



孙福艳,叶建斌,马歌丽,等. 烟草工业废水和烟草浓缩液中甾体雌激素的生物降解研究[J]. 轻工学报, 2021,36(3):54-62.

SUN F Y, YE J B, MA G L, et al. Study on biodegradation of steroidal estrogen in tobacco industrial wastewater and tobacco concentrate[J]. Journal of Light Industry, 2021, 36(3):54-62. DOI:10.12187/2021.03.007

中图分类号:TS48;X795 文献标识码:A 文章编号:2096-1553(2021)03-0054-09

烟草工业废水和烟草浓缩液中甾体雌激素的生物降解研究

Study on biodegradation of steroidal estrogen in tobacco industrial wastewater and tobacco concentrate

孙福艳¹, 叶建斌¹, 马歌丽¹, 齐晓娜¹, 张展², 冯颖杰², 杨峰³
SUN Fuyan¹, YE Jianbin¹, MA Geli¹, QI Xiaona¹, ZHANG Zhan², FENG Yingjie²,
YANG Feng³

1. 郑州轻工业大学 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001;

2. 河南中烟工业有限责任公司, 河南 郑州 450002;

3. 河南卷烟工业烟草薄片有限责任公司, 河南 许昌 461000

1. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

2. China Tobacco He'nan Industrial Co., Ltd., Zhengzhou 450002, China;

3. He'nan Cigarette Industry Tobacco Sheet Co., Ltd., Xuchang 461000, China

关键词:

烟草; 甾体雌激素; 生物降解; 废水处理

Key words:

tobacco;
steroidal estrogen;
biodegradation;
wastewater treatment

摘要:从烟草工业废水处理厂的污泥中筛选出一株以雌酮(E1)为底物的甾体雌激素降解菌株 ye22, 16S rRNA 鉴定该菌株为琼氏不动杆菌, 对其生长特性及降解动力学进行研究. 结果表明, 该菌株在以 E1 为唯一碳源的培养基中, 发酵 9 d 对 E1 的降解率达 41.88%; 烟草工业废水和烟草浓缩液中 E1 质量浓度较高, 分别达到 1.41×10^{-4} g/L 和 9.01×10^{-5} g/L; 收集培养到对数期的 ye22 菌株, 接种于烟草工业废水和烟草浓缩液中, 发酵 9 d, E1 降解率分别为 32.07% 和 27.23%.

收稿日期: 2020-07-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(4180071401)

作者简介: 孙福艳(1994—), 女, 河南省周口市人, 郑州轻工业大学硕士研究生, 主要研究方向为烟草生物技术.

通信作者: 冯颖杰(1990—), 男, 安徽省宿州市人, 河南中烟工业有限责任公司工程师, 主要研究方向为烟草生物技术.

Abstract: A steroid-estrogen-degrading strain ye22 with Estone (E1) as substrate was screened out from tobacco industry wastewater treatment plant sludge. It was identified as *Acinetobacter junii* by 16S rRNA sequencing. The results showed that the growth characteristics and degradation kinetics of the strain were studied. After 9 days fermentation, the degradation rate of E1 could reach 41.88%. The concentration of E1 in tobacco industrial wastewater and tobacco concentrate was higher, reaching 1.41×10^{-4} g/L and 9.01×10^{-5} g/L, respectively. The ye22 strain cultured to logarithmic phase could degrade 32.07% of E1 in tobacco industry wastewater and 27.23% of E1 in tobacco concentrate within 9 days.

0 引言

甾体雌激素是一类具有环戊烷多氢菲母核结构的类固醇激素. 环境中的甾体雌激素分为两大类:一类是人工合成甾体雌激素(外源雌激素),如乙炔基雌醇(Ethinyl Estradiol, EE2);另一类是天然甾体雌激素(内源雌激素),如雌酮(Estrone, E1)、雌二醇(Estradiol, E2)、雌三醇(Estriol, E3)等^[1]. 甾体雌激素可通过多种途径进入城市污水,多数污水处理厂中可检测出质量浓度高达数百 ng/L 的雌激素^[2]. 甾体雌激素属于持久性有机污染物,在环境中十分稳定且难以分解,随着食物链的富集作用,其质量浓度逐渐上升,从而对生物界造成难以预估的危害. 相关研究表明:环境中含有纳克级质量浓度的甾体雌激素即能表现出较强的生态(生理)毒性^[3],对人、水生生物、家禽动物等具有极大危害(包括生殖毒性^[4-5]、发育毒性^[6-7]和致癌性风险^[8-9]),世界卫生组织将甾体雌激素归为1类致癌物^[1]. 一些学者认为,环境中的甾体雌激素若不进行降解或去除,将会威胁人类的生存和发展^[10].

生物降解甾体雌激素是随着微生物自身代谢过程进行的,成本低、占地小、不需要特殊设备,可彻底去除甾体雌激素或将其转化为无毒无害的物质(CO₂、H₂O等),被称为环境友好型污染治理技术^[11]. 目前,微生物降解是去除环境中甾体雌激素污染相对有效的途径,而降解甾体雌激素的微生物大部分可从污水处理厂的活性污泥、堆肥或受甾体雌激素污染的土壤中

筛选分离得到. L. Y. Jiang 等^[12]从活性污泥中分离得到的5株菌株皆具有高效降解E2的能力,能使E2转化为E1,可大大降低E2生物降解过程中废水中总雌激素的活性. F. Kurisu 等^[13]从土壤样品中分离出5株能利用17 β -雌二醇(17 β -E2)和E1的细菌菌株,均显示出较高的E1和E2降解活性. Q. Qiu 等^[14]从北京一家制药厂附近收集的土壤样品中分离出1株不动杆菌 DSSKY-A-001,利用该菌株降解甾体雌激素时发现,3 d时甾体雌激素降解率为76%,6 d时甾体雌激素降解率达90%.

甾体雌激素的降解菌绝大部分为细菌,少部分为真菌、藻类植物^[1]. 假单胞菌 SJTE-3 能够利用不同的甾体雌激素(17 β -E2、E1、E3和17 α -乙炔基雌二醇)并将其转化为非甾体化学物质^[15]. 马红球菌 Y50156 在24 h内,对质量浓度为100 mg/L的甾体雌激素(E1、E2、E3、EE2)降解率均大于95%^[16]. 将不动杆菌属(LM1)和假单胞菌属(LY1)的细菌菌株共同培养,可在7 d内快速去除约98%的E2(5 mg/L);单独培养时,菌株 LM1 和 LY1 在7 d内可分别降解77%和68%的E2^[17].

在烟草制品生产过程中产生的大量工业废水,因烟叶中的尼古丁、有机酸、氨基联苯、萘胺等有毒有害物质而具有颜色深、成分复杂、毒性大、污染严重等特点,被欧盟法规认定为“有毒危险性废物”^[18-19]. 烟草工业废水的水质波动大,一般降解甾体雌激素的微生物很难在该环境中生存,难以进行生物降解^[19]. 目前尚无对

烟草工业废水中甾体雌激素进行含量检测、生物降解等的研究报道。鉴于此,本文拟采用气相色谱(GC)法检测烟草工业废水和烟草浓缩液中甾体雌激素的质量浓度,并采用合适的生物方法从烟草工业污水处理厂的污泥中筛选出甾体雌激素降解菌,以实现微生物降解烟草工业废水和烟草浓缩液中甾体雌激素的目的,为烟厂工业废水的处理、排放及环境保护提供一定的理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 样品

烟草工业废水(取样口为进水口,即未经处理的废水)、污泥(烟草工业污水处理厂未经处理的污泥,含水率80%左右)、烟草浓缩液(将烟梗、烟末、烟草废弃物等烟草原料放入粉碎机中将其打碎,取烟草碎料与水以1:12的质量比混合,使烟草碎料充分浸泡于水中并搅拌,浸提液浓缩至波美度为26,即得),河南卷烟工业烟草薄片有限责任公司提供。

1.2 主要试剂与仪器

主要试剂: K_2HPO_4 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 Na_2HPO_4 、 $CaCl_2$ 、 $NaNO_3$ 、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $(NH_4)_2SO_4$ 、 $NaCl$,天津市大茂化学试剂厂产;KI,成都市科龙化工试剂厂产; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 H_3BO_3 ,天津市凯通化学试剂有限公司产;乙酸乙酯、二甲基亚砜(DMSO),天津市富宇精细化工有限公司产;乙酸苯乙酯(>99%),阿达玛斯试剂有限公司产。以上试剂均为分析纯。E1(98%),上海麦克林生化科技有限公司产;琼脂粉、酵母提取物、蛋白胨,北京奥博星生物技术有限公司产;改良型Bradford法蛋白浓度测定试剂盒,生工生物工程(上海)有限公司产。

主要仪器:BSA2202S电子天平,北京赛多利斯仪器有限公司产;DGG-9140电热恒温鼓风干燥箱、SHP-150生化培养箱,上海森信实

验仪器有限公司产;LEICA ICC50电子显微镜,徕卡仪器有限公司产;SW-CJ-ID超净工作台,苏州净化有限公司产;GR85DA高压蒸汽灭菌锅,致微仪器有限公司产;ZQWY-200S摇床,上海知楚仪器有限公司产;EYELASB-1100旋转蒸发仪,瑞徽电子(上海)有限公司产;SB25-120超声波清洗机,宁波新芝生物科技股份有限公司产;GC-7820A气相色谱连用仪,美国安捷伦科技公司产;UV-2300紫外-可见分光光度计,北京普析通用有限责任公司产。

1.3 培养基

分离培养基: K_2HPO_4 1 g、 Na_2HPO_4 1.5 g、 $NaNO_3$ 1 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 6.5 g、 $CaCl_2$ 0.01 g、 $FeSO_4$ 0.01 g、DMSO 100 μ L、E1 1.0 g、琼脂 20 g、去离子水 1 L,pH值调至7.0~7.2,121 $^{\circ}C$ 条件下高压灭菌20 min。

种子(LB)培养基:蛋白胨 10 g、酵母粉 5 g、 $NaCl$ 10 g、去离子水 1 L,pH值调至7.2,121 $^{\circ}C$ 条件下高压灭菌20 min。

发酵培养基: $(NH_4)_2SO_4$ 0.777 g、 K_2SO_4 0.1708 g、 KH_2PO_4 0.5308 g、 Na_2HPO_4 2.1847 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03697 g、 $CaSO_4 \cdot H_2O$ 0.010204 g、KI 0.000166 g、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.000575 g、 $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.000338 g、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02224 g、 H_3BO_3 0.000124 g、E1 0.45 g、DMSO 100 μ L、去离子水 1 L,pH值调至7.0~7.2,121 $^{\circ}C$ 条件下高压灭菌20 min。

PBS缓冲液: KH_2PO_4 0.24 g、 Na_2HPO_4 1.44 g、 $NaCl$ 8 g、 KCl 0.2 g,pH值调至7.4,最后定容至1 L,115 $^{\circ}C$ 条件下高压灭菌20 min。

1.4 实验方法

1.4.1 甾体雌激素降解菌的分离、筛选和鉴定

富集:取10 g污泥加入100 mL分离培养基中,于200 r/min,37 $^{\circ}C$ 条件下振荡培养5~7 d后转接到新鲜分离培养基中,重复5~7次,进

行选择性富集培养。

分离:用 200 μL 微量移液器吸取 1 : 10 富集菌液 100 μL , 沿管壁缓慢注于装有 900 μL 无菌水的无菌试管中, 振摇试管使其混合均匀, 制成 1 : 100 的样品液; 另取 200 μL 微量移液器吸头, 按上述操作顺序, 共重复操作 7 次。每次均做 10 倍递增样品匀液, 每递增稀释一次, 即换用 1 次 200 μL 灭菌吸管或吸头。将最后一次稀释液均匀涂布于分离平板上, 观察菌株长势(大小、颜色等)变化。

初筛:挑取分离平板中的单菌落移至 LB 培养基中, 于 200 r/min、37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下振荡培养 14 ~ 16 h, 取 1 mL 菌液进行稀释, 稀释与上述分离步骤一致。将稀释液均匀涂布于 LB 平板和唯一碳源(E1)平板上, 从唯一碳源(E1)平板挑取单菌落至 LB 新鲜培养基中, 如此反复操作 3 ~ 5 次, 筛选出在唯一碳源(E1)平板上长势较好且在 LB 平板上为单菌落的菌株。

复筛:从初筛唯一碳源(E1)平板上挑取单菌落, 活化后接种于发酵培养基中, 于 200 r/min、37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下振荡培养 5 ~ 7 d, 取 100 μL 菌液稀释, 均匀涂布于富集培养平板上, 挑选出长势优良、菌落均匀的单菌株。

形态学鉴定:经富集、分离、初筛、复筛后获得 1 株降解甾体雌激素 E1 的菌株, 对其进行形态学鉴定。

分子生物学鉴定:提取细菌基因组 DNA, 对基因组进行 PCR 扩增(上游引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 下游引物 1492R: 5'-TACCTTGTTACGATT-3'), 扩增产物送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 从 BLAST 结果中挑选 18 株与该微生物同源性较为相近的细菌基因序列, 通过 Clustal X 进行多重序列比对, 并用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树。

1.4.2 优势菌种特性研究 从唯一碳源(E1)

平板上挑取单菌落移至 LB 培养基中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 条件下振荡培养 12 ~ 16 h, 根据菌株生长情况, 在不同时间测定 OD_{600} 。以培养时间为横坐标, OD_{600} 为纵坐标, 绘制标准曲线。设置 3 组平行实验。

1.4.3 菌株生长培养及 E1 降解动力学实验

活化菌株:从唯一碳源(E1)平板上挑取单菌落, 移至 100 mL LB 培养基中, 活化菌株 14 h, 于 4000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 离心培养菌液 10 min, 弃上清液, 利用缓冲液洗涤沉淀, 重复操作 3 次后, 添加缓冲液得 10 mL 菌悬液。

降解动力学实验:取 1 mL 菌悬液于 100 mL 发酵培养基中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 条件下进行好氧发酵, 分别在 0 d、3 d、5 d、7 d、9 d 时取样。取 1 mL 进行蛋白质量浓度测定 (A_{595}), 剩余发酵液经萃取、浓缩后进行 GC 分析。取 1 mL 无菌水加入 100 mL 发酵培养基中作为对照, 考查挥发、器壁吸附等非生物因素对减少甾体雌激素质量浓度的贡献。设置 3 组平行实验。按照公式 $D_{E1} = (C_t - C_0) / C_t$ 来计算 E1 降解率, 其中: D_{E1} 为 E1 降解率, C_t 为对照组 E1 质量浓度, C_0 为实验组 E1 质量浓度。

GC 条件:HP -5 (30 m \times 320 μm \times 0.25 μm) 色谱柱; 载气为 He; 载气流速为 1 mL/min; 采用不分流方式进样; 进样量为 1 μL ; 升温程序为初始温度 50 $^{\circ}\text{C}$, 保持 3 min, 以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 260 $^{\circ}\text{C}$, 保持 5 min, 再以 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 270 $^{\circ}\text{C}$, 保持 10 min。

微生物生长测定:利用改良型 Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒检测降解实验中微生物的生长情况。设置牛血清白蛋白(BSA)质量浓度分别为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 利用分光光度计测定各质量浓度下的 A_{595} , 其中以蒸馏水作为空白对照。

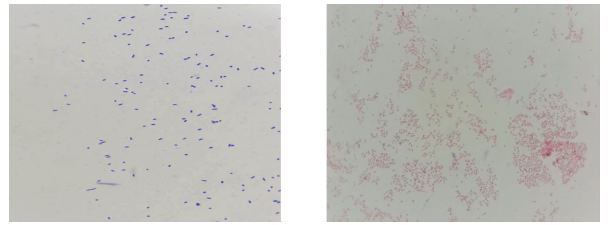
1.4.4 烟草工业废水和烟草浓缩液中甾体雌激素的降解实验 分别取 100 mL 烟草浓缩液、烟草工业废水,加入等体积的乙酸乙酯反复萃取 3 次,加入无水 NaSO₄ 干燥 4 h 以上,然后置于旋转蒸发仪中,于 50 °C、30 r/min、0.1 MPa 条件下真空浓缩至 1 mL,加入内标乙酸苯乙酯,与浓缩液以 1 : 9 的体积比混合均匀后,用 0.22 μm 有机膜过滤,滤液进行 GC 定量分析,GC 条件同 1.4.3.

菌株活化后,取 1 mL 菌悬液分别置于 100 mL 烟草浓缩液和烟草工业废水中,于 37 °C、200 r/min 条件下进行好氧发酵,9 d 时结束发酵,经萃取、浓缩至 1 mL 后进行 GC 定量分析.

2 结果与讨论

2.1 甾体雌激素降解菌筛选及其鉴定结果分析

通过多次筛选,从污泥中筛选到一株可以利用 E1 作为唯一碳源的菌株(命名为 ye22),该菌株在平板上长势好、生长周期短、对于降解 E1 有一定的优势,菌株显微镜检测结果如图 1 所示.从图 1 可知,ye22 菌株为革兰氏阴性短杆



a) ye22菌株显微镜检测图 b) ye22菌株革兰氏染色结果

图 1 菌株显微镜检测结果

Fig. 1 microscopic examination of strains

菌,单个排列,菌体饱满、光滑.

将该菌株 16S rRNA 测序序列与 GeneBank 上已有的序列进行 BLAST 同源检索,发现该序列与琼氏不动杆菌(*Acinetobacter junii*)的序列同源性达到 98% 以上,初步判断该菌的分类地位为琼氏不动杆菌.为进一步探究该菌株与已知菌株亲缘关系及分类地位,构建 ye22 菌株进化树,如图 2 所示.由图 2 可知,该菌株应归属于琼氏不动杆菌(*Acinetobacter junii*).

2.2 ye22 菌株生长特性研究结果分析

图 3 为 ye22 菌株的生长曲线,呈“S”形曲线.由图 3 可知,该菌株经 10 h 左右活化期后进入对数生长期,对数生长期维持时间为 10 ~

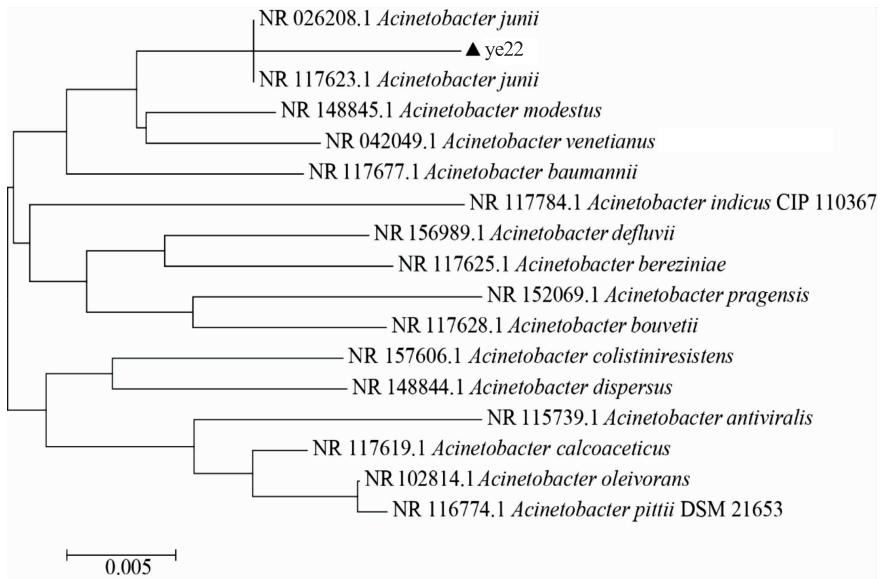


图 2 ye22 菌株进化树

Fig. 2 The cladogram of ye22 strain

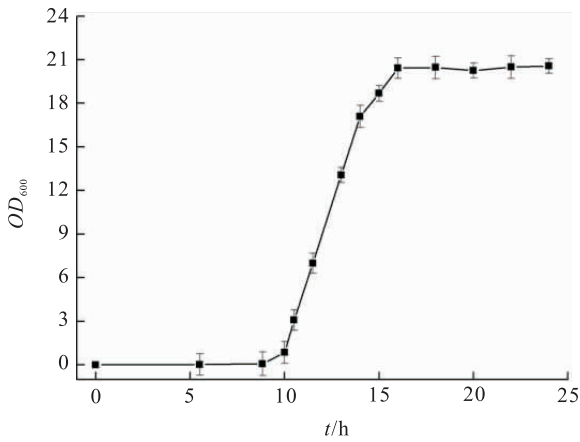


图3 ye22的生长曲线

Fig. 3 Growth curve of ye22

16 h,在 17 h 左右进入生长平稳期,最终 OD_{600} 达到 20 左右. 根据微生物生长的基本原理,在对数生长期的细胞活性较高. 为更好地在发酵中发挥细胞活力,选择培养 14 h 的菌液为后续发酵种子液,该时期菌株生长曲线的斜率最高,即该时期其活力最高.

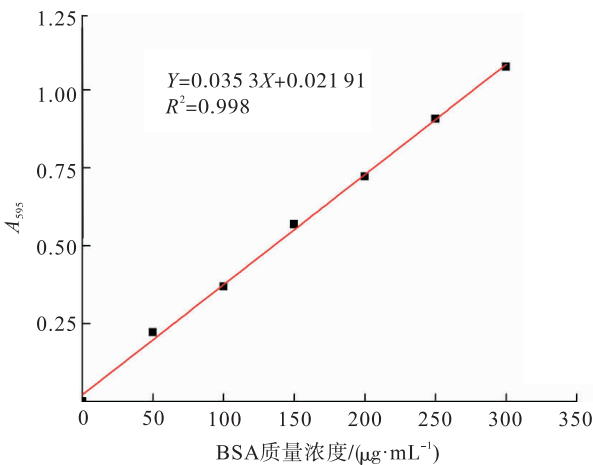
2.3 E1 降解动力学实验结果分析

E1 降解动力学实验结果如图 4 所示. 因 E1 在发酵液中存在微弱不溶解的现象,对 OD_{600} 检测结果具有一定的干扰性,故通过在发酵过程中测定蛋白(BSA)质量浓度的变化表征发酵过程中微生物随底物的变化情况^[20]. 由图

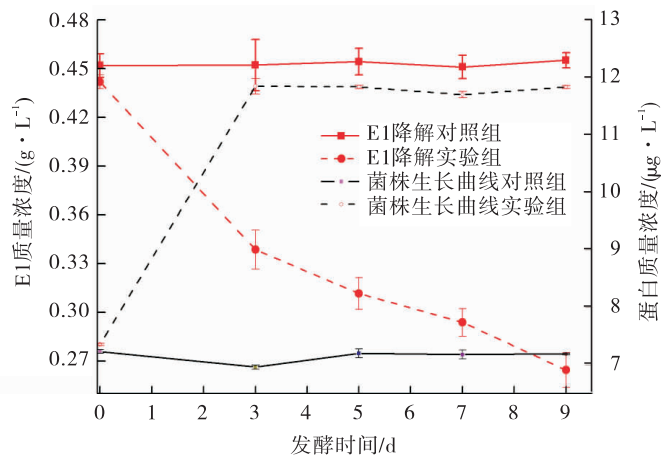
4a)可知,在 0 ~ 350 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内,BSA 质量浓度与 A_{595} 呈线性关系,说明该标准曲线可用于后续发酵过程中菌株含量的检测.

由图 4b)可知,ye22 菌株在第 3 d 时生物量大幅上升,E1 质量浓度有一定程度的降低,计算得 E1 降解率为 23.34%,在第 9 d 时计算得 E1 降解率为 41.88%,说明 E1 可以作为碳源供微生物生长,因此 ye22 菌株在该时期降解 E1 属于一种细胞生长代谢过程. 在发酵 3 ~ 7 d 过程中,ye22 菌株的生物量保持恒定,细胞生长可能处于稳定期,该时期 ye22 菌株对 E1 的降解可能主要归因于微生物降解 E1 为其他物质,而不是合成自身细胞结构.

据报道^[21],污泥中仅有 1% ~ 2% 的细菌被认为是可利用 E1 的细菌,这是因为在甾体雌激素的降解过程中,一般可以先将 E2 降解成 E1,但进一步降解 E1 为其他物质则比较困难^[22]. J. X. Ke 等^[23]以甾体雌激素为唯一碳源,发现不动杆菌降解时间长,15 d 才能将 E2 彻底降解,且不能降解 E1. 而本研究结果显示,ye22 菌株不但能利用 E1 为唯一碳源合成自身细胞骨架,维持细胞生长,还可以在细胞生长进入稳定期后将 E1 进一步降解成其他产物,但在



a) 蛋白质量浓度标准曲线



b) 生长及降解曲线

图4 E1 降解动力学实验结果

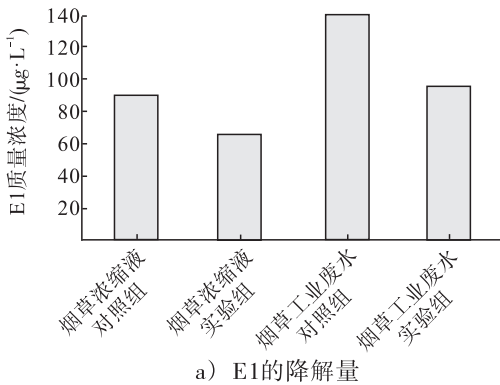
Fig. 4 Experiment results of kinetic study on degradation of steroidal estrone E1

GC 检测中并未发现新物质的生成,推测可能降解生成了 CO₂ 和 H₂O,这对于微生物将甾体雌激素进一步降解成无毒无害的物质具有重要意义.

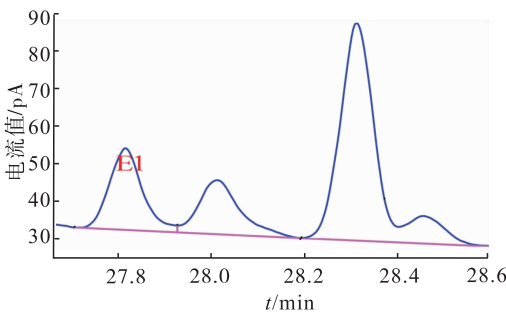
2.4 烟草工业废水和烟草浓缩液中 E1 的降解实验结果

烟草工业废水和烟草浓缩液中 E1 的降解结果如图 5 所示. 由图 5a) 可知,烟草工业废水和烟草浓缩液中均检测到较高质量浓度的 E1, 分别为 1.41×10^{-4} g/L 和 9.01×10^{-5} g/L. 与其他水体环境相比,烟草工业污水和烟草浓缩液中的 E1 质量浓度较高,这可能与烟草中的甾醇类化合物有关^[24];另外,工业废水中 E1 的质量浓度是浓缩液的近 2 倍,这说明烟草工业废水中甾体雌激素类物质经加工得到了一定富集,在排放前需要进行合适的处理. 在之前的研究中,未见在烟草工业废水和烟草浓缩液中检测到甾体雌激素类污染物的报道,本研究的检测结果补充了这方面的数据.

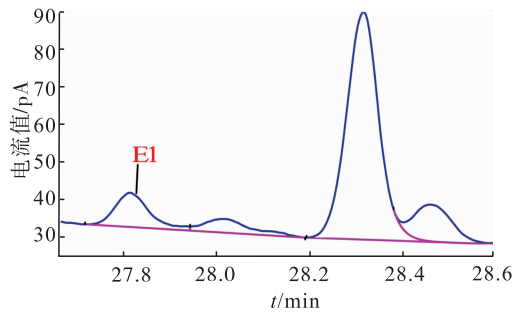
由图 5b) 可知,通过 ye22 菌株发酵,烟草工业废水和烟草浓缩液中 E1 均有不同程度的



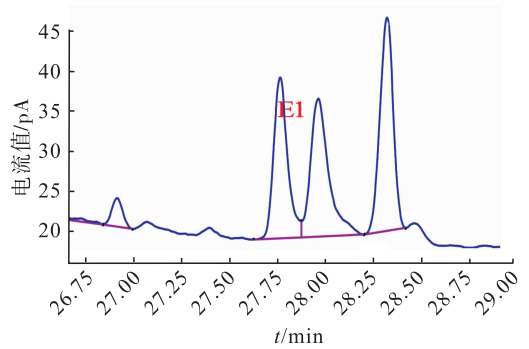
a) E1 的降解量



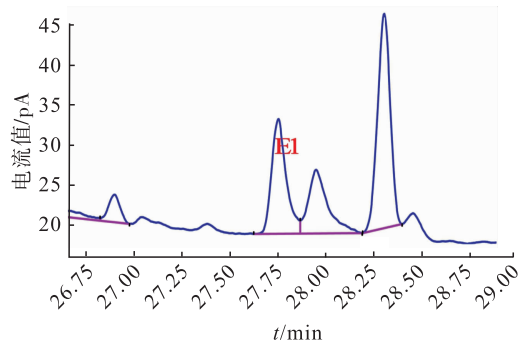
b) 烟草浓缩液对照组



c) 烟草浓缩液实验组



d) 烟草工业废水对照组



e) 烟草工业废水实验组

图 5 烟草工业废水和烟草浓缩液中 E1 的降解结果
Fig.5 Degradation results of steroidal estrogen E1 in tobacco industry wastewater and tobacco concentrate

降解,9 d 后,其 E1 降解率分别为 32.07 % 和 27.23 %,烟草浓缩液中 E1 的降解率较小,这可能是因为烟草浓缩液中烟碱等其他有毒物质含量较高,对微生物具有一定抑制作用^[25].

3 结论

本文从烟草工业废水处理厂的污泥中筛选出一株能以 E1 为底物的甾体雌激素降解菌株 ye22,并对该菌株进行 16S rRNA 鉴定、降解动

力学及应用研究. 结果表明,该菌株为琼氏不动杆菌,该菌株发酵3~9 d时,E1的质量浓度逐渐降低,发酵9 d时,对E1的降解率达41.88%;通过GC定量分析发现,烟草工业废水和烟草浓缩液中E1质量浓度较高,分别达到 1.41×10^{-4} g/L和 9.01×10^{-5} g/L;收集培养到对数期的该菌株,接种于烟草工业废水和烟草浓缩液中,发酵9 d,E1降解率分别为32.07%和27.23%.为更全面了解该菌株的功能特性,下一步将开展ye22菌株全基因组检测及基因编码降解酶的研究,并寻找一种有效的投菌方法以提高烟草工业废水和烟草浓缩液中甾体雌激素降解率.

参考文献:

- [1] 田克俭,孟繁星,霍洪亮. 环境雌激素的微生物降解[J]. 微生物学报,2019,59(3):442.
- [2] 纪付元. 合肥市水体中雌激素污染现状及其在生物处理工艺中的去除研究[D]. 合肥:合肥工业大学,2014.
- [3] 刘旭. 奶牛粪便高效降解菌的筛选及混合菌发酵研究[D]. 雅安:四川农业大学,2005.
- [4] CORRE C, SPRING S, METCALF A, et al. Impact of X/Y genes and sex hormones on mouse neuroanatomy[J]. Neuroimage,2018(173):551.
- [5] ARMENI A K, ASSIMAKOPOULOS K, MARIOLI D, et al. Impact of estrogen receptor α gene and oxytocin receptor gene polymorphisms on female sexuality [J]. Endocrine Connection, 2017,6(1):44.
- [6] BAINS M, ROBERTS J L. Estrogen protects against dopamine neuron toxicity in primary mesencephalic cultures through an indirect PI3K/Akt mediated astrocyte pathway[J]. Neuroscience letters,2016,610:79.
- [7] MIRANDA A, SOUSA N. Maternal hormonal milieu influence on fetal brain development [J]. Brain Behavior,2018,8(2):e00920.
- [8] DALLAL C M, LACEY J V, PFEIFFER R M, et al. Estrogen metabolism and risk of postmenopausal endometrial and ovarian cancer:the b-fit cohort[J]. Hormones and Cancer,2016,7(1):49.
- [9] YASUDA M T, SAKAKIBARA H, SHIMOI K. Estrogen and stress induced DNA damage in breast cancer and chemoprevention with dietary flavonoid [J]. Genes and Environment, 2017,39(2):10.
- [10] 张方方. 天然雌激素降解菌的筛选鉴定及其降解特性研究[D]. 淮南:安徽理工大学,2012.
- [11] 赵洪岩. 雌二醇高效降解菌 *Rhodococcus* DSSSKP-R-001 基因组初步研究[D]. 长春:东北师范大学,2018.
- [12] JIANG L Y, YANG J, CHEN J M. Isolation and characteristics of 17β -estradiol degrading *Bacillus* spp. strains from activated sludge [J]. Biodegradation,2010(21):729.
- [13] KURISU F, OGIURA 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.
- [14] QIU Q, WANG P, KANG H, et al. Genomic analysis of a new estrogen-degrading bacterial strain, *Acinetobacter* sp. DSSKY-A-001 [J/OL]. International Journal of Genomics, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2804134>.
- [15] ZHENG D, WANG X, WANG P, et al. Genome sequence of *Pseudomonas citronellolis* SJTE-3, an estrogen and polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterium[J]. Genome Announcements, 2016,4(6):1.
- [16] 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]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(9):5283.
- [17] LI M T, ZHAO X M, ZHANG X F, et al. Biodegradation of 17 β -estradiol by bacterial co-culture isolated from manure [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1):3787.
- [18] 侍浏洋, 王津, 马晶梅, 等. 烟草废水菌群处理及主要污染物降解过程解析[J]. *环境科学学报*, 2017(7):2594.
- [19] 周平. 烟草企业废水处理及再生回用技术的应用[J]. *烟草科技*, 2007(3):19.
- [20] 汪芳芳. 霍氏肠杆菌降解叶黄素的研究[D]. 郑州: 郑州轻工业大学, 2017.
- [21] YU C H, DEEB R A, CHU K H. Microbial degradation of steroidal estrogens [J]. *Elsevier Chemosphere*, 2013, 91(9):1225.
- [22] 王代懿. 天然类固醇激素在土壤中的环境行为及风险控制研究[D]. 徐州: 中国矿业大学, 2015.
- [23] KE J X, ZHUANG W Q, GIN K Y H, et al. Characterization of estrogen-degrading bacteria isolated from an artificial sandy aquifer with ultrafiltered secondary effluent as the medium [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 75(5):1163.
- [24] 张峻松, 徐如彦, 薄云川, 等. 毛细管气相色谱法测定烟草中的甾醇类化合物[J]. *烟草科技*, 2007(8):27.
- [25] 伍良伟. 降解烟碱微生物的筛选及在烟秆腐熟发酵中的应用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.