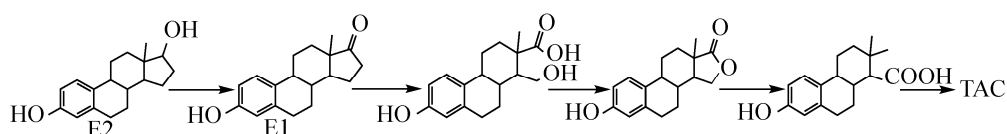


图 3. 活性污泥代表性菌群对 E2 的生物降解途径

Figure 3. Biodegradation pathway of E2 by the representative flora of activated sludge.

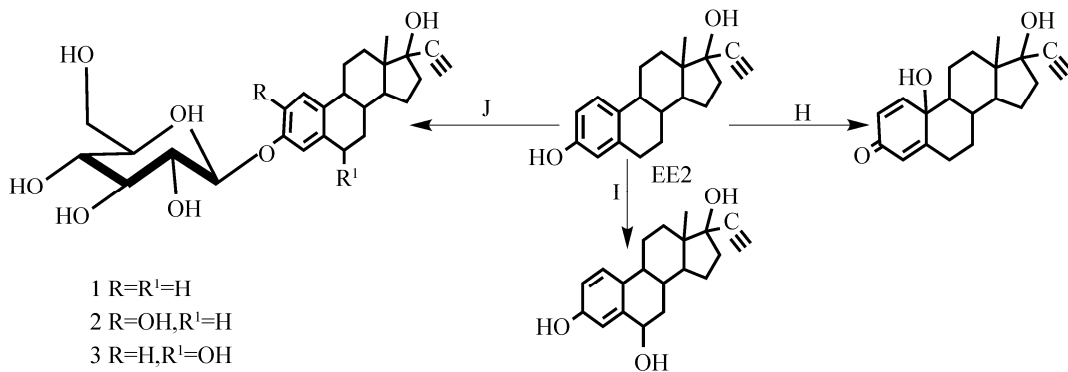


图 4. 3 种典型微藻对 EE2 的生物降解途径

Figure 4. Biodegradation pathway of EE2 by three typical microalgae.

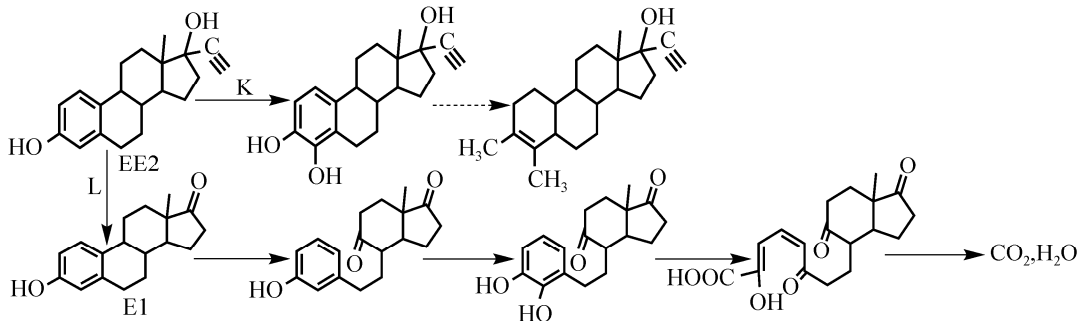


图 5. 变形菌门 4 种代表性菌株对 EE2 的生物降解途径

Figure 5. Biodegradation pathway of EE2 by four representative strains of Proteobacter.

总之, 固醇类雌激素主要在微生物加氧酶和脱氢酶作用下进行生物降解, 不同种类微生物降解作用所产生的中间产物也大不相同, 中间产物还可以相互转化, 但大多数以 E1 为第一级中间产物, 之后按不同路径再进一步代谢。所以, 雌激素的降解机制还需要深入研究, 降解途径还需要进一步完善。

5 结论和展望

雌激素污染问题已经成为全球性环境问题, 主要治理手段是利用微生物对其进行代谢。已经筛选的雌激素高效降解菌主要以变形菌门、厚壁菌门和放线菌门为主。在已知的雌激素降解菌中, 放线菌门红球菌属对高浓度雌激素具有更好的底

物适应性, 具有相对更高的降解效率和降解率。同时对于其他污染物, 如苯酚、萘、联苯和多氯联苯等都具有很好的去除效果^[50], 可以成为污水处理过程中工程菌构建的主要候选菌种。由于酶促反应是微生物实现雌激素降解的主要方式, 雌激素降解酶研究也成为学者关注的热点问题。放线菌门雌激素降解酶研究是一个重要领域。在已经发现的雌激素降解酶中, 羟化酶和脱氢酶在类固醇雌激素的开环裂解过程中发挥至关重要的作用。在酶促反应中, 雌激素降解的中间产物因菌株不同而有很大差异, 但大多是以 E1 为一级产物再进一步代谢。能够最终降解为 CO₂ 和 H₂O 或者进入 TCA 的报道并不多, 并且降解产物的雌激素生物活性也尚不明确。

随着人口不断增长以及养殖产业的迅猛发展,固醇类雌激素的排放量持续增加,城市生活污水和农村纳污水体雌激素含量日趋升高,对人类健康以及生态环境造成的影响也日趋加大。然而,我国对雌激素污染的研究工作开展较晚,污水处理排放雌激素指标体系还没有建立,对雌激素污染物处理还缺乏相应的制度约束。治理雌激素环境污染还需要从以下几方面做好工作。

(1) 在国家政策方面要对雌激素污染问题给予更高保障。将环境雌激素污染列为须着力解决的突出环境污染问题,制定明确的污水处理厂雌激素排放标准,提高污染排放标准,坚持源头防治,强化排污者责任,健全环保信用评价、信息强制性披露、严惩重罚等制度,以满足人民群众对水质安全和优美生态环境的需要。

(2) 提升雌激素降解菌株的应用技术水平。加强高效雌激素降解工程菌的构建,完善菌种固定化技术和投放方式使其可以在多菌种、多污染物的实际水体中长期存活、保持对雌激素的降解功能。同时不会对原有生态环境造成破坏,减小生态威胁以达到生态位平衡。针对实际水体中雌激素浓度较低,应对现有降解菌进行驯化,使其在实际污染水体中发挥最大的降解效用。

(3) 加强雌激素降解菌种和污水处理工艺的研发投入。从基因组、转录组和蛋白组水平对雌激素降解菌及其降解机制进行更为深入的研究,确定不同的降解酶或酶系的诱导条件以及在各个降解途径的功能和作用,以便于在基因水平优化和促进降解酶的表达水平,提高雌激素的降解效率。对污水处理厂现有工艺进行优化,采用深度处理技术等。

参考文献

- [1] Kurisu F, Ogura M, Saitoh S, Yamazoe A, Yagi O. Degradation of natural estrogen and identification of the metabolites produced by soil isolates of *Rhodococcus* sp. and *Sphingomonas* sp. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2010, 109(6): 576–582.
- [2] Pauwels B, Wille K, Noppe H, de Brabander H, van de Wiele T, Verstraete W, Boon N. 17 α -Ethinylestradiol cometabolism by bacteria degrading estrone, 17 β -estradiol and estriol. *Biodegradation*, 2008, 19(5): 683–693.
- [3] Yoshimoto T, Nagai F, Fujimoto J, Watanabe K, Mizukoshi H, Makino T, Kimura K, Saino H, Sawada H, Omura H. Degradation of estrogens by *Rhodococcus zopfii* and *Rhodococcus equi* isolates from activated sludge in wastewater treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(9): 5283–5289.
- [4] Chen YL, Yu CP, Lee TH, Goh KS, Chu KH, Wang PH, Ismail W, Shih CJ, Chiang YR. Biochemical mechanisms and catabolic enzymes involved in bacterial estrogen degradation pathways. *Cell Chemical Biology*, 2017, 24(6): 712–724.e7.
- [5] Khunjar WO, Mackintosh SA, Skotnicka-Pitak J, Baik S, Aga DS, Love NG. Elucidating the relative roles of ammonia oxidizing and heterotrophic bacteria during the biotransformation of 17 α -ethinylestradiol and trimethoprim. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(8): 3605–3612.
- [6] Koukoku AI, Drinas C. Addressing PAH biodegradation in Greece: biochemical and molecular approaches. *IUBMB Life*, 2008, 60(5): 275–280.
- [7] Ghosal D, Dutta A, Chakraborty J, Basu S, Dutta TK. Characterization of the metabolic pathway involved in assimilation of acenaphthene in *Acinetobacter* sp. strain AGAT-W. *Research in Microbiology*, 2013, 164(2): 155–163.
- [8] 王平. 不动杆菌DSSKY-A-001雌激素降解酶生物信息学分析. 东北师范大学学位论文, 2017.
- [9] van der Geize R, Hessels GI, van Gerwen R, van der Meijden P, Dijkhuizen L. Unmarked gene deletion mutagenesis of *kstD*, encoding 3-ketosteroid Δ^1 -dehydrogenase, in *Rhodococcus erythropolis* SQ1 using *sacB* as counter-selectable marker. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 205(2): 197–202.
- [10] Yu CP, Roh H, Chu KH. 17 β -Estradiol-degrading bacteria isolated from activated sludge. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(2): 486–492.

- [11] Ke JX, Zhuang WQ, Gin KYH, Reinhard M, Hoon LT, Tay JH. Characterization of estrogen-degrading bacteria isolated from an artificial sandy aquifer with ultrafiltered secondary effluent as the medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 75(5): 1163–1171.
- [12] Fujii K, Kikuchi S, Satomi M, Ushio-Sata N, Morita N. Degradation of 17 β -estradiol by a Gram-negative bacterium isolated from activated sludge in a sewage treatment plant in Tokyo, Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(4): 2057–2060.
- [13] Muller M, Patureau D, Godon JJ, Delgenès JP, Hernandez-Raquet G. Molecular and kinetic characterization of mixed cultures degrading natural and synthetic estrogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(3): 691–701.
- [14] Weber S, Leuschner P, Kämpfer P, Dott W, Hollender J. Degradation of estradiol and ethinyl estradiol by activated sludge and by a defined mixed culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 67(1): 106–112.
- [15] 曾庆玲. 活性污泥法去除城市污水中雌激素 E2 与 EE2 的机理研究. 同济大学博士学位论文, 2007.
- [16] Shi JH, Han R, Su LY, Cao JL, Hu LJ. Isolation and identification of a 17 α -ethynylestradiol-degrading strain from a wastewater treatment plant and its degradation characteristics. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2010, 30(12): 2414–2419. (in Chinese)
史江红, 韩蕊, 宿凌燕, 曹金玲, 呼丽娟. 某污水处理厂中 17 α -乙炔基雌二醇降解菌的分离鉴定及其降解特性. *环境科学学报*, 2010, 30(12): 2414–2419.
- [17] Zeng QL, Li YM, Gu GW, Zhao JM, Zhang CJ, Luan JF. Sorption and biodegradation of 17 β -estradiol by acclimated aerobic activated sludge and isolation of the bacterial strain. *Environmental Engineering Science*, 2009, 26(4): 783–790.
- [18] Fernández L, Louvado A, Esteves VI, Gomes NCM, Almeida A, Cunha Â. Biodegradation of 17 β -estradiol by bacteria isolated from deep sea sediments in aerobic and anaerobic media. *Journal of Hazardous Materials*, 2017, 323: 359–366.
- [19] Jiang LY, Yang J, Chen JM. Isolation and characteristics of 17 β -estradiol-degrading *Bacillus* spp. strains from activated sludge. *Biodegradation*, 2010, 21(5): 729–736.
- [20] van der Geize R, Hessels GI, van Gerwen R, Vrijbloed JW, van der Meijden P, Dijkhuizen L. Targeted disruption of the *kstD* gene encoding a 3-ketosteroid Δ^1 -dehydrogenase isoenzyme of *Rhodococcus erythropolis* strain SQ1. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(5): 2029–2036.
- [21] Knol J, Bodewits K, Hessels GI, Dijkhuizen L, van der Geize R. 3-Keto-5 α -steroid Δ^1 -dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* SQ1 and its orthologue in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv are highly specific enzymes that function in cholesterol catabolism. *Biochemical Journal*, 2008, 410(2): 339–346.
- [22] Rohman A, van Oosterwijk N, Thunnissen AM, Dijkstra BW. Crystal structure and site-directed mutagenesis of 3-ketosteroid Δ^1 -dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* SQ1 explain its catalytic mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(49): 35559–35568.
- [23] van der Geize R, van der Meijden P, Hessels GI, Dijkhuizen L. Identification of 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase genes and microorganisms blocked in 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase activity. US: 7,514,236 B2. 2009-04-07.
- [24] van der Geize R, Hessels GI, van Gerwen R, van der Meijden P, Dijkhuizen L. Molecular and functional characterization of *kshA* and *kshB*, encoding two components of 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase, a class IA monooxygenase, in *Rhodococcus erythropolis* strain SQ1. *Molecular Microbiology*, 2002, 45(4): 1007–1018.
- [25] Petrusma M, Dijkhuizen L, van der Geize R. *Rhodococcus rhodochromus* DSM 43269 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase, a two-component iron-sulfur-containing monooxygenase with subtle steroid substrate specificity. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(16): 5300–5307.
- [26] Petrusma M, Hessels G, Dijkhuizen L, van der Geize R. Multiplicity of 3-Ketosteroid-9 α -Hydroxylase enzymes in *Rhodococcus rhodochromus* DSM43269 for specific degradation of different classes of steroids. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(15): 3931–3940.
- [27] Yang XX, Dubnau E, Smith I, Sampson NS. Rv1106c from *Mycobacterium tuberculosis* is a 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochemistry*, 2007, 46(31): 9058–9067.
- [28] van der Geize R, Yam K, Heuser T, Wilbrink MH, Hara H, Anderton MC, Sim E, Dijkhuizen L, Davies JE, Mohn WW, Eltis LD. A gene cluster encoding cholesterol catabolism in a soil actinomycete provides insight into *Mycobacterium tuberculosis* survival in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(6): 1947–1952.
- [29] Marcus PI, Talalay P. Induction and purification of α - and β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Journal of Biological Chemistry*, 1956, 218(2): 661–674.
- [30] Fernández de las Heras L, van der Geize R, Drzyzga O, Perera

- J, María Navarro Llorens J. Molecular characterization of three 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase isoenzymes of *Rhodococcus ruber* strain Chol-4. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, 132(3/5): 271–281.
- [31] Mohn WW, Wilbrink MH, Casabon I, Stewart GR, Liu J, van der Geize R, Eltis LD. Gene cluster encoding cholate catabolism in *Rhodococcus* spp.. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(24): 6712–6719.
- [32] Donova MV. Transformation of steroids by actinobacteria: a review. *Prikladnaia Biokhimiia I Mikrobiologiya*, 2007, 43(1): 5–18.
- [33] Guevara G, Fernández de las Heras L, Perera J, María Navarro Llorens J. Functional differentiation of 3-ketosteroid Δ^1 -dehydrogenase isozymes in *Rhodococcus ruber* strain Chol-4. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 42.
- [34] Wilbrink MH. Microbial sterol side chain degradation in Actinobacteria. Groningen: Doctor Dissertation of University of Groningen, 2011.
- [35] Sang YY, Xiong GM, Maser E. Identification of a new steroid degrading bacterial strain H5 from the Baltic Sea and isolation of two estradiol inducible genes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, 129(1/2): 22–30.
- [36] Hu AY, He JB, Chu KH, Yu CP. Genome sequence of the 17 β -estradiol-utilizing bacterium *Sphingomonas* strain KC8. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(16): 4266–4267.
- [37] Qin D, Ma C, Hu AY, Zhang FF, Hu HB, Yu CP. *Altererythrobacter estronivorus* sp. nov., an estrogen-degrading strain isolated from Yundang lagoon of Xiamen city in China. *Current Microbiology*, 2016, 72(5): 634–640.
- [38] Zheng DN, Wang XL, Wang PP, Peng WL, Ji NN, Liang RB. Genome sequence of *Pseudomonas citronellolis* SJTE-3, an estrogen- and polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium. *Genome Announcements*, 2016, 4(6): e01373–16.
- [39] Zhang Y, Qin FJ, Qiao J, Li GM, Shen CH, Huang TW, Hu Z. Draft genome sequence of *Rhodococcus* sp. strain p14, a biodegrader of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(13): 3546.
- [40] McLeod MP, Warren RL, Hsiao WWL, Araki N, Myhre M, Fernandes C, Miyazawa D, Wong W, Lillquist AL, Wang D, Dosanjh M, Hara H, Petrescu A, Morin RD, Yang G, Stott JM, Schein JE, Shin H, Smailus D, Siddiqui AS, Marra MA, Jones SJM, Holt R, Brinkman FSL, Miyauchi K, Fukuda M, Davies JE, Mohn WW, Eltis LD. The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(42): 15582–15587.
- [41] Gong WJ, Kisiela M, Schilhabel MB, Xiong GM, Maser E. Genome sequence of *Comamonas testosteroni* ATCC 11996, a representative strain involved in steroid degradation. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(6): 1633–1634.
- [42] Yücel O, Wibberg D, Philipp B, Kalinowski J. Genome sequence of the bile salt-degrading bacterium *Novosphingobium* sp. strain Chol11, a model organism for bacterial steroid catabolism. *Genome Announcements*, 2018, 6(1): e01372–17.
- [43] Si D, Xiong YX, Li XY, Ma LJ, Deng XC, Wang Y, Yang ZB. Isolation and genome sequence analysis of a bacterium degrading dexamethasone. *Biomedical Research*, 2017, 28(11): 4825–4831.
- [44] Nakai S, Yamamura A, Tanaka S, Shi JH, Nishikawa M, Nakashimada Y, Hosomi M. Pathway of 17 β -estradiol degradation by *Nitrosomonas europaea* and reduction in 17 β -estradiol-derived estrogenic activity. *Environmental Chemistry Letters*, 2011, 9(1): 1–6.
- [45] Yu QM, Wang P, Liu DB, Gao RX, Shao HH, Zhao HY, Ma Z, Wang D, Huo HL. Degradation characteristics and metabolic pathway of 17 β -estradiol (E2) by *Rhodococcus* sp. DS201. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2016, 21(6): 804–813.
- [46] Lee HB, Liu D. Degradation of 17 β -estradiol and its metabolites by sewage bacteria. *Water, Air, and Soil Pollution*, 2002, 134(1/4): 351–366.
- [47] Della Greca M, Pinto G, Pistillo P, Pollio A, Previtiera L, Temussi F. Biotransformation of ethinylestradiol by microalgae. *Chemosphere*, 2008, 70(11): 2047–2053.
- [48] Yi T, Harper WF Jr. The link between nitrification and biotransformation of 17 α -ethinylestradiol. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(12): 4311–4316.
- [49] Ren HY, Ji SL, ud din Ahmad N, Wang D, Cui CW. Degradation characteristics and metabolic pathway of 17 α -ethinylestradiol by *Sphingobacterium* sp. JCR5. *Chemosphere*, 2007, 66(2): 340–346.
- [50] Sun Y, Chao YP, Qian SJ. Study on the degradation pathway of biphenyl by *Rhodococcus pyridinovorans* R04. *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43(5): 653–658. (in Chinese) 孙艳, 钞亚鹏, 钱世钧. 嗜吡啉红球菌 R04 的联苯降解途径的研究. *微生物学报*, 2003, 43(5): 653–658.

Microbial degradation of environmental estrogens

Kejian Tian¹, Fanxing Meng¹, Hongliang Huo^{1,2*}

¹ School of Environment, Northeast Normal University, Changchun 130117, Jilin Province, China

² Engineering Laboratory for Water Pollution Control and Resources Recovery, Changchun 130117, Jilin Province, China

Abstract: Estrogens are major substances of environmental endocrine disruptors, and biodegradation is the most economical, greenest and most suitable method to remove them. We elaborated the research status and progress of estrogen biodegradation by analyzing the major sources and hazards of estrogen, the isolation and identification of estrogen-degrading bacteria, the expression and detection of steroidal estrogen-degrading enzymes, the genomics study of estrogen-degrading bacteria and the estrogen degradation pathways. We also address future works of biodegradation of environmental estrogens.

Keywords: estrogen, degrading bacteria, degrading enzyme, degradation mechanism

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (51478096) and by the Natural Science Foundation of Jilin Province of China (20180101083JC)

*Corresponding author. Tel: +86-431-89165602; E-mail: huohl@nenu.edu.cn

Received: 14 May 2018; Revised: 26 August 2018; Published online: 28 November 2018