

研究报告

Gordonia sp. H52 对合成孕激素左炔诺孕酮的降解特性

赖思华^{1,2,3}, 张晋娜^{2,3}, 邓通初^{2,3}, 王安国^{2,3}, 陈乐天^{*1}, 许玫英^{*2,3}

1 华南农业大学生命科学学院, 广东 广州 510642

2 广东省科学院微生物研究所 华南应用微生物国家重点实验室 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东 广州 510070

3 广东省环境保护微生物与区域生态安全重点实验室, 广东 广州 510070

赖思华, 张晋娜, 邓通初, 王安国, 陈乐天, 许玫英. *Gordonia* sp. H52 对合成孕激素左炔诺孕酮的降解特性[J]. 微生物学通报, 2024, 51(6): 2127-2140.

LAI Sihua, ZHANG Jinna, DENG Tongchu, WANG Anguo, CHEN Letian, XU Meiyang. Degradation characteristics of levonorgestrel by *Gordonia* sp. H52[J]. Microbiology China, 2024, 51(6): 2127-2140.

摘要:【背景】合成孕激素左炔诺孕酮因其具有内分泌干扰效应而受到广泛关注, 微生物在污染物降解和环境修复方面具有广泛的应用潜力, 但目前对左炔诺孕酮在微生物降解中的特性和机理认识仍然有限。【目的】加速左炔诺孕酮污染的治理, 亟须分离获取左炔诺孕酮的高效降解菌并探究其降解机制。【方法】以养殖场的废水为接种物, 选育出对左炔诺孕酮具有高效降解功能的菌株; 基于菌株形态特征、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列分析, 确定菌株所属的分类层级; 进而通过对左炔诺孕酮的降解动力学进行探究, 同时结合菌株全基因组分析及降解产物谱图, 确定菌株对左炔诺孕酮的降解特性。【结果】分离获得与 *Gordonia cholesterolivorans* Chol-3 的 16S rRNA 基因序列相似性达 99.0% 的 *Gordonia* sp. H52, 该菌株在 18 h 内可以实现对 0.5 mg/L 左炔诺孕酮的 100% 去除。液相色谱与串联质谱联用分析结果发现, 菌株 H52 降解左炔诺孕酮后产生 5 种代谢产物, 侧链炔基的裂解及脱羟基是该菌降解左炔诺孕酮的主要途径。该菌株还可以同时促进水体中

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFA0910300); 国家自然科学基金(42107412); 广东省基础与应用基础研究基金联合基金(2021A1515110314); 广东省科学院打造综合产业技术创新中心行动专项资金项目(2022GDASZH-2022010203-001, 2022GDASZH-2022010105); 广东省科技计划(2022A0505090004); 广东省科学院建设国内一流研究机构专项(2021GDASYL-20210103006); 广东省海洋经济发展(海洋六大产业)专项(粤自然资合[2024]38 号)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFA0910300), the National Natural Science Foundation of China (42107412), the Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (2021A1515110314), the Guangdong Academy of Sciences' Special Project of Science and Technology Development (2022GDASZH-2022010203-001, 2022GDASZH-2022010105), the Science and Technology Program of Guangdong Province (2022A0505090004), the GDAS' Special Project of Science and Technology Development (2021GDASYL-20210103006), and the Special Project for Marine Economic Development of Guangdong Province (GDNRC[2024]38).

*Corresponding authors. E-mail: CHEN Letian, lotichen@scau.edu.cn; XU Meiyang, xumy@gdim.cn

Received: 2024-03-20; Accepted: 2024-04-27; Published online: 2024-05-23

多种合成孕激素的去除,使左炔诺孕酮的去除率由 0%提高到 91.06%、醋酸炔诺酮的去除率由 37%提高到 100%、孕二烯酮的去除率由 0%提高到 88.87%。【结论】*Gordonia* sp. H52 对合成孕激素左炔诺孕酮表现出高效的降解特性,为合成孕激素污染水体的治理与修复提供了宝贵的菌种资源和理论参考。

关键词: 合成孕激素; 左炔诺孕酮; *Gordonia* sp. H52; 降解特性

Degradation characteristics of levonorgestrel by *Gordonia* sp. H52

LAI Sihua^{1,2,3}, ZHANG Jinna^{2,3}, DENG Tongchu^{2,3}, WANG Anguo^{2,3}, CHEN Letian^{*1}, XU Meiying^{*2,3}

1 College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China

2 Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, Guangdong, China

3 Guangdong Provincial Key Laboratory of Environmental Protection Microbiology and Regional Ecological Security, Guangzhou 510070, Guangdong, China

Abstract: [Background] The synthetic progestin levonorgestrel has attracted wide attention due to its endocrine-disrupting effects. Microorganisms demonstrate extensive potential in pollutant degradation and environmental remediation. However, the characteristics and mechanisms of levonorgestrel degradation by microorganisms remain poorly understood. [Objective] To isolate an efficient levonorgestrel-degrading strain and explore its degradation mechanism for the remediation of levonorgestrel pollution. [Methods] We isolated a strain capable of efficiently degrading levonorgestrel from aquaculture wastewater and identified the strain based on its morphological, physiological, and biochemical characteristics and the 16S rRNA gene sequence. The degradation characteristics of the strain for levonorgestrel were investigated by whole genome analysis, degradation kinetics, and analysis of the degradation product spectrum. [Results] *Gordonia* sp. H52 was isolated, which had 99.0% homology of the 16S rRNA gene sequence compared with *Gordonia cholesterolivorans* Chol-3. This strain completely removed 0.5 mg/L levonorgestrel within 18 h. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry revealed that *Gordonia* sp. H52 produced five metabolites during the degradation process of levonorgestrel, primarily through the cleavage of the side chain and hydroxy group. Furthermore, the strain facilitated the removal of various synthetic progestins in water, increasing the removal rates of levonorgestrel from 0% to 91.06%, acetylene norethindrone from 37% to 100%, and gestodene from 0% to 88.87%. [Conclusion] *Gordonia* sp. H52 demonstrates high degradation efficiency for levonorgestrel. This study provides valuable microbial resources and theoretical references for the treatment and remediation of water contamination caused by synthetic progestins.

Keywords: synthetic progestin; levonorgestrel; *Gordonia* sp. H52; degradation characteristics

内分泌干扰物是指对人体和动物正常激素水平产生干扰的化学物质。在自然产生或人类生产生活过程中,大量的内分泌干扰物被释放到周围环境中,对人类健康和生态环境造成极大的威胁^[1]。内分泌干扰物已成为本世纪备受关注的一类新污染物^[2],其中,类固醇激素是最主要的环境内分泌干扰物之一。

孕激素是一类典型的类固醇激素,其以甾烷为母核^[3],被广泛应用于动物生长调节及人类生殖控制。甾烷是由脂环和碳环组成的环状结构,其核心包含 17 个碳原子。根据化学结构和作用机理的差异,孕激素可分为天然孕激素和合成孕激素,相较于天然孕激素,合成孕激素具有更强的生物活性和更显著的环境风险^[4]。

左炔诺孕酮(levonorgestrel, LNGT)是一种常用的合成孕激素,被广泛应用于紧急避孕措施中。由于左炔诺孕酮的广泛使用,该药物在多种水体中被频繁检出。Liu 等在流溪水库和淡水河流的地表水中检测到 59 ng/L 的左炔诺孕酮^[5],Viglino 等在城市污水处理厂的淤泥中检测到 52 ng/g 的左炔诺孕酮^[6]。此外,养殖场排放的废水也频繁检出左炔诺孕酮,其浓度甚至高达 2 380 ng/L^[7],远高于左炔诺孕酮的最低毒性效应浓度。

已有研究表明,左炔诺孕酮具有低剂量高毒性效应的特点^[8],严重威胁生态安全和人类健康。有研究发现,仅 0.8 ng/L 的左炔诺孕酮就能减少黑头鲈鱼的产卵量^[9-10]。除了降低繁殖能力,左炔诺孕酮还会导致雌鱼和两栖动物雄性化^[11]、诱发雄性第二性征^[12]、产生雄激素的生物标志物^[13-14],甚至会致使斑马鱼的肝功能受损^[15]。此外,近年来的行为研究表明,与黄体酮相比,左炔诺孕酮在增加雄性非洲爪蛙的比例上更为明显^[16]。因此,合成孕激素左炔诺孕酮的降解去除对于维持生态安全和人类健康至关重要。

微生物法作为环境污染治理的重要方法,因其高效、环保和经济等优势而被广泛应用于多种污染物的治理。Liu 等研究发现,在活性污泥系统中,0.5 mg/L 左炔诺孕酮在 12.5 d 内可实现完全去除^[17]。然而,迄今鲜见有关左炔诺孕酮降解功能菌株的相关报道,对微生物降解左炔诺孕酮的途径和机制仍缺乏认知。通过发掘左炔诺孕酮高效降解菌,并深入了解降解菌株对左炔诺孕酮的降解特性,将为左炔诺孕酮高效治理方法的建立提供科学指导。

本研究针对左炔诺孕酮降解菌种缺乏、降解特性不了解等问题,以养殖废水为接种源,富集筛选左炔诺孕酮降解功能菌株,并通过对菌株进行鉴定,结合降解动力学、基因组测序和产物分析深入探究菌株的降解效率及其降解通路,评估相关菌株对环境水体中合成孕激素的去除效果,有望为合成孕激素环境污染治理提供宝贵的菌株资源和理论参考。

1 材料与方法

1.1 样品

筛菌样品来源:湖南省某养殖场(112.49°E, 28.19°N)收集的废水。

环境水样来源:广东省佛山市某河流(113.25°E, 22.76°N)收集的环境水样,其酸碱度呈中性(pH 值约为 7.0),含少量溶解性有机物(dissolved organic carbon, DOC=1.98 mg/L)。

1.2 主要试剂和仪器

左炔诺孕酮、孕二烯酮和醋酸炔诺酮, Sigma-Aldrich 公司;甲醇等色谱级有机试剂, Thermo Fisher Scientific 公司,其他所有分析级化学试剂,广州化学试剂有限公司;FastPure gDNA Mini Columns III 试剂盒,南京诺唯赞生物科技有限公司;HBI 蜡样芽孢杆菌生化试剂盒,青岛海博生物技术有限公司。

Oasis HLB cartridges 固相萃取小柱(60 mg, 3 mL), Waters 公司; 透射电镜, Hitachi 公司; 微孔板分光光度计, BioTek 公司; 三重四极杆液相质谱仪和四极杆飞行时间质谱仪, Waters 公司。

1.3 培养基

无机盐培养基和 MH 液体、固体培养基均参考文献[18]配制。

1.4 养殖场废水中左炔诺孕酮降解菌的筛选

将养殖废水稀释到 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 后, 每个梯度加入孕激素 50 mg/L, 28 °C、150 r/min 驯化 30 d。随后取不同稀释梯度下的稀释液涂布于 MH 固体培养基上, 37 °C 培养箱孵育 48 h 后, 挑取形态各异的菌落在 MH 固体培养基上连续划线分离单菌落, 并将纯化后的单菌落分别接种到左炔诺孕酮终浓度为 0.5 mg/L 的 MH 液体培养基和无机盐培养基中, 28 °C、180 r/min 培养 48 h, 分析菌株对左炔诺孕酮的降解效果。选取一株可以在 MH 液体培养基中生长并降解左炔诺孕酮、但无法在以左炔诺孕酮为唯一碳源的无机盐培养基中生长的菌株 H52 开展后续实验。

1.5 左炔诺孕酮降解菌的鉴定

基于形态学、生理生化特征和 16S rRNA 基因序列分析对菌株进行鉴定。通过涂布 MH 固体培养基观察菌株 H52 的菌落大小、颜色、表面、边缘和纹理特征。为了进一步了解菌株 H52 的形态结构, 使用透射电镜对单个细胞进行观察。根据参考文献[19]使用 HBI 蜡样芽孢杆菌生化试剂盒进行生理生化分析。

使用 FastPure gDNA Mini Columns III 试剂盒提取菌株 H52 的基因组 DNA。使用引物 27F/1492R 扩增菌株的 16S rRNA 基因, 具体 PCR 反应体系和条件参考文献[20]。测试结果使用 BLAST 与 NCBI 数据库进行比对, 并使用 Clustal 程序与近缘物种进行对齐, 使用 Kimura

两参数模型计算进化距离。在 MEGA 7.0 中, 使用邻接、最大简约和最大似然方法构建系统发育树, 其 bootstrap 值基于 1 000 次重复。

在 28 °C、180 r/min 条件下, 培养菌株 24 h, 每隔 1 h 使用微孔板分光光度计在波长 600 nm 下监测细菌生长情况, 结果作为降解动力学实验接种时间依据。

1.6 左炔诺孕酮降解动力学及产物分析

将菌株 H52 接种到 MH 液体培养基中, 28 °C、180 r/min 培养 15 h 后以 1% 的接种量接种到 200 mL 的 MH 液体培养基中, 加入终浓度为 0.5 mg/L 的左炔诺孕酮, 摇匀。设置空白对照组和阴性对照组, 其中空白对照组只加左炔诺孕酮, 阴性对照组不加入左炔诺孕酮、只加菌液, 28 °C、180 r/min 培养, 分别在 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、22、26、30、34、40 和 48 h 各收集 3 份 1 mL 样品进行降解动力学分析, 同时收集 1 份 30 mL 样品进行中间产物分析。

降解动力学样品使用等体积乙酸乙酯进行液液微萃取, 提取液置于棕色离心管中, 经氮气吹干后再用 1 mL 甲醇复溶。将复溶样品经 0.22 μ m 有机相滤头过滤后置于棕色进样小瓶, 待上机测样。

将收集的产物样品摇匀, 加入甲醇和 4 mol/L 的浓硫酸后 4 500 r/min 离心 5 min 后取上清, 放入干净的锥形瓶中, 用甲醇重悬沉淀的菌体, 再次离心后取上清放入锥形瓶中。将样品过预处理(5%甲醇润洗)的 SPE 小柱后室温晾干, 用正己烷、乙酸乙酯和甲醇按 1:2:1 的体积比依次洗脱, 用氮气吹干浓缩, 再用 1 mL 甲醇复溶后过 0.22 μ m 的有机相滤头, 置于棕色进样小瓶中, 待上机测样。

1.7 基因组的分析

将菌株 H52 的总 DNA 送至美格生物公司,

使用 Illumina HiSeq 平台进行测序。下机数据使用 SPAdes v3.10.1 进行组装, 开放阅读框使用 Prodigal 预测, 并在 eggNOG-mapper 和 BlastKOALA 进行注释。

此外, 从 NCBI 数据库中下载已有类固醇激素降解基因的蛋白序列, 使用 BLAST 软件与菌株 H52 的蛋白序列进行比对, 筛选出潜在类固醇激素降解基因。

1.8 环境水体中菌株 H52 的合成孕激素降解动力学

以 20 mL 的环境水样为实验体系, 设置实验组和空白对照组, 加入终浓度为 0.5 mg/L 的左炔诺孕酮、孕二烯酮和醋酸炔诺酮的混合品, 摇匀后接种菌株 H52, 28 °C、180 r/min 培养, 在培养的不同时间点(0、6、12、24 和 30 h)分别收集 3 份各 1 mL 样品测定左炔诺孕酮、孕二烯酮和醋酸炔诺酮的浓度。样品的提取方法同 1.6。其中, 空白对照组只加入混合品、不接种菌株 H52。

1.9 降解速率分析方法

使用三重四极杆液相质谱仪的 Acquity UPLC I-Class 与 Xevo TQ-S 联用系统测定左炔诺孕酮的浓度以确定菌株 H52 对其的降解速率。液相段的色谱分离使用 CORTECS C18 Column (2.1 mm×150 mm, 1.6 μm) 色谱柱, 流速为 0.32 mL/min, 流动相为 0.1% 的甲酸水和乙腈, 柱温为 40 °C, 梯度时间共 28 min, 具体梯度如表 1 所示。质谱检测采用多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式, 并通过 ESI+ 离子源进行离子化。

1.10 降解产物分析方法

使用四极杆飞行时间质谱仪的 ACQUITY UPLC 与 Xevo G2 QTOF MS 耦合联用系统进行左炔诺孕酮转化产物(transformation products, TPs) 的识别和鉴定。液相色谱分离使用 ACQUITY UPLC BEH, 1.7 μm×2.1 mm×50 mm

色谱柱, 流速 0.3 mL/min, 流动相为 0.1% 的甲酸水和乙腈, 柱温为 40 °C, 梯度洗脱为 28 min (表 2)。流动相为 0.1% 的甲酸水和乙腈。质谱端采用 MS^E 扫描模式(表 3), 其中分子数据(碎片离子、前体离子和中性损失)在单次注射中采用并行低碰撞能量和高碰撞能量 MS 采集, 分别获得低能前体离子和高能碎片离子。

表 1 左炔诺孕酮浓度测试的色谱端条件

Table 1 Chromatographic conditions for levonorgestrel concentration testing

Time (min)	Flow rate (mL/min)	0.1% aqueous formic acid (%)	Acetonitrile (%)
Initial	0.32	60	40
15	0.32	40	60
25	0.32	20	80
28	0.32	60	40

表 2 降解产物检测的色谱端条件

Table 2 Chromatographic conditions for the detection of degradation products

Time (min)	Flow rate (mL/min)	0.1% aqueous formic acid (%)	Acetonitrile (%)
Initial	0.3	95	5
15	0.3	80	20
25	0.3	60	40
28	0.3	95	5
30	0.3	95	5

表 3 降解产物检测的质谱端条件

Table 3 Mass spectrometry conditions for the detection of degradation products

Ionization mode	ESI+	ESI-
Scan time (s)	0.1	0.1
Capillary voltage (kV)	2.13	1.67
Sampling cone (V)	40	40
Extraction cone (V)	4	4
Source temp (°C)	100	100
Desolvation temperature (°C)	250	250
Desolvation gas (L/h)	600	600
Cone gas (L/h)	50	50
Mass range (<i>m/z</i>)	50–100	50–100

2 结果与分析

2.1 菌株 H52 的鉴定与生理生化特征

经过富集和分离培养,从养殖废水中获得具有左炔诺孕酮高效降解能力的菌株 H52。首先,对该菌株进行多相分类学鉴定,包括形态学、生理生化特征和 16S rRNA 基因系统发育分析。如图 1A 所示,在 MH 固体培养基上,菌株 H52 的菌落呈乳白色、圆形,表面光滑,边缘无锯齿,大小 2–3 mm,革兰氏染色呈阳性。在透射电镜下观察,细菌呈棒状(图 1B)。进一步使用 HBI 蜡样芽孢杆菌生化试剂盒进行生理生化分析,结果表明菌株 H52 能利用淀粉和葡萄糖作为碳源进行生长,含有过氧化氢酶且能够还原硝酸盐(表 4)。基于 1 428 bp 的 16S rRNA 基因系统发育分析显示,菌株 H52 与 *Gordonia cholesterolivorans* Chol-3 的相似度为 99.0%。相关结果表明 H52 归属于 *Gordonia* (图 2)。

使用 MH 液体培养基对 *Gordonia* sp. H52 的生长特征进行了测试,发现该菌在 8 h 进入对数期,约 20 h 进入稳定期,符合 S 型生长特征(图 3)。后续研究统一选择培养 15 h 的菌液作为接种物。

2.2 菌株 H52 对左炔诺孕酮降解动力学

如图 4 所示,与空白对照组的左炔诺孕酮浓度相比,实验组的左炔诺孕酮浓度显著降低。这表明实验组中的左炔诺孕酮损失主要由生物降解引起,非生物降解可以忽略不计。由于存在滞后时间,将培养的第 6 h 设定为降解的开始。该时间点被设置为绘制降解曲线和计算降解动力学参数的初始时刻。根据菌株 H52 生物降解左炔诺孕酮的动力学参数,可以判断其反应为一级动力学方程。

2.3 菌株 H52 降解左炔诺孕酮的中间产物

使用四极杆飞行时间质谱仪对降解中间产

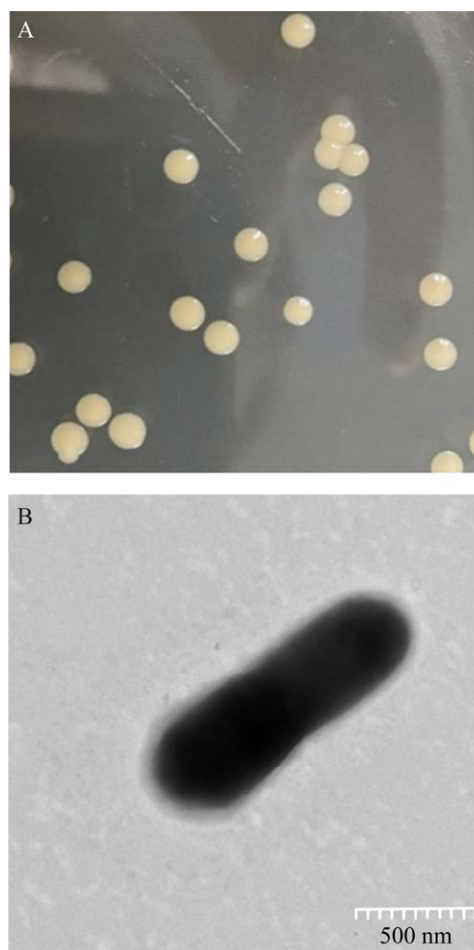


图 1 菌株 H52 的菌落形态(A)和显微特征(B)
Figure 1 Colony morphology (A) and microscopic characteristics (B) of strain H52.

表 4 菌株 H52 的生理生化特征

Table 4 Physiological and biochemical characteristics of strain H52

Item	Result
Nitrate broth medium	+
Starch	+
Simmons citrate agar	–
Voges-Proskauer test	–
Glucose	+
Mannitol	–
Lysozyme broth medium	–
Motility test medium	–
Gelatin	–
3% Catalase	+

+: Positive; –: Negative.

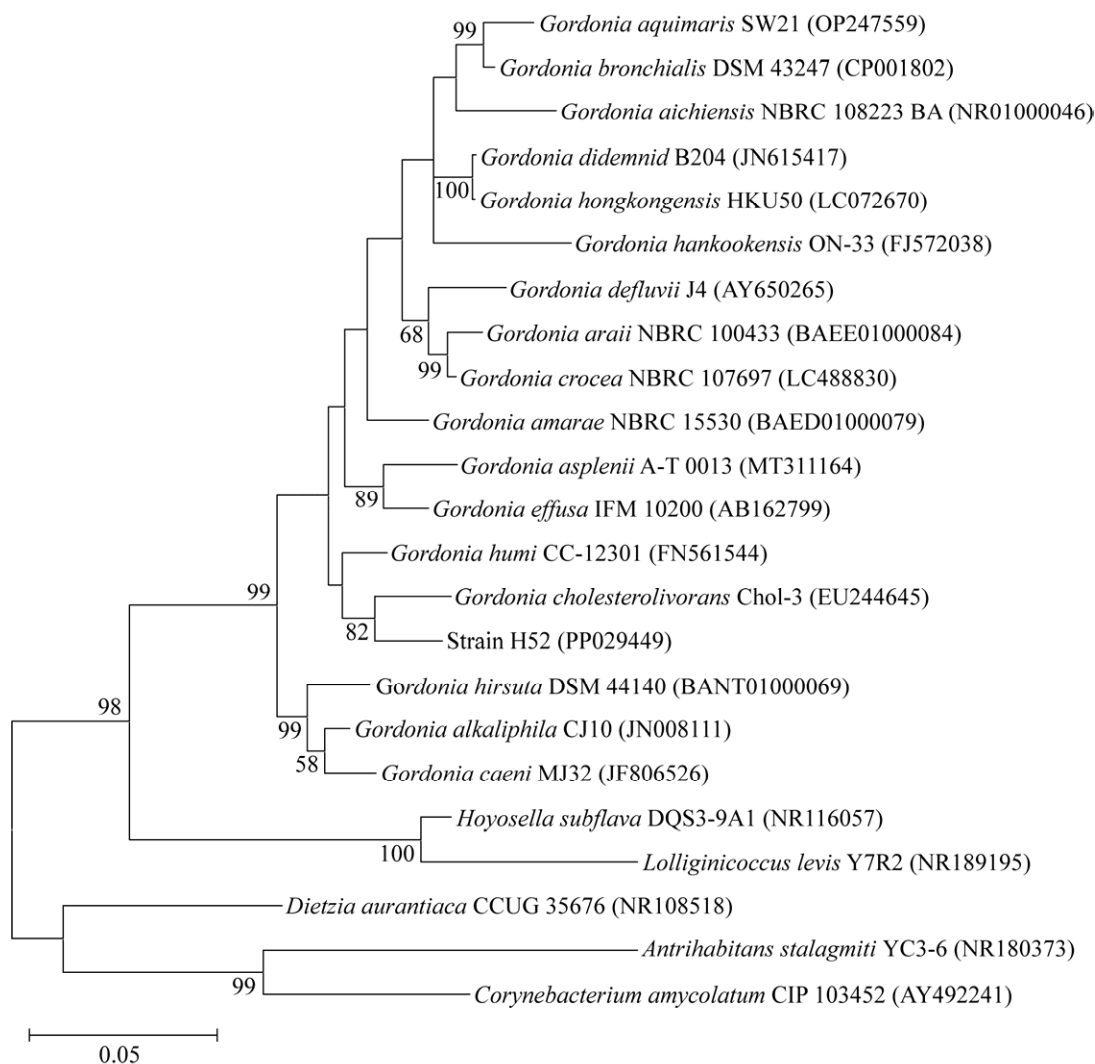


图 2 菌株 H52 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树 括号中为参与比对的序列 GenBank 登录号；分支处标注的数值为自展值；标尺长度 0.05 为核苷酸置换率

Figure 2 Phylogenetic tree of strain H52 based on 16S rRNA gene sequence. GenBank accession numbers of aligned sequences are shown in the brackets. The bootstrap values are shown at the node. Bar 0.005 means the nucleotide substitution rate of 0.005.

物进行测定，根据色谱端的保留时间(retention time, RT)和质谱端获得的离子碎片与数据库列出的标准化合物的相似性进行比对，并以接种 H52 和加入左炔诺孕酮的两个对照组对假阳性中间产物进行排除筛选，在菌株 H52 降解条件下共获得了 5 种左炔诺孕酮降解中间产物(图 5)。其中，TP2、TP3、TP4、TP5 和 TP7 的质荷比为

分别为 293.191 43、315.232 9、297.224 37、299.238 2 和 311.201 3，结构分别为 $C_{21}H_{24}O$ 、 $C_{21}H_{30}O_2$ 、 $C_{21}H_{28}O$ 、 $C_{21}H_{30}O$ 和 $C_{21}H_{26}O_2$ ，相应的保留时间分别为 11.700 6、13.159 7、13.157 7、11.867 2 和 11.699 9 min。通过结构分析推测产物的母核结构相对完整，表明菌株 H52 仅能在侧链上降解左炔诺孕酮。

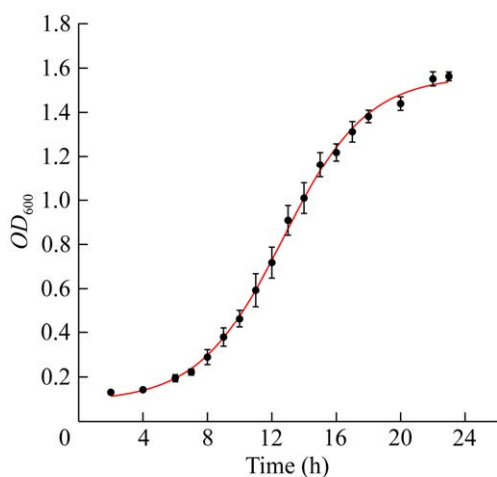


图3 *Gordonia* sp. H52 在 MH 肉汤培养基中的生长曲线

Figure 3 Growth curve of *Gordonia* sp. H52 in Mueller-Hinton Broth medium.

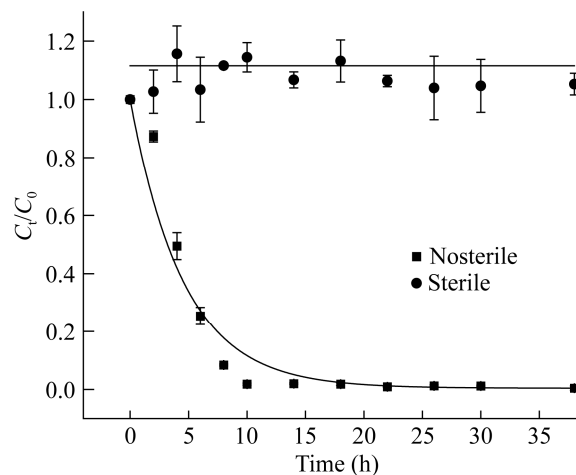
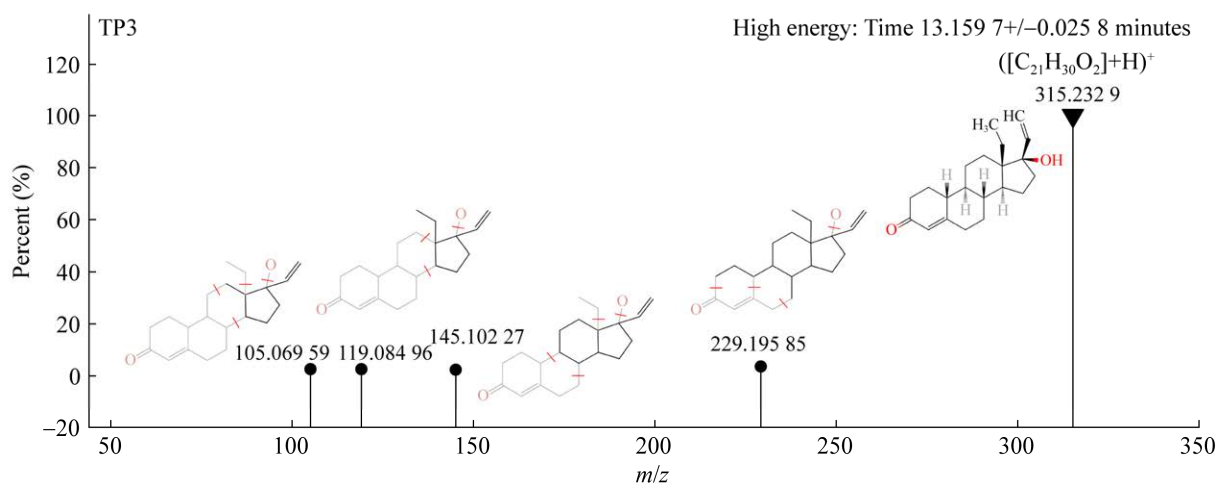
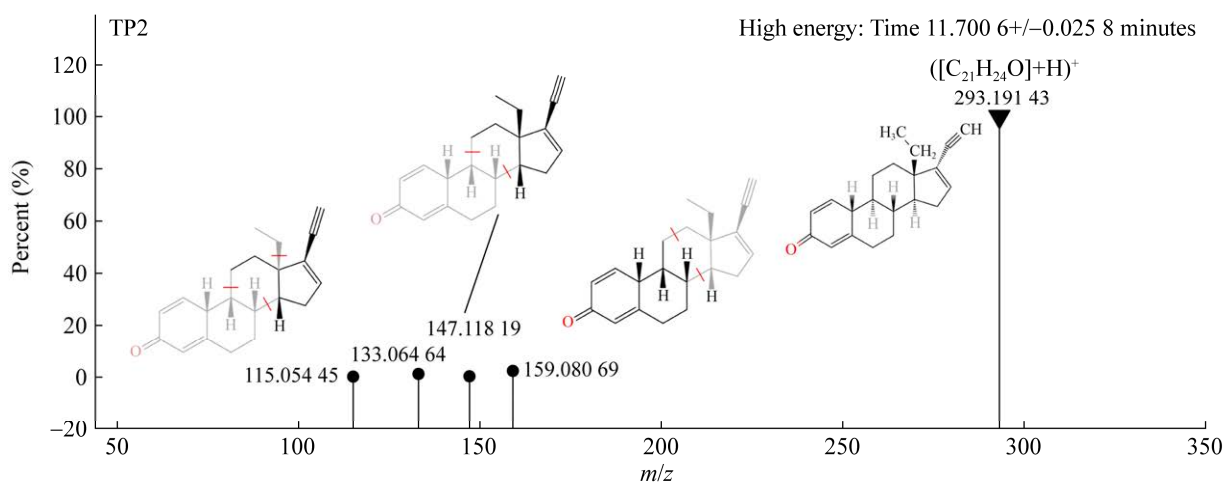


图4 *Gordonia* sp. H52 对左炔诺孕酮的降解动力学曲线

Figure 4 Degradation kinetics curve of levonorgestrel by *Gordonia* sp. H52.



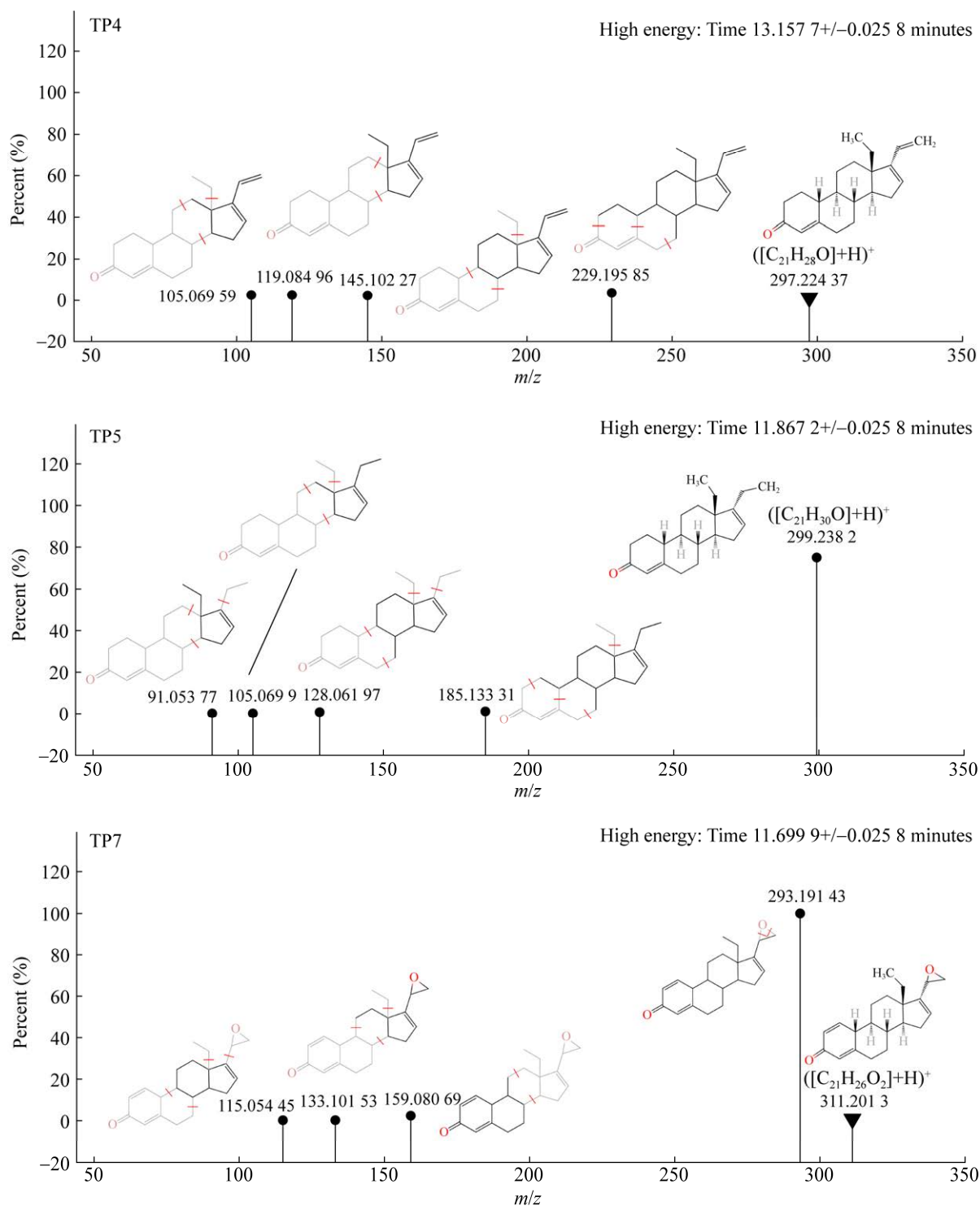


图5 *Gordonia* sp. H52 降解左炔诺孕酮的主要产物质谱图 三角形标记代表产物；圆形标记代表该产物的离子碎片

Figure 5 Mass spectrum of the key intermediates of levonorgestrel degraded by *Gordonia* sp. H52. Triangle markers represent products. Circular markers represent ions fragments of the products.

2.4 菌株 H52 降解左炔诺孕酮的潜在基因

将 *Gordonia* sp. H52 全基因组序列提交至 GenBank 数据库, 登录号为 PRJNA1101669。进一步利用 BLAST+软件对 *Gordonia* sp. H52 的基因组与本地信息库比对, 共找到 59 个与左炔诺孕酮降解相关的基因, 相关功能基因结果如表 5 所示: 参与 9-10 seco 途径的关键酶中, 找到了 12 条相关序列信息。其中, 3-酮甾体-9- α 单加氧酶加氧酶亚基 3 个、3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶 9 个。3-酮甾体-9- α 单加氧酶加氧酶亚基通过 A 环的 C1(2)发生脱氢作用, 而 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶则是使 B 环 C9 发生羟基化作用, 从而产生不稳定结构, 由于过高的分子势能自发地引发 B 环 C9(10)开环裂解^[21]。

参与 4-5-seco 途径降解 17 β -雌二醇的关键酶找到 69 条相关序列信息, 其中, 短链脱氢酶 51 个、黄素结合单加氧酶 14 个、2,3-二羟基联苯-1,2-双加氧酶 3 个、儿茶酚-1,2-双加氧酶 1 个。短链脱氢酶使 D 环的羟基位脱氢, 黄素结合单加氧酶使 A 环 C9 发生羟基化作用, 而 2,3-二羟基联苯-1,2-双加氧酶使得 A 环 C9 再次发生羟基化作用, 从而产生不稳定结构, 引发 A 环 C4(5)开环裂解^[22]。

2.5 *Gordonia* sp. H52 降解左炔诺孕酮途径的推测

结合中间产物和基因组分析结果推测

Gordonia sp. H52 降解左炔诺孕酮的途径。如图 6 所示, 在多种酶的催化作用下, 左炔诺孕酮主要通过脱氢、加氧、脱水、侧链加氢等反应进行降解。其中, 途径 I: 左炔诺孕酮先通过 3-氧代类固醇-1-脱氢酶(*kstD*)的作用先转化为 TP1, 再经过 4,5-9,10-二烯-3-羟基-5,9,17-三氧雄甾-1(10), 2-二烯-4-酸水解酶(*hasD*)脱去一个水转化为 TP2。途径 II: 左炔诺孕酮通过 3-酮甾体-9- α -羟化酶还原酶(*kshB*)的作用形成 TP3, 进而通过脱去一分子水转化为 TP4, 通过还原酶(*kshB*)的作用转化为 TP5。途径 III: 与途径 II 相同的产物 TP4 也可能通过黄素结合单加氧酶(*at1g12200*)形成 TP6, 然后通过 3-氧代类固醇-1-脱氢酶(*kstD*)的作用先转化为 TP7。由于 TP1 和 TP6 在 UPLC-QTOF-MS 分析条件下, 未能检测到相关的特征离子碎片, 推测这两种物质可能由于结构的不稳定性, 在经历短暂的过渡阶段后生成下游产物。

除了上述提到菌株 H52 特有的 4 种基因在降解代谢中起到关键作用外, 菌株 H52 还具有较完整的降解基因簇(表 5), 当参与合成孕激素降解时, 菌株 H52 可提供丰富的基因, 填补降解通路的空缺, 增强代谢。

综合以上分析, 推测 *Gordonia* sp. H52 通过在左炔诺孕酮不同碳位上进行氧化, 经过一系列反应, 最后经由氧化还原途径完成降解。

表 5 *Gordonia* sp. H52 中潜在类固醇激素降解基因

Table 5 Steroid hormone degradation genes present in *Gordonia* sp. H52

Enzyme name	Gene acronym	Gene ID	Query cover (%)	Identity (%)
3-oxosteroid- Δ^1 -dehydrogenase	<i>kstD</i>	888422	99	62.734
3-ketosteroid-9- α -monooxygenase oxygenase subunit	<i>kshA</i>	888268	98	59.211
3-ketosteroid-9- α -hydroxylase reductase subunit	<i>kshB</i>	887315	95	51.744
4,5-9,10-diseco-3-hydroxy-5,9,17-trioxoandrosta-1(10),2-diene-4-oate hydrolase	<i>hasD</i>	887378	99	31.818
Short chain dehydrogenase	<i>hsd17b14</i>	57576279	80	32.068
Flavin-binding monooxygenase	<i>at1g12200</i>	57579121	97	33.846
2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase	<i>hsaC</i>	57575651	94	37.966
4-hydroxy-2-oxohexanoate aldolase	<i>hsaF</i>	888387	96	48.943

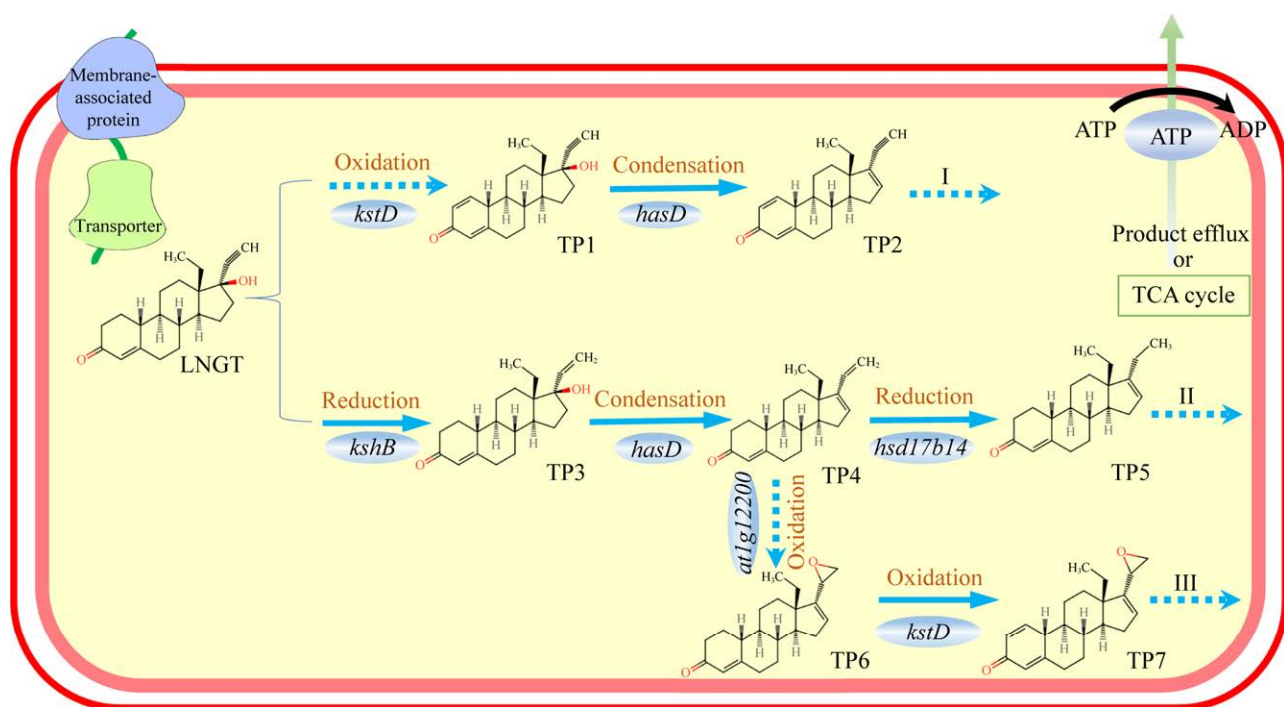


图 6 *Gordonia* sp. H52 对左炔诺孕酮降解途径的推测 单箭头表示一步反应，箭头上为降解反应类型，箭头下方为负责该反应的基因缩写。实线箭头表示检测到产物，虚线箭头表示未检测到产物

Figure 6 Prediction of the degradation pathway of levonorgestrel by *Gordonia* sp. H52. Single arrows indicate one-step reactions, with the degradation reaction type above the arrow and gene abbreviations involved in the degradation pathway below the arrow. Solid arrows represent products are detected, while dashed arrows represent products are undetected.

2.6 菌株 H52 对环境水体中合成孕激素的强化去除效果

为了验证菌株 H52 的实际应用潜力，将该菌株投加到环境水体中测定其对左炔诺孕酮、孕二烯酮和醋酸炔诺酮 3 种合成孕激素的强化去除作用。结果如图 7 所示，菌株 H52 的添加显著提高了水体中 3 种合成孕激素的去除率。其中，醋酸炔诺酮在 6 h 内的降解率达到 100%，而左炔诺孕酮和孕二烯酮在 30 h 内降解率分别达到了 91.06% 和 88.87%。在一致的条件和时间下，未添加菌株 H52 的环境水体中醋酸炔诺酮的去除率仅为 37%，而左炔诺孕酮和孕二烯酮的浓度无显著的变化，降解率都接近 0。这些

结果表明，菌株 H52 的加入能显著强化水体中合成孕激素的去除。

3 讨论

随着全球对新污染物治理的重视，有关孕激素这类典型内分泌干扰物的污染问题也逐渐引起了研究者的关注。本研究从养殖废水中分离到一株左炔诺孕酮高效降解菌株 H52，该菌株具有较好的合成孕激素降解能力。

已有的研究表明，*Gordonia* 菌属具有较强的生物降解能力，能够高效降解环境中的异生素和几乎不可降解的天然聚合物及胆固醇等^[23-24]，被广泛应用于废水处理工艺中。大部分 *Gordonia*

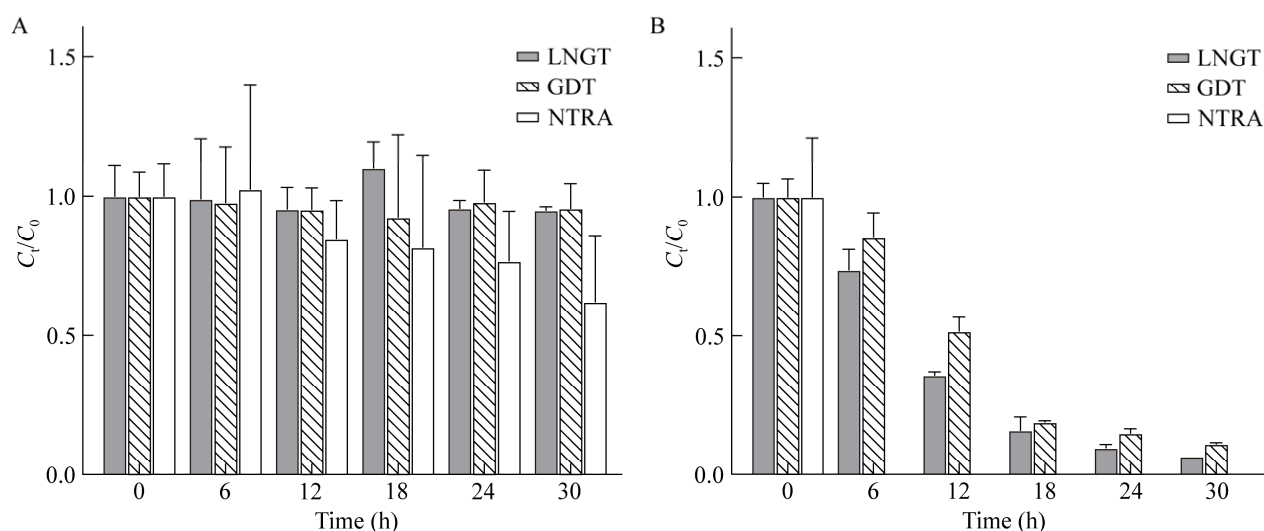


图7 环境水中 *Gordonia* sp. H52 对不同的合成孕激素的降解情况 A: 对照组只加入合成孕激素未加 *Gordonia* sp. H52. B: 实验组同时加入合成孕激素与 *Gordonia* sp. H52. LNGT: 左炔诺孕酮; GDT: 孕二烯酮; NTRA: 醋酸炔诺酮

Figure 7 Degradation of different synthetic progestins by *Gordonia* sp. H52 in environmental water. A: The control group with only synthetic progestins and without *Gordonia* sp. H52. B: The experimental group with synthetic progestins and the *Gordonia* sp. H52. LNGT: Levonorgestrel; GDT: Gestodene; NTRA: Norethindrone acetate.

菌属基因组中基本存在类固醇降解基因^[25]。*Gordonia neofelifaecis* NRRL B-59395^[23-24]和 *Gordonia cholesterolivorans*^[26-27]是 2 种典型的类固醇降解菌, 其基因组中均存在多种与类固醇激素降解相关的基因。*Gordonia* sp. H52 的全基因组中也有不少类固醇激素降解基因, 其中, Hsa 家族蛋白基因簇相对较为完整, 该酶可以通过催化羰基发生水解反应从而实现进一步降解。然而, 通过产物分析发现, 左炔诺孕酮的降解反应并未从 A 环中的羰基进行降解, 而是从 D 环上的炔基进行降解, 这是以往关于类固醇激素降解的文献中未曾报道的^[17,28]。

尽管 *Gordonia* sp. H52 无法以左炔诺孕酮为唯一碳源, 但可以高效地降解左炔诺孕酮。与活性污泥^[17]和微藻^[28]降解左炔诺孕酮的速率相比, *Gordonia* sp. H52 的降解速率远远高于二

者。同时, *Gordonia* sp. H52 能够强化环境水中孕二烯酮、醋酸炔诺酮和左炔诺孕酮的去除, 说明其对合成孕激素的降解具有底物普适性, 能够对多种合成孕激素进行高效地降解。且在环境水中明显地加速了 3 种合成孕激素的降解能力, 说明其在低碳氮比的环境水中适应能力较强, 在实际环境中有一定的应用潜力。

产物分析表明, 左炔诺孕酮的产物涉及的反应有加氢、加氧、脱水、侧链脱氢, 但降解产物中并未涉及母核的开环, 后期研究中, 值得基于菌株 H52 进行微生物组的构建, 利用微生物间的相互作用实现左炔诺孕酮母核的开环并资源化利用或者完全矿化。

上述结果表明, *Gordonia* sp. H52 具有高效的左炔诺孕酮降解功能, 为解决合成孕激素污染问题提供了宝贵的菌种资源和理论指导。为

了更好地利用菌株 H52 强化污水处理系统的合成孕激素处理能力, 需要进一步研究探索该菌株在污水处理系统中的定殖能力及功能活性特点, 分析其实际应用前景。

4 结论

本研究从养殖废水中分离获得左炔诺孕酮降解菌 H52, 经过形态特征观察、生理生化表征和 16S rRNA 基因序列比对鉴定, 初步确定其归属为 *Gordonia*。该菌株可在 18 h 完全降解 0.5 mg/L 左炔诺孕酮。结合降解产物及基因组分析, 推测菌株 H52 利用脱氢酶、加氧酶和水解酶通过脱氢、脱羟基、环氧化等反应降解左炔诺孕酮。此外, 该菌株还可以同时高效去除环境水体中左炔诺孕酮、孕二烯酮和醋酸炔诺酮这 3 种合成孕激素, 表现出较好的应用前景。

REFERENCES

- [1] BERGMAN Å, HEINDEL J, JOBLING S, KIDD K, ZOELLER RT. State-of-the-science of endocrine disrupting chemicals, 2012[J]. *Toxicology Letters*, 2012, 211: S3.
- [2] CASEY FXM, SELBIE D, HAKK H, RICHARDS KG. Leaching of free and conjugate natural estrogens in soil monoliths[J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2019, 230(2): 49.
- [3] KUHL H, WIEGRATZ I. Can 19-nortestosterone derivatives be aromatized in the liver of adult humans? Are there clinical implications?[J]. *Climacteric*, 2007, 10(4): 344-353.
- [4] MUECK AO, SITRUK-WARE R. Nomegestrol acetate, a novel progestogen for oral contraception[J]. *Steroids*, 2011, 76(6): 531-539.
- [5] LIU S, YING GG, ZHAO JL, CHEN F, YANG B, ZHOU LJ, LAI HJ. Trace analysis of 28 steroids in surface water, wastewater and sludge samples by rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218(10): 1367-1378.
- [6] VIGLINO L, PRÉVOST M, SAUVÉ S. High throughput analysis of solid-bound endocrine disruptors by LD-APCI-MS/MS[J]. *Journal of Environmental Monitoring: JEM*, 2011, 13(3): 583-590.
- [7] LIU SS, YING GG, LIU YS, YANG YY, HE LY, CHEN J, LIU WR, ZHAO JL. Occurrence and removal of progestagens in two representative swine farms: effectiveness of lagoon and digester treatment[J]. *Water Research*, 2015, 77: 146-154.
- [8] RUNNALLS TJ, BERESFORD N, LOSTY E, SCOTT AP, SUMPTER JP. Several synthetic progestins with different potencies adversely affect reproduction of fish[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(4): 2077-2084.
- [9] PAULO P, RUNNALLS TJ, NALLANI G, La POINT T, SCOTT AP, SUMPTER JP, HUGGETT DB. Reproductive responses in fathead minnow and Japanese medaka following exposure to a synthetic progestin, Norethindrone[J]. *Aquatic Toxicology*, 2010, 99(2): 256-262.
- [10] ZEILINGER J, STEGER-HARTMANN T, MASER E, GOLLER S, VONK R, LÄNGE R. Effects of synthetic gestagens on fish reproduction[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2009, 28(12): 2663-2670.
- [11] WATANABE A, MYOSHO T, ISHIBASHI A, YAMAMOTO J, TODA M, ONISHI Y, KOBAYASHI T. Levonorgestrel causes feminization and dose-dependent masculinization in medaka fish (*Oryzias latipes*): endocrine-disruption activity and its correlation with sex reversal[J]. *The Science of the Total Environment*, 2023, 876: 162740.
- [12] SVENSSON J, FICK J, BRANDT I, BRUNSTRÖM B. Environmental concentrations of an androgenic progestin disrupts the seasonal breeding cycle in male three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2014, 147: 84-91.
- [13] MYLLYMÄKI S, HAAVISTO T, VAINIO M, TOPPARI J, PARANKO J. *In vitro* effects of diethylstilbestrol, genistein, 4-tert-butylphenol, and 4-tert-octylphenol on steroidogenic activity of isolated immature rat ovarian follicles[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, 204(1): 69-80.
- [14] HOFFMANN F, KLOAS W. The synthetic progestogen, Levonorgestrel, but not natural progesterone, affects male mate calling behavior of *Xenopus laevis*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2012, 176(3): 385-390.
- [15] CARDOSO PG, RESENDE-DE-OLIVEIRA R, ROCHA E. Combined effects of increased temperature and levonorgestrel exposure on zebrafish female liver,

- using stereology and immunohistochemistry against catalase, CYP1A, HSP90 and vitellogenin[J]. *Environmental Pollution*, 2019, 252(Pt B): 1059-1067.
- [16] KVARNRYD M, GRABIC R, BRANDT I, BERG C. Early life progestin exposure causes arrested oocyte development, oviductal agenesis and sterility in adult *Xenopus tropicalis* frogs[J]. *Aquatic Toxicology*, 2011, 103(1/2): 18-24.
- [17] LIU S, YING GG, LIU YS, PENG FQ, HE LY. Degradation of norgestrel by bacteria from activated sludge: comparison to progesterone[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(18): 10266-10276.
- [18] ZHANG NJ, GONG FX, YING GG, WANG AG, DONG MJ, LIU YS, DENG TC, XU MY. Innovative bioremediation of dexamethasone in aquatic ecosystems using *Rhodococcus* sp. D32: Pathway discovery and reduction of ecotoxicity[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2024, 444: 141319.
- [19] Buchanan RE, Gibbons NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所, 译. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
- Buchanan RE, Gibbons NE. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*[M]. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, trans. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese).
- [20] 田小芳. 竹柏内生菌的分离筛选及 DYSL5、LR5 16S rDNA 的扩增[J]. *热带农业工程*, 2019, 43(4): 31-37.
- TIAN XF. The isolate selection of *Podocarpus nagi* endophytes and amplification of DYSL5 and LR5 16S rDNA[J]. *Topical Agricultural Engineering*, 2019, 43(4): 31-37 (in Chinese).
- [21] CHIANG YR, WEI STS, WANG PH, WU PH, YU CP. Microbial degradation of steroid sex hormones: implications for environmental and ecological studies[J]. *Microbial Biotechnology*, 2020, 13(4): 926-949.
- [22] TIAN KJ, MENG Q, LI SG, CHANG MH, MENG FX, YU Y, LI H, QIU Q, SHAO JH, HUO HL. Mechanism of 17 β -estradiol degradation by *Rhodococcus equi* via the 4,5-seco pathway and its key genes[J]. *Environmental Pollution*, 2022, 312: 120021.
- [23] GE FL, LI W, CHEN GY, LIU YC, ZHANG GX, YONG B, WANG Q, WANG N, HUANG ZM, LI WT, WANG J, WU C, XIE Q, LIU G. Draft genome sequence of *Gordonia neofelifaecis* NRRL B-59395, a cholesterol-degrading actinomycete[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(18): 5045-5046.
- [24] LIU YC, CHEN GY, GE FL, LI W, ZENG LH, CAO WG. Efficient biotransformation of cholesterol to androsta-1,4-diene-3,17-dione by a newly isolated actinomycete *Gordonia neofelifaecis*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 27(4): 759-765.
- [25] LIU N, MASER E, ZHANG TD. Genomic analysis of *Gordonia polyisoprenivorans* strain R9, a highly effective 17 beta-estradiol- and steroid-degrading bacterium[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2021, 350: 109685.
- [26] DRZYZGA O, LLORENS JN, de LAS HERAS LF, FERNÁNDEZ EG, PERERA J. *Gordonia cholesterolivorans* sp. nov., a cholesterol-degrading actinomycete isolated from sewage sludge[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(Pt 5): 1011-1015.
- [27] DRZYZGA O, de LAS HERAS LF, MORALES V, NAVARRO LLORENS JM, PERERA J. Cholesterol degradation by *Gordonia cholesterolivorans*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(14): 4802-4810.
- [28] PENG FQ, YING GG, YANG B, LIU S, LAI HJ, LIU YS, CHEN ZF, ZHOU GJ. Biotransformation of progesterone and norgestrel by two freshwater microalgae (*Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*): transformation kinetics and products identification[J]. *Chemosphere*, 2014, 95: 581-588.